

Untersuchungen zur Translokation und Funktion von Tandem-Poren Kaliumkanälen der TPK-Familie aus *Arabidopsis thaliana*

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Marcel Dunkel

aus Schweinfurt

Würzburg 2008

Eingereicht am: 10.November 2008

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Tag des Promotionskolloquiums: 13. März 2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Funktionsprinzip von Kaliumkanälen	1
1.2 Kaliumkanalformen	4
1.3 Kaliumkanäle in Pflanzen	4
1.4 Die Tandem-Poren Kaliumkanäle von <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.5 Translokation von Membranproteinen	11
1.6 Entstehung und Funktion der pflanzliche Vakuole	14
1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Die <i>AtTPK/KCO</i> -Gene und cDNA-Ausgangsvektoren	17
2.1.1 Konventionen	17
2.1.2 Die <i>AtTPK/KCO</i> -Familie	17
2.1.3 Ausgangsvektoren	17
2.2 Verwendete Antibiotika	18
2.3 DNA-Rekombination und Mutagenese	18
2.3.1 Transformation, Selektion und Kultur von <i>Escherichia coli</i>	18
2.3.2 Plasmidisolation aus <i>E.coli</i>	19
2.3.2.1 DNA Minipräparation	19
2.3.2.2 DNA Midipräparation	19
2.3.3 Restriktion	20
2.3.4 Ligation	21
2.3.4.1 TOPO-Ligation	21
2.3.4.2 T4-DNA Ligase-Ligation	21
2.3.4.3 Gateway-Rekombination	22
2.3.5 PCR-Reaktionen	22
2.3.5.1 Primerdesign	22
2.3.5.2 DNA-Polymerasen	23
2.3.5.3 Die Standard-PCR-Reaktion	23
2.3.5.4 gerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese	24
2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese	25
2.3.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	25
2.3.8 DNA-Konzentrationsbestimmung	26

2.3.9 Klonierungsstrategien	26
2.3.9.1 Klonierung der TPK1/TPK4 Chimären und halben Kanäle.	26
2.3.9.2 Klonierung der TPK1/TPK3-Deletionsmutanten	27
2.3.9.3 Klonierungen der TPK4 Punktmutanten und Deletionen	27
2.3.9.4 Klonierung der Einzeltransmembran-Konstrukte	27
2.3.9.5 Klonierung der TPK4/TPKx Porechimären	28
2.3.9.6 Klonierung der <i>TPK</i> cDNA in den Pflanzenexpressionsvektor pMDC32	28
2.3.9.7 Klonierung der BiFC-Konstrukte	29
2.3.10 Sequenzierung	29
2.3.11 Kryokonservierung	30
2.4 Proteinanalytik	30
2.4.1 Proteinextraktion aus Tabak	30
2.4.2 Diskontinuierliche, denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.4.3 Western Blot	32
2.4.4 Dot Blot	33
2.5 Pflanzentransformation mittels „Particle Bombardment“	33
2.5.1 Probenvorbereitung	33
2.5.2 Beschuss von Pflanzenzellen	34
2.6 Fluoreszenzmikroskopie	34
2.6.1 Fluoreszierende Proteine	34
2.6.2 Bi-molekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	35
2.6.3 Theorie und technischer Hintergrund zum konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	37
2.6.4 Mikroskopie und Bildakquisition	37
2.7 Agrobakterien-vermittelte Transformation von Tabak	38
2.7.1 Herstellung kompetenter Agrobakterien	38
2.7.2 Agrobakterientransformation	39
2.7.3 Transiente Transformation von Tabak	39
2.7.4 Herstellung stabil transformierter Tabakpflanzen	40
2.8 <i>In vitro</i> Transkription	41
2.9 Präparation der Oozyten und Injektion der cRNA in Oozyten	42
2.10 Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (DEVC) an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	43
2.10.1 Biophysikalische Theorie zur DEVC-Technik	44

2.10.2 Konventionen	46
2.10.3 Messung der Ganzzellströme	46
2.10.4 Bestimmung der Umkehrspannungen und der relativen Permeabilitäten	47
2.10.5 Meßaufbau	48
2.10.6 Elektroden	49
2.10.7 Messungen mit der protonenselektiven Mikroelektrode	50
2.10.8 Mess-Lösungen	51
2.11 Marker des sekretorischen Apparats	52
2.12 Modellierung des TPK-Kanalstruktur	52
2.13 Phylogenetische Analyse	53
3. Ergebnisse	55
3.1 Phylogenie der Doppel-Poren Kaliumkanäle	55
3.2 Die Translokation der vakuolären TPKs erfolgt auf Golgi-abhängige Weise	59
3.3 14-3-3 Bindung spielt keine Rolle für die Translokation von TPK1	60
3.4 Der Domänen austausch zwischen TPK1 und TPK4 bewirkt eine veränderte Translokation	61
3.5 Der Carboxy-terminus von TPK1 ist notwendig für ER- und Golgi-Export	63
3.7 Die Oberflächenexpression von TPK4 wird im heterologen und homologen System sehr niedrig gehalten	71
3.9 Ein „domain-swapping“ Ansatz zur elektrophysiologischen Charakterisierung der TPK-Kanäle	73
3.10 Mutationen im TPK4 Selektivitätsfilter	79
3.11 Die schwache Gleichrichtung von TPK4 wird durch ein Aspartat in der zweiten Transmembrane vermittelt	81
3.12 Intrazelluläre Ansäuerung führt zur Inaktivierung von TPK4	85
3.13 Die TPK-Kanäle interagieren in einem BiFC-Test	87
3.14 Vorbereitungen zu weitergehenden elektrophysiologischen und strukturellen Untersuchungen der TPK/KCO-Kanäle <i>in planta</i>	90
4. Diskussion.....	93
4.1 Translokation der Tandemporen-Kaliumkanäle ≈ Tonoplast intrinsischen Kaliumkanäle	93
4.1.1 14-3-3 Bindung aktiviert TPK1, aber nicht über die Translokation	93
4.1.2 Golgi-abhängige Translokation des TPK1	94
4.1.3 Die Rolle des CT für die Sortierung des TPK1	94

4.1.4 Funktion des di-azidischen Motivs in TPK1	95
4.1.5 Dimerisierung: Voraussetzung für ER-Export?	95
4.1.6 Wie funktioniert der Golgi-Export der TPK Kanäle?	96
4.1.7 Die Rolle der Transmembranen für die Lokalisation	97
4.2 Regulation und Funktion der TPK-Kanäle	97
4.2.1 TPKs: vakuoläre, Ca ²⁺ und 14-3-3 regulierte Kaliumkanäle	97
4.2.2 Homomere oder Heteromere?	98
4.2.3 Mechanismus und Funktion der Einwärtsgleichrichtung des TPK4	99
4.2.4 Die pH-Abhängigkeit des TPK4	101
5. Zusammenfassung.....	104
6. Summary.....	106
7. Anhang.....	108
7.1 Eidesstattliche Erklärung	108
7.2 Danksagung	109
7.3 Lebenslauf	110
7.4 Publikationen	111
7.5 Poster	111
7.6 Vorträge	111
7.7 Synthetische Oligonukleotide	112
7.8 Chemikalienliste	113
7.8 Ausgangsvektoren	116
7.9 putative Doppelporen-Kaliumkanäle	118
7.10 Proteinsequenzalignment der TPK/KCO-Kanäle	120
8. Referenzen	122

1. Einleitung

Kalium ist für Tiere wie für Pflanzen ein essentieller Makronährstoff. Mit einem Anteil von bis zu 8% am Trockengewicht einer Pflanze ist Kalium das wichtigste ionische Osmotikum und fungiert darüber hinaus als Co-faktor verschiedener Enzyme (Evans und Sorger, 1966). Die Funktion als wichtigstes ionisches Osmotikum impliziert die Beteiligung von Kalium an wichtigen physiologischen Prozessen wie der Turgorregulation (Dolan und Davies, 2004), der kurzzeitigen Stabilisierung des Membranpotentials (Cheeseman und Hanson, 1979) oder Schließzellen- und Blattbewegungen (Moshelion und Moran, 2000, Dietrich *et al.*, 2001, Moran, 2007). Der größte Speicher für Kalium in der Pflanzenzelle ist die Vakuole (125-232 mM (Fricke *et al.*, 1994, Walker *et al.*, 1996)). Dort, erfüllt Kalium eine rein biophysikalische Funktion (Walker *et al.*, 1996). Dieses Kalium sowie das extrazelluläres Kalium dient der Pflanze dazu, die Kaliumkonzentration im Zytosol konstant zu halten (80-100 mM). Denn während Kalium in der Vakuole durch andere Osmotika ersetzt werden kann (Leigh und Jones, 1984), können andere verfügbare Ionen es für enzymatische Prozesse im Zytosol kaum ersetzen. Somit ist die Kaliumhomöostase entscheidend für viele zelluläre Prozesse. Kaliumhomöostase setzt voraus, dass die Pflanze den Kaliumfluss zwischen Vakuole-Zytosol-Apoplast und entlang des chemischen Potentialgradienten von Kalium steuern kann. Eine Barrierefunktion übernehmen die Biomembranen, die sich aus einer Lipiddoppelschicht aufbauen und deswegen praktisch impermeabel für geladene Moleküle sind. Man nennt die Membran zwischen Vakuole und Zytosol Vakuolenmembran oder Tonoplast und die äußere Zellmembran Plasmamembran oder auch Plasmalemma. Andererseits impliziert Kaliumregulation, dass die Pflanze den Kaliumaustausch zwischen den Kompartimenten zulässt und auch Kalium energieabhängig, entgegen des elektrochemischen Potentials zwischen den Kompartimenten verschieben kann. Während der passive Kaliumfluß durch Ionenkanäle ermöglicht wird (Lebaudy *et al.*, 2007), kann die Kaliumaufnahme oder -abgabe entgegen des elektrochemischen Gradienten über Kaliumtransporter erfolgen, die durch den Co-Transport eines Protons oder anderer Ionen (sekundär aktiver Transport) energetisiert werden (Rigas *et al.*, 2001, Ashley *et al.*, 2006, Grabov, 2007).

1.1 Funktionsprinzip von Kaliumkanälen

Die membranintegralen Proteine, die eine hydrophile Pore in der Membran bilden, nennt man Ionenkanäle. Normalerweise sind diese Ionenkanäle speziell dafür konstruiert die Permeation von Kationen oder Anionen zu erleichtern. Manche aber diskriminieren nicht nur zwischen

1. Einleitung

der Ladung der Ionen, sondern auch nach deren Größe. Wenn die Permeabilität eines Kanals für Kalium wesentlich höher ist als für andere Ionen spricht man von einem Kaliumkanal. Wie aber funktioniert die Kaliumpermeation und was macht einen Kanal kaliumselektiv? Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Prozesse die in einem Kaliumkanal stattfinden, lieferten Arbeiten zur Aufklärung der dreidimensionalen Kanalstruktur. Das erste Strukturmodell eines Kaliumkanals wurde durch Röntgen-kristallographische Untersuchungen am KscA von *Streptomyces lividans* abgeleitet (Doyle et al 1998). Dieser bakterielle Prototyp eines Kaliumkanals besteht aus zwei transmembranen Domänen und einer Porenregion. In der Folgezeit wurden auch die dreidimensionalen Strukturen anderer Kalium-Kanaltypen wie der Ca^{2+} - (MthK; Jiang *et al.*, (2002)), der spannungsabhängigen (KvAP, Jiang *et al.*, (2003)) und der einwärtsgerichteten Kanäle (KirBac, Kuo *et al.*, (2003)) erschlossen. Die unterschiedlichen Schaltmechanismen dieser Kaliumkanäle gründen sich auf Konformationsänderungen transmembraner Domänen, die für eine Kanalklasse spezifisch sind (Gulbis und Doyle, 2004). Im Gegensatz dazu ist die Architektur der Porenregion bei allen Kaliumkanälen sehr ähnlich. Die Porenregion bildet den äußeren Teil der eigentlichen Pore und besteht aus einer exponierten, ungeordneten Region, der α -helikalen Porenhelix und dem Selektivitätsfilter (Doyle *et al.*, 1998). Dieser Bereich enthält bei fast allen Kaliumkanälen die Signatursequenz TXXTXGYG (Heginbotham *et al.*, 1994). Der innere Teil der Pore ist eine wasser- und ionenzugängliche Kavität, die von den Porenregionen C-terminal folgenden Transmembranen ausgekleidet wird (Abb. 1.1).

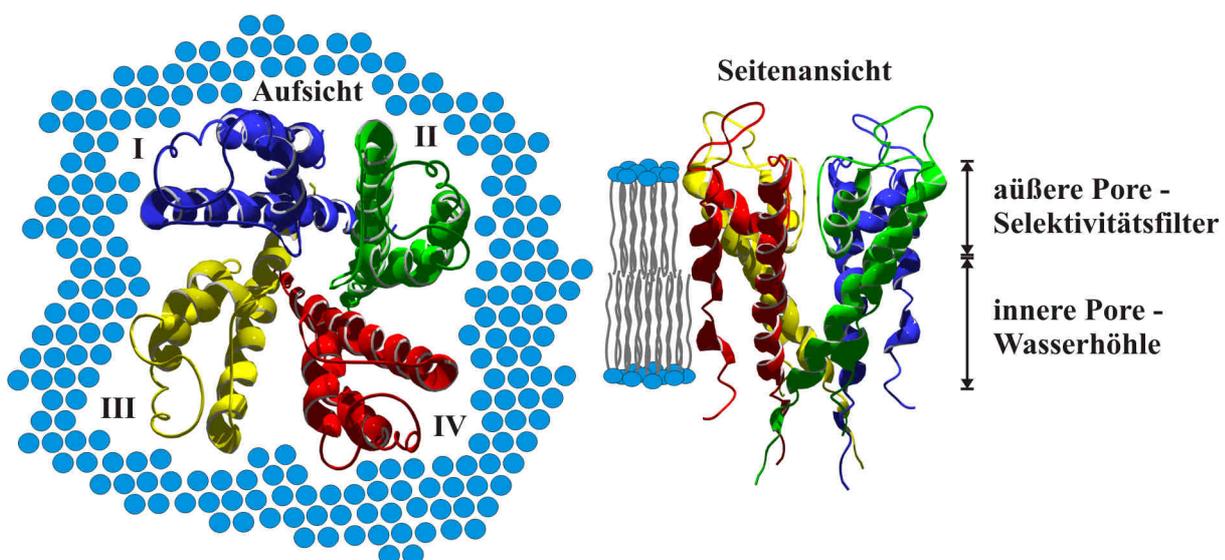
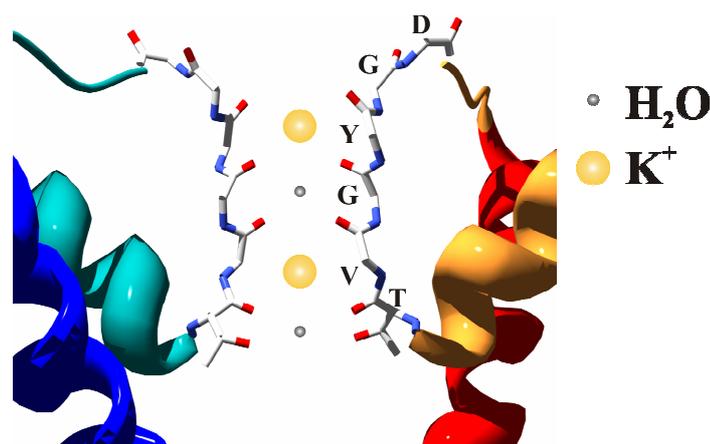


Abb. 1.1 Struktur und Membraninsertion des bakteriellen Kaliumkanals KcsA

Strukturmodell des geschlossenen KcsA (pdb entry 1bl8) in der Aufsicht und Seitenansicht. Die Membran ist dargestellt durch die Lipiddoppelschicht (blaue Kreise (Kopfgruppen), graue Linien (Kohlenwasserstoffketten)). Der Kanal setzt sich aus vier Untereinheiten (I, II, III, IV) mit je zwei Transmembranen α -Helices und einer Porendomäne zusammen (Doyle *et al.*, 1998).

Negative Ladungen an der zytoplasmatischen und der extrazellulären Eintrittsseite in den Kanal dienen wahrscheinlich der Konzentrierung von Kalium. Wenn Kalium von der zytoplasmatischen Seite eintritt, bleibt es innerhalb der wassergefüllten Aufweitung der Kanalpore hydratisiert und kann innerhalb dieser bereits etwa $2/3$ der Distanz des Kanals durchlaufen. Das Kaliumion wird dabei durch die mit ihrer negativen Partialladung in die Wasserhöhle orientierte Porenhelix stabilisiert. Beim Eintritt in den Flaschenhals des Kanals, der vom Selektivitätsfilter gebildet wird, wird das Kaliumion dehydratisiert und die Wassermoleküle durch den Sauerstoff von Carbonylgruppen ersetzt. Die Carbonylgruppen stammen von der Hauptkette der Sequenz TVGY und der Hydroxylgruppe des Threoninrests (Doyle *et al.*, 1998, Zhou *et al.*, 2001). Damit gibt es vier Kaliumbindestellen, wobei sich in der Pore nur zwei Kaliumionen in einem Abstand von 7.5 \AA aufhalten. Zwischen den beiden Kaliumionen befindet sich ein Wassermolekül, und ein weiteres Wassermolekül okkupiert die übrige Bindestelle (Abb. 1.2). Vermutlich bewirkt die gegenseitige Abstoßung der Kaliumionen, dass diese koordiniert von der $1'-3'$ - Konfiguration in die $2'-4'$ - Konfiguration übertreten und dann aus der Pore austreten. (Zhou und MacKinnon, 2003) Die durch diese Struktur erreichte Energieminimierung der Kaliumpermeation kann die hohen Durchsatzraten von Kalium von bis zu $10^8 \text{ K}^+/\text{s}$ erklären, was einem Kaliumdurchtritt durch die Membran entspricht, der fast so schnell von statten geht wie es bei freier Diffusion der Fall wäre.



1. Einleitung

Abb. 1.2 Strukturmodell des Kaliumselektivitätsfilters von TPK4

Das Modell entstand auf Basis der von Doyle et al. (1998) publizierten Kristallstruktur des KcsA (pdb entry code 1BL8). Der Übersichtlichkeit halber ist nur jeweils das erste Porenmotiv der beiden Untereinheiten dargestellt. Die Wassermoleküle und die Kaliumionen deuten eine Besetzung der vier Bindestellen in der 1'-3' Konfiguration an. Man erkennt, dass diese Bindestellen von den Carbonylresten der Tyrosin-Glycin-Valin-Threonin-Kette und dem Hydroxylrest des Threonins (alle in rot) gebildet werden.

Die Permeabilität eines anderen Ions als Kalium hängt sehr stark davon ab wie sehr es der Größe des Kaliumions im dehydratisierten Zustand ähnelt und somit in die Bindestellen des Selektivitätsfilters passt. So sind kaliumselektive Kanäle kaum durchlässig für das kleinere Natriumion (0.95 Å gegenüber 1.33 Å bei K⁺), aber im erheblichen Maß durchlässig für Rubidiumionen (1.48 Å) (Doyle *et al.*, 1998).

1.2 Kaliumkanalformen

Die einfachste, weil kleinste Form eines Kaliumkanals, mit zwei Transmembranen und einer Porendomäne (2TM-1P), findet sich im ganzen Organismenreich und sogar in einigen Viren wieder (Plugge *et al.*, 2000). In dieser ist wohl die Grundform für eine ganze Reihe von verschiedenen Kaliumkanaltypen zusehen. So gibt es spannungsabhängige Kanäle, bei denen die Grundform ergänzt wird durch vier weitere Transmembranen (Shaker-Kanäle, Kv-Kanäle 6TM-1P)); Kanäle, wie der Tok1p aus *Saccharomyces cerevisiae*, bei der die Grundform mit einer Shakeruntereinheit ergänzt wird (8TM-2P); tierische BK Kanäle mit sieben Transmembranen und einer Pore und häufig auch Doppel(Tandem)-Poren Kanäle, bei denen die Grundform dupliziert wurde (4TM-2P).

1.3 Kaliumkanäle in Pflanzen

Aktivitäten von pflanzlichen Ionenkanälen wurden bereits an der Plasmamembran, sowie an den Membranen verschiedener Kompartimente, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Klüsener *et al.*, 1995), der Vakuole (Hedrich und Neher, 1987), den Mitochondrien (Petrucci *et al.*, 2001) und Chloroplasten (Schönknecht *et al.*, 1988) aufgezeichnet. Unter den vielen verschiedenen Kanaltypen wurden Kaliumkanäle bisher nur der Plasma- (Hirsch *et al.*, 1998, Ache *et al.*, 2000) oder der Vakuolenmembran zugeordnet (Czempinski *et al.*, 2002, Schönknecht *et al.*, 2002, Voelker *et al.*, 2006, Gobert *et al.*, 2007, Latz *et al.*, 2007a). Die Kaliumkanäle der Plasmamembran von *A. thaliana* setzen sich fast ausschließlich aus Homo- und Heteromeren von neun verschiedenen Shaker-Kanaluntereinheiten zusammen (Dreyer *et al.*, 1997a, Dreyer *et al.*, 2004, Xicluna *et al.*, 2007) (Abb. 1.3). Dagegen scheint die Vakuolenmembran von vier Tandemporen Kanälen der TPK-Familie und des Ein-Poren Kanals KCO3 dominiert zu werden (Czempinski *et al.*, 2002, Schönknecht *et al.*, 2002, Voelker *et al.*, 2006, Gobert *et al.*, 2007, Latz *et al.*, 2007a) (Abb. 1.3, Abb. 1.5).

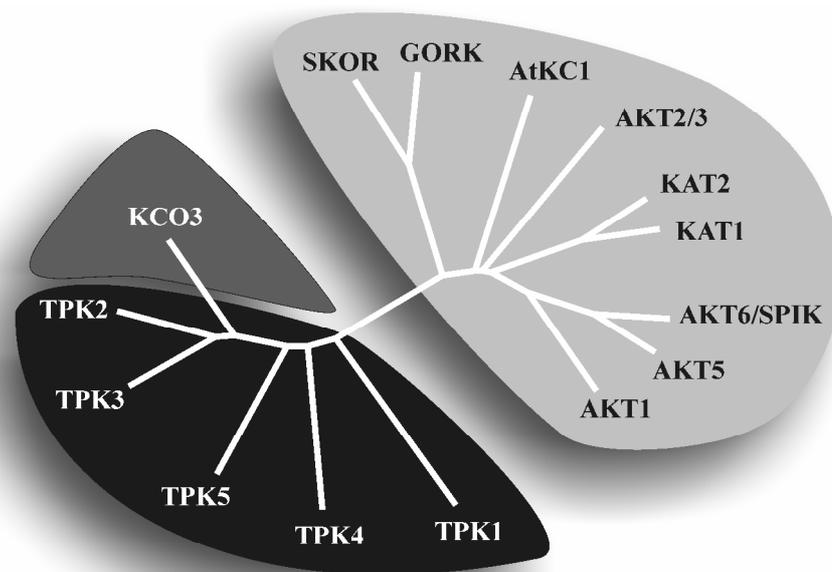


Abb. 1.3 Phylogenie der 15 *Arabidopsis thaliana* Kaliumkanäle

Dieser Stammbaum ohne Außengruppe zeigt die mögliche evolutionäre Verwandtschaft der 15 *Arabidopsis* Kaliumkanäle auf Basis eines multiplen Sequenzalignments (M-Coffee (Wallace *et al.*, 2006)) ihrer Proteinsequenzen auf. Auf der hellgrauen Plattform sind die *Shaker*-Kanäle dargestellt. Wie auch aus dem Stammbaum ersichtlich ist, werden diese in die AKT-Unterfamilie (AKT1/AKT5/SPIK), in die KAT-Unterfamilie der einwärtsgerichteten Kanäle (KAT1/KAT2), in die SKOR-Unterfamilie der auswärtsgerichteten Kanäle (GORK/SKOR), die AKT2/3-Unterfamilie und in AtKC-Unterfamilie unterteilt (Pilot *et al.*, 2003b). Die Tandem-Poren Kaliumkanäle (TPK) sind auf der schwarzen Plattform dargestellt. Trotz struktureller Ähnlichkeiten weichen TPK1 und TPK4 stärker in ihrer Sequenz von den anderen TPKs ab und nehmen eine Sonderposition ein, die sich, wie im nächsten Kapitel beschrieben, in ihren funktionellen Eigenschaften reflektiert. Der Ein-Porenkanal KCO3 zeigt gerade zu TPK2 eine große Ähnlichkeit, was sich in diesem Stammbaum widerspiegelt. Dieser Stammbaum wurde mit Phylodraw V0.82 (<http://pearl.cs.pusan.ac.kr/phylodraw/>) illustriert.

1.4 Die Tandem-Poren Kaliumkanäle von *Arabidopsis thaliana*

Der erste Doppel-Poren Kaliumkanal aus Pflanzen wurden 1997 aufgrund der Homologie seines Kaliumselektivitätsmotivs zu bereits beschriebenen Kaliumkanälen in EST-Datenbanken von *Arabidopsis thaliana* entdeckt (Czempinski *et al.*, 1997). Daraufhin konnte die vollständige cDNA isoliert werden. Neben der Bestimmung der Membrantopologie und putativer regulatorischer Domänen wie der zwei EF-Hände im C-Terminus dieses Kanals erfolgte auch die elektrophysiologische Charakterisierung nach heterologer Expression im Insekten-Zellsystem (Sf9 und Sf21, *Spodoptera frugiperda*). So wurde dieser, vormals putative Kaliumkanal, als Kalium-selektiver und auswärtsgerichteter Kanal mit einer starken Ca^{2+} -Abhängigkeit beschrieben und dementsprechend KCO1 (Kalium Channel Outward-rectifying) genannt (Czempinski *et al.*, 1997). Kurze Zeit später wurde aber

1. Einleitung

eingerräumt, dass auch untransfizierte Sf21 Zellen einen solchen, noch nicht zuvor beschriebenen Kanal besaßen.

In den darauf folgenden Arbeiten wurde zunächst die KCO-Familie der Tandem-Poren Kanäle von *A. thaliana* mit der Beschreibung des KCO2, KCO4, KCO5 und KCO6 komplettiert (Abb. 1.4) (Czempinski *et al.*, 1999, Maser *et al.*, 2001). Ursprünglich wurde auch KCO3 beschrieben (Czempinski *et al.*, 1999), der aber nur eine Porendomäne besitzt (Abb. 1.4), und deswegen nicht zu der Familie der Tandem-Poren Kaliumkanäle gezählt wird. Dennoch muss er, wie in Kap. 3.1 erörtert wird und aus Abb. 1.3 ersichtlich ist, zumindest evolutiv den Tandem-poren Kaliumkanälen zugeordnet werden. Die folgenden Arbeiten zu den Tandem-Poren Kanälen konnten mittels GFP-Fusionen die vakuoläre Lokalisation des KCO1 aufzeigen (Czempinski *et al.*, 2002, Schönknecht *et al.*, 2002). Dass KCO1 in fast allen Pflanzengeweben exprimiert wird, fand man durch Promotorstudien und quantitative RT-PCR Experimente heraus (Czempinski *et al.*, 2002, Schönknecht *et al.*, 2002). Für die anderen KCOs, außer KCO6, wurden im Gegensatz zu KCO1 in Spross und Wurzel relativ wenig Transkripte nachgewiesen (Schönknecht *et al.*, 2002), was auf eine schwache Expression oder eine auf bestimmten Gewebetypen beschränkte Expression hindeutete. Neuere Untersuchungen, auf die noch eingegangen wird, bestätigen dies.

Was die Funktion des KCO1 anging, war nun klar, dass er einen Kaliumkanal in der Vakuole darstellen musste, der eine bedeutende Funktion für die Osmoregulation und das Ionengleichgewicht der Pflanze haben könnte. Unklar war aber, ob er einen der bereits elektrophysiologisch beschriebenen Kationenkanäle der Pflanzenvakuolen darstellt. Diese Kationenkanäle wurden mittels Patch-Clamp Technik in verschiedenen Pflanzenarten gemessen und als SV-, FV- und VK-Kanäle beschrieben. Die SV-Kanäle sind langsam aktivierende (slow vacuolar), depolarisations- und Ca^{2+} -aktivierte Kanäle (Hedrich und Neher, 1987, Reifarth *et al.*, 1994). Sie sind permeabel für monovalente und unter unphysiologischen Bedingungen auch für divalente Kationen (Ward und Schroeder, 1994, Allen und Sanders, 1996, Pottosin *et al.*, 1997, Pottosin *et al.*, 2001). Der FV (fast vacuolar)-ist nur für monovalente Kationen permeabel (Bruggemann *et al.*, 1999) und wird durch divalente Kationen wie Ca^{2+} geblockt (Hedrich und Neher, 1987, Tikhonova *et al.*, 1997). Die dritte Gruppe, die VK (Vakuoläre Kalium)-Kanäle, sind wie es der Name verrät kaliumselektiv, darüber hinaus spannungsunabhängig und Ca^{2+} - aktiviert (Ward und Schroeder, 1994, Allen und Sanders, 1996).

Elektrophysiologische Messungen an Pflanzen mit einer En1-Insertion im *TPK1* ergaben, dass die Dichte des SV-Stroms, nicht aber die des FV-Kanals an den Mesophyllvakuolen signifikant abgenommen hatte (Schönknecht *et al.*, 2002). Daraus wurde eine Partizipation des KCO1 am SV-Kanal geschlossen. Da aber der SV-Kanal in *kco1-7* nicht vollends ausgeknockt war und die Charakteristika des SV-Kanals erhalten blieben, musste die Basis des SV-Kanals auf einem anderen Gen beruhen. Dieses Gen wurde später ebenfalls mittels patch-clamp Messungen an Knock-out Pflanzen identifiziert. Es heißt *TPC1* und die entsprechenden Knock-out Pflanzen zeigten keinerlei SV-Kanalaktivität mehr (Peiter *et al.*,

2005, Ranf *et al.*, 2008), wobei bisher lediglich eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber ABA bei der Keimung und extrazellulärem Kalzium beim Schließen der Stomata als Phänotypen beschrieben wurden (Peiter *et al.*, 2005). Interessanterweise handelt es sich bei TPC1 ebenfalls um einen Tandem-Porenkanal, der aber nicht das Kaliumselektivitätsmotiv besitzt und in seiner Topologie mit einem halbem L-Typ Kalziumkanal zu vergleichen ist (Abb. 1.4).

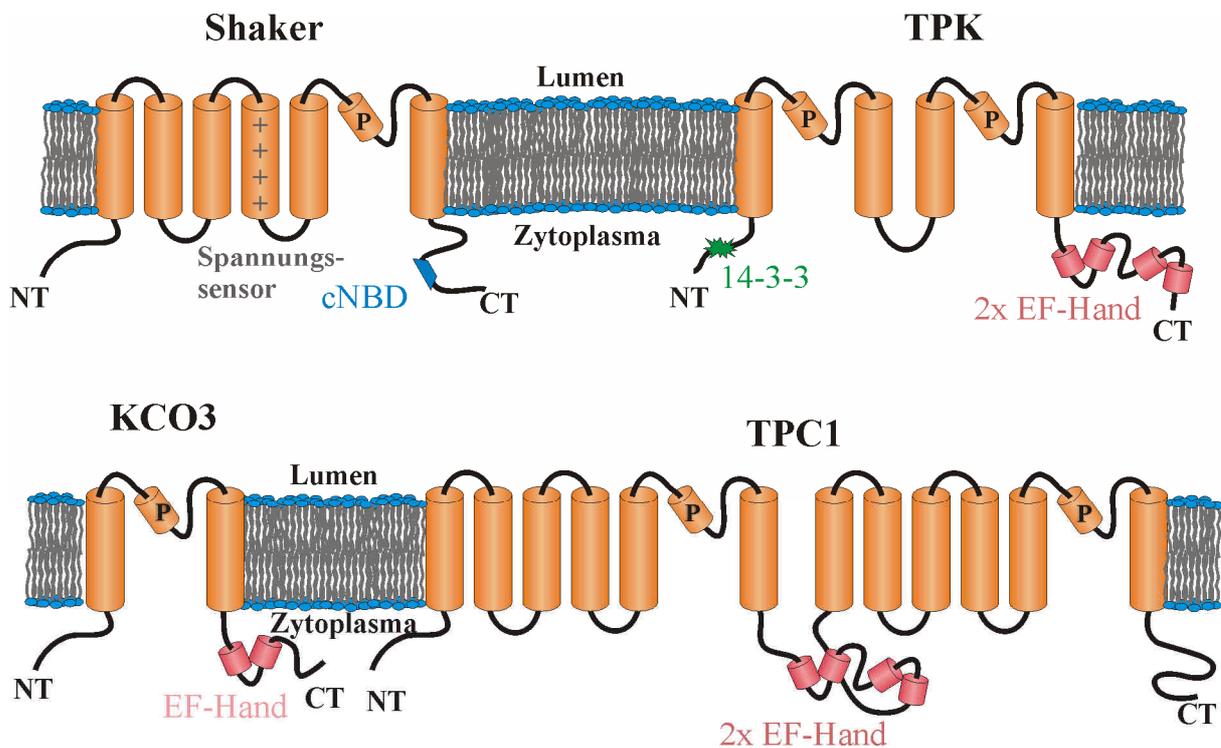


Abb. 1.4 putative Topologie der 15 Kaliumkanäle und des TPC1 von *A. thaliana*

Alle Ionenkanäle werden über hydrophobe und meist α -helicale Domänen in den Biomembranen verankert (vertikale Zylinder). Bei allen Kaliumkanälen und dem nicht selektiven Kationenkanal TPC1 findet sich ein Grundmotiv dieser Kanäle wieder, das aus zwei transmembranen Domänen (TMD) besteht, die eine ebenfalls hydrophobe Porendomäne (P) umgeben. Die neuen *Shaker*-Kanäle sind meist spannungsabhängig, wobei der Spannungssensor durch basische Aminosäuren in der vierten TMD gebildet wird. Außerdem besitzen alle *Shaker*-Kanäle eine C-terminale Bindestelle für cyclische Nukleotide (cNBD). Die fünf *TPK*-Kanäle bauen sich aus zwei Grundmotiven auf und besitzen teilweise eine N-terminale 14-3-3 Bindestelle und C-terminale, Ca^{2+} bindende EF-Hände. Der *KCO3* wird möglicherweise über zwei oder auch drei (nicht dargestellt) Transmembranen in der Membran verankert und besitzt nur eine vollständige Porendomäne (siehe Kap. 3.1). TPC1 ist der einzige nicht selektive Doppelporen Kationenkanal und baut sich praktisch aus zwei *Shaker*untereinheiten auf, in deren Linker zwei regulatorische EF-Hände sitzen. NT, CT = Amino- bzw. Carboxyterminus

1. Einleitung

In der Zwischenzeit konnten wir die ersten elektrophysiologischen Untersuchungen eines Tandem-Poren Kanals der KCO-Familie in einem heterologen Expressionssystem durchführen. Es war KCO4 der als einziger der putativen Tandem-Poren Kaliumkanäle in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* funktionell exprimierbar war. KCO4 zeigte eine sehr schnelle Aktivierung und war bei allen Membranspannungen offen. Mit dieser fehlenden Spannungsabhängigkeit ähnelt KCO4 seinen tierischen Pendanten, die als Hintergrundkanäle zum Beispiel das Membranpotential von Nervenzellen auf das Kaliumgleichgewichtspotential klemmen (Fink *et al.*, 1996, Lesage *et al.*, 1996a, Duprat *et al.*, 1997, Fink *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 1998, Patel *et al.*, 1998, Reyes *et al.*, 1998, Maingret *et al.*, 2000, Kang *et al.*, 2004, Kang und Kim, 2006). Diese Erkenntnisse und das Fehlen eines typischen Spannungssensors wie bei Shaker-Kanälen ließen es angebracht scheinen, diese Kanal-Familie nicht mehr als Kaliumauswärtsgleichrichtende Kanäle, was KCO bedeutet, zu bezeichnen, sondern sie entsprechend ihrer besonderen Struktur Tandem-Poren-Kaliumkanäle oder abgekürzt TPK-Kanäle zu nennen. Dementsprechend wurde KCO4 in TPK4 und die anderen KCO-Kanäle entsprechend Tabelle 1.1 umbenannt.

Tab. 1.1 Alte und neue Nomenklatur der Tandem-Poren-Kaliumkanäle von *Arabidopsis thaliana*

Alte Bezeichnung in der KCO-Familie	Neue Bezeichnung
KCO1	TPK1
KCO2	TPK2
KCO3	KCO3
KCO4	TPK4
KCO5	TPK5
KCO6	TPK3

Wie erwartet war TPK4 selektiv für Kalium und wurde durch typische Kanalblocker wie Cs^+ und Ba^{2+} geblockt. Aber auch durch hohe (20mM) Ca^{2+} Konzentrationen in der Badlösung konnten die Einwärtsströme reduziert werden. Besondere Eigenschaften des TPK4 sind die nicht perfekte Einwärtsgleichrichtung des Kaliumstroms und das Schließen des Kanals bei zyttoplasmatischer Ansäuerung. Hinsichtlich seiner Expression und Lokalisation in der Zelle konnten wir nachweisen, dass er ausschließlich in den Pollen exprimiert wird und dort in der Plasmamembran sitzt. Deswegen vermuten wir, dass TPK4 im Pollen das Membranpotential über einen großen Spannungsbereich stabilisiert und das Schließen des Kanals durch zyttoplasmatische Ansäuerung den Pollen empfänglich für die Depolarisation durch Kalziumeinstrom macht. TPK4 könnte somit eine wichtige Rolle beim Pollenschlauchwachstum spielen, das einen pH und Ca^{2+} regulierten Prozess darstellt. (Becker *et al.*, 2004)

TPK4 scheint in vielen Aspekten einen Sonderfall innerhalb der TPK-Familie darzustellen. Unter anderem fehlen TPK4 regulatorische Domänen in seinen zytoplasmatischen Teilen. Das ist zum einen die 14-3-3 Bindestelle im N-Terminus, wie sie bei allen anderen TPK-Kanälen vorhanden ist (Kap 7.10). 14-3-3 Proteine sind regulatorische Proteine, die bei allen Eukaryonten vorkommen. *Arabidopsis thaliana* besitzt 13 Isoformen dieser Dimer formenden Proteine. Sie besitzen ein breites Wirkungsspektrum und werden daher auch GRF (general regulating factors) genannt. So fungieren sie zum Beispiel auch Inhibitoren des SV-Kanals (van den Wijngaard *et al.*, 2001). Die Bindung an das Zielprotein ist dabei an verschiedene Motive möglich, ist aber abhängig von der Phosphorylierung eines Serins oder Threonins. Die TPKs besitzen eine so genannte „mode 1“ Bindestelle, RSXp(S/T)XP (Muslin *et al.*, 1996). Andreas Latz konnte während seiner Doktorarbeit die Bindung von zwei spezifischen GRFs (GRF1 und GRF6) von *A. thaliana* an den N-Terminus des TPK1 nachweisen (Latz *et al.*, 2007b). Und Messungen an Hefevakuolen, die den AtTPK1 exprimierten, konnten eine Aktivierung der TPK1 Ströme durch Zugabe von 14-3-3 zeigen. Die Aktivierung beruhte dabei auf einer Öffnung des Kanals (Latz *et al.*, 2007b).

Die Arbeiten an TPK1 exprimierenden Hefevakuolen brachten auch den Durchbruch zur weiteren elektrophysiologischen Charakterisierung des TPK1. So wurde TPK1 als spannungsunabhängiger und kaliumselektiver Kanal beschrieben. Er besitzt eine Einzelleitfähigkeit von 40pS bei positiven und 75pS bei negativen Spannungen. Ähnlich wie der SV- und der VK-Kanal wird er durch mikromolare Konzentrationen an zytoplasmatischem Ca^{2+} aktiviert (Bihler *et al.*, 2005, Latz *et al.*, 2007b). Andreas Latz wiederum konnte die Bindung von radioaktivem Ca^{2+} durch den TPK1 C-Terminus nachweisen (Latz *et al.*, 2007b). Die Bindung erfolgt dabei wahrscheinlich an zwei EF-Hände im TPK1 C-Terminus, die dem TPK4 und TPK5 fehlen, aber bei TPK2 und TPK3 in einfacher Ausführung ebenfalls vorhanden sind. EF-Hände sind Helix-Loop-Helix-Motive, über die viele Ca^{2+} -bindende Proteine, wie zum Beispiel das ubiquitäre Calmodulin, Kalzium koordinieren können. Wie bei TPK1 bilden sie meist eine aus zwei, aber auch aus vier oder sechs EF-händen bestehende funktionelle Einheit. (Übersichtsartikel zu EF-Händen: Grabarek, 2006, Übersichtsartikel zu EF-Händen: Gifford *et al.*, 2007)

Mit dem detaillierten Wissen um die Regulation des TPK1 war es nun auch möglich TPK1 *in planta* zu identifizieren. Auch in Pflanzenvakuolen erwies sich TPK1 als spannungsunabhängig offener Kanal mit einer schwachen intrinsischen Einwärtsgerichtung. Die Offenwahrscheinlichkeit war abhängig von mikromolaren zytoplasmatischen Kalzium und der optimale pH-Wert für die Aktivität des Kanals lag bei pH 6,7. (Gobert *et al.*, 2007) Damit besitzt TPK1 sehr ähnliche Eigenschaften wie sie für den VK-Kanal u.a. in *Vicia faba* Schließzellen beschrieben wurden (Ward und Schroeder, 1994, Allen und Sanders, 1995, Allen *et al.*, 1998). Ob TPK1 alleine den VK-Kanal bildet ist nicht klar. Denn wie wir zeigen konnten, sind die anderen TPK-Kanäle und KCO3 mit Ausnahme des TPK4 ebenfalls in der Vakuolenmembran lokalisiert (Latz *et al.*, 2007b) (Abb. 1.5).

1. Einleitung

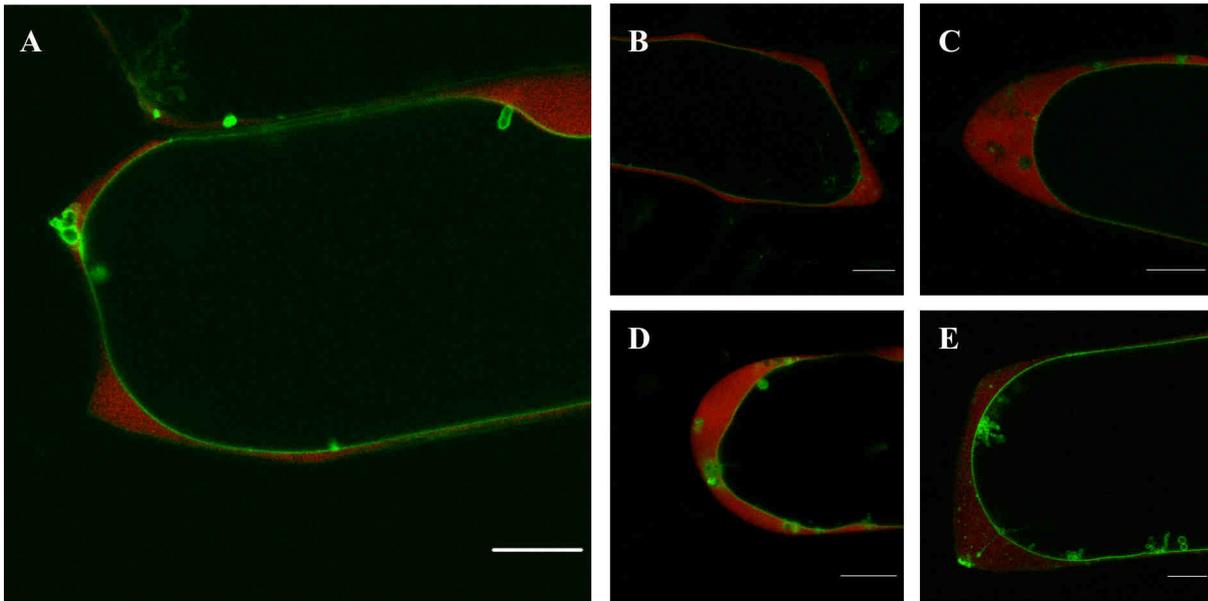


Abb. 1.5 Lokalisierung der vakuolären Vertreter der TPK/KCO-Familie

A *TPK1*, **B** *TPK2*, **C** *TPK3*, **D** *TPK5* und **E** *KCO3* wurden mit *mGFP4* fusioniert und zusammen mit *mRFP1* auf Zwiebelepidermiszellen geschossen. Während *mRFP1* (rot) sich frei und gleichmäßig im Zytoplasma und auch im Zellkern verteilt, markiert GFP (grün) die Vakuolenmembran. Es sei angemerkt, dass die Farben zwar mit der tatsächlichen Fluoreszenz übereinstimmen, aber in allen LSM-Bildern frei gewählte Falschfarben darstellen. Die Helligkeit gibt dabei die Fluoreszenzintensität, der im 8bit oder 12bit-Modus aufgenommenen Bilder wieder. Maßstab = 20µm

Es wäre also denkbar, dass diese bis dato nicht näher elektrophysiologisch untersuchten putativen Kaliumkanäle sich mit *TPK1* zu einem heteromeren Kanal zusammenschließen oder eigenständige, homomere VK-Kanäle bilden. Dieser Frage haben sich in einer jüngeren Arbeit Camilla Voelker und Mitarbeiter gewidmet. Auf Basis von FRET-Messungen wurde angenommen, dass die *TPK*-Kanäle Homomere in der Vakuolenmembran bilden (Voelker *et al.*, 2006). Da aber dies das bisher einzige Indiz dafür ist, sich diese Untersuchung zudem auf *TPK1*, *TPK5* und *KCO3* beschränkt hat und die *TPKs* durchaus überlappende Expressionmuster aufweisen (Abb. 1.6), kann eine Heteromerisierung noch nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Genauere Hinweise auf mögliche Expressionsmuster und -stärken lieferten sowohl gewebespezifische „Mikro-Array“ Hybridisierungen (genevestigator, (Zimmermann *et al.*, 2004) als auch Promotor-GUS-Linien (Voelker *et al.*, 2006). Daraus ergab sich, dass *TPK1*, *TPK3* und *TPK5* in fast allen Pflanzenorganen transkribiert werden, wobei die Transkriptmenge über die ganze Pflanze gesehen in derselben Reihenfolge abnimmt. *TPK2* und *TPK4* werden nur im Staubblatt und dort hauptsächlich im Pollen exprimiert. Promotor-GUS-Studien zeigen, dass die Expression von *KCO3* und *TPK5* auf das Leitgewebe beschränkt ist. Außerdem gibt es eine besonders auffällige überlappende Expression von *TPK1* und *TPK3* in der Wurzelspitze, von *TPK1*, *KCO3* und *TPK5* in den Leitgeweben und

von TPK1, TPK2, TPK3 und TPK4 im Pollen. Äußere biotische und abiotische Stimuli haben kaum Einfluss auf die transkriptionelle Regulation der TPKs. Auffällig ist ein Anstieg der *TPK5*-Transkripte während des programmierten Zelltods (+7fach) und nach Behandlung mit dem Cortison Dexamethason (+6fach). Bei *TPK3* fällt die Veränderung der Transkriptmenge bei Behandlung mit Pflanzenläusen (*Myzus persicae*, -3fach) und Behandlung mit dem Hormon Methyljasmonat (+2,4fach) auf. *TPK1*-Transkriptmengen werden offensichtlich durch Hitzestress (-5,3fach) und durch eine Inhibition der Gibberellinsynthese mittels PAC (-2,7fach) reguliert.

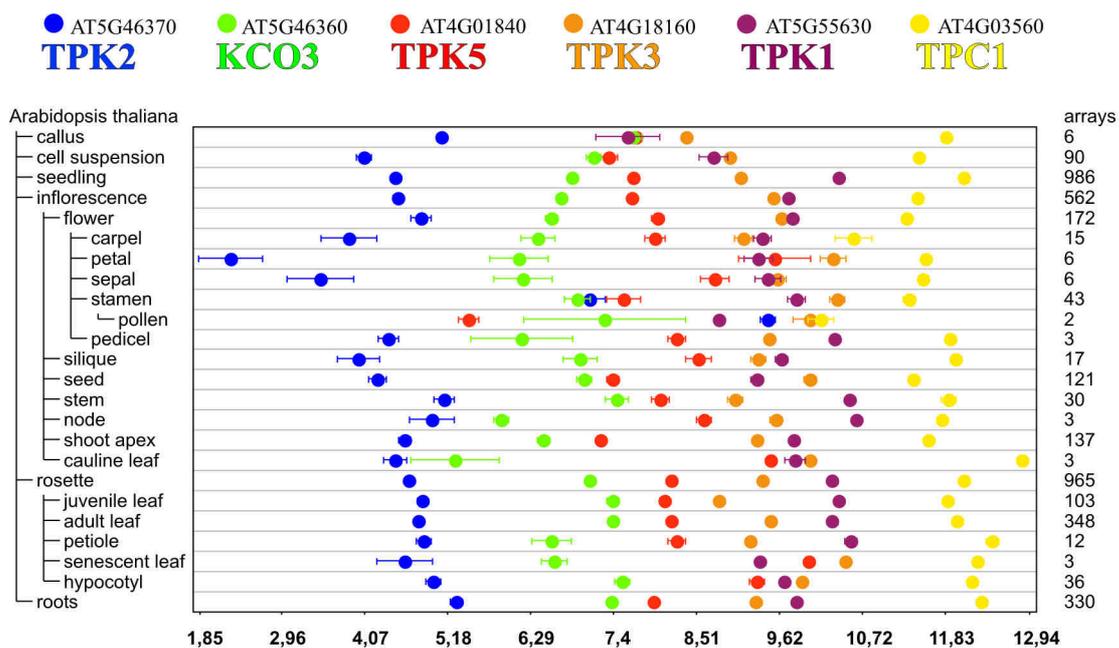


Abb. 1.6 Micro-array Analyse der Expression von vakuolären Kaliumkanälen und TPC1

Die bei Genevestigator (Zimmermann *et al.*, 2004) gesammelten Daten von mehr als 3000 „Micro-Array“-Hybridisierungen (22k arrays) wurden genutzt, um das Expressionmuster der TPKs, des KCO3 und des TPC1 darzustellen. TPK4 ist auf diesem „Micro-Array“ nicht vertreten. Die Abszisse gibt die Signalstärke als \log_2 an. Das durchschnittliche Signal eines Blots liegt bei 9,97 (TGT value: 1000). Der Hintergrund variiert von array zu array zwischen 0 und 6,64 (0-100).

1.5 Translokation von Membranproteinen

Wie bei den *TPKs* gibt es viele Genfamilien von unterschiedlich lokalisierten Membranproteinen (*AtVAMP*-Familie, *AtCLC*-Familie, *ZmPIP*-Familie etc.). Dennoch ist wenig bekannt, was die Sortierung von Membranproteinen, besonders vom Typ III und Typ IV (mit mehr als einer Transmembrane), angeht.

Man weiß, dass die Synthese von Membranproteinen am rauen ER stattfindet, wo bereits während der Translation die Proteine gefaltet und am Translokationskomplex in der Membran verankert werden (Deutsch, 2003). Die Verankerung erfolgt durch hydrophobe α -Helices von

1. Einleitung

etwa 17-24 Å Länge. Die Topologie des Kanals wird ebenfalls durch diese hydrophoben Domänen bestimmt, die entsprechend ihrer topogenen Funktion in Typ I ($N_{\text{exo}}/C_{\text{cyt}}$) und Typ II ($N_{\text{cyt}}/C_{\text{exo}}$) Signal-Anker oder Stopp-Transfer Sequenzen eingeteilt werden (Sato *et al.*, 2002). So wie die Faltung und Assemblierung aller ER-Proteine von einem ER spezifischen Qualitätskontrollsystem überprüft wird (Ellgaard und Helenius, 2003), scheint auch die korrekte Assemblierung der Kanäle wie im Falle der tierischen $K_{(\text{ATP})}$ Kanäle eine Voraussetzung für die Oberflächenexpression zu sein (Zerangue *et al.*, 1999, Cartier *et al.*, 2001). Es wird allgemein angenommen, dass membrangebundene Proteine, die für die folgenden Kompartimente des sekretorischen Signalwegs bestimmt sind, an sehr beweglichen ER-Exportstellen konzentriert werden (daSilva *et al.*, 2004). Von diesen mobilen Stellen am ER schnüren sich so genannte COPII-Vesikel ab, die später mit dem Golgi-Membranen fusionieren (Bar-Peled und Raikhel, 1997, Andreeva *et al.*, 2000, Takeuchi *et al.*, 2000, Phillipson *et al.*, 2001, Ritzenthaler *et al.*, 2002, Barlowe, 2003, daSilva *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu vielen löslichen Proteinen innerhalb des ER-Lumen, von denen ein eher zufälliger massenstromartiger Export angenommen wird, unterliegen Membranproteine wahrscheinlich einem selektiven Export, indem sie mit COPII-Hüllproteinen interagieren.

Für Sys1p, einem Membranprotein aus der Hefe, wurde eine Interaktion mit den COPII-Hüllproteinen nachgewiesen. Die Interaktion war abhängig von einem di-azidischen Motiv in Sys1p (Votsmeier und Gallwitz, 2001). Ähnliche Motive wurden auch in Membranproteinen von Säugetieren mit dem ER-Export assoziiert (Nishimura und Balch, 1997, Sevier *et al.*, 2000, Ma *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2004). Diese einfachen Motive setzen sich aus zwei Asparaginsäuren oder Glutaminsäuren zusammen die durch eine dritte Aminosäure (i.d.R. Leucin) getrennt werden [D/E]X[D/E] (Votsmeier und Gallwitz, 2001, Malkus *et al.*, 2002).

Vor kurzem wurden auch die ersten pflanzlichen Membranproteine mit di-azidischen ER-Exportmotiven entdeckt (Hanton *et al.*, 2005, Mikosch *et al.*, 2006).

Aber nicht alle exportierten Membranproteine tragen solche di-azidischen Motive. Es gibt Hinweise, dass zumindest ein weiteres ER-Exportmotiv existiert, welches sich aus hydrophoben/aromatischen Aminosäuren zusammensetzt und das wie das di-azidische Motiv die Interaktion mit COPII-Hüllproteinen vermittelt (Kappeler *et al.*, 1997, Nufer *et al.*, 2002). Die Bindestellen an den COPII-Hüllproteinen beider Motive unterscheiden sich jedoch (Miller *et al.*, 2003). Schließlich könnten auch di-basische Motive am ER-Export beteiligt sein, wie im Fall der Membran-verankerten Prolylhydroxylase (Yuasa *et al.*, 2005).

Von tierischen Kanälen wissen wir, dass die Oberflächenexpression oft durch das Gegenspiel von ER-Export- und ER-Rückhaltesignalen reguliert wird. Rückhaltesignale können aus hydrophoben Aminosäuren bestehen wie das CVLF-Motiv in einer Splice-Variante des MaxiK- Kanals (hSlo) (Zarei *et al.*, 2004), oder sind, wie im tierischen Tandem-Poren Kaliumkanal KCNK3, im allgemeinen auf Arginin basierende Motive zurückzuführen (Zerangue *et al.*, 1999, Scott *et al.*, 2001, O'Kelly *et al.*, 2002, Yuan *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass diese basischen Motive die Bindung an COPII-Hüllproteine vermitteln, die den

retrograden Vesikeltransport vom Golgi zum ER steuern (Nilsson *et al.*, 1989, Zerangue *et al.*, 1999, O'Kelly *et al.*, 2002, Yuan *et al.*, 2003, Contreras *et al.*, 2004). Um der ER-Retention zu entkommen, muss das basische Motiv maskiert werden. Im Falle des KCNK3 geschieht das durch die Bindung eines 14-3-3 Proteins (O'Kelly *et al.*, 2002).

Haben die Membranproteine endgültig das ER verlassen, müssen alle nicht Golgi-ansässigen Proteine den Golgi passieren und unterliegen an cis-Golgi-Stapeln oder am *Trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) einem weiteren Sortierungsschritt, der entscheidet ob sie zur lysischen Vakuole (LV), zur Proteinspeichervakuole (PSV) oder zur Plasmamembran transportiert werden. Der Transport zu beiden Vakuolentypen bezieht ein intermediäres Kompartiment, das prävakuoläre Kompartiment (PVC), und spezifische Vesikel wie glatte, elektronendichte Vesikel (DV) und Clathrin-umhüllte Vesikel (CCV) mit ein (Müntz, 2007).

Nur sehr wenig ist über die Mechanismen bekannt, denen die Sortierung von pflanzlichen Membranproteinen an diesem Punkt unterliegt. In der Familie der VAMP-Proteine (SNAREs) bestimmt die N-terminale Longin-Domäne ob diese Typ II Transmembranproteine z.B. in der Vakuole oder der Plasmamembran lokalisieren (Uemura *et al.*, 2005). Wie die Longin-Domäne bewirkt, dass die entsprechenden VAMPs in dem einen oder anderen Vesikeltyp akkumulieren ist nicht bekannt. Die Sortierung könnte ähnlich wie bei der Sortierung in COP-umhüllte Vesikel auf der Interaktion mit den Vesikelhüllproteinen beruhen. Ein erstes Indiz hierfür liefert der membrangebundene, vakuoläre Sortierungsrezeptor ELP aus *Arabidopsis thaliana*. Für ELP wurde eine Interaktion des cytoplasmatischen Terminus mit dem AP1-Komplex (Adaptorprotein 1-Komplex) nachgewiesen (Sanderfoot *et al.*, 1998). AP-Komplexe, von denen 4 verschiedene beschrieben werden, sind zusammen mit kleinen GTPasen vom ARF-Typ und Clathrin an der Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCV) beteiligt. Vom AP1-Komplex wird im allgemeinen angenommen, dass er bei den meisten Eukaryoten die Akkumulation von membrangebunden Transportproteinen in CCV am TGN vermittelt. (Sanderfoot und Raikhel, 2003)

Für einfache Transmembranproteine wird auch eine Rolle der Transmembranlänge diskutiert, weil sich die Lipiddoppelschichten entlang des sekretorischen Signalwegs unterschiedlich zusammensetzen und ihre Dicke zunimmt. Tatsächlich akkumulieren an künstliche Transmembranen gekoppelte Reporter im ER, wenn die transmembrane Domäne 17 Å lang ist, im Golgi, wenn sie 20 Å einschließt. 23 Å lange Transmembranen zeigten, dass die Standardzielmembran von Typ I Transmembranproteinen die Plasmamembran und nicht die Vakuolenmembran ist (Brandizzi *et al.*, 2002). Diese Annahme wird gestützt durch SNAREs, die im ER zurückgehalten werden wenn sie eine 17 Å TM besitzen, aber mit einer 20 Å TM im Golgi und *post*-Golgi Kompartimenten verweilen (Uemura *et al.*, 2005). Zusammengenommen würde das eine Rolle der Transmembranlänge für die *post*-Golgi-Sortierung ausschließen.

1. Einleitung

1.6 Entstehung und Funktion der pflanzliche Vakuole

Die Zielmembran von vier TPK-Kanälen und KCO₃ ist die Vakuole. Sie ist das zentrale Organell aller Pflanzen und erfüllt zahlreiche, verschiedene Aufgaben, die für das Überleben von Pflanzen wichtig sind. Wenn, wie in der *vcl1 (vacuoleless1)* Mutante von *Arabidopsis thaliana*, keine Vakuolen gebildet werden, stirbt die Pflanze bereits im Embryonalstadium (Rojo *et al.*, 2001).

Pflanzenzellen besitzen dennoch nicht von Beginn an Vakuolen. Vielmehr entstehen sie bei der Teilung und Differenzierung der vormals meristematischen Zellen. In Vakuolenbildenden Zellen entstehen zuerst tubuläre Provakuolen von etwa 100nm Durchmesser durch vesikuläre Abschnürung vom TGN oder dem ER. Diese können sich reißverschlussartig zu einem Zytoplasma umhüllenden Ball zusammenschließen. Diese Struktur wird Autophagosom genannt, denn was folgt ist die Auflösung der inneren der beiden Membranen und der hydrolytische Abbau des Zytoplasmas. Dabei entstehen kleine Vakuolen, die zu einer großen fusionieren können. (Marty, 1999)

Eine der überlebenswichtigen Funktionen der Vakuole ist der Katabolismus von Proteinen und anderen Stoffwechselprodukten mit Hilfe hydrolytischer Enzyme. Dies geschieht innerhalb des meist leicht sauren Milieu's (pH5) der lytischen Vakuolen (LV). Wie eingangs erwähnt, ist die Vakuole mit der Fähigkeit des selektiven Stofftransports über den Tonoplasten entscheidend an der Ionen-Homöostase der Zelle beteiligt. Neben dem Austausch von Kalium vermag die Pflanze so auch andere Ionen, Zucker, Proteine und toxische Substanzen in der Vakuole zu konzentrieren und zu speichern. Besonders die Speicherung von Ionen und niedermolekularen Substanzen führt zu einer Erhöhung des osmotischen Potentials, welches durch den statischen Druck, der sich zwischen dem Protoplast und der relativ starren pflanzlichen Zellwand bildet kompensiert wird. Dieser Druck (Turgor) verleiht pflanzlichem Gewebe Stabilität und stellt die treibende Kraft für pflanzliches Wachstum und Bewegung dar.

Neben lytischen Vakuolen bildet die Pflanze in Samen und bestimmten Speichergeweben, auch spezialisierte Vakuolen (PSV), die der Speicherung von Reserveproteinen dienen. Auf Verwundung und bestimmte Entwicklungssignale werden auch in vegetativem Gewebe Speicherproteine produziert und ebenfalls in Speichervakuolen abgelagert (Sonnwald *et al.*, 1989, Staswick, 1990, Jauh *et al.*, 1998).

Als molekulare Marker für die drei beschriebenen Vakuolentypen dienen den Pflanzenphysiologen unter anderem Wasserkanäle (Aquaporine) der TIP-Familie (tonoplast intrinsic protein). Während γ -TIP die vegetative, lytische Vakuole markiert, finden sich α -TIP in den Proteinspeichervakuolen von Samen und δ -TIP in Proteinspeichervakuolen von vegetativen Geweben wieder (Hofte *et al.*, 1992, Marty-Mazars *et al.*, 1995, Paris *et al.*, 1996, Jauh *et al.*, 1998, Neuhaus und Rogers, 1998, Swanson *et al.*, 1998, Barrieu *et al.*, 1999). In Aleuronzellen von Gerstensamen, im Hypokotylhaken von Erbsenkeimlingen, den Wurzelzellen von Erbse und Gerste oder auch in Tabak ist die Existenz unterschiedlicher

Vakuolentypen in ein und der selben Zelle nachgewiesen worden (Paris *et al.*, 1996, Swanson *et al.*, 1998).

1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit

Wie bei den TPKs ist bei vielen pflanzlichen Membranproteinen sehr wenig über die Mechanismen des spezifischen Targetings bekannt. Da es sich bei der TPK-Familie, um eine Gruppe homologer Kaliumkanäle handelt, die in unterschiedlichen Membranen zu finden sind, eignet sich diese Familie besonders für eine vergleichende Untersuchung der Targetingmechanismen. So sollten auf diese Homologie gestützt und anhand von Strukturvorhersagen Domänen innerhalb dieser Kaliumkanäle identifiziert werden, die an der spezifischen Translokation beteiligt sind und Hinweise auf die zugrunde liegenden Mechanismen geben können.

Neben den Targetingmechanismen waren auch die elektrophysiologischen Eigenschaften der vakuolären TPKs, mit Ausnahme des TPK1, bisher unbekannt. Die Analyse vakuolärer Transporter gestaltet sich aufgrund technischer Limitationen oft schwierig. Sowohl für den TPC1 Kanal als auch für TPK1 vergingen mehr als 15 Jahre von der ersten elektrophysiologischen Charakterisierung bis hin zur molekularen Identifizierung. (Hedrich und Neher, 1987, Bihler *et al.*, 2005, Peiter *et al.*, 2005, Gobert *et al.*, 2007). Ein Grund ist sicherlich darin zu sehen, dass sich mit Ausnahme der Hefe, vakuoläre Membranproteine in den verfügbaren etablierten tierischen, heterologen Expressionssystemen nicht in die Plasmamembran einbauen können, da eine Vakuole fehlt. Zum anderen fehlten bei der anfänglichen patch-clamp Untersuchung von Vakuolen wichtige zytoplasmatische Faktoren, die zur Aktivierung des TPK1 gebraucht werden (Ca^{2+} und 14-3-3 Proteine). Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, sollten Chimären des einzigen im *Xenopus* Oozytensystem messbaren TPK4 und den vakuolären TPKs erzeugt werden, um mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme Rückschlüsse auf die Funktion dieser Kanäle zu ziehen.

Desweiteren sollte auf Basis eines Strukturmodells des TPK4 Aminosäuren identifiziert werden, die an der pH-Regulation und der Gleichrichtung des TPK4s beteiligt sind und so die Regulation des TPK4 genauer geklärt werden.

Schließlich sollte der Frage nachgegangen werden, ob die TPKs auch heterodimerisieren. Der stichhaltigste Beweis für eine Heteromerisierung von Kanaluntereinheiten ist in der Veränderung elektrophysiologischer Eigenschaften nach Heteromerisierung zu sehen. Da diese Eigenschaften jedoch aus oben genannten Gründen bisher nicht untersucht werden konnten, sollte die fluoreszenz-mikroskopische Technik der „bimolekularen

1. Einleitung

Fluoreszenzkomplementation“ (BiFC) zusätzlich Aufschluss über die Heterodimerisierung der TPK-Untereinheiten liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Die *AtTPK/KCO*-Gene und cDNA-Ausgangsvektoren

2.1.1 Konventionen

Die Schreibweise der Gene und Proteine in dieser Arbeit richtet sich nach den allgemeinen Regeln der Arabidopsis Forschungsgemeinschaft (Meinke und Koornneef, 1997). Demnach werden alle wildtypischen *ALLELE* groß und kursiv, mutante *allele* klein und kursiv und PROTEINE groß und aufrecht geschrieben.

2.1.2 Die *AtTPK/KCO*-Familie

Die *AtTPK/KCO*-Familie besteht aus fünf Genen, die für Tandem-Poren Kaliumkanäle kodieren und ein Gen, welches für den Ein-Poren Kaliumkanal *KCO3* kodiert. Die DNA- und Proteinsequenzen dieser Gene sind in der refseq-Datenbank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) hinterlegt (Tab. 2.1)

Tab. 2.1 Liste der Referenzen zu den *AtTPK/KCO*-Sequenzen

Name	Lokus-Identifikation (AGI)	Zugangs-nr. CDS	Zugangs-nr. Protein
<i>TPK1 (KCO1)</i>	At5g55630	NM124945.3	NP851196.1
<i>TPK2 (KCO2)</i>	At5g46370	NM124007.2	NP199449.1
<i>TPK3 (KCO6)</i>	At4g18160	NM117926.2	NP193550.1
<i>TPK4 (KCO4)</i>	At1g02510	NM100132.2	NP171752.1
<i>TPK5 (KCO5)</i>	At4g01840	NM116414.3	NP192093.1
<i>KCO3</i>	At5g46360	NM124006.2	NP199448.1

2.1.3 Ausgangsvektoren

Wie in meiner Diplomarbeit beschrieben, wurden die cDNA-Ausgangsvektoren von *TPK1*, *TPK2*, *TPK4*, *TPK5* und *KCO3* durch RT-PCR auf verschiedene *Arabidopsis thaliana* cDNAs und TOPO-Klonierung in den pcDNA3.1D-TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe) gewonnen. Die cDNAs des *TPK1* in pCRII-TOPO[®] (T7-Orientierung) (Invitrogen, Karlsruhe) und des *TPK3* in psGEM waren bereits in der AG Hedrich vorhanden und wurden von Andreas Latz synthetisiert.

2. Material und Methoden

2.2 Verwendete Antibiotika

Tab. 2.2 Liste der verwendeten Antibiotika mit Angabe der Arbeitskonzentrationen

Antibiotikum	Stock	Bakterienkultur	Pflanzenkultur
Ampicilin	50mg/ml	50µg/ml	x
Kanamycin	50mg/ml	50µg/ml	x
Gentamycin	30mg/ml	30µg/ml	x
Rifampicin	10mg/ml	10µg/ml	x
Hygromycin	30mg/ml	x	30µg/ml
Cefotaxim	250mg/ml	x	500µg/ml

2.3 DNA-Rekombination und Mutagenese

2.3.1 Transformation, Selektion und Kultur von *Escherichia coli*

Die Kultivierung der *E. coli* - Bakterien erfolgte als Flüssigkultur in antibiotikahaltigem LB-Medium (Tab. 2.4) oder auf mit Antibiotika versetzten LB-Agarplatten. Verwendet wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α für die Transformation von Gateway-Reaktionen und XL1Blue MRF' für die sonstigen Applikationen (Tab. 2.3)

Tab. 2.3 Genotyp der verwendeten *E.coli* Stämme

Stamm	Genotyp
DH5 α	SupE44; lac U 169 (lacZ M15) hsd R17 rec A1 EndA1 gyrA96 thi-1 rel A1
XL1Blue MRF'	Δ (mcrA)183; Δ (mcrCB-hsdSMRmrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Lac

Die bei -80°C gelagerten chemisch kompetenten *E. coli* wurden zuerst auf Eis aufgetaut, anschließend mit einem zehntel Volumen DNA (5µl/3µl) aus einem Ligations- oder Topoligationsansatz beschickt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in einem 42°C warmen Wasserbad für 60s einem Hitzeschock ausgesetzt. Nachdem die Bakterien zwei Minuten auf Eis standen, wurden 400µl vorgewärmtes SOC-Medium (Tab. 2.4) zugefügt und die Bakterien eine Stunde bei 37°C geschüttelt (Inkubator Shaker Model G25, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA). Schließlich wurden die Bakterien auf vorgewärmte, ampicilin- oder kanamycinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und im Wärmeschrank bei 37°C über Nacht kultiviert.

Tab. 2.4 Zusammensetzung von LB-Medium(-Agar) und SOB-Medium

LB-Medium (-Agar)		SOB-Medium (SOC)	
Trypton	10 g/l	Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l	Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l	NaCl	0,5 g/l
(Agar-Agar	15g/l)	MgSO ₄	5 g/l add 1l dH ₂ O
in dH ₂ O		(Glucose	20mM)

2.3.2 Plasmidisolation aus *E.coli*

2.3.2.1 DNA Minipräparation

Nachdem die *E. coli* über Nacht auf einer LB-Platte zu Kolonien heranwuchsen, wurden einzelne Kolonien mit Pipettenspitzen aufgenommen und in je ein mit 3ml antibiotikahaltigem LB-Medium befülltes 15ml Falcon-Röhrchen überimpft. Diese Impfkulturen wurden wiederum über Nacht bei 37°C in einem Inkubationsschüttler kultiviert. Am Tag darauf erfolgte die Plasmid-DNA-Präparation aus 1,5 ml Bakteriensuspension nach einem *Alkaline Lysis*-Protokoll. Zuerst wurden die Bakterien durch 30s Zentrifugieren bei 14000rpm pelletiert („Eppendorf mini spin plus“, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde bis auf ca. 50µl entfernt und die Bakterien resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellwände wurde die Bakteriensuspension mit 300µl TENS-Puffer (Tab. 2.5) versetzt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Die klare, viskose Lösung wurde mit 150µl 3M Natrium-Acetat (pH 5,2) neutralisiert und durch zweiminütiges Zentrifugieren das Zelldebris (gDNA, Proteine, Lipide, SDS) von der Plasmid-DNA getrennt. Daraufhin wurde die Plasmid- DNA mit 600µl Isopropanol gefällt und durch vierminütiges Zentrifugieren pelletiert. Schließlich wurde die Plasmid-DNA durch Waschen mit 500µl 70% Ethanol von Salzen befreit, bei 37°C getrocknet, in 40 µl TE-RNase (0,5µg/µl RNase) gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tab. 2.5 Zusammensetzung von TE- und TENS-Puffer

TENS-Puffer		TE-Puffer	
TE-Puffer	9,4 ml	Tris-HCl pH 7,5	10 mM
10 % SDS	500 µl	Na-EDTA	1 mM
10 M NaOH	100 µl	in dH ₂ O	
RNase	200 µg/ml		

2.3.2.2 DNA Midipräparation

Um saubere Plasmid-DNA in größeren Mengen zu gewinnen, die für das Particle Bombardment von Zwiebelzellen geeignet war, wurden Plasmid-Midipräparationen

2. Material und Methoden

angewandt. Da jedes Bakterium nur eine begrenzte Zahl von Plasmiden replizieren kann, erreicht man größere DNA-Ausbeuten durch Anzucht von mehr Bakterien.

Deshalb wurden für eine Midipräparation Bakterien über Nacht bei 37°C und 300rpm in einem Schikanekolben mit 100ml antibiotikahaltigem LB-Medium vermehrt. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmidpräparation mit dem „Wizard Plus Midipreps Kit“ (Promega, Mannheim) oder dem „E.Z.N.A. Plasmid Midiprep Kit“ (Pqlab, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die DNA-Konzentrationen photometrisch bestimmt und die DNA-Proben bei -20°C aufbewahrt.

2.3.3 Restriktion

Ein wichtiges Werkzeug der Molekularbiologie sind Restriktionsendonucleasen vom Typ II. Diese aus Bakterien stammenden und nach ihnen benannten Enzyme sind in der Lage spezifisch palindromische DNA-Sequenzen von 4-8 Basenpaaren Länge zu erkennen und durch Phosphoesterhydrolyse die DNA auf immer dieselbe Weise zu spalten. Bei einer auf Watson und Crick versetzten Hydrolyse entstehen klebrige Enden mit entweder einem 5'- oder 3'- Überhang und bei einer parallelen Hydrolyse stumpfe Enden. Alle DNA-Fragmente mit stumpfen Enden und alle mit klebrigen Enden, die identische Überhänge besitzen, lassen sich mit Hilfe von Ligasen wieder miteinander verestern (siehe Kap. 2.3.4.2). Restriktionsenzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit zum einen dazu eingesetzt, die codierenden Sequenzen der TPK-Kanäle für Umklonierungen zu präparieren und zum anderen die so neu entstandenen Plasmide aufgrund eines vorhersagbaren Restriktionsmusters zu analysieren. Die Zusammensetzung eines analytischen und eines präparativen Restriktionsansatzes sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 2.6 Zusammensetzung eines präparativen und eines analytischen Restriktionsverdau

Komponenten	Präparative Restriktion	Analytische Restriktion
10x Puffer (je nach Enzym)	2-4µl	1-2µl
DNA	10-15µg	2-5µg
Restriktionsenzym	5-10U	3U
ddH ₂ O	add. 20µl	add. 10µl

Für beide Ansätze wurden ausschließlich Restriktionsenzyme von MBI Fermentas (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) verwendet. Die Ansätze wurden solange bei der für das Enzym optimalen Temperatur (i.d.R. 37°C) inkubiert bis die Plasmid-DNA vollständig verdaut war. Die Analyse, Trennung und Aufreinigung der dabei entstandenen DNA-Fragmente erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.3.6).

2.3.4 Ligation

2.3.4.1 TOPO-Ligation

Das „pcDNA3.1D Directional TOPO Expression Kit“ (Invitrogen) ermöglicht das Klonieren von blunt-end PCR-Produkten in einen Plasmid-Vektor, pcDNA3.1D/V5-His-TOPO[®], und ermöglicht die transiente oder stabile Expression eines Gens in einer Säuger-Zelllinie wie zum Beispiel der HEK293-Zelllinie oder auch die cRNA-Synthese für die Mikroinjektion in Oozyten über einen T7-Promotor.

Die Effizienz dieser Methode beruht auf einer Topoisomerase (Topoisomerase I vom *Vaccinia* Virus), welche die Esterbindung zwischen PCR-Produkt und dem geöffneten Vektor knüpft. Ein 3'-GTGG-Überhang im Vektor und eine 5'-CACC-Sequenz, um die der sense-Primer verlängert werden muss, bewirkt eine gerichtete Klonierung.

Die Klonierung von PCR-Produkten mit Adenin-Überhängen, die bei PCRs mit Polymerase ohne proof-reading entstehen, erfolgte in den pCRII-TOPO[®]. Wie bei der gerichteten TOPO-Klonierung in den pcDNA3.1D/V5-His-TOPO[®] bewerkstelligt die Ligation von Insert und Vektor die Topoisomerase I, welche kovalent an die 3'-Phosphate der Tyrosin-Überhänge des offenen Vektors gebunden ist.

Für eine erfolgreiche TOPO-Klonierung reichte es aus den im Handbuch beschriebenen Ansatz zu halbieren (Tab 2.7). Die PCR-Fragmente wurden nur dann für die TOPO-Klonierung über ein DNA-Gel aufgereinigt, wenn Matrize der PCR und TOPO-Vektor dieselbe Antibiotika-Resistenz vermittelten. Das hat den Vorteil, zum einen falsch-positive Kolonien zu vermeiden und zum anderen war erfahrungsgemäß die Effizienz der Klonierungen höher, wenn PCR-Fragmente direkt eingesetzt wurden. Ein Vorteil der TOPO-Methode gegenüber der klassischen TA-Klonierung ist dass 80% der Ligationen bereits nach fünf Minuten stattgefunden haben. Trotz der hohen Reaktionsgeschwindigkeit wurden die Ansätze eine halbe Stunde statt fünf Minuten bei RT inkubiert und dann direkt für die Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli* eingesetzt.

Tab. 2.7 Zusammensetzung eines TOPO-Reaktionsansatzes

Reagenz	Volumen
DNA	2 µl
Salzlösung (1,2M NaCl, 0,06M MgCl ₂)	0,5 µl
TOPO [®] -Vektor	0,5 µl

2.3.4.2 T4-DNA Ligase-Ligation

Die T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas, St.Leon-Roth) katalysiert die ATP- und Mg²⁺ abhängige Verknüpfung von 3'- Hydroxy- mit 5'-Phosphat- Enden von doppelsträngigen DNA-Molekülen. Die T4-DNA Ligase wurde für die Umklonierung von kodierenden Sequenzen aus den Ausgangsvektoren in die Expressionvektoren verwendet (Tab. 2.8). Es

2. Material und Methoden

lassen sich nur DNA-Fragmente ligieren welche die gleiche Überhangsequenz tragen (klebrig-klebrig-Ligation) oder keine Überhangsequenz besitzen (stumpf-stumpf-Ligation). Wenn beide Fragmente sowohl ein klebrig als auch ein stumpfes Ende besitzen, spricht man von einer stumpf-klebrig Ligation. Es wurden ausschließlich klebrig-klebrig oder stumpf-klebrig Ligationen von zwei DNA-Fragmenten konzipiert und durchgeführt, weil diese sowohl effizienter sind, als auch in gerichteter Weise ablaufen.

Tab. 2.8 Zusammensetzung eines DNA-Ligationansatzes mit der T4 DNA-Ligase

Reagenz	Volumen / Menge
10x Ligationspuffer	2µl
Vektor-Rückgrat	400-800ng
Insert	im mehr als dreifachen molaren Überschuß
PEG4000	2µl (nur bei Ligationen mit blunt-end Fragmenten)
T4 DNA Ligase	2µl (1U/µl) bei klebrig-klebrig und 3µl bei stumpf-klebrig
dH ₂ O	add. 20µl

Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 21°C bzw. über Nacht bei 16°C inkubiert. Wenn der Ansatz über Nacht lief, wurde vor der Transformation von *E. coli* die T4 DNA-Ligase 20 min bei 65°C inaktiviert.

2.3.4.3 Gateway-Rekombination

Um die TPK cDNAs für die Transformation von Pflanzen vorzubereiten mussten diese in den Gateway-Destinationvektor pMDC32 (Curtis und Grossniklaus, 2003) eingebracht werden. Für Gateway® Klonierungs Reaktionen (Invitrogen, Karlsruhe) wurden die TPK cDNAs über eine „multiple cloning site“ (MCS) zwischen die „attachment L-sites“ des pENTR-MCS (siehe Kap. 2.3.9.6 und Kap. 7.8) kloniert. Die „LR clonase“-Reaktion, um die DNA-Fragmente der „Entry“-Klone in den „Destination“-Vektor pMDC32 (Curtis und Grossniklaus, 2003) zu übertragen wurden nach Angabe des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Mit 5µl des LR-Reaktionsansatzes wurden DH5α- *E. coli* mittels Hitzeschock transformiert.

2.3.5 PCR-Reaktionen

Die PCR-Technik wurde eingesetzt um bestimmte DNA-Sequenzen mit Hilfe spezifischer Primer exponentiell zu vermehren.

2.3.5.1 Primerdesign

Die Primersequenzen wurden mit Hilfe des Programms VNTI Advance 10 (Invitrogen, Karlsruhe) ausgewählt und die Schmelztemperatur mit Hilfe des Online-Rechners „OligoCalc“ (<http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) nach der „nearest neighbour“-Methode berechnet. Für die anschließende pcDNA3.1D-TOPO®- Klonierung wurde dem sense-Primern ein CACC am 5'-Ende angehängt. Oft wurden die Primer mit 5'-

terminalen Restriktionsschnittstellen versehen. Für die effektivere Restriktion solcher endständiger Schnittstellen wurden den Primersequenzen entsprechend der Vorgaben von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) zusätzliche Desoxyribonukleotide angehängt.

Synthetische Oligonukleotide (siehe Kap. 7.7) für die PCR-Amplifikation und gerichtete Mutagenesen wurden von Sigma (Hamburg) und Metabion (Martinsried) bezogen.

2.3.5.2 DNA-Polymerasen

Für die PCR-Reaktionen wurden ausschließlich zwei hitzestabile DNA-Polymerasen (-Mischungen) benutzt. Zum einen wurde für die Vorbereitung einer TOPO-TA Klonierung des PCR-Fragments das „BD Advantage™ 2 PCR Enzyme System“ (BD) (BD Bioscience, Heidelberg) verwendet. Dieser Polymerasemix besteht zum Großteil aus einer Nuklease-defizienten Taq Polymerase und einer kleinen Menge einer Korrektur-lesenden Polymerase und verbindet somit eine effektive, aber fehlerarme Amplifikation mit der Synthese von Adenin-Überhängen. Für TOPO-Klonierungen und die gerichtete Mutagenese wurde die Phusion (Ph) (Finnzymes, <http://www.finnzymes.fi>). Die Phusion ist eine rekombinante Polymerase mit Korrekturlesefunktion und sehr hoher Syntheserate (1KB/15-20s), so dass Mutagenese-Reaktionen nur weniger als ein Drittel der Zeit einer Mutagenese mit einer normalen DNA-Polymerase in Anspruch nehmen.

2.3.5.3 Die Standard-PCR-Reaktion

Die Standard PCR-Reaktion für die anschließende Rekombination der PCR Fragmente in einen Plasmidvektor wurde wie in Tab. 2.9 beschrieben angesetzt und durchgeführt. Als PCR-geräte dienten der „Mastercycler personal“ (eppendorf, Hamburg) und der „Primus Thermocycler“ (MWG-Biotech AG, Ebersberg).

2. Material und Methoden

Tab. 2.9 Zusammensetzung und Durchführung einer Standard-PCR-Reaktion

Komponente		Menge
Buffer		1x
dNTP-Mix (10mM)		0,2mM
template		100ng
Sense-Primer (10µM)		500nM
Antiense-Primer (10µM)		500nM
ddH ₂ O		add. 50µl
Polymerase (Mix)		1µl (BD)/0,5µl (Ph)
Zyklen	Temperatur °C (BD/Ph)	Zeit (BD/Ph)
1	95/98	3:00min/ 1:00min
20-25	95/98	0:30min/ 0:20min
	Annealing (Primer-abhängig)	0:30min/ 0:30min
	68/72	1:00min/Kb / 0:20min/Kb
1	68/72	15:00min/ 5:00min

2.3.5.4 gerichtete *in vitro*-Mutagenese

Die gerichtete *in vitro*-Mutagenese ist ein Abwandlung des PCR-Grundprinzips, um auf Grundlage eines zirkulären Plasmids gerichtet Mutationen in Gene einzuführen. Für eine IvM werden die Primer so synthetisiert, dass beide die Mutation in der Mitte ihrer Sequenz enthalten und somit komplementär zu einander sind und eine Schmelztemperatur möglichst über 72°C besitzen. Aufgrund der Fehlpaarung in der Mitte der Primer ist die Schmelztemperatur der Primer-Matrix-Heteroduplexe niedrigerer als 72°C und niedriger als der Primerduplexe. Deswegen wurde eine Annealingtemperatur deutlich unter 72°C bei etwa 50-55°C gewählt. Bei der gerichtete *in vitro*-Mutagenese kann keine exponentielle Vermehrung der DNA stattfinden wie es bei einer Standard-PCR der Fall ist. Aus diesem Grund wurde für eine IvM mehr template-DNA eingesetzt, 200ng-400ng, dafür aber weniger Zyklen gefahren, 20-25. Als DNA-Polymerase wurde die Phusion (Finnzymes, <http://www.finnzymes.fi>) benutzt.

Um zu verhindern, dass die nicht mutagenisierte template-DNA transformiert wird, wurde dem kompletten Ansatz 1µl DpnI (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) zugefügt und bei 37°C 1h verdaut. DpnI ist eine Endonuclease, die spezifisch die methylierte template-DNA zerschneidet (Erkennungssequenz: 5'-Gm₆ATC-3'), während die nicht methylierte, *in vitro* synthetisierte DNA unberührt bleibt. 15µl des Reaktionsansatzes wurden anschließend auf einem 1%-Agarose Gel analysiert, und wenn eine auch nur schwache Bande zu sehen war wurde DpnI für 20 min bei 80°C inaktiviert und der Ansatz für die chemische Transformation von XL1 blue MRF' verwendet. Positive Klone wurden, falls eine Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde, durch Restriktion identifiziert und in jedem Fall durch Sequenzierung verifiziert.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Größenauftrennung von DNA-Fragmenten aufgrund ihrer, durch das Phosphatrückgrat, negativen Ladung. Wird in einer mit einer Salzlösung gefüllten Kammer eine Spannung angelegt kann man DNA in dieser Kammer in eine Richtung, vom Minus-Pol zum Plus-Pol der Spannungsquelle, laufen lassen. Um eine Größenauftrennung der DNA zu bekommen, wird die DNA in ein Gel aus Agarose eingebracht, das sich zwischen beiden Polen befindet. Aufgrund der im Agarosegel vorhandenen Porenstruktur laufen kleinere DNA-Fragmente schneller durch das Gel. Durch die Konzentration von Agarose im Gel lässt sich die Porengröße so beeinflussen, dass man die optimale Größenauftrennung der Länge der DNA-Fragmente anpassen kann. So lassen sich in einem 3%igen Agarose-Gel Moleküle von 50-1000bp, in einem 2%igen Agarose-Gel Moleküle von 100-4000bp und in einem 1%igen Agarose-Gel Moleküle von 400-7000bp gut voneinander trennen. Zur Sichtbarmachung der DNA dient Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert und durch UV-Licht angeregt längerwelliges Licht emittiert.

Den zu untersuchenden DNA-Proben wurde vor der Auftragung aufs Gel ein Viertel ihres Volumens an 5x DNA-Probenpuffer (Tab. 2.10) zugefügt. Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurde eine Elektrophorese-Kammer mit 1x TBE (Tab. 2.10) als Laufpuffer befüllt, der aus einer 10x Stocklösung verdünnt wurde. Für X %ige Agarosegele wurde X g Agarose in 100ml 1xTBE durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 1µl Ethidiumbromid (10mg/ml) versetzt und in ein mit einem Kamm bestückten Gelschlitten ergossen. Als DNA-Marker dienten λ-Pst (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) und die „Seegene forever 100Bp-Ladder“ (BioGene Ltd, Kimbolton, UK).

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente aus PCR und Restriktion wurde in der Regel eine Spannung von 80 V für 30-60min angelegt. Anschließend wurden die Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Tab. 2.10 Zusammensetzung von 5x DNA-Probenpuffer und 10x TBE

5x DNA-Probenpuffer		10x TBE	
Bromphenolblau	0,25 %	Tris	0,9M
Xylencyanol	0,25 %	Borsäure	0,9M
EDTA	100 mM	EDTA	20 mM
Glycerin	50 %	in ddH ₂ O	pH 8,3
in ddH ₂ O			

2.3.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Verwendung in Ligationen oder PCRs mussten DNA-Fragmente, die zuvor in DNA-Agarosegelen aufgetrennt wurden, aus denselben wiedergewonnen werden. Die Methodik beruht auf einem Einschmelzen der DNA bei 50°C in einem Puffer mit hoher Konzentration

2. Material und Methoden

an chaotropen Salzen (z.B. Guanidinhydrochlorid) mit anschließender Bindung an eine Silikat-Matrix, niedrig-Salz Waschung und Elution mit 20-30µl ddH₂O (pH8, 1mM Tris). Hierfür verwendet wurde das „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden).

2.3.8 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte auf Basis der Absorption (A_{260}) der Nucleotide bei 260nm. Diese wurde mit einem UV-Spektrophotometer (GeneQuant pro RNA/DNA Calculator, GE Healthcare, München) gemessen. Die Berechnung der DNA-Konzentration (c) erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz anhand der Formel $c (\mu\text{g/ml}) = A_{260} * F * \text{Verdünnungsfaktor}$. Der Verdünnungsfaktor war 35 und der Faktor F gibt die DNA/RNA-Konzentration bei einer OD von eins und einer Schichtdicke von 1cm an, die bei 40µg/ml für RNA und bei 50µg/ml für DNA liegt.

2.3.9 Klonierungsstrategien

2.3.9.1 Klonierung der TPK1/TPK4 Chimären und halben Kanäle.

Für die Synthese der Porenchimären, TPK4P1-TPK1P2 und TPK1P1-TPK4P2, mussten zuerst durch die Sequenzen vor und nach der putativen TM3 amplifiziert werden. Dazu dienten die folgenden Primerpaare:

TPK1-P1: TPK1s und TPK1-TM3as

TPK1-P2: TPK1-TM3s und TPK1as

TPK4-P1: TPK4s und TPK4TM3as

TPK4-P2: TPK4-TM3s und TPK4as

Die P1-PCR Produkte wurde in den pcDNA3.1D-V5-His-TOPO[®] (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>) and P2-PCR Produkte in den pCRII-TOPO[®] kloniert. Daraufhin wurden die Kanalfragmente über XhoI and EcoRI innerhalb des *TPKx-P1*/pcDNA3.1D-V5-His-TOPO kombiniert und schließlich über BamHI and Eco47III in den *mGFP4/pPILY* umkloniert.

Die halben TPK1 und TPK4 Kanäle (TPK4-P2/TPK1-P2), die nur aus N-Terminus, TM3-Pore2-TM4 und C-Terminus des jeweiligen Kanals bestehen, wurden durch Klonierung des TPKx-P2 in TPKx-NT-EcoRI/pcDNA3.1D über XhoI und EcoRI generiert. Anschließend erfolgte die Umklonierung in den TPK1::mGFP4/pPily über Cfr9I und Eco47III.

Um den zytoplasmatischen Loop des TPK4 durch den des TPK1 zu ersetzen (TPK4loopTPK1/pGEMKN), wurde zuerst TPK4 aus dem pcDNA3.1D über BamHI und XhoI in den Ozytenexpressionvektor pGEMKN kloniert. Anschließend wurde die TPK1 Loop-Sequenz mit TPK1TM2s und TPK1TM3as und TPK4/pGEMKN ohne Loop mit TPK4TM3s und TPK4TM2as amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit KspAI und EcoRI geschnitten, dann aufgereinigt und schließlich direkt ligiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten pGEM-Vektoren (...HE/KN) basieren auf dem pGEM-3Z (Promega cooperation, Madison, USA; emb_X65304) und sind mit dem 5' und 3'UTR des Xenopus β-Globin Gens versehen (Liman *et al.*, 1992). Über SP6 und T7 Promotoren

ermöglichen diese Vektoren die *in vitro* Transkription und eine starke Expression der Kaliumkanäle in *Xenopus leavis* Oozyten.

2.3.9.2 Klonierung der TPK1/TPK3-Deletionsmutanten

Für die Konstruktion der TPK1 Deletionsmutanten wurde zuerst eine PCR mit dem TPK1s Primer und den in Tab. 2.11 gelisteten as-Primern auf der TPK1cDNA durchgeführt

Tab. 2.11 Für die TPK1-Deletionsmutanten verwendete as-Primer

Name der Mutante = Name des Primers	Zusammensetzung der Mutante (WT = aa1-363)
TPK1 Δ CT	aa 1-273
TPK1 Δ H1	aa 1-284
TPK1 Δ L1	aa 1-299
TPK1 Δ H2	aa 1-308
TPK1 Δ L2	aa 1-321
TPK1 Δ H3	aa 1-327
TPK1 Δ L3	aa 1-338

Die PCR-Produkte wurden wiederum erst in den pCRII-TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert, um dann über Cfr9I and Eco47III/KspAI in ein zusammenhängendes Leseraster mit entweder *mRFP1* (Campbell *et al.*, 2002) oder *mGFP4* (Haseloff *et al.*, 1997) innerhalb des pPily (Ferrando *et al.*, 2000, Latz *et al.*, 2007a) gebracht zu werden.

Ähnlich entstand die TPK3 Mutante mit fehlendem C-Terminus durch eine PCR mit TPK3s und TPK3 Δ CT, anschließender pCRII-TOPO®-Klonierung und Ligation in den mRFP1/pPily über XbaI und KspAI/Eco47III.

2.3.9.3 Klonierungen der TPK4 Punktmutanten und Deletionen

TPK4 wurde aus dem pcDNA3.1D über BamHI und XhoI in den Oozytenexpressionvektor pGEMKN kloniert. Auf diesem Plasmid wurden gerichtete Mutagenesen mit den Primern D86N, D200N, D110A, D110N, D110R, Y198F und den komplementären anti-sense Primern durchgeführt. Außerdem wurden die Deletionskonstrukte TPKd1-16 und TPKd263-284 durch Standard-PCRs auf diesem Plasmid und mit TPK4 Δ 1-16s/TPK4as, bzw. TPK4s/TPK4 Δ 263-284as als Primer amplifiziert. Die aufgereinigten PCR Fragmente wurden dann direkt über Cfr9I und KspAI/Eco47III in den TPK4/pGEMKN kloniert.

2.3.9.4 Klonierung der Einzeltransmembran-Konstrukte

Die Vektoren *TPK1-TMD4/pSAT6A-RFP-N1*, *TPK1-TMD4-CT/pSAT6A-RFP-N1*, und *TPK3-TMD4/pSAT6A-RFP-N1* entstanden durch PCRs mit TPK1/TPK3 cDNA als Matrize, anschließender pCRII-TOPO®-Klonierung der PCR-Produkte und Rekombination in

2. Material und Methoden

pSAT6A-RFP-N1 (Chung *et al.*, 2005). Für *TPK3-TMD4* wurden TPK3P2ms und TPK3CTas als Primer benutzt und HindIII und KspAI als Schnittstellen für die Umklonierung in den mit SmaI und HindIII geöffneten pSAT6A-RFP-N1. Für *TPK1-TMD4(-CT)* wurden als Primer TPK1P2ms und TPK1 Δ CTas (TPK1as) verwendet und die Umklonierung basierte auf HindIII und KspAI (Eco47III).

2.3.9.5 Klonierung der TPK4/TPKx Porenchimären

Um den ersten bzw. den zweiten Poren-Loop der TPKs und des KCO3 in den TPK4 einzubauen und somit der elektrophysiologischen Untersuchung in *Xenopus* Oozyten zugänglich zu machen, wurden innerhalb der TM1 und TM2 durch gerichtete Mutagenese Bst1107I und BamHI Restriktionsschnittstellen und in TM3 und TM4 AgeI und NaeI Schnittstellen in den TPK4 (/pGEMHE) eingefügt.

Die Poren-Loops des TPK4, der übrigen TPKs und des KCO3 wurde mit Primern PCR-amplifiziert, die eine den jeweiligen Restriktionsschnittstellen entsprechende 5'- Extension besaßen. Die PCR-Produkte wurden daraufhin in den TPK4AgeI-NaeI/pGEMHE (pore2TPK1, pore2TPK2, pore2TPK3, pore2TPK5, pore1KCO3), wenn nur die erste Porendomäne getauscht werden sollte, und in den TPK4Bst1107I-BamHI-AgeI-NaeI/pGEMHE (TPK4pore1pore2TPK1, TPK4pore2pore2, TPK4pore2pore1, TPK4pore1pore1), wenn beide Porendomänen getauscht werden sollten, ligiert. Die primäre Aminosäuresequenz dieser Porenchimären kann aus einem Alignment entnommen werden (Kap 3.9)

2.3.9.6 Klonierung der TPK cDNA in den Pflanzenexpressionsvektor pMDC32

Um die TPK cDNAs in Tabak überexprimieren und dann auch die Kanäle nachweisen zu können, wurde zunächst ein passender V5-„tag“ generiert. Dazu wurden zwei komplementäre Primer von 76 bp Länge mit der V5 Sequenz (V5-watson/V5-crick) in einem Thermocycler in equimolarer Menge hybridisiert und anschließend in den pcDNA3.1D-TOPO[®] kloniert. In den V5/pcDNA3.1D wurde dann TPK1 aus TPK1/pcDNA3.1D über BamHI und Eco47III vor (5') V5 kloniert. Aus diesem Vektor wiederum wurde TPK1::V5 über KpnI und Cfr9I in den pENTR-MCS kloniert. Der Klonierungsvektor pENTR-MCS wurde in unserer Arbeitsgruppe von Elisabeth Dunkel unter Anleitung von Dirk Becker hergestellt und beruht im wesentlichen auf dem pENTR/D-TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe), der die Ampicillin-Resistenz aus dem pUC18 (Accession bei ncbi L08752) und die „multiple cloning site“ aus dem pBlu2KSP (Accession bei ncbi X52327) zwischen den „Attachment L-sites“ besitzt. Die Klonierung in den pENTR-MCS ermöglicht die LR-Rekombination des TPK1::V5 in den Pflanzenexpressionsvektor pMDC32 (Curtis und Grossniklaus, 2003). Dieser besitzt wie die meisten anderen binären „Destination“-Vektoren ein Kanamycin-Resistenzgen und kann somit von nicht-rekombinierten TPK1::V5/pENTR-MCS-Vektoren selektiert werden.

Die anderen vakuolären TPKs, die TPK1-Deletionsmutanten Δ CT, Δ L1, Δ H2 und KCO3 wurden entsprechend Tab. 2.12 den TPK1 ersetzend in den TPK1::V5/pENTR-MCS kloniert und wiederum in den pMDC32 rekombiniert.

Tab. 2.12 Strategie für die Klonierung der TPKs, des KCO3 und der TPK1 Mutanten in den TPK1::V5/pENTR-MCS

Ausgangsvektor (AV)	Restriktion über AV/pENTR-MCS	Endvektor (EV)
<i>TPK1ΔCT::mGFP4/pPily</i>	Cfr9I-HpaI/ Cfr9I-Eco47III	<i>TPK1ΔCT::V5/pENTR-MCS</i>
<i>TPK1ΔL1::mGFP4/pPily</i>	Cfr9I-Eco47III/ Cfr9I-Eco47III	<i>TPK1ΔL1::V5/pENTR-MCS</i>
<i>TPK1ΔH2::mGFP4/pPily</i>	Cfr9I-Eco47III/ Cfr9I-Eco47III	<i>TPK1ΔH2::V5/pENTR-MCS</i>
<i>TPK2/pcDNA3.1D</i>	Cfr9I-Eco47III/ Cfr9I-Eco47III	<i>TPK2::V5/pENTR-MCS</i>
<i>TPK3/psGEM</i>	NotI-Eco47III/ NotI-Eco47III	<i>TPK3::V5/pENTR-MCS</i>
<i>TPK5/pcDNA3.1D</i>	Cfr9I-Eco47III/ Cfr9I-Eco47III	<i>TPK5::V5/pENTR-MCS</i>
<i>KCO3/pcDNA3.1D</i>	Cfr9I-Eco47III/ Cfr9I-Eco47III	<i>KCO3::V5/pENTR-MCS</i>

2.3.9.7 Klonierung der BiFC-Konstrukte

Zur Untersuchung der Interaktion der TPKs und des TPC1 wurden die CDS dieser Kanäle in den pUC-SPYCE(M) und den pUC-SPYNE-173 (Rainer Waadt *et al.*, in preparation) entsprechend Tabelle 2.13 umkloniert (siehe auch Kap 2.6.2).

Tab. 2.13 Klonierungsstrategie für die BiFC-Analyse der Kanalinteraktion

Ausgangsvektor (AV)	Restriktion über AV/ pSPYCE(M) und pSPYNE-173	EV (.../pSPYCE(M) und .../pSPYNE-173)
TPC1/pCRII (T7)	XbaI-Eco47III/XbaI-SmaI	TPC1/...
TPK1/pcDNA3.1D	BamHI-Eco47III/BamHI-SmaI	TPK1/...
TPK2/pcDNA3.1D	BamHI-Eco47III/BamHI-SmaI	TPK2/...
TPK4/pcDNA3.1D	BamHI-Eco47III/BamHI-SmaI	TPK4/...
TPK5/pcDNA3.1D	KpnI-Eco47III/KpnI-SmaI	TPK5/...
TPK3/psGEM	XbaI-Eco47III/XbaI-SmaI	TPK3/...

2.3.10 Sequenzierung

Die rekombinierten und mutagenisierten cDNAs wurden allesamt durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Die Reaktion beruhte auf dem Kettenabbruchverfahren, das von Frederick Sanger 1977 entwickelt wurde (Sanger *et al.*, 1977). Dazu wurde zuerst eine Amplifikation mit dem „Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems (AB), Foster City, CA, U.S.A.) und einem spezifischen Primer angesetzt. Die dabei entstandenen Fragmente wurden mit dem „3100 Avant Genetic Analyzer“ (AB)

2. Material und Methoden

aufgetrennt und die Fluoreszenz ausgelesen. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der zugehörigen Software (AB). Die Sequenzierdaten wurden mittels AlignX und ContigExpress (Invitrogen, Karlsruhe) analysiert und mit den vorhergesagten Sequenzen verglichen.

2.3.11 Kryokonservierung

Für die Langzeitaufbewahrung der genetisch veränderten *E. coli*/Agrobakterien wurden die durch Restriktion und Sequenzierung verifizierten Klone in LB/YEP-Medium mit 20%/15% Glycerin aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, um dann bei -80°C gelagert zu werden.

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Proteinextraktion aus Tabak

Zur Kontrolle der erfolgreichen Transformation der Tabakpflanzen mittels Agrobakterien wurden etwa 100mg Blattmaterial in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß und flüssigem Stickstoff eine Minute bei einer Frequenz von 30Hz in einer Kugelmühle gemörsert (MM300, Retsch, Haan). Das zermörserte und tiefgefrorene Blattmaterial wurde in 500µl RIPA-Puffer (Tab. 2.14) aufgenommen, der frisch mit Proteaseinhibitoren („complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Mini EDTA-free“, Roche, Mannheim) versetzt wurde. Daraufhin wurden die Proteine eine halbe Stunde bei 4°C und langsamen Rotieren extrahiert, um dann durch Zentrifugation (14000rpm, 5', 4°C) vom Zelldebris gereinigt zu werden. Die Proben wurden schließlich entweder kurzzeitig bei -20°C aufgehoben oder gleich im Western/Dot Blot analysiert.

Tab. 2.14 Zusammensetzung des RIPA-Puffers

RIPA-Puffer	
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	20mM (pH7)
Triton X-100	1%
SDS	0,1%
EDTA	2mM
DTT	1mM (nach Autoklavierung)

2.4.2 Diskontinuierliche, denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größenfraktionierung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Im Gegensatz zu Nukleinsäuren, die durch das Phosphatrückgrat eine der Molekülgröße proportionale Ladung bekommen, ist die Ladung eines Proteins stark abhängig vom pH-Wert und von seiner Aminosäurezusammensetzung. Bei der elektrophoretischen Auftrennung in einem nativen Agarose- oder Polyacrylamidgel würde die Migrationsgeschwindigkeit eines Proteins von dem Verhältnis aus Netto-Ladung und Molekulargewicht abhängen. Um

Proteine dennoch nach ihrer Größe aufzutrennen, wird dem Gel und den Proben SDS zugegeben. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches über sein hydrophobes Ende an Proteine bindet und zwar in einem zur Proteingröße proportionalen Verhältnis (1g SDS bindet 1,4g Protein). So entsteht eine stark negative Ladung, die der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Darüberhinaus zerstört SDS Wasserstoffbrückenbindungen, blockiert hydrophobe Wechselwirkung und minimiert somit Unterschiede in der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Durch den Zusatz des Reduktionsmittels DTT, das kovalente Disulfidbrücken auflöst, kann SDS die Proteine komplett entfalten.

Tab. 2.15 Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gel

Komponente	Trenngel 12%	Sammelgel
4x Tris-Cl/SDS, pH8,8 (1,5M Tris-Cl; 0,4% SDS)	2,5ml	x
4x Tris-Cl/SDS, pH6,8 (0,5M Tris-Cl; 0,4% SDS)	x	2,5ml
dH ₂ O	4,4ml	6,6ml
40% Acrylamid	3,0ml	0,8ml
10% Ammoniumpersulfat	50µl	100µl
TEMED	5µl	10µl

Bei der SDS-PAGE ist die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins im elektrischen Feld abhängig von der elektrischen Feldstärke und dem Reibungskoeffizienten, der von der mittleren Porengröße des Gels und der Proteingröße abhängt.

Für ein Polyacrylamidgel wurde zuerst ein Trenngel (Tab 2.15) in einem vertikalen „Dual Gel-Caster“ (Höfer Inc., San Francisco, CA, USA) gegossen und mit dH₂O überschichtet. Auf das polymerisierte Trenngel wurde nun das Sammelgel (Tab 2.15) gegossen und mit einem Kamm für die Geltaschen versehen. Das fertige Gel wurde nun vertikal in einer Elektrophoresekammer (SE250, Höfer Inc., San Francisco, CA, USA) mit SDS-Laufpuffer (Tab. 2.16) eingespannt. Je nach Größe der Geltaschen wurden 20-40µl Proteinlösung mit 6x SDS Probenpuffer (Tab. 2.16) versetzt und für 6 min bei 80°C gekocht und danach in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Als Größenmarker und zur Kontrolle der Effizienz des anschließenden Transfers diente der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ oder die „Pageruler Protein Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese wurde mit 10mA gestartet. Sobald die Bromphenolblaubande des Probenpuffers das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf 20mA erhöht.

2. Material und Methoden

Tab. 2.16 Zusammensetzung von SDS-Laufpuffer und SDS-Probenpuffer

5x SDS-Laufpuffer		6x SDS Probenpuffer	
Tris	0,125M	4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8 (0,5M Tris-Cl; 0,4% SDS)	7ml
Glycin	0,96M	Glycerol	24%
SDS	0,5%	DTT	0,2M
H ₂ O	add. 1l	Bromphenolblau	0,012%
		SDS	8%
		H ₂ O	add. 10ml

2.4.3 Western Blot

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Hybond-P, GE Healthcare, München) transferiert. Dazu wurde das Gel und die PVDF-Membran 20 min in Transferbuffer (Tab. 2.17) inkubiert. Zuvor wurde die PVDF-Membran mit Methanol getränkt und anschließend in dH₂O gewaschen. Daraufhin wurden von der Anode zur Kathode eines Elektrobloppers drei in Transferbuffer getränkte Whatman Papiere, die PVDF-Membran, das Gel und wieder drei in Transferbuffer getränkte Whatman Papiere luftblasenfrei aufeinander gelegt. Der Transfer erfolgte bei 70mA für 2h. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in PBST (Tab. 2.17) geblockt. Nach dem Absättigen der freien Bindestellen wurde der primäre Anti-V5 Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe) 1:5000 in PBST verdünnt zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in PBST wurde ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Anti-Maus Antikörper (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) als sekundärer Antikörper 1:20.000 in PBST verdünnt zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran wiederum dreimal in PBST gewaschen, um die ungebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Die Detektion der Meerrettichperoxidase erfolgte mit dem „Enhanced ChemiLuminescence Detection Kit“ (Applichem, Darmstadt) nach den Vorgaben des Herstellers. Die Lumineszenz wurde aufgenommen mit dem „ChemiLux Imager“ (Intas, Göttingen).

Tab. 2.17 Zusammensetzung von Transferpuffer und PBS(T)

Transferpuffer		PBS (PBST) pH7,4	
Tris	3g	NaCl	8g
Glycin	14,4g	KCl	0,2 g
Methanol	150ml	Na ₂ HPO ₄	1,44 g
ddH ₂ O	add. 1l	KH ₂ PO ₄	0,24 g
		ddH ₂ O	add. 1l
		(Tween 20	0,1%)

2.4.4 Dot Blot

Der Dot Blot wurde nach dem Protokoll der Firma GE Healthcare für das manuelle dotblotten von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Hybond-P, GE Healthcare, München) durchgeführt. Im wesentlichen wurde ein Stück PVDF-Membran zurechtgeschnitten, in Methanol angefeuchtet, dann mit dH₂O und PBS gewaschen und zum Blotten auf mit PBS voll gesogenes Whatman-Papier gelegt. Sobald keine Flüssigkeit auf der Membran mehr zu sehen war, wurden ohne die Membran zu verletzen 2µl der Proteinprobe aufgetragen. Sobald diese eingetrocknet waren, wurde die Membran sofort in eine Schale mit PBST und 5% entfettetes Milchpulver gegeben und für eine Stunde geblockt. Zur Proteindetektion wurde mit der Membran wie mit einem normalen Western Blot verfahren.

2.5 Pflanzentransformation mittels „Particle Bombardment“

Es gibt verschiedene Wege Pflanzenzellen zu transformieren. Die am häufigsten angewendete Methode bedient sich dem natürlichen DNA-Transfer durch Agrobakterien (siehe Kap. 2.7). Eine andere Methode, die industriell dazu verwendet wird Resistenzen in Pflanzenzellen zu etablieren ist das „Particle Bombardment“. Diese Technik, erstmals von Klein beschrieben (Klein *et al.*, 1988a, Klein *et al.*, 1988b), beruht darauf DNA auf einem Trägermaterial zu verkleben und mittels Überdruck, praktisch per Bombardement, in intakte Pflanzenzellen einzuschleusen. Es lassen sich damit nahezu alle Zelltypen und Pflanzenarten transformieren, aber die Effektivität variiert dabei sehr stark, weswegen viele unterschiedliche Protokolle etabliert wurden. Leider war es gerade bei *Arabidopsis thaliana* nur schwer möglich diese mit den in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten zu transformieren, weswegen die Untersuchungen zur Lokalisation an handelsüblichen Zwiebeln oder *Nicotiana benthamiana* und die Untersuchungen zur Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) an Zwiebeln und handelsüblichen Lauch durchgeführt wurden. Diese Expressionssysteme zeichnen sich durch eine gute Transffektionseffizienz aus und eignen sich im Falle von Zwiebel und Lauch aufgrund fehlender Chloroplasten bzw. Chlorophyllfluoreszenz hervorragend für die Fluoreszenzmikroskopie.

2.5.1 Probenvorbereitung

Im ersten Schritt der Probenvorbereitung wurden 50mg Wolframpartikel mit einem Durchmesser von 1,1µm (tungsten M-17, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in einem 1,5ml Reaktionsgefäß abgewogen und mit 1ml destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 50mg/ml gebracht.

Für einen vollen Ansatz wurden 100µl dieser Wolframsuspension in einem neuen 1,5ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Unter Vortexen wurden nun 20µl DNA (1µg/µl, bei Co-Transformationen je 10µl), 100µl 2,5M CaCl₂ und 40µl Spermidin-trihydrochlorid zugegeben und für weitere 3 min gevortext. Danach wurde die DNA mit 600µl 100% eiskaltem Ethanol für 30min bei -20°C gefällt. Schließlich wurden die Wolframpartikel in 100µl dH₂O gut

2. Material und Methoden

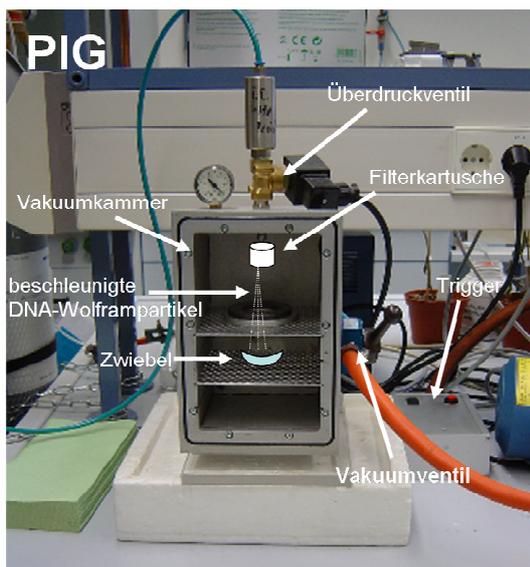
resuspendiert und waren somit zum Beschuss fertig. Um DNA zu sparen, wurde der Ansatz gegebenenfalls halbiert oder es wurden die Reste bei -20°C für eine späteren Beschuss aufgehoben.

2.5.2 Beschuss von Pflanzenzellen

Für einen Schuss wurden $10\mu\text{l}$ der DNA-Wolframsuspension in eine Filterkartusche pipettiert und diese in eine Particle Inflow Gun (PIG) nach Liner eingeschraubt. Nachdem die Porbe zurechtgeschnitten und in 12cm Abstand unter der Kartuschenöffnung platziert wurde, wurde ein 0,8 bar Unterdruck erzeugt und die DNA-Wolframsuspension durch einen kurzzeitigen 8-9 bar Heliumüberdruck aus der Kartusche auf das Gewebe geschossen.

Danach wurden die Pflanzenproben entnommen und auf 1x MS-Agarplatten (2% AgarAgar dänisch) gelegt, um die Luftfeuchtigkeit hochzuhalten. Die Platten wurden bis zur Mikroskopierung bei RT und im Dunkeln aufbewahrt.

Abb. 2.1 Aufbau einer „Particle Inflow Gun“ (PIG)



Die *Particle Inflow Gun* nach Liner stellt eine Vakuumkammer dar, welche über zwei Ventile mit einer Vakuumpumpe und einer Heliumdruckflasche verbunden ist. Das zu transfizierende Pflanzenmaterial wird zentral in der Kammer platziert. Die DNA-Probe wird in eine Filterkartusche pipettiert und diese direkt unter das Druckluftventil geschraubt. In der Kammer wird ein Unterdruck von 0,8 bar erzeugt und über einen Trigger das Druckluftventil kurzzeitig geöffnet, so dass die Wolframpartikel durch den Druckunterschied von 8,8 bar angetrieben die Zellwände der Pflanzenzellen durchschießen.

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

2.6.1 Fluoreszierende Proteine

Das grün fluoreszierende Protein GFP wurde Anfang der 60 Jahre als Beiprodukt bei der Extraktion von Aequorin aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* entdeckt (Shimomura *et al.*, 1962). Dieses Protein besitzt ein Fluorophor welches durch Photonen bestimmter Wellenlängen (Absorptionsmaxima bei 396nm und 475nm) angeregt wird und nach wenigen Nanosekunden in den Grundzustand übergeht. Die dabei frei werdende Energie kann als

Fluoreszenzlicht abgegeben werden oder nicht strahlend eine Schwingungsrelaxation bewirken. Dieser nicht strahlende Energieverlust bewirkt, dass die emittierten Photonen längerwelliger (energieärmer) sind als die Anregungsphotonen (Stokes-Verschiebung). Im Falle des GFP bedeutet das eine Verschiebung ins Grüne. Bereits 1996 wurde anhand röntgenkristallographischer Untersuchungen die dreidimensionale Struktur des GFP aufgeklärt (Ormo *et al.*, 1996). GFP formt mit 11 antiparallel verlaufenden β -Faltblatt-Strängen eine Art Tonne in deren Zentrum sich der Fluorophor befindet (Abb. 2.2). Der Fluorophor bildet sich autokatalytisch aus den drei Aminosäuren Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ (Cody *et al.*, 1993), weswegen das GFP als Reporterprotein in nahezu allen Organismen fungieren kann und dabei den Einsatz kostspieliger künstlicher Fluorophore überflüssig macht. Dennoch war die Anwendung in Pflanzen zunächst beschränkt, weil ein kryptisches Intron von 86 bp Länge die Fluoreszenz des GFP in Pflanzen herabsetzte. Erst mit der Entdeckung dieses Introns und einem veränderten Codongebrauchs wurde es möglich GFP (mGFP4) effektiv auch als cDNA einzusetzen (Haseloff *et al.*, 1997).

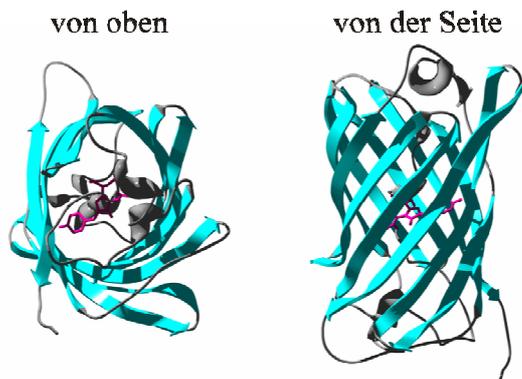


Abb. 2.2 Kristallstruktur des GFP aus *Aequorea victoria*

Dargestellt ist die Tertiärstruktur mit den 11 β -Faltblättern (türkis) und dem zentralen Fluorophor (magenta). Das Modell entstand aus den Koordinaten des „Swiss-Prot entry“ P42212 (pdb entry 1W7S).

Neben GFP existieren mittlerweile die verschiedensten fluoreszierenden Proteine und GFP-Varianten (BFP/CFP/YFP), die sich in Anregung, Emission, Fluoreszenzintensität, Photostabilität und vielen anderen Eigenschaften unterscheiden. Diese ermöglichen es unter anderem, verschiedene Fluoreszenzen in eine Zelle einzubringen und somit Proteine innerhalb einer Zelle unterscheidbar zu markieren. So wird in dieser Arbeit häufig das rot fluoreszierende Protein mRFP1 verwendet (abgeleitet aus einem Gen der Koralle *Discosoma spec.*). Dieses Protein wird bei ca. 580 nm angeregt, emittiert rotes Licht bei ca. 615 nm (Campbell *et al.*, 2002) und lässt sich deswegen relativ gut von der GFP-Fluoreszenz trennen.

2.6.2 Bi-molekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation ist es möglich die Interaktion und die Kolokalisation von in der Regel unterschiedlichen Proteinen *in vivo* zu studieren. Sie basiert auf einem in zwei Hälften geteilten YFP. Die beiden Hälften können für sich alleine nicht fluoreszieren, wohl aber wenn beide Hälften komplementieren. Als Paar mit der höchsten Fluoreszenzintensität erwiesen sich YFPaa1-154 und YFPaa155-238 (Hu *et al.*, 2002). Wenn man jede Hälfte mit einem anderen Protein kovalent verknüpft, kann man anhand der Fluoreszenzkomplementation die Proteininteraktion erkennen und in der Zelle

2. Material und Methoden

lokalisieren. Gegenüber der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) –Analyse, bei der die Proteininteraktion als Veränderung in der Fluoreszenzintensitäten von zwei intakten Fluoreszenzproteinen messbar ist, hat sie den Vorteil, dass es nur ein zwei Zustände des YFP gibt, fluoreszierend und nicht fluoreszierend. Sie ermöglicht also einen technisch einfachen und vermeintlich sicheren Nachweis der Proteininteraktion. Gleichzeitig bedeutet diese Einfachheit eine Einschränkung der Anwendung gegenüber FRET. Es können keine Konformationsveränderungen mehr nachgewiesen werden können, sobald sich YFP einmal zusammengesetzt hat. Auch ist die YFP-Komplementation irreversibel und verhindert so eine transiente Interaktion, gleichzeitig gibt es natürlich eine Tendenz zur Selbstkomplementation der YFP-Hälften und somit zum Anzeigen von falsch positiven Interaktionen (Walter *et al.*, 2004, Voelker *et al.*, 2006).

Für die Untersuchung der Interaktion der TPK Kanaluntereinheiten wurden zwei BiFC-Vektorkombinationen für die Expression in Pflanzen benutzt. Diese wurden uns freundlicher Weise von Prof. Jörg Kudla und seinen Mitarbeitern (Universität Münster) zu Verfügung gestellt. Das eine Vektorset basierte auf den YFP-Fragmenten wie sie von Hu und Mitarbeitern (2002) verwendet wurden, pUC-SPYCE (aa1-154) und pUC-SPYNE (aa155-239) (Walter *et al.*, 2004). Das andere Vektorset basiert auf pUC-SPYCE und pUC-SPYNE, wobei von Rainer Waadt (Universität Münster) die YFP-Hälften modifiziert wurden, um die Selbstkomplementation des YFP zu unterdrücken. Diese Modifikation beinhaltet die Verlängerung der YFP-N-terminalen Hälfte bis zur 173. Aminosäure (pUC-SPYNE-173), so dass eine Überlappung der YFP-Hälften entsteht (aa155-173) und außerdem eine Mutation, A206K, in der C-terminalen Hälfte (pUC-SPYCE(M)), die ebenfalls unspezifische Komplementation unterdrücken soll (Rainer Waadt, in preparation) (Abb. 2.3).

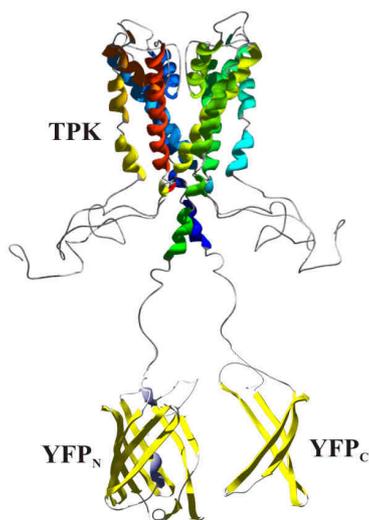


Abb. 2.3 Modell der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation durch die Interaktion zweier Kanaluntereinheiten

Die N- und C-terminalen Enden des YFP sind über Peptidbindungen kovalent an einen Terminus einer TPK Kanaluntereinheit gebunden. Bei der Bildung der homo- oder heteromeren Kanäle kommt es zu einem Zusammenschluss der beiden YFP-Hälften und zur Bildung eines durch blau-grünes Licht zur Fluoreszenz anregbaren YFPs.

2.6.3 Theorie und technischer Hintergrund zum konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

Alle Aufnahmen von Pflanzenzellen die ein oder zwei Fluoreszenzproteine (FP) exprimierten wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) LSM 5 Pascal von Zeiss gemacht. Das LSM-Modul ist dabei auf einem aufrechten Mikroskop (Axioskop 2 MOT) angebracht. Zur Anregung der FP ist das LSM5 Pascal mit einem 25mW Argon und einem 1mW Helium/Neon-Laser ausgestattet, die Photonen definierter Wellenlängen (458nm, 488nm, 514nm, 543nm) erzeugen. Diese sind in der Regel ausreichend, um die Standard-FP effektiv und selektiv anzuregen. Der Laser ersetzt mit diesen definierten Wellenlängen einen Polychromator, der bei der Anregung mit einer Quecksilberkurzbogenlampe (HBO) ebenfalls das Anregungsspektrum auf wenige Nanometer eingrenzen kann, gleichzeitig liefert der Laser aber eine viel höhere Lichtintensität als eine HBO. Die hohe Intensität und das parallele Licht des Lasers ermöglichen es, dass die Probe Punkt für Punkt abgerastert werden kann, ohne andere Bereiche des Präparats zu beleuchten. Das Fluoreszenzlicht aus diesem Punkt oder besser Linie durch das Präparat wird in der Bildebene durch eine Lochblende gefiltert, so dass hauptsächlich Licht aus der Fokusebene detektiert wird. Durch die Öffnungsweite der frei verstellbaren Lochblende kann man die Dicke des optischen Schnitts bestimmen. Um bei den kurzen Belichtungszeiten ($\sim 1\mu\text{s}$) eine hohe Sensitivität und zeitliche Auflösung zu erreichen, werden zur Detektion Photomultiplier eingesetzt. Durch den geschickten Einsatz von Laser, optischen Strahlenteilern und Filtern ist es im Falle vom LSM 5 Pascal möglich zwei Fluoreszenzen, wie die vom GFP und RFP, spektral und eventuell räumlich sicher voneinander zu trennen.

2.6.4 Mikroskopie und Bildakquisition

Für die Lokalisation verschiedener Reporterkonstrukte mit dem CLSM wurden Einstellungen gewählt, um die maximale Lichtausbeute bei vernachlässigbarer Fluoreszenzbleichung und Hintergrundrauschen zu erreichen und um Mehrfachfluoreszenzen sicher voneinander zu trennen. Als Objektive wurden ein 40x Plan-Apochromat Wasser-Immersion- oder ein 63x Plan-Neofluar Öl-Immersionobjektiv verwendet. Die Lochblende wurde mit 1-2 μm bei Mehrfach-Fluoreszenzaufnahmen relativ klein gehalten. Bei Mehrfachfluoreszenzen wurde ein Signalübersprechen dadurch verhindert, dass die Bilder im „multi-track mode“ aufgenommen wurden. Das heißt: Es wurden zwei parallele Bilder aufgenommen, wobei dem einen Bild die optimale Anregung und Emission des einen FP zu Grunde lagen, dem anderen die des zweiten FP. Das quasi parallele Aufnehmen der zwei Bilder wird durch einen AOTF bewerkstelligt, der die Anregungswellenlänge Zeile für Zeile ($\sim 1\text{ms}$) wechselt. Dies verhindert, dass bei Co-Lokalisationen schnelle Bewegungen innerhalb der Zelle (Zytoplasmaströmung) die Ergebnisse verfälschen. Die genauen Einstellungen des CLSM sind der Tabelle 2.18 zu entnehmen.

2. Material und Methoden

Tab. 2.18 Einstellung des CLSM zur Detektion von RFP, GFP und YFP

Ar= Argon-Laser, HeNe= Helium/Neon-Laser, NFT= Nebenfarbteiler, BP= Bandpass, LP = Longpass, BiFC= Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (Split-YFP)

Fluoreszenzen	Laser	NFT	BP-Filter	LP-Filter
GFP	Ar 488nm	x	x	505nm
RFP	HeNe 543nm	x	x	560nm
GFP und RFP	Ar 488nm HeNe 543nm	545nm	505-530nm x	x 560nm
YFP (BiFC)	Ar 514nm	x	x	530nm

2.7 Agrobakterien-vermittelte Transformation von Tabak

Das gram-negative Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* verursacht bei höheren Pflanzen krebsartige Wucherungen, die Wurzelhalstumoren genannt werden. Die Ursache für die Bildung dieser Tumore ist die Übertragung von so genannter Transfer DNA (T-DNA) vom Bakterium in die Pflanzenzelle. Auf der T-DNA sind Gene für die Produktion der zellteilungsfördernden Phytohormone Auxin und Cytokinin und ein Gen für die Synthese der ungewöhnlichen Aminosäure Opin, die nur vom Bakterium verwertet werden kann, codiert. Die T-DNA ist Teil des Tumor induzierenden (Ti)-Plasmid, das die für die Übertragung notwendigen Faktoren bereitstellt.

Ersetzt man die Gene innerhalb der T-DNA Grenzen und innerhalb des Ti-Plasmids durch ein Gen von Interesse (z.B. Resistenzgene, Markergene) kann man die Agrobakterien für die genetische Manipulation der natürlichen Wirtspflanzen, Gymnospermen und dikotyle Pflanzenarten, und seit Mitte der 1990er Jahre auch zur Transformation von Monokotylen und damit landwirtschaftlich bedeutender Gräser heranziehen (Hiei *et al.*, 1994). In der Praxis wird den gebräuchlichen Agrobakterienstämmen die T-DNA komplett entfernt und in Form eines zweiten (binären) Plasmids in die Agrobakterien eingebracht, das aufgrund seiner Größe ~10-15Kb besser zu handhaben ist als das Ti-Plasmid (200Kb). Der in dieser Arbeit verwendete Agrobakterienstamm heißt GV3101 und beinhalten das virulenz Helferplasmid pCH32 (Hamilton *et al.*, 1996) anstatt des Ti-Plasmids.

2.7.1 Herstellung kompetenter Agrobakterien

Für die Transformation der binären T-DNA-Vektoren (pMDC32) wurden die GV3101 elektrokompent gemacht. Dazu wurden die Bakterien auf YEP-Platten (Tab. 2.19) (+Rif/Gen) über Nacht bei 28°C in einem Schüttler hochgezogen. Am darauf folgenden Tag wurde eine Kolonie in 15ml YEP-Medium (+Rif/Gen) überimpft und unter Schütteln einen weiteren Tag vermehrt. Am dritten Tag wurden mit der Impfkultur 200ml YEP-Medium inokuliert (ohne Antibiotika) und bis zur OD 0,5 vermehrt (~3h) und anschließend 30min auf Eis gestellt. Es folgten zwei Waschschrte mit 100 und 50ml kaltem dH₂O (4000g 10' 4°C) und ein Waschschrte mit 10 ml kalten 10% Glycerin/Wasser. Schließlich wurden die

Bakterien in 1ml 10% Glycerin/Wasser resuspendiert, aliquotiert und sofort für die Elektroporation benutzt.

2.7.2 Agrobakterientransformation

Für die Elektroporation wurden in einem GV3101-Aliquot 1µl einer normalen DNA-Minipräparation verteilt. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und dann für mehr als 3ms einem elektrischen Feld von 1,25MV/m ausgesetzt (Elektroporator 2510, eppendorf, Hamburg). Zur Regeneration wurden den Bakterien sofort 1ml YEP-medium ohne Antibiotika zugesetzt. Nach 2-3h Schütteln bei 28°C wurden 50µl der Bakteriensuspension auf YEP-Agarplatten mit den Antibiotika Rif/Gen/Kan ausplattiert.

Tab. 2.19 Zusammensetzung des YEP-Mediums/Agar

YEP-Medium (Agar)	
Trypton	5g/l
Hefeextrakt	5g/l
Saccharose	5g/l
MgSO ₄	50 mM
(Agar-Agar Koblel	15g/l) add. 1l dH ₂ O

2.7.3 Transiente Transformation von Tabak

Für die transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* wurde die Agrobakterien-Infiltrationsmethode (Romeis *et al.*, 2001) angewendet.

Nicotiana benthamiana Pflanzen wurden auf Erde bei einem 12/12h Tag- und Nachtwechsel bei 26°C am Tag und 22°C in der Nacht und bei einer Photonenfluxdichte von 600 µmol/m²s angezogen. Voll entwickelte junge Blätter von 4-6 Wochen alten Pflanzen wurden für die transiente Transformation herangezogen.

Die mit den binären pMDC32-Vektoren transformierten Agrobakterien wurden in 15 ml YEP-Medium mit Rif/Gen/Kan und in einem 50ml Schikanekolben zwischen 24-48h bei 28°C hochgezogen. Parallel dazu wurden 19K-Agrobakterien in 15ml YEP-Medium mit Kan herangezogen. 19K-Agrobakterien sind ein GV3101-Stamm der das *19K*-Gen besitzt. Das Genprodukt des *19K*-Gens codiert für einen Suppressor des posttranskriptionalen "Gensilencing" (Liu *et al.*, 2002). Die Bakterienkulturen (OD₆₀₀ ~0,5) wurden dann in 5ml bzw. 3ml (19K) Agromix-Puffer (Tab. 2.20) resuspendiert (4000g 10' RT) und für 2h bei RT im Dunkeln geschüttelt.

Danach wurde die pMDC32 transformierten GV3101 mit 1ml 19K vermischt und auf 15 ml mit Agromix-Puffer aufgefüllt. Mit dieser Bakteriensuspension wurde eine 10ml Einwegspritze ohne Nadel aufgezogen und auf die Blattunterseite einer Tabakpflanze aufgesetzt. Die Tabakpflanzen wurden 2h vor Infiltration gut gewässert, so dass man nun leicht aber vorsichtig die Agrobakterien über die geöffneten Stomata in das Blatt spritzen konnte. Nach

2. Material und Methoden

etwa 3 Tagen wurden die so exprimierten Proteine wieder aus den infiltrierten Blättern isoliert und im Western Blot analysiert.

Tab. 2.20 Zusammensetzung des Agromix-Puffer

Agromix-Puffer	
Mes (pH5.8)	10mM
MgCl ₂	10mM
Acetosyringone	150µM

2.7.4 Herstellung stabil transformierter Tabakpflanzen

Für die Gewinnung von *Nicotiana tabacum* SR1, die stabil TPKx überexprimieren, mussten zuerst Tabakpflanzen steril hochgezogen werden. Dazu wurden die Samen sterilisiert, indem sie in 12% Natriumhypochlorid 20min geschüttelt und dann 5-mal mit sterilem dH₂O gewaschen wurden. Die sterilisierten Samen wurden in Magentas-Boxen (Magenta Corporation, Chicago, IL, USA) auf MS-Agar (1,5% Agar-Agar KobleI) ausgelegt. Die Pflanzen wuchsen 5 Wochen bei einem 12h Tag-Nachtwechsel (26°C Tag/22°C Nacht, Photonenfluxdichte 600µmol/m²s) herangezogen. Am Tag vor der Transformation wurden die Agrobakterien pGV3101 mit TPK1/TPK2/TPK5/pMDC32 in 50ml YEP-Medium (Schikanekolben, inklusive der Antibiotika Rif/Gen/Kan) hochgezogen. Am nächsten Tag wurden diese abzentrifugiert (4000g, 10', RT) und in MS-Medium mit 150µM Acetosyringon aufgenommen, so dass die Suspension in etwa eine OD₆₀₀ von 0,1 hatte. Die Tabakblätter wurden steril auf 0,5 cm große Stücke zurechtgeschnitten und für 20 min in die Agrobaktériensuspension getaucht. Anschließend wurden die Blattstücke auf sterilen Papiertüchern abgetropft und mit Unterseite nach unten auf MS-Agarplatten (Tab. 2.21) gelegt. Diese wurden zwei Tage im Dunkeln bei 25°C aufbewahrt, um dann die Blattstücke auf MS-Agarplatten mit 500µg/ml Cefotaxim und 30µg/ml HygromycinB umzusetzen.

Nachdem Kalli aus den Blättern wuchsen, wurden die Kalli in Magentas mit MS-Agarplattenmedium mit Antibiotika umgesetzt. Dort wuchsen aus den Kalli neue Sprossen, die nach 2-3 Wochen auf Magentas mit Wurzel-induzierendem Medium (MS-Agarplatten ohne 1-NAA aber mit Antibiotika) umgesetzt. Schließlich wurden die bewurzelten Tabakpflanzen in Erde getopft und im Gewächshaus bis zur Samenernte gehalten. Noch vor der Samenernte wurden Proteinproben genommen und im Dot Blot analysiert, um die Integration der T-DNA im Genom zu verifizieren.

Tab. 2.21 Zusammensetzung von MS-Agarplatten

MS-Agarplatten	
MS-Medium	1,92g
Saccharose	12g
Myo-inositol	40mg
6-Benzylaminopurine	400µg
Thiamine	400µg
Naphtylessigsäure (1-NAA)	40µg
Agar-Agar Kobel	4g
In 400ml ddH ₂ O	pH5,8

2.8 *In vitro* Transkription

Für die Expression eines Proteins in den Oocyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus leavis* kann man DNA in Eizellkern oder cRNA in die Eizelle injizieren. Die Herstellung von cRNA kann in großen Mengen durch *in vitro* Transkription der cDNA auf Grundlage geeigneten Vektoren wie den pGEM-Vektoren stattfinden.

Für das Umschreiben der cDNA in cRNA nutzt man die RNA-Polymerasen, die von bestimmten bakteriellen Viren wie dem T7-Virus gebildet werden. Eine Voraussetzung dieser Methode ist, dass die zu transkribierende DNA-Matrize über einen Promotor (z.B. den T7-Promotor) für die virale RNA-Polymerase besitzt. Zur Vorbereitung der *in vitro* Transkription wurden zunächst 10µg Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym NheI für 120min bei 37°C linearisiert und die Linearisierung auf einem Gel kontrolliert. Die linearisierte DNA wurde anschließend mit dem „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert und in 20 µl BPC- oder DEPC-H₂O aufgenommen. Die so von RNasen gereinigte DNA wurde direkt in einem *in vitro* Transkriptionsansatz verwendet (AmpliCap-Max™ T7 High Yield Message Maker Kit, Epicentre™ Biotechnologies, Madison, WI, USA) (Tab. 2.22). Der durchmischte und abzentrifugierte Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 2 - 3h inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit 20µl 7.5 M LiCl (+50 mM EDTA) für 30min bei -20°C gefällt, dann 45min bei 20000g und 4°C abzentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen (10min, 20000g, 4°C) und schließlich in 20µl BCP-H₂O oder DEPC- H₂O aufgenommen. Die Qualität der RNA wurde auf einem TBE-Agarosegel in RNA-Probenpuffer (Tab. 2.23) überprüft, die Konzentration photometrisch bestimmt und auf 0,5µg/µl eingestellt. Die so gewonnene cRNA wurde bis zur Injektion bei -20°C aufbewahrt.

2. Material und Methoden

Tab. 2.22 Zusammensetzung eines *in vitro* Transkriptionsansatzes

Komponente	Menge
Matrize, linearisierter Vektor	1µg /3µl
10x Transcription Buffer	1µl
CAP/NTP PreMix	4µl
DTT	1µl (100mM)
AmpliCap-Max T7 Enzyme solution	1µl

Tab. 2.23 Zusammensetzung des 2x RNA-Probenpuffers

2x RNA-Probenpuffer	
Formamid	95%
Xylen Cyanol	0.025%
Bromophenolblau	0.025%
EDTA	18 mM
SDS	0.025%

2.9 Präparation der Oozyten und Injektion der cRNA in Oozyten

Die südafrikanischen Krallenfrösche wurden zu sechst in Aquarien bei etwa 20 °C Wasser- und Raumtemperatur gehalten. Die Entnahme der Oozyten erfolgte operativ durch die befugten Personen nach Narkotisierung der Tiere mit Tricaine (3-Aminobenzoessäure-ethylester; 1,25 g/ 1,5 l H₂O) auf Eis. Dazu wurden die Bauchhaut und das darunterliegende Muskelgewebe mit etwa 0,5-1cm Schnitten geöffnet und einige Ovarlappen herausgezogen. Diese wurden sofort in Ca²⁺-haltige ND96 (Tab. 2.24) überführt. Nach der Entnahme wurde der Frosch mit einem Stich in die Bauchhaut und drei Stichen in die Epidermis zugenäht. Die Oozyten wurden mit Uhrmacherpinzette aus den Ovarlappen befreit, mit Ca²⁺- freier ND96 gewaschen (Tab. 2.24) und etwa 1,5h mit Collagenase (1-2mg/ml, RT) von Follikelzellen und Bindegewebe befreit. Eine zu lange Exposition der Oozyten verringert deren Vitalität. Die so vereinzelt Oozyten wurden mehrfach mit Ca²⁺-freier ND96-Lösung gewaschen und in Ca²⁺-haltiger ND96-Lösung bei 16 °C aufbewahrt.

Die Injektion der cRNA in die Oozyten erfolgte mittels kleiner Druckstöße (General Valve™ Picospritzer™II, USA) durch die zwischen 20-50µl cRNA (10-25ng) injiziert wurden.

Die Injektionskapillaren (3_{1/2}“ Drummond #3-00-203-G/X, Drummond Scientific Company) wurden mit einem Laserpuller (Sutter Instruments Co. Model p-2000) fein ausgezogen und die Spitze unter einem Mikroskop auf einen Durchmesser von etwa 10µm-20µm abgebrochen. Die injizierten Oozyten wurden in Ca²⁺-haltiger ND96 bei 16 °C aufbewahrt und konnten abhängig von der Expressionsstärke des Kanals zwischen dem 1. und dem 5. Tag nach Injektion gemessen werden.

Tab.2.24 Zusammensetzung von Ca²⁺-haltiger und -freier ND96

ND96-Lösung	
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
(CaCl ₂)	1 mM)
MgCl ₂	1 mM
Mes/NaOH	10 mM pH 7,4
Gentamycin	60µg/ml
D-Sorbitol	$\pi = 220$ mosmol/kg

2.10 Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (DEVC) an *Xenopus leavis* Oozyten

Entwickelt wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik Ende der 40er und Anfang der 50er Jahre im letzten Jahrhundert von Marmont, Cole, Hodgkin, Huxley und Katz an Tintenfisch-Axonon (Cole, 1949, Hodgkin *et al.*, 1949, Marmont, 1949, Hodgkin *et al.*, 1952). Anfang der 70er Jahre wurde diese Technik mit dem heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten kombiniert und wurde daraufhin ein sehr beliebtes System zur funktionellen Charakterisierung und Struktur-Funktionsuntersuchung von Membrantransportproteinen (Gurdon *et al.*, 1971). Finkel und Gage sowie das Buch „Ionic Channels of Excitable Membranes“ von B. Hille beschreiben die DEVC-Technik und deren Anwendungsmöglichkeiten im Detail (Finkel und Gage, 1985, Hille, 1992).

Die DEVC-Technik ermöglicht die Ableitung von Ionenströmen unter der Kontrolle des Membranpotentials; eine Voraussetzung für die elektrophysiologische Charakterisierung von Zellen und deren elektrogenen Transporter.

Das technische Prinzip dieser Methode basiert auf der Messung des Membranpotentials über einer Mikroelektrode (PE). Ein Differentialverstärker (Dv) vergleicht diese Spannung mit einer vorgegebenen Spannung (U_{com}), um durch Stromapplikation (negative Rückkopplung) über eine zweite Mikroelektrode (CE) das Membranpotential auf U_{com} einzustellen (Abb. 2.4). Die Trennung von Spannungsmessung und Stromapplikation auf zwei Mikro-Elektroden ist nur bei großen Zellen und Strömen im nA und µA-Bereich nötig. Bei kleinen Zellen und geringen Strömen kann eine Elektrode verwendet werden („discontinuous single electrode voltage clamp“ (Park *et al.*, 1981), „patch clamp“ (Neher *et al.*, 1978)).

2. Material und Methoden

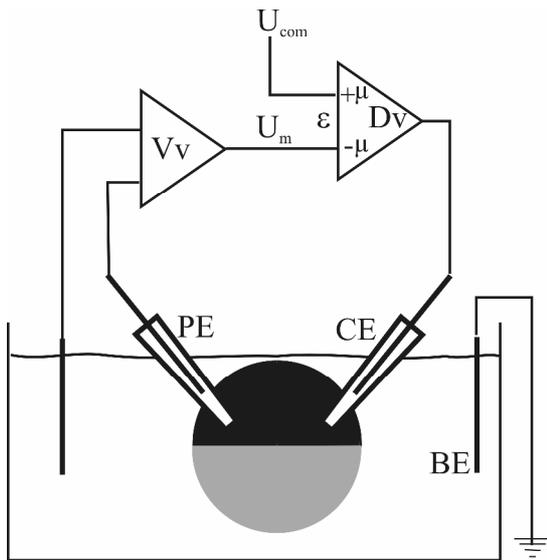


Abb. 2.4 Ersatzschaltbild der DEVC-Technik

Das Membranpotential U_m wird über den Vorverstärker (Vv), der mit der Potentialelektrode (PE) verbunden ist, gemessen. Über einen Hochverstärkungsdifferentialverstärker (Dv, Verstärkungsfaktor = μ) wird U_m mit der vorgegebenen Spannung U_{com} verglichen. Der Ausgang von Dv ist proportional zu der Differenz (ϵ) zwischen U_m und U_{com} . Die Spannung im Ausgang des Dv bewirkt einen Ausgleichsstrom über die Stromelektrode (CE) in die Zelle. (modifiziert nach „The Axon Guide“, 1993). Eine Badelektrode (BE) leitet den injizierten Strom ab.

2.10.1 Biophysikalische Theorie zur DEVC-Technik

Elektrisch und vereinfachend gesehen stellt eine Biomembran ein RC-Glied dar, also eine Kombination aus einem Kondensator und einem Widerstand. Die Kondensatoreigenschaft beruht auf der isolierenden Wirkung der Lipiddoppelschicht. Die Kapazität C dieses Kondensators hängt von der Dielektrizitätskonstante ϵ der Lipiddoppelschicht, der Dicke der Membran d und der Membranfläche A ab (abbX).

$$C = \epsilon \cdot \epsilon_0 \cdot A / d \quad (1)$$

Dabei ist ϵ_0 die Polarisierbarkeit des freien Raumes ($8.85 \cdot 10^{12} \text{ CV}^{-1} \text{ m}^{-1}$) und ϵ liegt etwa bei 2.1 (Huang und Levitt, 1977). Die spezifische Kapazität einer Biomembran liegt bei $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Weil die Lipiddoppelschicht einen sehr großen Widerstand darstellt, wird der Widerstand einer Membran hauptsächlich durch die in der Membran verankerten Proteinen bestimmt. Kommt es nun durch die Aktivität eines Transporters zu einer Abweichung der Membranspannung von U_{com} , so wird im Spannungsklemmenmodus Strom appliziert, um die Membranspannung wieder auf U_{com} einzustellen. Dabei kommt es zuerst zu einer Aufladung der Membran und dann zum Einstellen der Membranspannung auf U_{com} . Die zeitabhängige Spannungsänderung lässt sich durch eine Exponentialgleichung darstellen ((2) und Abb. 2.5)

$$U(t) = IR \cdot (1 - e^{-t/\tau}) \quad (2)$$

Die Zeitkonstante τ ist die gleiche Zeitkonstante, mit der der kapazitive Strom abnimmt und berechnet sich aus dem Produkt des Widerstands der Stromelektrode und der Kapazität der Zelle ($R_{CE} * C_m$) (Abb.2.5). Erst nach Einstellen des Membranpotentials (U_{com}) und Abklingen des kapazitiven Stroms I_{Kap} , lässt sich der Strom durch Membranproteine bei konstanter Spannung messen. Bei einigen Applikationen kann ein großes τ hinterlich sein, weswegen der Widerstand der Stromelektrode möglichst klein gewählt werden sollte. Für die Bestimmung der Gleichgewichtströme des TPK4 waren die kapazitiven Ströme zu vernachlässigen, weil die Ströme im Gleichgewicht am Ende eines jeden Testpulses ausgewertet wurden; die kapazitiven Transienten (Abb.2.5) waren dort längst abgeklungen.

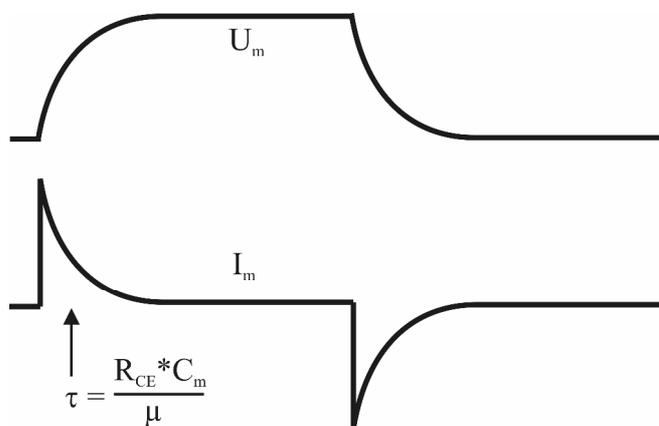


Abb. 2.5 Kapazitive Transienten im Spannungsklemmenmodus.

Verlauf von Membranspannung U_m und Strom I_m bei einer sprunghaften Veränderung von U_{com} . Die Zeitkonstante τ der kapazitiven Transienten ist umso kleiner, je kleiner der Widerstand der Stromelektrode R_{ce} und die Kapazität der Membran C_m ist und je größer der Verstärkungsfaktor μ des Dv ist. (modifiziert nach „The Axon Guide“, 1993)

Ein Problem bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ist, dass aufgrund der Zugriffswiderstands der Stromelektrode (etwa $1M\Omega$) ein Teil der Kommandospannung über der Stromelektrode abfällt und daher die Membranspannung von der Kommandospannung abweicht. Dieser Fehler berechnet sich nach Gleichung (3 und 4) (nach Axon Guide, 1993).

$$U_m = U_{com} \frac{\mu K}{\mu K + 1} \quad (3)$$

Wobei μ der Verstärkungsfaktor des Messverstärkers ist und K die Schwächung des Verstärkers darstellt (4)

$$K = \frac{R_m}{R_m + R_i} \quad 45$$

(4)

Bei einem Widerstand der Zelle (R_m) von mindestens $6,5\text{k}\Omega$ und $\mu > 5 \times 10^3$ ist der Spannungsfehler stets kleiner als 3%, weswegen er bei der Auswertung nicht korrigiert wurde.

Die Badlösungen enthielten immer weniger Chlorid als die Elektrodenlösungen. Dadurch entstehen an der Grenze von Elektroden und Badlösung Diffusionspotentialgradienten, die aber nach Eintauchen in die Badlösung elektronisch subtrahiert werden konnten.

2.10.2 Konventionen

Die Differenz zwischen dem Potential auf der zytosolischen Membranseite und dem Potential des extrazellulären Raums bestimmt die Membranspannung. Das extrazelluläre Potential wird konventionsgemäß auf Null gesetzt. Ein Einstrom von Kationen in die Zelle und ein Auström von Anionen in den extrazellulären Raum, entspricht einem negativen elektrischen Strom.

2.10.3 Messung der Ganzzellströme

Zur Messung der Ganzzellströme wurde die Membranspannung nach einem bestimmten Pulsprotokoll verändert (Abb. 2.6). Dieses Pulsprotokoll besteht aus 20 Durchläufen, wobei angefangen bei $+60\text{mV}$ die Spannung bei jedem Durchlauf sukzessive um -10mV erniedrigt wurde. Weil es sich bei den TPK-Kanälen um instantan aktivierende Kaliumkanäle handelt, wurde die Dauer des Testpulses mit 200ms kurz gehalten. Durch die instantane Aktivität ist der Gleichgewichtsstrom schon direkt nach Abklingen des I_{Kap} erreicht. Dennoch wurde der Gesamtstrom erst zwischen 80 und 90% des Testpulses abgegriffen und gemittelt. Der so ermittelte Spannungs- und Zeit-abhängige Gleichgewichtsstrom I_{ss} wird bestimmt durch die Anzahl N der Kanäle in der Membran, den Einzelkanalströmen i und der Offenwahrscheinlichkeit p_o ; Diese Berechnung gilt unter der Annahme, dass die Kanäle zwischen einem leitenden und einem geschlossenen Zustand hin und her springen (5).

$$I_{\text{ss}}(U,t) = N * i(U) * p_o(U,t) \quad (5)$$

Nach den Testspulsen wurde das Membranpotential für weitere 200ms auf einen Folgepuls U_F von konstant -60mV geklemmt, um eine Veränderungen der Messbedingungen und der Kanalaktivität während der Messung auszuschließen. Am Anfang und am Ende eines Durchlaufs wurde die Membranspannung auf die Haltespannung U_H von -30mV geklemmt.

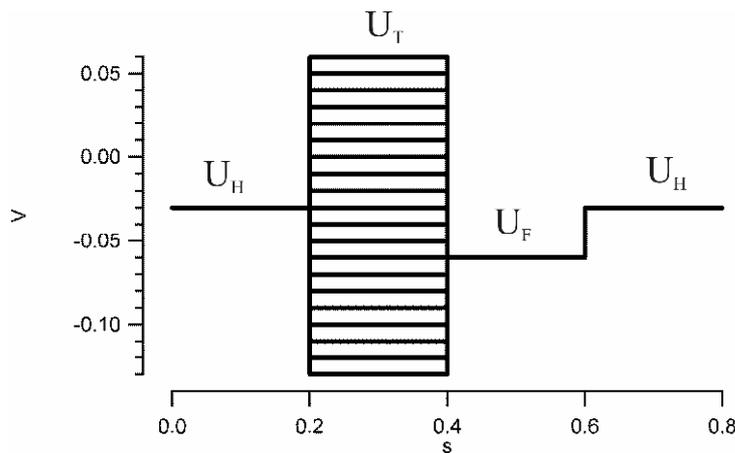


Abb. 2.6 Standardpulsprotokoll

Ein Durchgang des Pulsprotokolls war 0,8s lang und bestand aus Haltespannung U_H (-30mV), Testspannung U_T und der Folgespannung U_F (-60mV). Vom ersten bis zum 20. Durchgang wurde die U_T von +60mV in 10mV Schritten bis -130mV variiert.

2.10.4 Bestimmung der Umkehrspannungen und der relativen Permeabilitäten

Die Umkehrspannung ist definiert als die Membranspannung, bei der sich alle Ströme über die Membran zu null summieren. Gibt es in einer Membran nur rein Kalium-selektive Kanäle, so wird das Umkehrpotential durch das elektrochemische Gleichgewicht des einzig permeierenden Ions Kalium bestimmt. Dieses berechnet sich nach der Nernst-Gleichung (7)

$$U_{\text{rev}} = \frac{RT}{z_k F} \ln \frac{P_k [K^+]_{\text{außen}}}{P_k [K^+]_{\text{innen}}} \quad (7)$$

Wobei R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur, F die Faradaykonstante, P die Permeabilitätskoeffizienten und z_k (1 bei einwertigen Ionen) die Ladung des Kaliums ist. Da aber in der Regel eine Membran oder ein Ionenkanal für verschiedene Ionen durchlässig ist, muss diese Gleichung zur Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) Spannungsgleichung (8) erweitert werden.

$$U_{\text{rev}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_x [X^+]_{\text{außen}} P_y [Y^+]_{\text{außen}} P_z [Z^-]_{\text{innen}}}{P_x [X^+]_{\text{innen}} P_y [Y^+]_{\text{innen}} P_z [Z^-]_{\text{außen}}} \quad (8)$$

Unter biionischen Bedingungen, wo auf jeder Seite nur ein permeierendes Ion vorliegt, lässt sich das Umkehrpotential durch eine vereinfachte GHK-Gleichung (9) bestimmen.

$$U_{\text{rev}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_x [X^+]_{\text{außen}}}{P_k [K^+]_{\text{innen}}} \quad (9)$$

2. Material und Methoden

Aus dem unter biionischen Bedingungen gemessenen Umkehrpotential lässt sich die relative Permeabilität P_x/P_k direkt aus der GHK-Gleichung bestimmen (Hille, 1992)(10).

$$\frac{P_x}{P_k} = e^{\frac{U_{rev} F}{RT} \frac{[K^+]_{innen}}{[X^+]_{außen}}} \quad (10)$$

Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an Oozyten ist die Kaliumkonzentration in der Oozyte nicht bekannt. Dieses Problem kann aber umgangen werden, wenn man anstatt des absoluten Umkehrpotentials die Veränderung des Umkehrpotentials ΔU_{rev} nach Ersetzen von Kalium durch X in der Badlösung heranzieht. Unter der Bedingung von konstanten Ionenkonzentrationen in der Oozyte lässt sich die relative Permeabilität P_x/P_k dann aus einer einfachen Gleichung berechnen (Hille, 1992)(11).

$$\Delta U_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_x [X^+]_{außen}}{P_k [K^+]_{außen}} \mapsto \frac{P_x}{P_k} = e^{\frac{\Delta U_{rev} F}{RT} \frac{[K^+]_{außen}}{[X^+]_{außen}}} \quad (11)$$

2.10.5 Meßaufbau

Der mechanooptische Teil der Messapparatur wurde auf einem schwingungsgedämpften Tisch und unter einen Faraday'schen Käfig platziert. Als Perfusionsystem dienten Spritzen als Reservoir für die Messlösungen und eine Peristaltic Pumpe (LKB Pump P 1, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) für das Absaugen der Messlösungen aus einem kleinen, der Badkammer nachgeschaltetem Reservoir. Gleichmäßig, von der Schwerkraft getrieben flossen die Messlösungen mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,3ml/min durch die Badkammer. Die Oozyten wurden über Platindrähte in der Badkammer gehalten, die an dieser Stelle ~3mm breit war. Strom-/Spannungs-/pH-Elektroden wurden an Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann, Ratingen) befestigt. Alle leitenden Bestandteile der Messeinheit wurden unter Vermeidung von Erdungsschleifen geerdet. An die Erde des Vorverstärkers der Spannungselektrode war die Referenzelektrode angeschlossen, die nahe der Zelle in die Badlösung eintauchte. Die Referenzelektrode für die pH-Mikroelektrode wurde ebenfalls in die Badlösung eingetaucht. Die von der Membran abgeleitete Stromantwort wurde über den Vorverstärker in den eigentlichen Messverstärker (Turbo TEC 03X, NPI electronic, Tamm) geleitet. Für die pH-Messungen wurde ein weiterer hoch-ohmiger Verstärker benutzt (ELEKTROMETER Model FD 223, World Precision Instruments, Berlin). Die analogen

Signale des Verstärkers wurden mit einem 16 Bit AD/DA-Wandler (ITC16 ST, Instrutech Corporation, New York, USA) digitalisiert. Die Spannungspuls-Protokolle wurden mit der Software „Pulse“ (HEKA, Lambrecht/Pfalz) erstellt.

2.10.6 Elektroden

Zur Messung der elektrischen Ströme wurden Silber/Silberchlorid-Elektroden verwendet. Vor den Messungen wurde der Silberdraht der Elektrode durch Anlegen einer Gleichspannung in 2M KCl chloriert. Die Referenzelektroden wurden entweder direkt in der Nähe der Oozyte in die Badlösung getaucht oder es wurden kleine Schläuche auf sie geschoben, die mit einer 2%-Agarbrücke verstopft und mit 3M KCl gefüllt wurden.

Für die Spannungs- und Stromelektroden wurden Einstichpipetten aus Borsilikatkapillaren (KWIK-FIL™ TW120F-3, World Precision Instruments Inc., USA) gezogen. Für die pH-Elektrode wurden dieselben Kapillaren ohne Filament verwendet (KWIK-FIL™ TW120-3, World Precision Instruments, Berlin). Mit etwa 1µm wurde der Durchmesser Pipettenöffnung groß genug gewählt, um den Widerstand der Elektroden möglichst klein zu halten und andererseits klein genug gewählt, um ein Herausdiffundieren der Pipettenlösung in die Oozyte zu verhindern. Der typische Widerstand einer solchen Elektrode betrug etwa 1MΩ.

Die Strom- und Spannungselektroden wurden luftblasen-frei mit 3M KCl befüllt, bevor sie auf die Silberchloriddrähte geschoben wurden. Damit durch die pH-Elektrode spezifisch der Protonenpotentialgradient über der Oozytenmembran gemessen werden konnte, wurde ein Hydrogen-ionophore-cocktail (Hydrogen-ionophore I cocktail A, Fluka, Deisenhofen) etwa 0,5-1mm weit in die Spitze der Mikrokapillare gezogen und anschließend die Mikrokapillare mit „Backfilling“-Puffer (Tab. 2.25) befüllt. Damit der sehr hydrophobe Cocktail in der Spitze der Pipette verbleibt, wurden Kapillaren ohne Filament gewählt und diese zuvor silanisiert. Dazu wurden die gezogenen und leeren Kapillaren in einem Ofen bei 200°C für 2 Stunden vorgebacken und anschließend bei derselben Temperatur 30 min mit Dimethyl-Dichlorsilan unter einem Abzug bedampft. Die silanisierten Kapillaren konnten bis zu zwei Tage nach Silanisierung verwendet werden.

Tab. 2.25 Zusammensetzung des „Backfilling“-Puffers

„Backfilling“-Puffer	
KH ₂ PO ₄	0,04 M
NaOH	0,023 M
NaCl	0,150 M

2. Material und Methoden

	pH 7,5
--	--------

2.10.7 Messungen mit der protonenselektiven Mikroelektrode

Um die Abhängigkeit der Inaktivierung des TPK4 vom zytoplasmatischen pH-Wert bestimmen zu können, wurden Protonen-selektive Elektroden eingesetzt. Zu Beginn jeder Messung wurde eine Dreipunkteichung der pH-Elektrode vorgenommen. Dazu wurde die pH-Elektrode in Standard-Badlösungen (100K^+) mit unterschiedlichem pH-Wert (pH5, pH6, pH8) getaucht und das elektrochemische Potential der Protonen aufgezeichnet. Bei guten pH-Elektroden betrug die Potentialänderung 55-65 mV pro pH-Einheit, was nach Nernst einer Protonen-selektiven Membran entsprechen würde. Die so geeichten pH-Elektroden wurden nun neben Strom- und Spannungselektrode in die Oozyte eingestochen. Als Kontrolle diente hierbei das Potential an der pH-Elektrode, das sich beim Einstechen aus einer Standardlösung (30 mM K^+ , pH 5,6) in eine *Xenopus* Oozyte (pH 7,4-7,6) sprunghaft veränderte. Da beim Einstechen die pH-Elektrode in der Regel zu tief in die Oozyte rutschte, wurde sie wieder möglichst weit herausgezogen, um mit der Öffnung nahe an die Membran zu gelangen. Nach Positionierung der pH-Elektrode, wurde die Oozyte auf 0mV geklemmt. Bei der Perfusion der Standardlösung (pH 5,6) mit 10 mM Natriumacetat wurde der Kaliumstrom und die Spannung an der pH-Elektrode nach einem speziellen Protokoll aufgezeichnet (Abb. 2.7).

Während des gesamten Versuchs wurde das Membranpotential in 2 Sekunden-Perioden erst auf 0 mV, dann auf -100mV und schließlich wieder auf 0mV geklemmt. So bald sich die pH-Elektrode in der Oozyte befand und das Membranpotential geklemmt wurde, zeichnete die pH-Mikroelektrode die Summe aus Membranpotential und des Protonenpotentials auf. Deswegen wurde der pH-Wert alle zwei Sekunden abgegriffen, wenn das Membranpotential auf null geklemmt war. Veränderungen in der TPK4-Aktivität wurden bei einem Membranpotential von -100mV beobachtet.

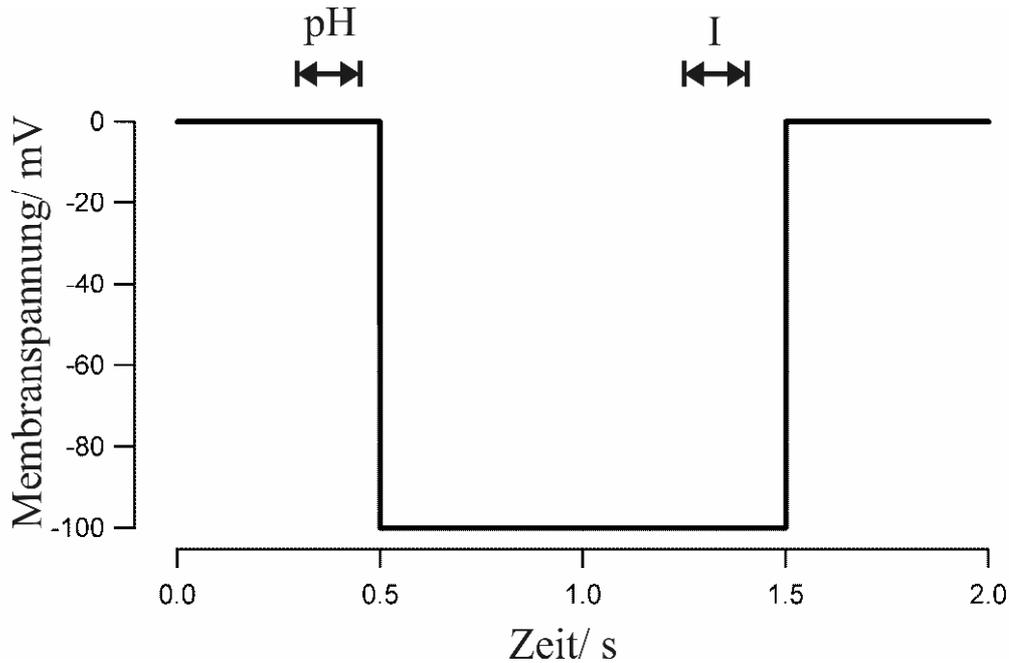


Abb. 2.7 Pulsprotokoll zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit des TPK4-Kanals und seiner Mutanten.

Zu Beginn eines 2 s andauernden Durchgangs wurde das Membranpotential für 0,5s auf 0mV, dann für 1s auf -100mV und schließlich wieder für 0,5s auf 0mV geklemmt. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, zu denen die Spannung an der pH-Elektrode und der TPK4-Strom aufgezeichnet und gemittelt wurden.

2.10.8 Mess-Lösungen

Für die Bestimmung der elektrophysiologischen Eigenschaften der TPK-Kanäle und -Mutanten wurden die intakten Oozyten in der Messkammer von Lösungen mit unterschiedlichen Ionenzusammensetzungen umspült. Die in der Tabelle 2.26 aufgeführten Badlösungen dienten als Standard für die Herstellung verschiedener Messlösungen. So entstanden die 10mM K^+ und 30mM K^+ -Lösungen durch einen 1:9 bzw. 3:7 Mischung aus Lösung A und B. Der 30mM K^+ -Lösung wurde wiederum 5mM der Kaliumkanalblocker CsCl oder $BaCl_2$ aus einer 1M Stocklösung zugegeben. Für die zytoplasmatische Ansäuerung der Oozyten wurde der Lösung C 10mM $NaCH_3COO$ zugegeben. Der pH-Wert von 5,6 der Lösung C sorgt dafür, dass der Anteil an Essigsäure in der Lösung größer ist. Die ungeladene Essigsäure ist Membran-permeabel und wird im alkalischeren Zytoplasma (\sim pH 7,5) deprotoniert. Das verursacht eine Ansäuerung des Zytoplasmas der Oozyten bis maximal zum pH-Wert der Badlösung (Ionenfallenprinzip).

Tab. 2.26 Zusammensetzung der Badlösungen

2. Material und Methoden

Komponente	A	B	C
KCl	100 mM	x	30 mM
NMDG-Cl	x	100 mM	70 mM
CaCl ₂	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM
MES	pH 7,5	pH 7,5	10 mM
Tris	10 mM	10 mM	pH5,6

2.11 Marker des sekretorischen Apparats

Als Marker des endoplasmatischen Retikulums wurde ein GFP mit einer ER-Targeting und – Rückhaltesequenz in Form des Vektors *GFP::Err/pMG* (von B.G. Pickard, Universität Washington) co-transfiziert. Um die ER und Golgi-Kompartimente zu markieren, wurde der dem *Arabidopsis* K/HDEL-Rezeptor analoge ERD2 in Form des Vektors *ERD2::GFP/pVKH18En6* verwendet, und um die Golgi-Stapel alleine zu markieren, wurde ein von der Sialyltransferase (aus der Ratte) abgeleitetes Konstrukt innerhalb des Vektors *STmd::RFP/pVKH18En6* co-transfiziert (Boevink *et al.*, 1998).

2.12 Modellierung des TPK-Kanalstruktur

Die Kanalstrukturmodelle von TPK1 und TPK4 wurden von Thomas Müller (Molekular Pflanzenphysiologie, Universität Würzburg) erstellt. Die Modellierung des TPK1 auf Basis der Kristallstruktur des *Streptomyces lividans* KscA (PDB entry 1BL8) und seiner EF-Hände auf Basis der Kristallstruktur des Calcineurin (Griffith *et al.*, 1995) ist in einer anderen Arbeit beschrieben (Latz *et al.*, 2007b). Das TPK4-Modell entstand durch eine auf Homologie basierende Modellierung mit dem TPK1-Modell als Matrize. Kurz zusammengefasst- die Aminosäuresequenz des TPK4 und TPK1 wurden mit ClustalW alignet. Die unterschiedlichen Aminosäurepositionen wurden mit Hilfe von „ProteinDesign“ der Software QUANTA2006 (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA) ersetzt. Sterische Zusammenstöße aufgrund von van-der-Waals Überlappungen wurden durch Rotamersuche für die Seitenketten betroffener Aminosäuren mit Hilfe von „XBUILD“ (QUANTA2006) entfernt. Um das Modell zu verfeinern wurden 100 Schritte der Energieminimierung auf Basis geometrischer Energie-Berechnungen und kurzer (10-20ps) „molecular dynamics“-Simulationen durchgeführt. Um Positionsveränderung weit abseits der Mutationen zu unterbinden, wurden Aminosäuren, die mehr als 5Å weit von einer Mutation entfernt waren, fixiert. Koordinaten-Fluktuationen wurden minimiert, indem die Aminosäuren, die einer Verfeinerung unterzogen wurden, einem harmonischen Potential (Kraftkonstante: $50\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$) und der schrittweisen Senkung der harmonischen Einschränkung auf null unterworfen wurden.

Die Darstellung der 3-D Strukturen von TPK1, TPK4, KcsA und GFP erfolgte mit Hilfe des Swiss-PDB Viewer (Guex und Peitsch, 1997) und des 3D-Renderers Pov-Ray 3.6 (Persistence of Vision Raytracer Pty Ltd., Williamstown, Australia).

2.13 Phylogenetische Analyse

Um mögliche Homologe der *At* TPKs zu finden, wurden mit Hilfe von Blast-Algorithmen (blastp, tblastn; Altschul et al., (1990, 1997)) in den GenBank, RefSeq, DDBJ, Swiss-Prot, EMBL and JGI Datenbanken nach Tandem-Poren Kaliumkanälen gesucht. Die TPK1 und TPK4 Proteinsequenzen dienten dabei als Matrize. Die mit den jeweiligen Standardparametern erzielten Suchergebnisse wurden manuell nach echten Tandem-Poren Zusammenstellungen selektiert, da gerade die zweite Porendomäne der TPKs starke Ähnlichkeit zur prokaryotischen Ein-Poren Kaliumkanälen aufweist und somit diese auch in den Blast-Ergebnissen erschienen. Da die Zusammensetzung der Suchergebnisse selbstverständlich eine starke Gewichtung auf pflanzliche TPKs besaß, wurden die Suchergebnisse durch viele tierische Tandem-Poren Kaliumkanäle ergänzt. Hingegen wurde viele pflanzliche cDNAs, die zwar eindeutig für Tandem-Poren Kaliumkanäle kodieren von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da diese eindeutig auf unvollständigen EST-Sequenzen beruhten. Auf diese Weise wurden 114 Sequenzen gesammelt, die der statistischen Analyse der Selektivitätsfilter unterzogen wurden. 68 putative Tandem-Poren Kaliumkanäle wiederum, darunter alle pflanzlichen Ursprungs, wurden einem multiplen Sequenzalignment-Algorithmus namens K-align zugeführt (Lassmann und Sonnhammer, 2005, Lassmann und Sonnhammer, 2006). Das Algorithmus wurde auf dem Server des Europäischen Bioinformatik-Instituts (<http://www.ebi.ac.uk/kalign>) mit den Standardparametern (gap open penalty = 11.0, gap extension penalty = 0.85, terminal gap penalties = 0.45, bonus score = 0) ausgeführt. Auf Basis dieses Alignments wurde eine molekulare phylogenetische Analyse mit Hilfe des Programms MEGA Version 4 durchgeführt (Tamura et al., 2007). Der phylogenetische Stammbaum wurde mit der „neighbour-joining“-Methode berechnet (Saitou und Nei, 1987). Ein „bootstrapped“ Consensus-Stammbaum wurde von 1000 Replikaten abgeleitet (Felsenstein, 1985). Die evolutionäre Distanz der Sequenzen wurde mit der Poisson-Korrektur-Methode berechnet (Zuckerkanndl und Pauling, 1965). Alle Positionen mit Lücken im Alignment wurden nur jeweils beim paarweisen Vergleich der Sequenzen entfernt („Pairwise deletion option“). So flossen insgesamt 1978 Positionen in die Berechnung mit ein. Um die *TPK* Gene in paralogen Blöcken innerhalb *Arabidopsis thaliana* Genoms zu lokalisieren, wurden die AGI Lokus-Identifikatoren dem Suchwerkzeug auf Ken Wolfe's Arbeitsgruppen-Webseite zugeführt. (<http://wolfe.gen.tcd.ie/athal/dup>) (Blanc et al., 2003).

2. Material und Methoden

3. Ergebnisse

3.1 Phylogenie der Doppelporen Kaliumkanäle

Um einen Überblick von der Diversität der Doppelporen Kaliumkanäle im Organismenreich zu gewinnen, wurde eine Suche nach TPK1 und TPK4 ähnlichen Proteinsequenzen in bekannten Sequenz-Datenbanken wie genbank, refseq, ddbj, swissprot, embl and jgj gestartet. Die Blastsuche förderte putative und bereits verifizierte Tandem-Porenkanalsequenzen aus Pflanzen, Tieren und Pilzen zu Tage. Einige Protisten der Gattungen *Aureococcus*, *Ostreococcus*, *Thalassiosira*, *Naegleria*, *Phytophthora*, *Monosiga* und *Phaeodactylum* besitzen ebenfalls Doppel-Poren Kaliumkanäle. Auch wenn die blast-Suche die Homologie zu bakteriellen Ein-Poren Kaliumkanälen noch einmal verdeutlichte, kodierte kein bakterielles Gen für einen Doppelporen Kaliumkanal. Da der genbank-Datenbank bis dato 988 prokaryotische Genome zu Grunde liegen, muss man davon ausgehen, dass der Besitz von Tandem-Poren Kaliumkanälen auf eukaryotische Spezies beschränkt ist.

Ein aus einem Alignment von 68 Tandem-Porenkanälen abgeleiteter phylogenetischer Stammbaum zeigt, dass die Doppel-Poren Kaliumkanäle entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen Organismenreichen aufzweigen (Abb.3.1). Die pflanzlichen Tandemporen Kaliumkanäle trennen sich in zwei Unterfamilien, die TPK1-Unterfamilie und die TPK2-Unterfamilie (mit *AtTPK2*, *AtTPK3* und *AtTPK5*), auf.

Hinweise zur Evolution der TPK/KCO-Familie liefern Untersuchungen zur Genomstruktur von *Arabidopsis thaliana*. Über 70% des Arabidopsis-genoms besitzen Schwesterregionen (2 Schwesterregionen = ein Block) auf anderen Chromsomen mit ähnlichen Genen in gleicher Reihenfolge. Insgesamt gibt es 108 Schwesterregionen, die mindestens 6 duplizierte Gene teilen (Blanc *et al.*, 2003). Die unterschiedlichen Raten an synonymen, stillen Substitutionen in diesen Genen oder aber auch die Substitutionen in den Poreinsequenzen dieser Gene deuten daraufhin, dass das Genom mindestens zwei großen Duplikationsereignissen und anschließenden Deletionen und Chromosomenumordnungen unterlag (Vision *et al.*, 2000, Blanc *et al.*, 2003). Auch die TPK-Kanäle und KCO3 liegen in Blöcken von duplizierten Genen (Blanc *et al.*, 2003). Wie zu erwarten war gibt es zu TPK1 (*At5g55630*), das sich auch Chromosom fünf befinden, kein entsprechendes Duplikat im paralogen Block auf Chromosom vier. Hier hat wahrscheinlich eine Deletion der Duplikate stattgefunden, wie sie nach solche Ereignissen häufig vorkommt (Lynch und Conery, 2000, Lynch und Conery, 2003). TPK4 (*At1g02510*) und TPK5 (*At4g01840*) hingegen stellen Duplikate innerhalb zweier Schwesterregionen auf Chromosom eins und fünf dar (Abb.3.2B, Tab. 3.1). Auch TPK2 (*At5g46370*) und TPK3 (*At4g18160*) gehen auf ein solches Duplikationsereignis zwischen Chromosom vier und fünf zurück (Abb.3.2B, Tab. 3.1).

3. Ergebnisse

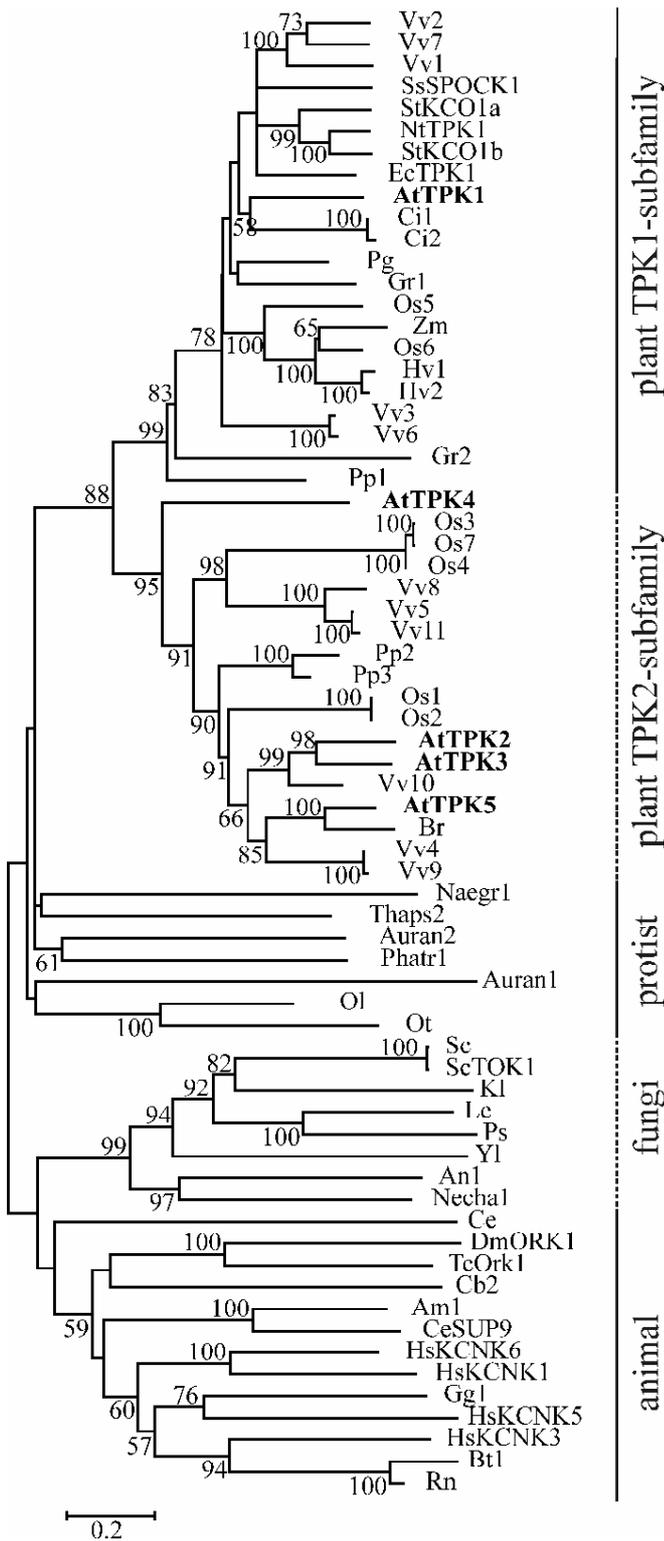


Abb. 3.1 Phylogramm von 68 teils putativen Tandemporen Kaliumkanälen

Der evolutionäre Abstammung dieser 68 Tandemporen Kaliumkanäle wurde mit der „Neighbour-Joining-Methode“ abgeleitet (Saitou und Nei, 1987) und stellt einen „Bootstrap“-Consensus-Stammbaum von 1000 Replikaten dar (Felsenstein, 1985). Die Zweige, welche Aufteilungen zugehören, die in weniger als 50% der „Bootstrap“-Replikate reproduziert wurden, wurden zusammengeführt. Der prozentuale Anteil (≥ 50) der aus den Replikaten abgeleitenden Bäume, in denen die Tandemporen Kanäle zu einem Cluster vereinigt sind, wurde neben den Knotenpunkten angegeben. Die Zweiglänge entspricht der evolutionären Distanz aus der der Stammbaum abgeleitet wurde und entspricht der Anzahl von Aminosäuresubstitutionen pro Position. Den Kanälen wurden so weit bekannt die Trivialnamen vergeben. Andernfalls wurden sie nach Artherkunft abgekürzt und durchnummeriert. Die vollständigen Artnamen sowie „Accession“-Nummern finden sich im Anhang.

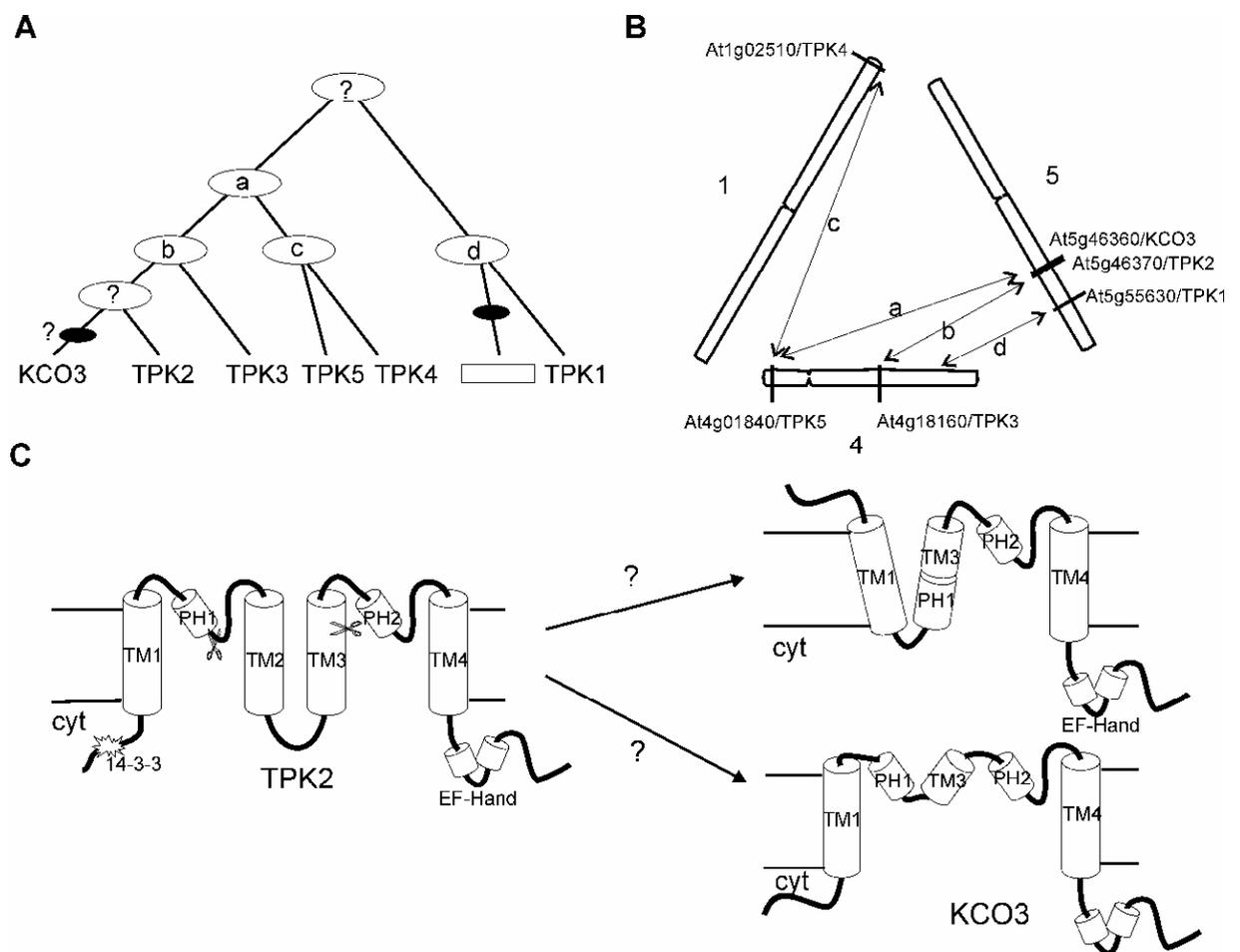
In beiden Fällen wurden diese Duplikationen auf ein jüngeres Poly- oder Aneuploidie-Ereignis zurückgeführt, dessen Alter auf 24-40 Millionen Jahre datiert wurde und noch vor der Trennung von *Arabidopsis* und *Brassica rapa* stattgefunden haben soll (Blanc *et al.*, 2003). Während TPK2 und TPK3 eine einer solchen phylogenetischen Entwicklung entsprechende größere Sequenzähnlichkeit zueinander als zu den anderen TPKs aufweisen,

ist TPK5 den anderen TPKs ähnlicher als TPK4, was auch auf Veränderungen und Deletionen im N und C-Terminus zurückzuführen ist (Tab. 3.2 und Alignment Kap.7.10).

Tab. 3.1 Lokalisation der TPK/KCO –Kanäle in paralogen Blöcken der *Arabidopsis thaliana* Chromosomen (<http://wolfe.gen.tcd.ie/athal/dup>)

Kanal/ Chromosom	Block	Größe*	Dichte#	Alter der Duplikation	Duplikat/ Chromosom
TPK1/ 5	0405189803620	134	28.44	Jung (24-40 Mill. Jahre)	Kein D./ 4
TPK2/ 5	0405128403640	89	28.85	Jung	TPK3/ 4
	0405016800210	3	14.64	undefiniert	TPK5/ 4
TPK3/ 4	0405128403640	89	28.85	Jung	TPK2/ 5
TPK4/ 1	0104000102440	65	23.44	Jung	TPK5/ 4
KCO3/ 5	(0405128403640	89	28.85	Jung)	Kein D./ 4
TPK5/ 4	0104000102440	65	23.44	Jung	TPK4/ 1
	0405016800210	3	14.64	undefiniert	TPK2/ 5

* Größe = Anzahl duplizierter Gene innerhalb des Blocks, # Dichte = Anteil duplizierter Gene innerhalb des Blocks in Prozent



3. Ergebnisse

Abb. 3.2 Duplikations- und Deletionsereignisse in der Evolution der TPK/KCO-Kanäle

A Entstehung der TPK/KCO-Familie aufgrund von gesicherten und putativen (?) Duplikationsereignissen (weiße Ellipsen) und putativen Deletionsereignissen (schwarze Ellipsen). Die Duplikationen b, c und d fanden wahrscheinlich etwa vor 24-40 Mill. Jahren in Folge von Polyploidie- oder Aneuploidie-Ereignissen statt, die Duplikation a geht auf ein nicht definiertes, älteres Duplikationsereignis zurück (Blanc *et al.*, 2003). **B** Lokalisation der TPK/KCO-Gene und der duplizierten Schwesternregionen (Pfeile) aus (A) innerhalb der Chromosomen 1, 4 und 5 von *Arabidopsis thaliana*. **C** Mögliche Entstehung und Topologie des KCO3 aus einer kleinen intrachromosomalen Duplikation des TPK2 und anschließender Deletion einer zentralen Gensequenz (zwischen den zwei Scheren). PH=Porenhelix, TM=Transmembrane, cyt = Zytoplasma.

Schließlich finden TPK2 und TPK5 sich innerhalb eines Blocks von drei duplizierten Genen wieder die wahrscheinlich auf ein noch älteres Duplikationsereignis zurückgehen (Tab. 3.1). Die Trennung von TPK1 und dem gemeinsamen Vorläufer der anderen TPKs hingegen lässt sich nicht mehr auf ein Duplikationsereignis zurückführen, weil eine Trennung wahrscheinlich sehr früh während der Evolution der Landpflanzen und noch vor der Trennung von Gefäßpflanzen (Tracheophyta) und Moosen (Bryophyta) (vor ~ 420 Mill. Jahren (Kenrick und Crane, 1997)) stattfand. Dies geht aus dem phylogenetischen Stammbaum hervor (Abb. 3.1), der zeigt dass die drei Tandemporenkanäle des Mooses *Physcomitrella patens* ssp. *patens* (Pp1, Pp2, Pp3) keine eigene Unterfamilie innerhalb der pflanzlichen TPKs bilden.

Schließlich lässt sich auch KCO3, der eigentlich einen Ein-Poren-Kanal darstellt, durch eine phylogenetische Analyse auf einen Tandem-Porenkanal und nicht etwa auf einen evolutiv älteren Ein-Porenkanal zurückführen. KCO3 zeigt die höchste Ähnlichkeit in der Proteinsequenz zu TPK2 (Tab. 3.2), wobei dem KCO3 neben der 14-3-3-Bindestelle, eine zentrale Proteinsequenz inklusive erstem Selektivitätsfilter, TM2 und einem Teil von TM3 fehlt. Somit besitzt KCO3 nach einer Hydrophobizitätsanalyse (Schwacke *et al.*, 2003) vier hydrophobe Bereiche. Unklar ist, ob sich aus Porenhelix 1 (PH1) und den Resten der Transmembranen Helix 3 (TM3) eine zusätzliche transmembrane Helix bildet oder nicht. Eine zusätzliche, dritte Transmembrane hätte zur Folge, dass die TM1 eine andere Orientierung als in TPK2 annehmen müsste (N_{ext}/C_{cyt}) (Abb.3.2C) Neben der Sequenzähnlichkeit von TPK2 und KCO3 finden sich beide tandem-repitiert auf Chromosom 5. Somit liegt KCO3 innerhalb desselben Blocks wie TPK2 und TPK3, ist aber nicht dupliziert. Zusammengenommen deutet dies daraufhin, dass KCO3 auf eine kleine, intrachromosomale Duplikation nach der Trennung von TPK2 und TPK3 und eine anschließende Deletion zurückzuführen ist (Abb. 3.2A).

Tab. 3.2 Matrix zum Vergleich identischer und ähnlicher (Blosom 62) Positionen in einem Proteinsequenzalignment der TPK/KCO-Kanäle

		ähnlich						
		TPK1	TPK2	KCO3	TPK3	TPK4	TPK5	
identisch	TPK1		44%	35%	44%	44%	47%	
	TPK2	26%		44%	78%	40%	61%	
	KCO3	20%	38%		41%	30%	36%	
	TPK3	26%	66%	35%		41%	61%	
	TPK4	26%	25%	18%	25%		48%	
	TPK5	28%	44%	27%	48%	33%		

3.2 Die Translokation der vakuolären TPKs erfolgt auf Golgi-abhängige Weise

Die subzelluläre Lokalisation der Tandemporen Kanäle von *Arabidopsis* war bereits Gegenstand meiner Diplomarbeit. Aufgrund dieser Arbeiten konnten wir zeigen, dass vier der fünf TPKs in die Vakuolenmembran integriert werden. Dabei wurde aber noch nicht klar, ob die Translokation der TPKs vom ER zur Vakuole über die Stapel des Golgiapparats verläuft oder ob sie über einen Golgi-unabhängigen Weg zu ihrer Zielmembran gelangen. Letzteres wurde bereits für das Aquaporin α -TIP beschrieben, welches aber ausschließlich in einer speziellen Vakuolenform, der Protein-Speicher-Vakuole (PSV) zu finden ist (Jiang und Rogers, 1998).

Es gibt zwei Möglichkeiten die Passage der TPKs durch den Golgi nachzuweisen. Entweder man sucht nach einer Golgi-spezifischen Glykosilierung des Proteins oder einfacher, man löst die Golgi-Struktur mittels des Pilztoxins Brefeldin A (Bref A) in spezifischer Weise auf und beobachtet die Folgen für die Translokation zur Vakuole. Initiierte man eine Co-expression von TPK1-mRFP1 mit dem Golgi-Marker (ST-GFP) in Zwiebel-Epidermiszellen in Abwesenheit von Bref A, so konnte man TPK1 ausschließlich im Tonoplast sehen (Abb 3.3A,C). ST-GFP markierte dabei ausschließlich die im Cytoplasma verteilten etwa 1-2 μ m großen Golgi-Stapel (Abb. 3.3B,C). In einem parallelen Experiment führte die Inkubation der Epidermistreifen in Bref A zu einer Umverteilung des Golgi-markers in ein ER-ähnliches Kompartiment der transformierten Zellen (Abb. 3.3E,F). Dieselbe Umverteilung ergab sich auch für den TPK1, der nun mit dem Golgi-marker ko-lokalisierte (Abb. 3.3D,F). Daraus kann man schließen, dass die Translokation des TPK1 einen intakten Golgi benötigt.

3. Ergebnisse

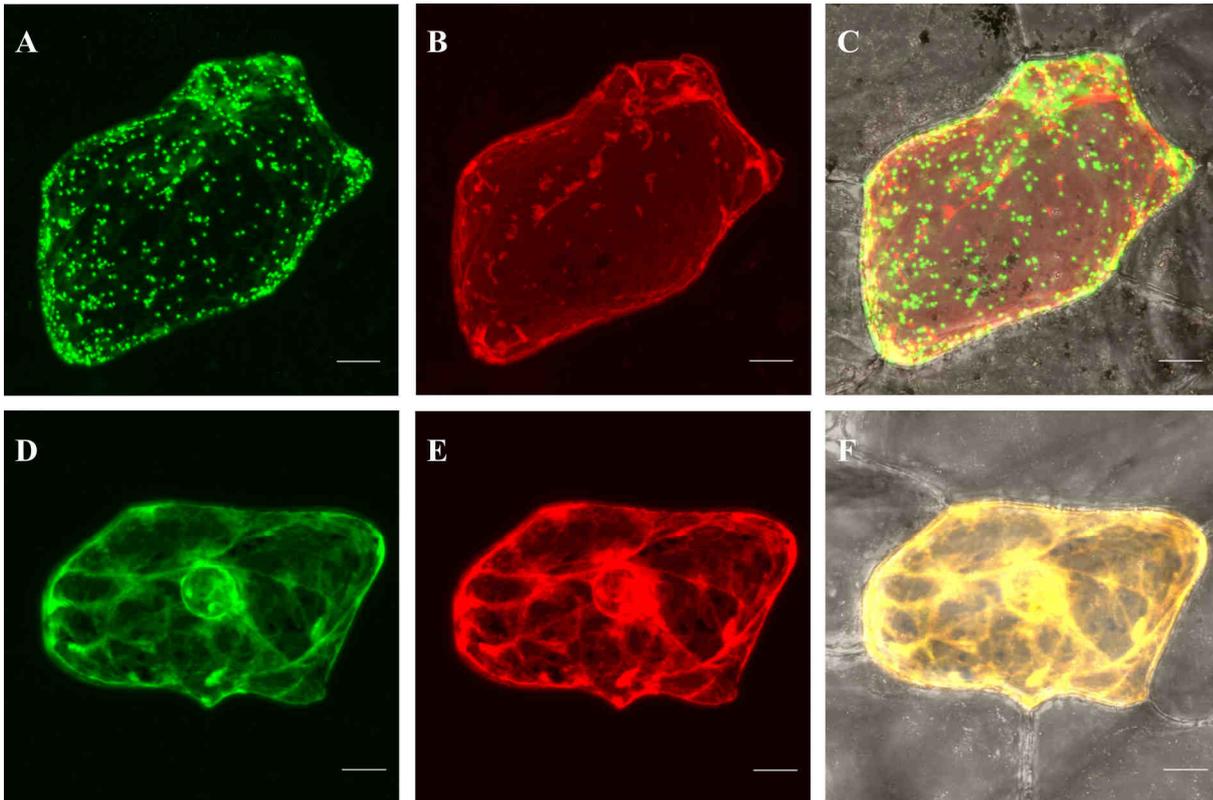


Abb. 3.3 Golgi-abhängige Translokation des TPK1

Eine TPK1::mRFP1-Fusion (**B,D**) wurde zusammen mit einer Golgimarker(ST)::GFP-Fusion (**A,D**) in Zwiebeln ko-exprimiert. Dabei wurden die Zwiebeln einmal ohne (**A,B,C**) und ein anderes Mal mit (**D,E,F**) Brefeldin A inkubiert. **C,F** Überlagerungen von A,B und Durchlichtbild bzw. von D,E und Durchlichtbild. Die Bilder entstanden durch eine Projektion von verschiedenen Schichtbildern der Zelle. Maßstab = 20µm

3.3 14-3-3 Bindung spielt keine Rolle für die Translokation von TPK1

Vergleicht man TPK1 mit dem tierischen Doppelporen Kanal KCNK3 fällt auf, dass TPK1 ähnlich wie KCNK3 ein 14-3-3 Bindemotiv und ein basisches Motiv besitzt. Beide Motive befinden sich überlappend im zytoplasmatischen N-Terminus von TPK1 (RKRRLRRRSR_pAP: unterstrichen ist das Typ I 14-3-3 Bindemotiv).

Deshalb wurde getestet, ob ein dem KCNK3 ähnlicher 14-3-3 vermittelter ER-Exportmechanismus (wie in der Einleitung beschrieben) auch TPK1 inne wohnt. Dazu wurde der N-Terminus des TPK1 durch den des TPK4 ersetzt. Die daraus erfolgte Entfernung des 14-3-3 Motivs hat keinen sichtbaren Einfluß auf die Translokation des TPK1. TPK1-TPK4NT fand sich nach transients Expression ebenso wie der Wildtyp in der Vakuolenmembran wieder (Abb.3.4A). Damit ist noch nicht ausgeschlossen, dass die 14-3-3 Bindung für die Translokation des intakten TPK1 von Nöten ist. Denn es könnte sein, dass eben wie bei KCNK3 die 14-3-3 Bindung an den N-Terminus ein ER-Rückhaltesignal maskiert, dass sich bei TPK1 ebenfalls im NT befindet. Um diese Frage endgültig zu klären, muß ich die Arbeiten von Andreas Latz heranziehen, der im 14-3-3 Bindemotiv (RSRS_pAP) das phosphorylierbare Serin einmal zu einem nicht – phosphorylierbaren Alanin und ein andermal

zu einem das negativ geladenen Phosphat imitierenden Glutamat mutiert hat. Alanin, aber auch Glutamat unterdrückte die 14-3-3 Bindung nachgewiesener Maßen (Latz *et al.*, 2007b). Dennoch fanden sich beide Mutanten wie der Wildtyp in der Vakuolenmembran wieder, womit nun klar war, dass 14-3-3 Bindung nicht für die Translokation des TPK1 notwendig ist, wohl aber für die Öffnung des Kanals (Latz *et al.*, 2007b).

3.4 Der Domänen austausch zwischen TPK1 und TPK4 bewirkt eine veränderte Translokation

Um die Targetingmechanismen von Proteinen im sekretorischen Apparat zu studieren werden oft Protein-Chimären eingesetzt, die eine veränderte Translokation zeigen (Nothwehr *et al.*, 1993, Nothwehr und Stevens, 1994, Nothwehr *et al.*, 1995, Jiang und Rogers, 1998, Cervelli *et al.*, 2004, Oufattole *et al.*, 2005). Um die Targeting-Mechanismen der TPKs genauer zu studieren, habe ich einen ähnlichen Ansatz gewählt und Chimären der TPKs erzeugt. Ich habe mich dabei vor allem auf TPK1 und TPK4 konzentriert, weil sie die bisher einzig genauer beschriebenen TPKs waren und weil sie natürlich unterschiedlich in der Zelle lokalisiert sind. TPK4 in der ER- und in der Plasmamembran, TPK1 in der Vakuolenmembran. Um Ansatzpunkte für einen Domänen austausch zu finden, wurde ein Sequenzalignment herangezogen. Bereiche, in denen sich TPK1 und TPK4 unterscheiden könnten unter anderem verantwortlich für das unterschiedliche Targeting dieser beiden Kanäle sein. Ein Sequenzalignment zeigt, dass TPK1 und TPK4 im Bereich der TM1 bis TM4 zu 35% identisch sind. Dieser Bereich beinhaltet die Porenregion. Deswegen ist eine hohe Übereinstimmung in dem für die Kanalfunktion essentiellen Teil des Kanals nicht verwunderlich. Die zytoplasmatischen orientierten Enden des Kanals dagegen unterscheiden sich in TPK1 und TPK4 mit 5% (NT) und 23% Übereinstimmung (CT) zum Teil erheblich. Mit dem Wissen, dass in vielen Studien gezeigt wurde, dass Targeting-Signale oft zytoplasmatisch orientierte Domänen eingebettet sind, wurden die Untersuchungen der Targetingmechanismen an N- und C-Terminalen Chimären von TPK1 und TPK4 begonnen. Deshalb haben Elena Jeworuzki und ich durch Einfügen von Restriktionsschnittstellen direkt vor der ersten transmembranen Domäne und direkt nach der letzten transmembranen Domäne den N- und C-Terminus des TPK1 durch den des TPK4 ersetzt. Es sei ausdrücklich daraufhin gewiesen, dass die Ergebnisse des CT-Austausches bereits in meiner Diplomarbeit (2004) und die des NT-Austausches in der Doktorarbeit von Andreas Latz (2007) beschrieben wurden. Für das Verständnis der Translokation dieser Kanäle ist es wichtig, dass ich die drei wichtigsten Erkenntnisse zusammenfasse und mit neuen Lokalisationsstudien untermauere. Zum einen wurde ersichtlich, dass die Lokalisation des TPK4 weder vom Verlust seiner zytoplasmatischen Enden noch von deren Austausch durch den N- bzw. C-Terminus des TPK1 offensichtlich beeinflusst wird. Ebenso unverändert bleibt die vakuoläre Lokalisation des TPK1 mit dem TPK4 NT anstatt des eigenen (Abb. 3.4A). Der Austausch des TPK1 CT durch den des TPK4 hingegen bewirkt eine Retention des TPK1 im ER (Abb. 3.4B). Wie aus

3. Ergebnisse

dieser und vielen folgenden Abbildungen schön zu sehen ist, bildet sich das ER aus einem Netzwerk von flachen, unterschiedlich großen Zisternen, die über schmale Tubuli miteinander verbunden sind. Dieses Netzwerk erstreckt sich zudem gleichmäßig über die ganze Zwiebelepidermiszelle. Während sich die Tonoplast-Lokalisation sich am besten in einem konfokalen Querschnitt durch die Mitte der Zelle darstellen lässt (Abb. 3.4C), lässt sich das ER am besten darstellen wenn man den optischen Schnitt tangential zum Tonoplasten wählt oder optische Schnitte aus der oberen Hälfte der Zelle aufeinander projiziert (Abb. 3.4D).

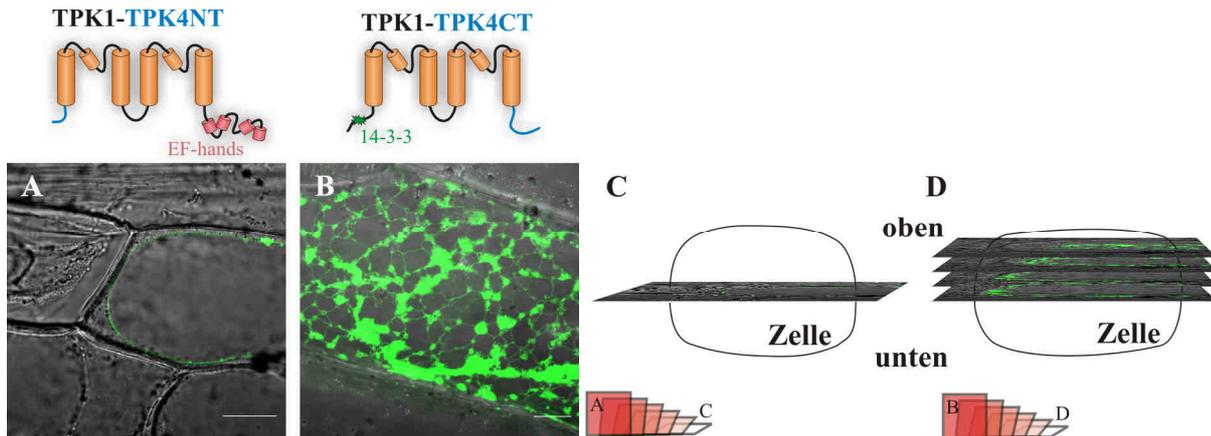


Abb. 3.4 Lokalisation von N- und C-terminalen Chimären des TPK1 und des TPK4

A Eine TPK1-TPK4NT::mGFP4-Fusion lokalisierte in der Vakuolenmembran von Zwiebelepidermiszellen, während die TPK1-TPK4CT::mGFP4-Fusion das ER nicht verlässt (**B**). **C, D** Illustration wie die Abbildungen am CLSM zu stande kommen. **C** Der Tonoplast lässt sich am besten bei einem optischen Schnitt durch die Mitte der Zelle von Zytoplasma und Plasmamembran trennen. Die Anwendung von leicht hypertonischen Lösungen wie 0,3-0,5M KNO_3 unterstützt dabei die Trennung durch ein Aufquellen des Zytoplasmas. **D** Die netzartige Struktur des ER und die Form der flachen und parallel zur Plasma und Vakuolenmembran lässt sich am besten abbilden, wenn man eine zur Vakuolenmembran ebenfalls tangentialen Schnitt wählt oder mehrere optische Ebenen vertikal zu einem Teil- oder Gesamtfluoreszenzbild der Zelle projiziert. Maßstab = 20 μm

Ob neben dem C-Terminus auch andere Bereiche offensichtlich für das korrekte Targeting nötig sind, wurde an weiteren Mutanten getestet, bei denen große Bereiche des TPK1 und TPK4 ausgetauscht oder deletiert wurden. Chimären, bei denen TPK1 und TPK4 vor der dritten TM geteilt und neu zusammengesetzt wurden, lokalisierten wie TPK4 im ER, wo sie zurückgehalten wurden und akkumulierten (Abb. 3.5). Auch Mutanten von TPK4 und TPK1, bei denen der NT direkt an der dritten TM sitzt, akkumulieren im ER (Abb. 3.5). Da diese in Abb. 3.5 skizzierten Mutanten keine funktionellen Kanäle in *Xenopus* Oozyten-Expressionsystem formen, ist es wahrscheinlich, dass die ER-Retention auf einem Faltungs- und Assembly-Defekt beruht. Außerdem unterstreichen diese Befunde, dass es auf Ebene des ER ein Kontrollsystem gibt, das einen unspezifischen Export von Membranproteinen effektiv verhindern kann. Oder, im Umkehrschluß: es gibt einen spezifischen ER-Exportmechanismus,

der den Export von vakuolären Membranproteinen wie TPK1 steuert. Für die weitere Suche nach einem spezifischen ER-Exportmotiv habe ich mich auf den C-Terminus des TPK1 konzentriert und ihn in einer Serie von Deletionen auf Sortierungssignale hin überprüft.

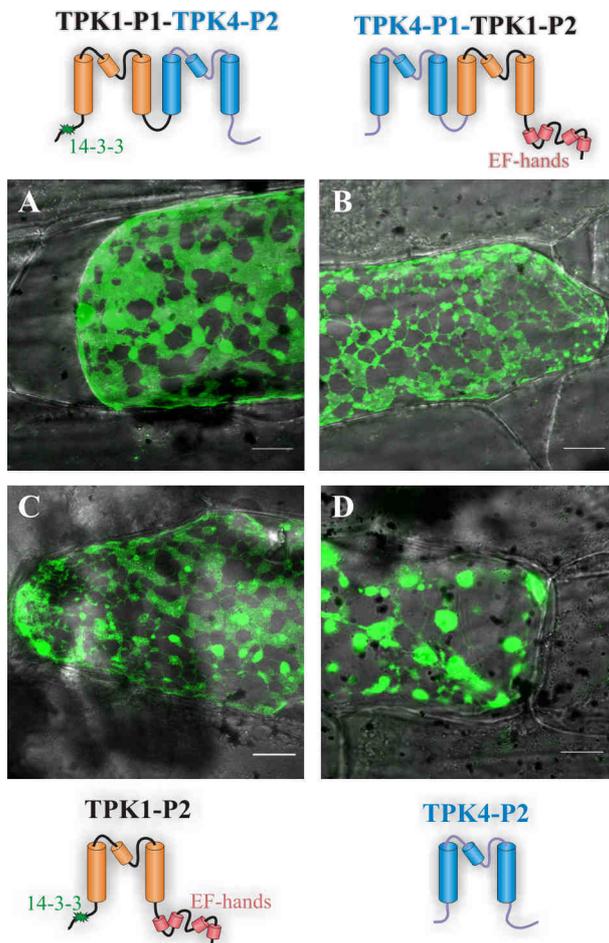


Abb. 3.5 Lokalisation von TPK1 und TPK4 Mutanten.

A Die Chimären TPK1-P1-TPK4-P2 und (B) TPK4-P1-TPK1-P2 akkumulierten nach transientser Expression von mGFP4-Fusionen in Zwiebelepidermiszellen im ER. Die um TM1-P1-TM2 deletierten Mutanten TPK1-P2 (C) und TPK4-P2 (D) wurden ebenfalls im ER zurückgehalten. Maßstab = 20µm

3.5 Der Carboxy-terminus von TPK1 ist notwendig für ER- und Golgi-Export

Geht man nach einer Consensusvorhersage der TPK Transmembranen durch ARAMEMNON (Schwacke et al., 2003), beginnt der TPK1 C-Terminus nach der vierten TM an Position 271 und erstreckt sich bis zur Aminosäure 363. Innerhalb dieses Bereichs liegen zwei EF-Hände, die eine hohe Sequenzhomologie zum neuronalen Ca^{2+} bindenden Protein Calcineurin aufweisen. Auf Basis der Kristallstruktur des Calcineurins im Komplex mit FKBP12 und FK506 (Griffith *et al.*, 1995), hat Prof. Thomas Müller (Universität Würzburg) ein Strukturmodell geschaffen, welches die Helix-Loop-Helix-Struktur der EF-Hände im TPK1 CT hervorhebt (Abb. 3.6B). Nach Ihrer Folge in diesem Modell wurden die Helices und Loops durchnummeriert (Abb.3.6) und Deletionsmutanten generiert, die nach der ersten deletierten Helix bzw. Loop benannt wurden.

3. Ergebnisse

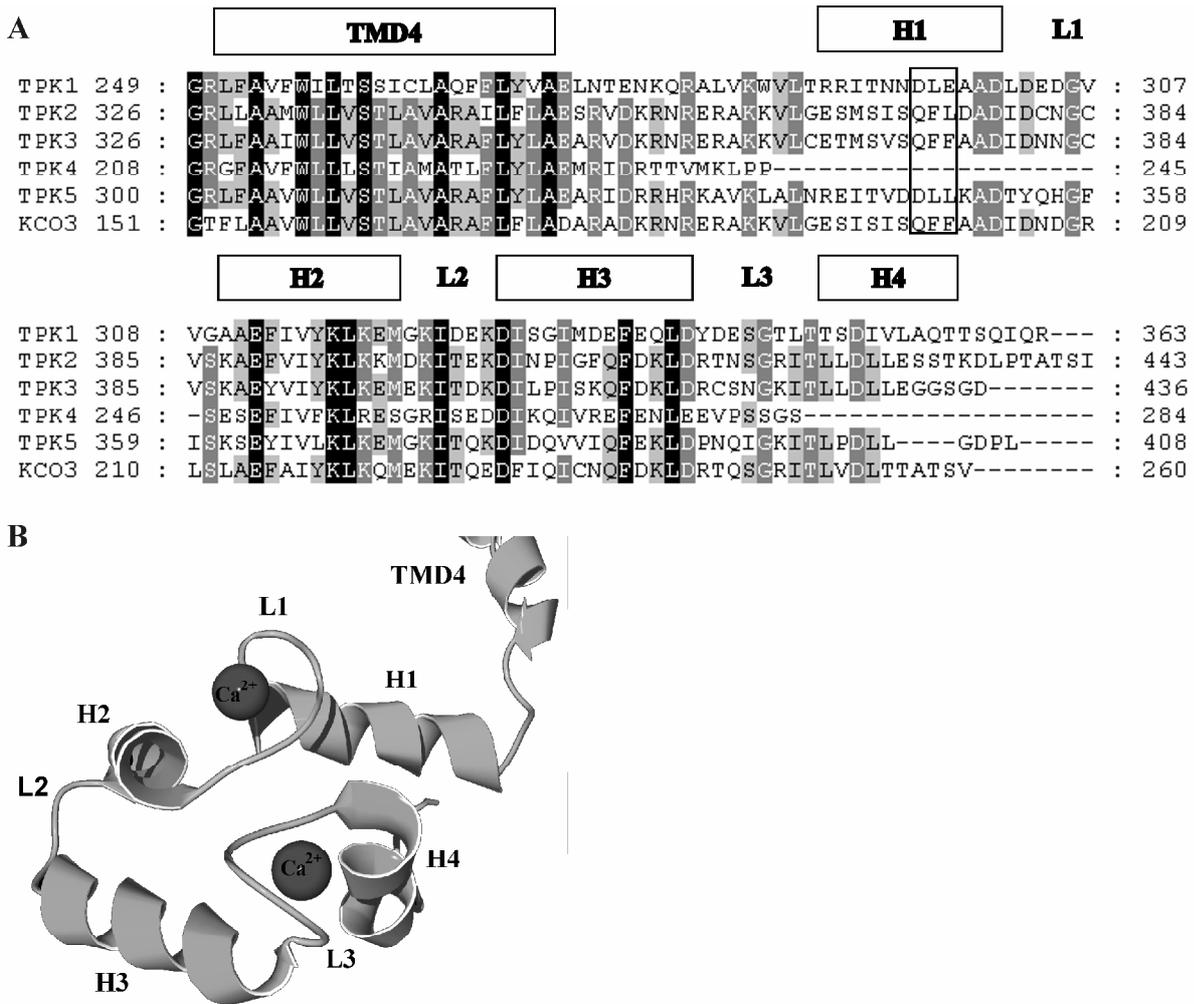


Abb. 3.6 Alignment der TPK/KCO3 CTs und ein Strukturmodell des TPK1 CT

A Alignment der C-terminalen TPK1, TPK2, TPK3, TPK4, TPK5 and KCO3 Proteinsequenzen mit den putativen α -Helices der TPK1 EF-Hände (H1-4) und dem di-azidischen ER-Export innerhalb des vertikalen Rechtecks **B** Die strukturelle Modellierung des TPK1-CT zeigt die A-Helikalen Ausläufer der letzten TM (TMD4) und die zwei EF-Hand Helix-Loop-Helix-Motive (H1-L1-H2/H3-L3-H4), von denen je ein Ca^{2+} -Ion koordiniert wird.

Wenn man den kompletten CT (Abb. 3.7, Tab. 3.3 Δ CT) oder den CT ab H1 (Abb. 3.7, Tab. 3.3 Δ H1) deletiert, beobachtete man eine Retention der Mutanten im ER. Dies deutet daraufhin, dass mit dem Bereich nach H1 ER-Exportinformation verloren ging. Außerdem legt es nahe, dass in der zuvor beschriebenen Chimäre TPK1-TPK4CT nicht das Anhängen des TPK4CT, sondern der Verlust des TPK1CT die ER-Retention verursacht hat.

Eine Deletionsmutante (TPK1 Δ L1), welche gerade noch H1 mit einschließt, wurde teilweise aus dem ER zum Golgi transportiert (Abb. 3.7). Nichtsdestotrotz war der ER-Export langsamer als der des WT und es erfolgte auch keine Translokation zur Vakuole (Tab. 3.3).

Wenn man den CT bis H2 verlängerte (TPK1 Δ H2), wiesen die Kanäle einen schnelleren ER-Export auf und nach 24h war ein Teil in der Vakuolenmembran zusehen (Abb. 3.7, Tab. 3.3). Es ist nicht klar, ob L1 ein vakuoläres Sortierungssignal enthält oder ob die Kanäle nur in der

Vakuolenmembran sichtbar wurden, weil der ER-Export beschleunigt war. In diesem Fall könnte die vakuoläre Sortierung auf einem Signal basieren, welches N-terminal vom ER-Exportsignal liegt.

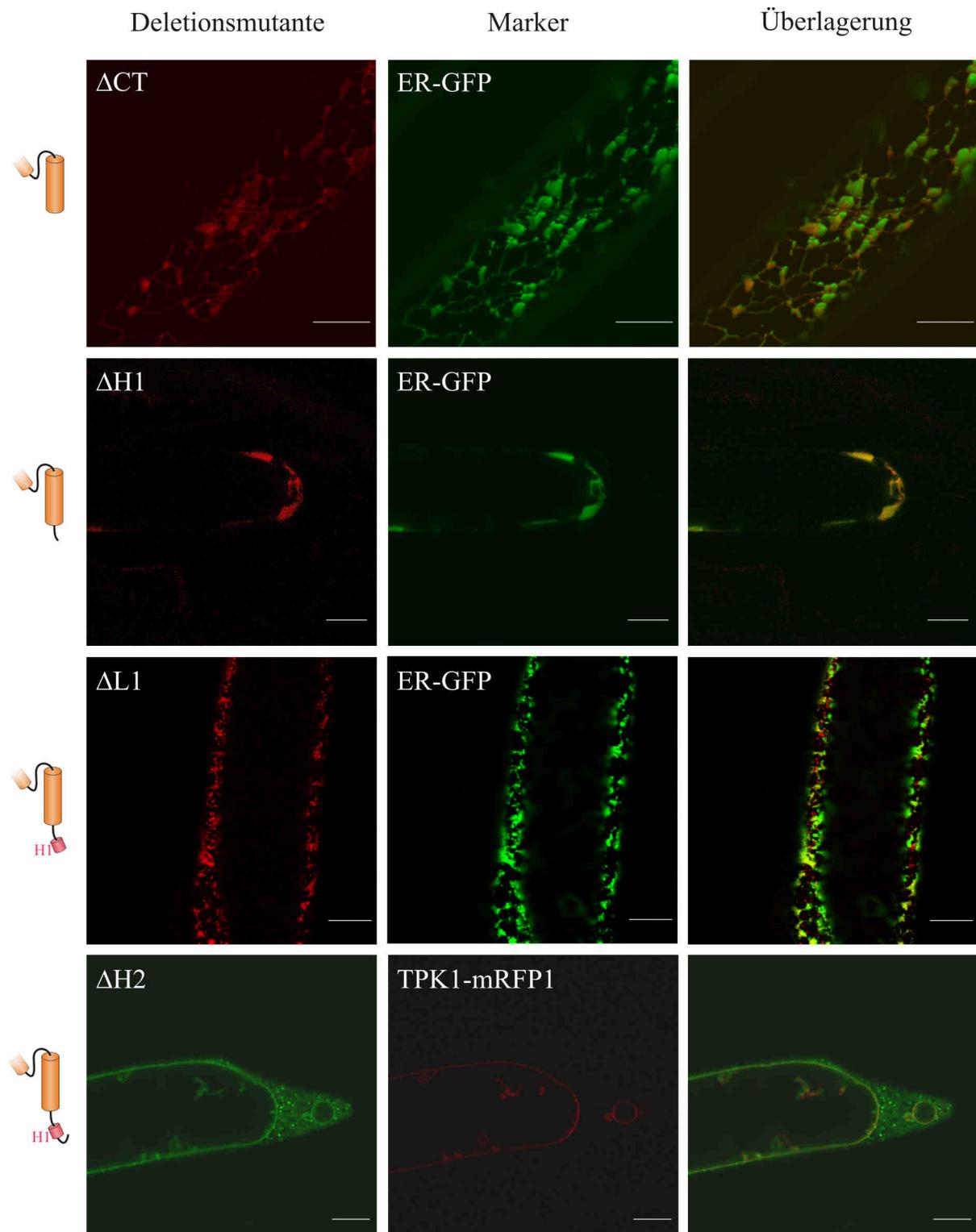


Abb. 3.7 Lokalisation von TPK1 CT-Deletionsmutanten

Co-Expression von TPK1 CT-Deletionsmutanten und Markern des Sekretorischen Apparats in Zwiebelepidermiszellen. Maßstab = 20µm

3. Ergebnisse

Zwei weitere Mutanten, TPK1 Δ L2 und TPK1 Δ H3, wurden in etwa so schnell wie der WT aus dem ER transportiert, akkumulierten dann aber im Golgi (Abb. 3.8). Die Translokation zur Vakuole war aber nicht völlig aufgehoben, sondern nur verzögert. Denn nach weiteren 19h Inkubation waren auch diese Mutanten in der Vakuolenmembran sichtbar (Tab. 3.3). Verlängerte man diese Mutante um H3 (TPK1 Δ L3) so erhielt man Kanäle, die keine größeren Translokationsdefekte mehr aufwiesen (Abb. 3.8, Tab. 3.3). Diese Ergebnisse implizieren eine Rolle von H1 im ER-Export und einen strukturellen Einfluß der übrigen C-terminalen Domänen sowohl auf den ER- als auch den Golgi-Export.

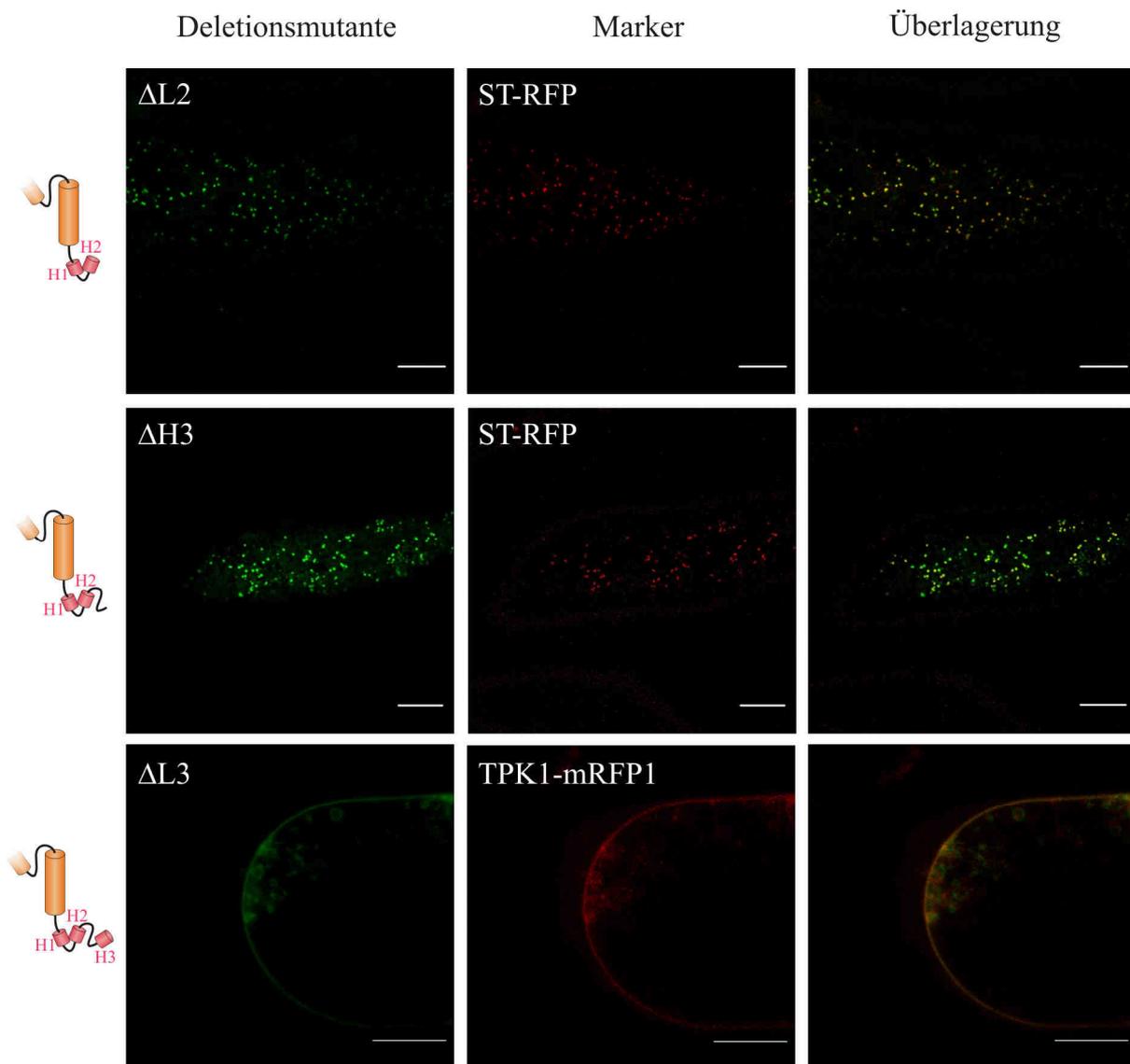


Abb. 3.8 Lokalisation von TPK1 CT-Deletionsmutanten

Co-Expression von TPK1 CT-Deletionsmutanten und Markern des Sekretorischen Apparats in Zwiebelepidermiszellen. Maßstab = 20 μ m

Tab. 3.3 Subzelluläre Verteilung von TPK1 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Kanal	Häufigkeit der Lokalisation in %								
	16h			24h			43h		
	ER	GO	VM	ER	GO	VM	ER	GO	VM
TPK1ΔCT	100			100			100		
Δ H1	100			100			100		
Δ L1	100			100	50		100	100	
Δ H2	100	100		100	100	22	89	100	79
Δ L2	100	100		100	100		82	100	73
Δ H3	100	100		100	100		93	100	57
Δ L3	100	67		100	100	100	13	13	100
DA I	100			100			100		
DAII+III	100	100		100	100	100	23	23	100
TPK1	67	100	100	63	63	100	13	13	100

Für jedes Konstrukt und jeden Zeitpunkt nach der Transfektion wurde die subzelluläre Verteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Deutliche oder fehlende Fluoreszenz im ER, im Golgi (GO) oder der Vakuolenmembran (VM) wurde mit eins oder null bewertet, für mindestens vier Zellen summiert und durch die Gesamtzahl der analysierten Zellen geteilt. L= Loop, H= Helix, DA= di-azidisches Motiv, CT= Carboxy-Terminus. Δ = Deletion, Δ CT= TPK1 Δ aa274-363, Δ H1= TPK1 Δ aa285-363, Δ L1= TPK1 Δ aa300-363, Δ H2= TPK1 Δ aa309-363, Δ L2= TPK1 Δ aa322-328, Δ H3= TPK1 Δ aa328-363, Δ L3= TPK1 Δ aa339-363.

3.6 Der ER-Export von TPK1 beruht auf einem di-azidischen Motiv

Wie zuvor erwähnt sind Aminosäuren in H1 und L1 notwendig für den ER- und Golgi-Export von TPK1. Gerade zu diesem Bereich gibt es keine homologe Sequenz im TPK4 (Abb. 3.6A), der zum Großteil im ER lokalisiert. Wie sieht aber das für den ER-Export von TPK1 nötige Strukturelement genau aus?

Sucht man in diesem Bereich nach bekannten Sortierungsmotiven so findet man drei di-azidische Motive (292-ITNNDLEAADLDEDGVV-308, unterstrichen). Um zu testen, ob eines dieser Motive am ER-Export von TPK1 beteiligt ist, wurden zum einen die Aspartate 301 und 303 (DAII+III) und zum anderen Aspartat 296 und Glutamat 298 (DAI) zu Glycinen mutiert. Während TPK1-DAII+III normale vakuoläre Lokalisation zeigte, lokalisierte TPK1-DAI ausschließlich im ER (Abb. 3.9, Tab. 3.3).

Zu diesem Zeitpunkt war aber noch nicht hundertprozentig klar, ob es sich bei diesem di-azidischen Motiv um ein ER-Exportmotiv handelt oder ob es an der Dimerisierung des Kanals beteiligt ist. Denn das „Ausknocken“ von Assemblierungsdomänen führt oft zur ER-Retention (Sharma *et al.*, 1999, Zerangue *et al.*, 1999, Ma *et al.*, 2001). Wenn man, wie in Abbildung 3.9 dargestellt, TPK1-DAI mit dem TPK1 Wildtyp co-exprimiert sieht man nach einem Tag, dass der TPK1 WT vollständig in der Vakuolenmembran sitzt und die Mutante ausschließlich im ER zu sehen ist. Wie passt das zu der Annahme, dass die TPK-Kanäle

3. Ergebnisse

Dimere bilden? Vorrausgesetzt diese Kanäle dimerisieren, dann müsste man theoretisch entweder 50% der Mutante in der Vakuolenmembran sehen oder 50% des WT im ER, je nachdem was in den Heteromeren überwiegt, das vorhandene ER-Exportmotiv oder der Verlust eines ER-Exportmotivs. Eine Erklärung könnte sein, dass das di-azidische Motiv an der Assemblierung des Kanals beteiligt ist und eine andere wäre, dass die Assemblierung nicht im ER stattfindet und auch Monomere das ER verlassen können.

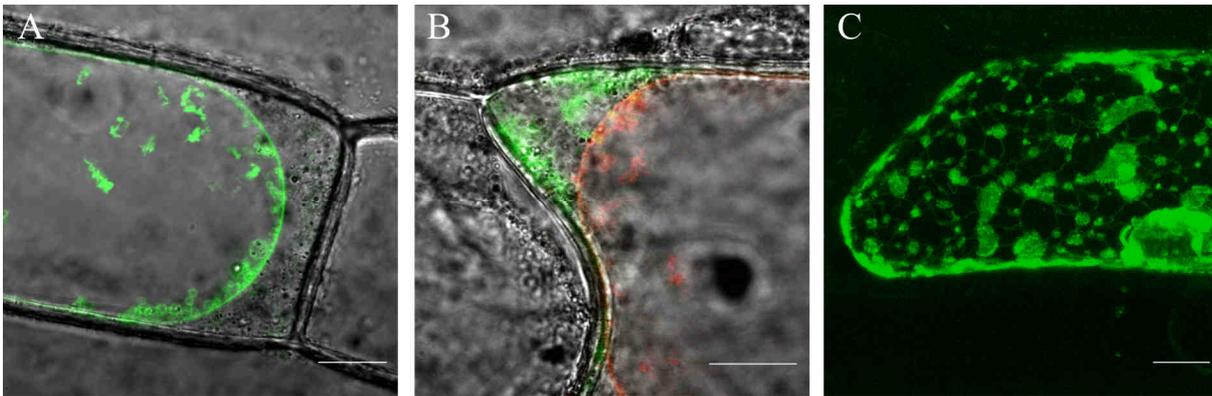


Abb. 3.9 Subzelluläre Lokalisation von TPK1-Mutanten in di-azidischen Motiven

A Expression von TPK1-DAII+III::mGFP4 im Tonoplast von Zwiebelepidermiszellen **B** Co-Expression von TPK1::mRFP1 und TPK1-DAI::mGFP4 **C** Aufnahme einer allein TPK1-DAI::mGFP4 exprimierenden Zwiebelepidermiszelle. Maßstab = 20µm

Machte man denselben Versuch mit anderen bereits beschriebenen TPK1 CT-Deletionsmutanten, so erkannte man, dass trotz intakten di-azidischen Motivs eine ähnliche subzelluläre Trennung der beiden Signale stattgefunden hat ($\Delta H2$ Abb. 3.7, $\Delta H3$ Abb. 3.10). Auch hier findet anscheinend keine Heteromerisierung statt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass DAI an der Assemblierung beteiligt ist. Es wird aber klar, dass eine möglicherweise fehlende Dimerisierung keinen Einfluß auf den ER-Export der deletierten Kanaluntereinheiten hat. Die ER-Retention der DAI-Mutante ist also nicht notwendigerweise Folge einer fehlenden Dimerisierung, sondern ist begründet im Verlust eines di-azidischen ER-Exportmotivs.

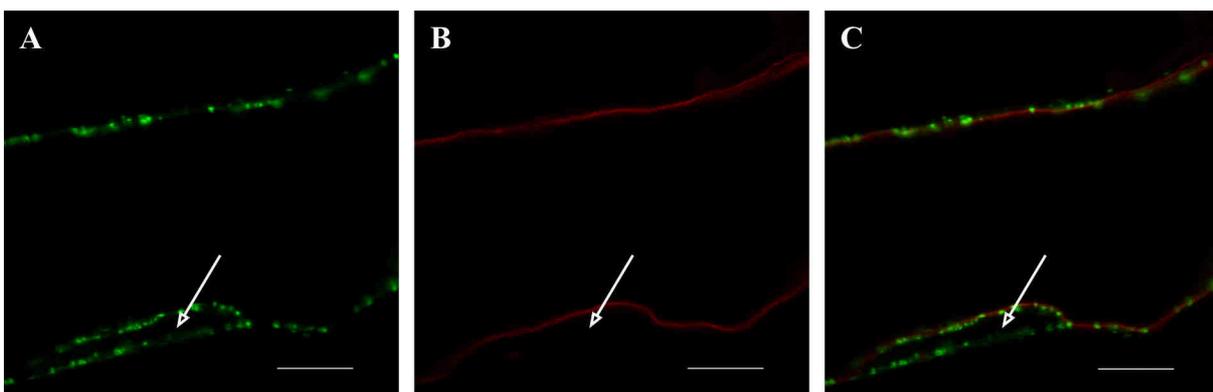


Abb.3.10 Lokalisation von TPK1ΔH3 und TPK1

A TPK1ΔH3, fusioniert mit GFP, lokalisiert im Golgi, während TPK1, fusioniert mit mRFP1, ausschließlich im Tonoplast zu lokalisieren ist (B). Der Pfeil markiert den Nukleus. C Überlagerung von A und B. Maßstab = 20µm

Interessanterweise besitzen TPK1 homologe Kanäle anderer Pflanzenarten, die eine Ähnlichkeit von 50-60% aufweisen, dasselbe di-azidische Motiv an derselben Position im C-Terminus (Abb. 3.11). Sogar ein Tandemporen Kaliumkanal des Moores *Physcomitrella patens ssp patens* (Pp1) weist dasselbe Motiv auf (nicht gezeigt). Diese Kanäle wurden zwar noch nicht hinsichtlich ihrer Lokalisation untersucht, doch lässt sich nun zumindest ein ähnlicher ER-Exportmechanismus vermuten. Im Gegensatz dazu wurde für TPK2, TPK3 und TPK5 die gleiche vakuoläre Lokalisation wie beim TPK1 nachgewiesen (Latz *et al.*, 2007b), dennoch besitzen sie kein di-azidisches Motiv wie der TPK1 (Abb. 3.11).

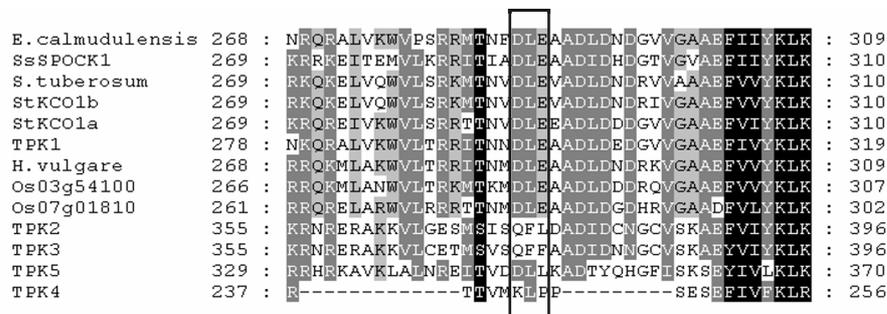


Abb. 3.11 Multiples Sequenzalignment von TPK1 homo- und heterospezifischen Homologen

Das Alignment umfasst die Aminosäuren des proximalen C-Terminus. Die Schattierung gibt den Grad der Konservierung an (nach Blossum 62). Durch die vertikale Box sind die di-azidischen Motive markiert. Die Sequenzen stammen von den bei ARAMEMNON (Schwacke *et al.*, 2003) aufgelisteten homo- und heterospezifischen TPK1 Homologen.

Wird die Translokation zur Vakuole bei diesen Kanälen auch durch den C-Terminus bestimmt? Um diese Frage zu beantworten, wurde wie beim TPK1 mittels einer PCR der C-Terminus des TPK3 von der TMD4 an deletiert. Diese Deletionsmutante, TPK3ΔCT zeigte im Gegensatz zu TPK1ΔCT unverändert eine vakuoläre Translokation (Abb. 3.12). Der CT des TPK3 enthält wie vermutet kein di-azidisches ER-Exportmotiv. Darüber hinaus gibt es scheinbar kein vakuoläres Sortierungssignal. Interessant in diesem Zusammenhang ist, was über zahlreiche Versuche der heterologen Expression der TPKs und auch des TPC1 augenscheinlich geworden ist, aber nicht näher ausgewertet wurde: Die Zeit, bis die TPK1 Kanäle in der Vakuole von Zwiebelepidermiszellen sichtbar wurden, war im Vergleich zu allen anderen TPKs viel kürzer besonders zu der des TPK3, KCO3 und des TPC1. Dass dieses Phänomen mit vorhandenen oder fehlenden di-azidischen ER-Exportmotiven zusammenhängt erscheint plausibel, kann aber nicht eindeutig nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

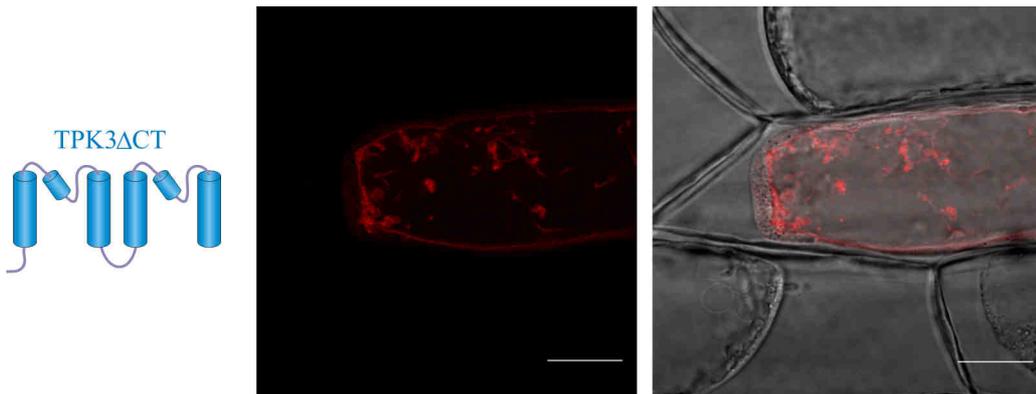


Abb. 3.12 TPK3 Δ CT Lokalisation in einer Zwiebelepidermiszelle

Mitte: Darstellung der mRFP1-Fluoreszenz in einer Zwiebelepidermiszelle die TPK3 Δ CT exprimiert. **Rechts:** Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzsignalen. Maßstab = 20 μ m

Einen weiteren Schlüssel zum Verständnis wie Kaliumkanäle translozieren, könnten Untersuchungen der transmembranen Domänen (TMD) liefern. TMDs wurden schon oft mit der Translokation von Membranproteinen in Verbindung gebracht, weil sie ER-Retentionssignale oder rein physikalische Sortierungsinformation inne hatten (Fiedler und Rothman, 1997, Jiang und Rogers, 1998, Brandizzi *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2002, Sato *et al.*, 2003).

Eine umfassende Untersuchung der Funktion der TPK TMD für die Translokation würde die Isolierung aller Transmembranen voraussetzen, voraussetzen die Transmembranen mit Reportern zu versehen und zumindest sicher zu stellen, dass die Transmembranen die richtige Orientierung einnehmen. Da eine solche umfassende Untersuchung einen zu großen Aufwand bedeuten würde, habe ich mich darauf beschränkt eine Idee davon zu bekommen, wie die Länge und weniger die Zusammensetzung der letzten TPK1 und TPK3 TMD die Translokation des Reporters mRFP1 beeinflusst. Laut einer Konsensusvorhersage sind die letzten TMD von TPK1 und TPK3 22 und 21 Aminosäuren lang. Laut vorangegangenen Studien ist diese Länge ausreichend damit ein Typ I Membranprotein rein über einen Massenstrom das ER verlassen kann und aufgrund der Länge seiner hydrophoben Domäne im Golgi akkumuliert (Brandizzi *et al.*, 2002).

Mit dieser Vorhersage wurden die TMD4 von TPK1 (aa217-273) und TPK3 vom CT (aa292-353) und den anderen Transmembranen isoliert, mit mRFP1 fusioniert und in Zwiebelepidermiszellen überexprimiert.

Das TPK1-TM4 Konstrukt fand sich 43h nach Transfektion immer noch hauptsächlich im ER wieder, während der ER/Golgi-Marker ERD2 sich stärker im Golgi anreicherte (Abb. 3.13).

Das TPK3-TM4 Konstrukt akkumulierte, wie erwartet, nach derselben Zeit im Golgi (Abb. 3.13). Um zu testen, ob das di-azidische Motiv den ER-Export von TPK1-TM4 bewirken könnte, wurde dieses Konstrukt um den CT von TPK1 verlängert. Die entsprechende mRFP1-Fusion war jedoch immer noch im ER zu lokalisieren (Abb. 3.13). Eine mögliche Erklärung

hierfür wäre, dass die TM4 eine falsche Orientierung während der Translation angenommen hat und somit der CT mit dem di-azidischen Motiv luminal statt zytoplasmatisch orientiert wäre. Dennoch kann man aus den Ergebnissen schließen, dass die TM4 von TPK3 gut in die Golgi-Membran passt, aber ohne zusätzliche Signale nicht zur Plasma- oder Vakuolenmembran transloziert wird.

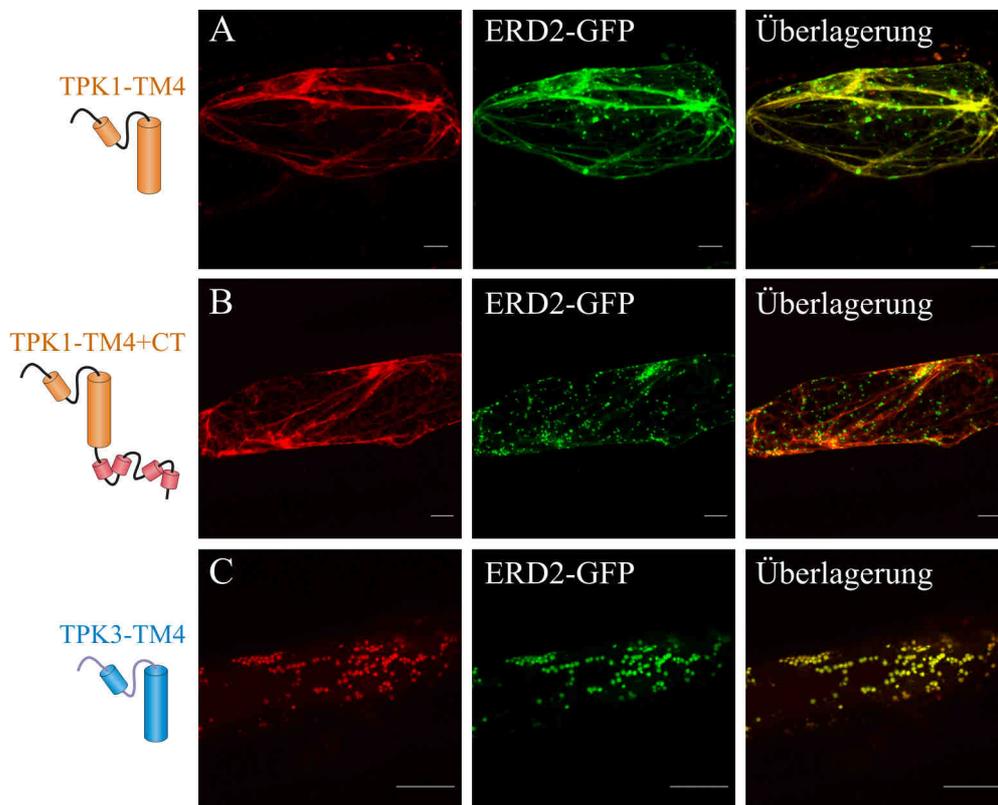


Abb. 3.13 Subzelluläre Lokalisation von TM4-Konstrukten von TPK1 und TPK3
Co-Expression von A TPK1-TM4 B TPK1-TM4+CT und C TPK3-TM4 mit dem ER/Golgi-Marker ERD2-GFP in Zwiebelepidermiszellen. Maßstab = 20µm

3.7 Die Oberflächenexpression von TPK4 wird im heterologen und homologen System sehr niedrig gehalten

Da TPK4 in der Zelle den nahezu spannungsunabhängigen Austausch von Kalium mit der Umgebung bewirkt, führt die Expression dieses Kanals in der jeweiligen Zelle dazu, dass das Membranpotential zum großen Teil durch Kalium bestimmt wird. Aufgrund dieser Eigenschaften würde dieser Kanal in jeder normalen Pflanzenzelle eine Depolarisation bewirken, was eine starke Reduktion der Aufnahme von Nährstoffen über sekundäre aktive Transportsysteme zur Folge hätte.

Allein wegen dieser Eigenschaften wäre zu erwarten, dass Zellen, welche TPK4 exprimieren, eine besondere Funktion zu kommt und dass die Oberflächenexpression dieses Kanals transkriptionell und post-transkriptionell auf einem niedrigen Niveau gehalten bzw. reguliert wird.

3. Ergebnisse

Quantitative RT-PCR Experimente konnten dann auch zeigen, dass TPK4 ausschließlich im Pollen und auf sehr niedrigem Niveau (~160 mRNA-Moleküle/10000 Moleküle Aktin-mRNA) exprimiert wird (Becker *et al.*, 2004).

Dass auch die Translokation des TPK4 zur Plasmamembran strikt kontrolliert wird, zeigte die Überexpression von TPK4-GFP-Fusionen im heterologen wie auch im homologen System.

Nach der transienten Transformation von Zwiebel (*Allium cepa*) und Tabak (*Nicotiana benthamiana*) mit Hilfe des Particle Bombardments ließ sich das Fusions-Protein jeweils im ER darstellen (Abb. 3.14). Wie aber aus Abb. 3.14 ebenso ersichtlich ist fand keine sichtbare Translokation des Kanals zur Plasmamembran statt. Stattdessen führte die Überexpression dazu, dass sich vom ER Membran-Vesikel abschnürten, die den TPK4 in höherer Dichte enthielten als das ER selbst. Der Grund hierfür ist nicht im heterologen Expressionssystem zu sehen, welches unter Umständen die Targetinginformationen des TPK4 nicht richtig verwerten kann. Die Expression einer TPK4-GFP-fusion unter Kontrolle des „Pollen lelat“, eines von zwei voneinander abhängigen regulatorischen Promotor-Elementen des pollenspezifischen *lat52* Gens aus der Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), in *Arabidopsis* führte zum selben Verteilungsmuster des TPK4 innerhalb des sekretorischen Apparats (Abb. 3.14B) (diese transgenen Pflanzen wurden von Kerstin Neuwinger unter der Anleitung von Dirk Becker hergestellt., der „Pollen lelat“ wurde uns freundlicherweise von Gerhard Obermeyer, Universität Salzburg zur Verfügung gestellt). Die Vesikel-abschnürung scheint also eher eine Folge der Überexpression und einer damit zusammenhängenden Überproduktion von Membranlipiden zu sein, erklärt aber nicht die Akkumulation des TPK4 in diesen Vesikeln.

Die Retention im ER und der Zerfall des ER in Vesikel ist auch nicht auf die Kaliumkanalfunktion des überexprimierten TPK4 zurückzuführen, denn eine Knock-out Mutante des TPK4 wird ebenfalls im ER zurückgehalten (Abb. 3.14D).

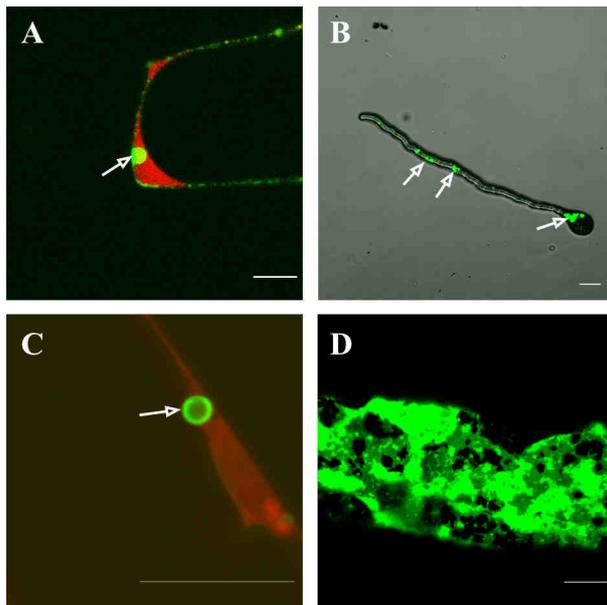


Abb. 3.14 Subzelluläre Lokalisation von TPK4 in verschiedenen Pflanzen

A Expression von *TPK4::mGFP4* in einer Epidermiszelle von *Allium cepa*. Das Zytoplasma ist mit Hilfe von mRFP1 rot markiert. Die weißen Pfeile markieren Vesikel oder sich bildende Vesikel mit einer hohen Dichte an TPK4 **B** Ein keimender Pollen von *Arabidopsis thaliana* (Quelle: Dirk Becker/Kerstin Neuwinger) **C** *TPK4::mGFP4* in einem Trichom von *Nicotiana benthamiana* exprimiert. **D** *TPK4D86N::mGFP4* in einer Epidermiszelle von *Allium cepa* exprimiert. Maßstab =20μm

3.9 Ein „domain-swapping“ Ansatz zur elektrophysiologischen Charakterisierung der TPK-Kanäle

Als erster pflanzlicher Tandem-Poren-Kaliumkanal wurde TPK4 nach cRNA-Injektion in Eizellen des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Becker *et al.*, 2004) und später auch nach Expression in Tabak (Latz *et al.*, 2007c) elektrophysiologisch untersucht. Während TPK4 sich in den Froscheizellen funktionell exprimieren ließ, kam es nach cRNA-Injektion zu keiner funktionellen Expression der anderen TPKs und von KCO3.

Die Gründe hierfür wurden nicht genauer untersucht, könnten aber einmal in einem falschen Targeting dieser eigentlich vakuolären Kanäle liegen. Das tierische Pendant zur pflanzlichen Vakuole wäre eher im Lysosom zu sehen als in der Plasmamembran. Zum anderen wäre es denkbar, dass die Kanäle aufgrund von intrinsischen oder oozyten-spezifischen Faktoren in einem inaktiven, geschlossenen Zustand vorliegen. Durch die elektrophysiologische Charakterisierung des TPK1 in Hefevakuolen ist z.B. bekannt, dass dieser Kanal über Ca^{2+} -Bindung sowie Phosphorylierung und anschließender 14-3-3-Bindung aktiviert wird (Latz *et al.*, 2007b). Fehlen entsprechende Enzyme und Ko-Faktoren in Oocyten, könnte das ebenso deren In-Funktionalität erklären.

Nichtsdestotrotz kann man sich das Oozyten-Expressionssystem, das sich durch einen kleinen Anteil endogener Leitfähigkeiten und eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auszeichnet, für die funktionelle Charakterisierung der vakuolären TPKs zu nutze machen.

Einige Arbeiten in unserem Labor (Hoth *et al.* (2001); Diplomarbeit Dietmar Geiger) haben gezeigt, dass man durch gezielten Austausch von Domänen zwischen unterschiedlichen

3. Ergebnisse

Kanaluntereinheiten wertvolle Rückschlüsse auf die Funktionsweise dieser Kanäle und die Rolle der ausgetauschten Domänen für die Kanalfunktion erhält.

Deswegen wurde in folgenden Versuchen verschiedene Domänen des TPK4 durch entsprechende Domänen der anderen TPKs und des KCO3 ausgetauscht. Die Kombination aus TPK4 und Teilen der vakuolären TPKs hat in einigen Fällen die funktionelle Charakterisierung einzelner Kanaldomänen von TPK4 und der übrigen TPKs ermöglicht.

Keine messbare Kanalaktivität zeigte sich beim Austausch der cytoplasmatischen N- und C-Termini von TPK4 durch die entsprechenden Domänen von TPK1. Einer von vielen möglichen Gründen könnte darin liegen, dass sowohl NT und CT von TPK1 sich stark von der Sequenz und somit der Struktur des TPK4 NT und CT unterscheiden und die Termini von TPK1 bekanntermaßen starken Einfluss auf das Öffnen und Schließen dieses Kanals haben. Das vollständig intakte TPK4 N- und C-Termini nicht für die Kanalfunktion nötig sind, zeigten N- (TPK4d1-16) und C-terminale (TPK4d263-284) Deletionsmutanten von TPK4 (Abb. 3.15), die dieselben schwach spannungsabhängigen Gleichgewichtströme zeigen wie der Wildtyp. Die Schwankung in den Auswärtströmen hängt wahrscheinlich, wie später noch verdeutlicht werden soll, mit einem höheren Expressionniveau der TPK4d1-16 Mutante zusammen.

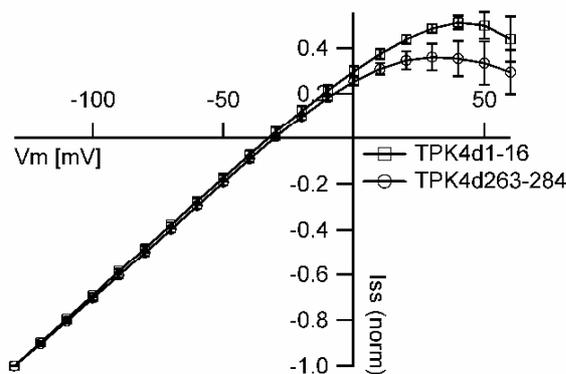


Abb. 3.15 Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtströme von zwei TPK4 Deletionsmutanten

Die N-terminale (\square) und die C-terminale (\circ) Deletionsmutante wurden in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Gleichgewichtströme (I_{ss}) bei verschiedenen Membranspannungen (V_m) und mit 30mM K^+ in der Standardbadlösung (pH7,5) aufgezeichnet und normiert. Mittelwert \pm SE, n=4-5.

Für weitere Untersuchungen wurde die zweite Porendomäne des TPK4 durch die zweite Porendomäne von TPK1, 2, 3 und 5 sowie durch die Porendomäne von KCO3 ersetzt. Hierzu wurden im Bereich der die Transmembranen 3 und 4 codierenden Sequenz Restriktionsschnittstellen eingefügt und über diese die komplette Porenschleife ausgetauscht (Abb. 3.16B).

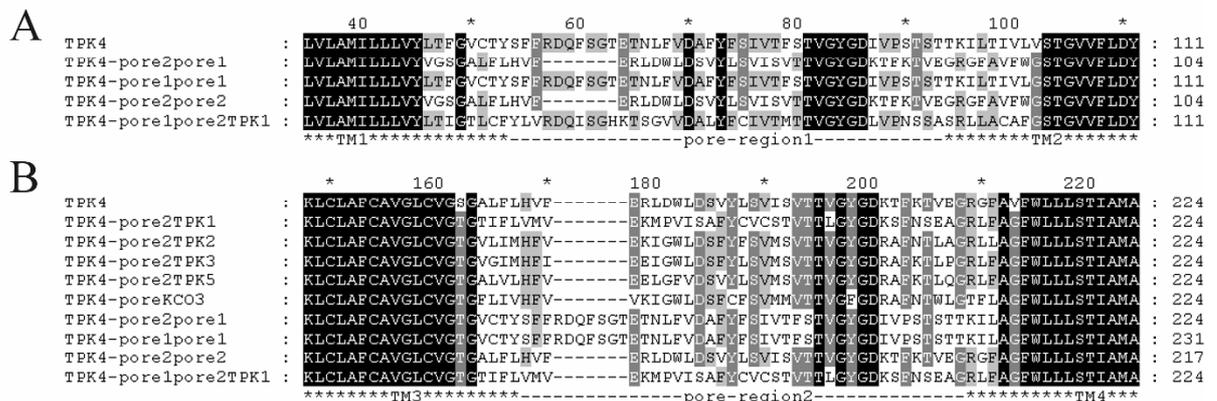


Abb. 3.16 Proteinsequenz-Alignment verschiedener TPK4/TPKx Chimären

A Porenregion eins aus einem Alignment von TPK4 und TPK1 Chimären, bei denen unter anderem die erste Porenregion ausgetauscht wurde. **B** Porenregion zwei aus einem Alignment von TPK4 und TPK1 Chimären, bei denen die zweite Porenregion des TPK4 ausgetauscht wurde.

Die anschließende cRNA-Injektion dieser Chimären zeigte, dass die Porendomänen von TPK2, 3 und TPK5, nicht aber die Porendomänen von TPK1 und KCO3 den TPK4 zu einem funktionellen Kaliumkanal komplimentieren konnten (Abb 3.17).

Dabei veränderten sich weder die instantane Aktivierung des TPK4 noch die typische Strom-Spannungs-Beziehung des TPK4, die bei gegenüber dem Umkehrpotential positiven Spannungen durch einer Reduktion der Leitfähigkeit des Kanals charakterisiert ist (Becker *et al.*, 2004)(Abb. 3.17). Diese Eigenschaft wurde für den WT durch Einzelkanalmessungen im Oozyten-Makropatch bestimmt (Becker *et al.*, 2004).

3. Ergebnisse

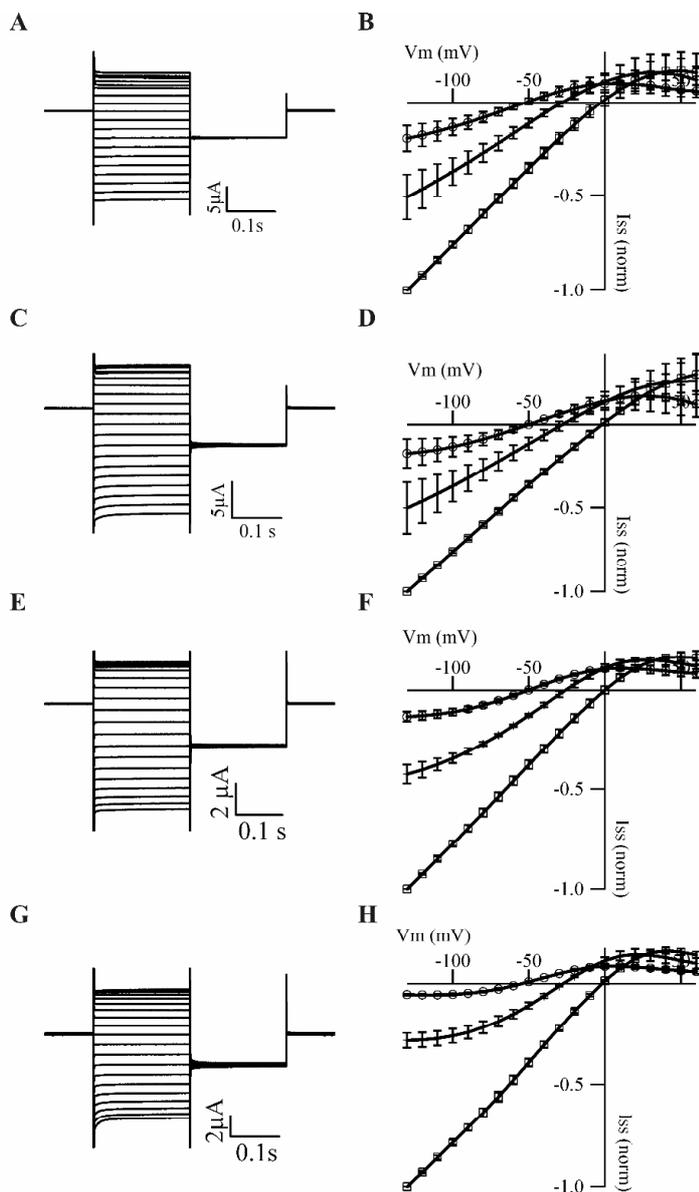


Abb. 3.17 Makroskopische Strom-Spannungsbeziehung von TPK4-TPKx Porenchimären

Ganzzellströme von *Xenopus* Oozyten, die entweder TPK4 (A,B), TPK4pore2TPK5 (C,D) TPK4pore2TPK2 (E,F) oder TPK4pore2TPK3 (G,H) exprimieren wurden mittels DEVC-Technik aufgezeichnet. A,C,E,G Einzelzell-messungen in 30mMK⁺ pH7,5 Standardlösung. Das Membranpotential wurde am Beginn und Ende eines jeden Durchgangs auf -30mV geklemmt, was aufgrund des elektrochemischen Potentials des Kaliums keinen Strom zur Folge hat (~Nulllinie). In der zweiten Phase wurde von Durchgang zu Durchgang in 10mV Schritten von +60mV bis -130mV geklemmt und in der dritten Phase auf -60mV, um einen konstante Messung sicherzustellen. B,D,F,H Das selbe Pulsprotokoll wurde auch bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen in der Standardbadlösung (pH 7,5) ((\circ) 10mM K⁺, ($+$) 30mM K⁺ und (\square) 100mM K⁺) angewendet, um am Ende

des Testpulses die Gleichgewichtsströme I_{ss} abzugreifen und gegen das Membranpotential aufzutragen. Mittelwerte \pm SE mit $n = 3-9$.

Eine andere Eigenschaft des TPK4, die maßgeblich durch die in diesem Versuch ausgetauschten Porendomänen bestimmt wird ist die Selektivität. TPK4 ist permeabel für Kalium in geringerem Maß für Rubidium und nahezu undurchlässig für die anderen Alkali-Ionen Na⁺ und Li⁺. Die Selektivitätsreihe der TPK Chimären für diese Alkali-Ionen wurde über die relative Permeabilität zu Kalium bestimmt. Daraus ergab sich, dass die Permeabilität von Natrium wie beim WT weniger als 3% der Kaliumpermeabilität betrug (Tab. 3.4), also der eines kaliumselektiven Kanals entspricht.

Tab. 3.4 Relative Permeabilitäten P_x/P_k verschiedener TPK Chimären und Mutanten für Rb^+ und Na^+

Kanal	Rb^+ (mean±SE)	Na^+ (mean±SE)	n
TPK4	0,75±0,012	0,03±0,001	11
TPK4pore2TPK2	0,97±0,007	0,01±0,001	6
TPK4pore2TPK3	0,92±0,02	0,02±0,002	7
TPK4pore2TPK5	0,83±0,005	0,02±0,001	4
TPK4pore1pore1	0,72±0,01	0,05±0,015	3
TPK4Y198F	0,87±0,056	0,02±0,002	3

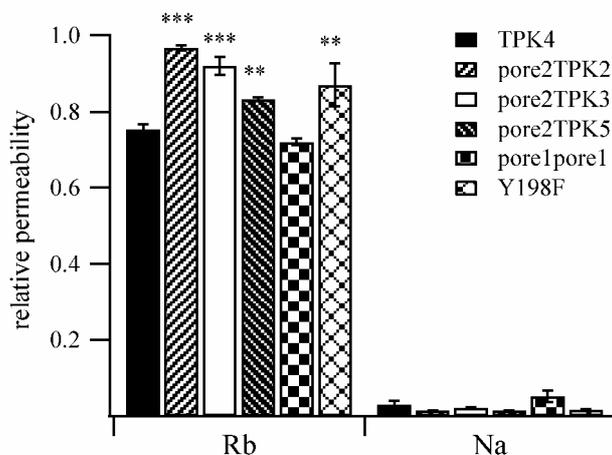
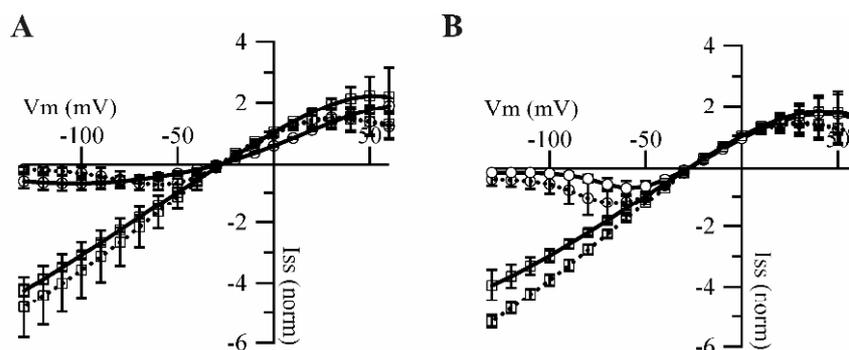


Abb. 3.18 Graphische Darstellung der relativen Permeabilität verschiedener TPK4 Mutanten

Graphische Darstellung der in Tab. 3.4 aufgeführten Werte. *** = höchst ($\alpha \leq 0.001$, t-test) und ** = hoch signifikant ($\alpha \leq 0.01$, t-test) verschieden von TPK4.

Andererseits ist die relative Permeabilität von Rubidium bei den drei Porechimären signifikant erhöht (Abb. 3.18), was wahrscheinlich von einer leicht geänderten Porengeometrie herrührt. Dabei besitzt Rb^+ bei TPK4-Pore2TPK2 fast die gleiche Permeabilität wie Kalium. Streng genommen kann man dann eigentlich nicht mehr von einem kaliumselektiven Kanal reden. Aber da Rubidium in der Zelle und im Erdreich in viel geringeren Konzentrationen vorkommt und es in der Zelle viele der Funktionen von Kalium übernehmen kann ist eine hohe Permeabilität von Rubidium eher von geringerer Bedeutung. Die Porenchimeren lassen sich ebenso wie der WT mit dem Kaliumkanalblocker Cs^+ und den Tandem-Porenkanalblocker Ba^{2+} blocken (Abb. 3.19) und sind somit impermeabel für Cs^+ und wahrscheinlich für divalente Kationen wie Ba^{2+} .



3. Ergebnisse

Abb. 3.19 Barium- und Cäsium-Block

Um die Spannungsabhängigkeit des (A) Ba^{2+} - und des (B) Cs^{+} - Blocks zu untersuchen, wurden die Oozyten mit 30mM K^{+} Standardlösung (pH7.5) mit (\circ) und ohne (\square) 5mM Cs^{+} oder 5mM Ba^{2+} umspült. TPK4 (gestrichelte Linie) und TPK4pore2TPK5 (durchgezogene Linie) Gleichgewichtsströme (Iss) wurden normiert (0mV) und gegen das Membranpotential aufgetragen. Mittelwert \pm SE, n = 3-6

Zusammengenommen lässt sich sagen, dass die Porendomänen von TPK2, 3 und 5 alle Voraussetzungen für die Bildung eines funktionellen, kaliumselektiven Tandem-Porenkanals in der Vakuolenmembran besitzen.

Es liegt nahe die Infunktionalität der beiden Porechimeren TPK4-Pore2TPK1 und TPK4-PoreKCO3 darin zu sehen, dass sie strukturell nicht zur Porendomäne des TPK4 passen. Tatsächlich weisen deren beiden Porendomänen gegenüber den anderen deutlichere Sequenzunterschiede auf (Abb. 3.16B).

Die Unterschiede liegen dabei weniger im Selektivitätsmotiv als im Bereich der N-terminalen Porenhelix. Die Hypothese, dass ein zusätzlicher Austausch der Porendomäne 1 in TPK4-Pore2TPK1 durch die erste Porendomäne 1 des TPK1 eine funktionelle Pore ergeben würde, wurde widerlegt.

Desweiteren wurde getestet, ob die TPK4 Porendomänen auch innerhalb derselben Untereinheit ausgetauscht beziehungsweise ersetzt werden können. Wie aus einem Alignment der Porechimeren von TPK4 ersichtlich ist, bestehen größere Sequenz- und Längenunterschiede in den Porenschleifen von TPK4 (Abb. 3.16). Der Austausch wurde so vollzogen, dass die komplette und 7As längere Porenschleife 1 durch die zweite ersetzt wurde und umgekehrt. Von den drei, durch diesen Austausch möglichen Porenmutanten, TPK4Pore1Pore1, TPK4Pore2Pore2 und TPK4Pore2Pore1, konnte nur TPK4Pore1Pore1 funktionell exprimiert werden (Abb. 3.20). Dabei zeigte auch diese Mutante spannungsunabhängig instantane Ströme und besaß eine von TPK4 nicht unterscheidbare Selektivität (Tab. 3.4). Aus einem Vergleich der Strom-Spannungsbeziehungen (Abb. 3.17B und Abb.3.20B) von TPK4 und TPK4Pore1Pore1 ist aber eine unterschiedlich starke Einwärtsgleichrichtung erkennbar. Da die Einwärtsgleichrichtung des TPK4 wahrscheinlich auf einen zytoplasmatischen Block zurückzuführen ist (Becker *et al.*, 2004), ist es möglich, dass die beiden Porendomänen einen unterschiedlichen Einfluß auf die Bindung bzw. Wirkung dieses noch unbekanntes Blockers haben.

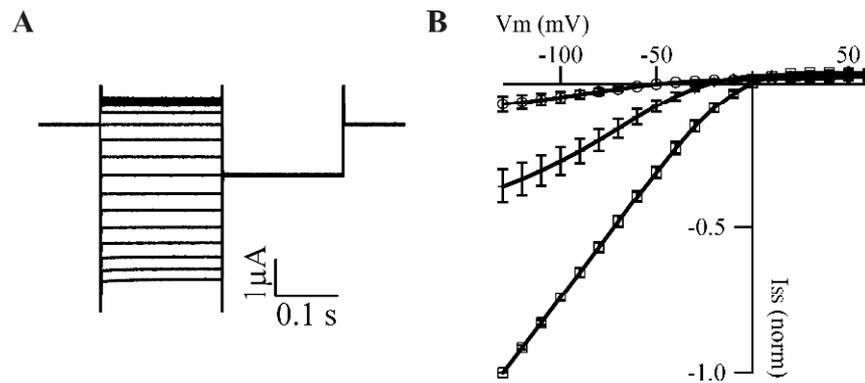


Abb. 3.20 Strom-Spannungsbeziehung von TPK4-Pore1

A Eine TPK4-Pore1 exprimierende Oocyte wurden dem Standardpulsprotokoll unterzogen und der dabei gemessene Strom aufgezeichnet. **B** Vergleich der in (○) 10mM K⁺, (+) 30mM K⁺ und (□) 100mM K⁺ gemessenen und normierten (-130mV in 100K⁺) Gleichgewichtsströme (Iss). Mittelwert ± SE, n = 3

3.10 Mutationen im TPK4 Selektivitätsfilter

Betrachtet man den Aufbau der sehr ähnlichen Porendomänen von 114 Tandemporen-Kaliumkanälen sticht ein Unterschied zwischen pflanzlichen und anderen Tandemporenkanälen hervor. Die Selektivitätsfilter in der ersten und zweiten Porenregion fast aller 40 pflanzlichen Tandemporen-Kanäle enthalten die Sequenz GYGD. Die Tandem-Poren Kanäle der Pilze und Tiere weisen eine viel höhere Substitutionsrate für Tyrosin (Pilze erste Pore, Tiere zweite Pore) und Aspartat (Tiere erste Pore) auf (Tab. 3.5). Die physiologische Bedeutung dieser Aminosäuren wurde bereits untersucht. Mutationen des Aspartats in spannungs-geschalteten Einporen-Kanälen und künstlichen Tandem-Dimeren derselben führten zur Auswärtsgleichrichtung des Kaliumstroms und Mutationen des Tyrosins beeinflussten die Leitfähigkeit und die Selektivität der getesteten Kanäle (Kirsch *et al.*, 1995, Chapman *et al.*, 2001). Da in Tieren die Erregbarkeit von Nervenzellen vom Membranpotential abhängt und dieses stark von Hintergrundkanälen der KCNK-Familie beeinflusst wird, wird vermutet, dass mit der Expression unterschiedlich leitender und selektiver Doppelporen-Kanäle das Membranpotential kontrolliert wird (Plant *et al.*, 2005).

Tab. 3.5 Aufbau des Selektivitätsfilters bei 114 putativen Doppel-poren Kaliumkanälen

Domäne (Kanäle)	Pore 1						Pore 2					
	T	V	G	Y	G	D	T	V	G	Y	G	D
Pflanzen (40)	S ₃	I ₁₇					S A	L ₂₁		F ₁		
Tiere (41)		I ₃₆ T ₃	S ₁	F ₆		N ₂₃ M ₄ T ₂ S Y		I ₂₆		F ₃₃ L ₄ I ₂	E	
Pilze (19)		I ₁₀ L		L ₉ F ₅ I ₄		N ₂		I ₁₈ T				V
Protisten (14)		I ₂ A T		F ₂ L			S ₂	I ₅ T		F ₃		

3. Ergebnisse

Weil TPK4 einen kaliumselektiven Kanal formt, der zwei Porendomänen statt einer besitzt, wird angenommen, dass er wie sein tierisches Pendant TWIK1 ein Homodimer formt (Lesage *et al.*, 1996b). Unter dieser Annahme müßte das „Ausknocken“ einer Porendomäne den Kanal in-funktionell machen.

Die separate Mutation von in Pflanzen hoch konservierten Asparaginsäuren zu Asparagin (Asp86Asn, Asp200Asn) in beiden Selektivitätsfiltern von TPK4 hatte genau diesen Effekt, auch wenn tierische Kanäle in der ersten Porendomäne eine der TPK4 D86N Mutante entsprechende Substitution tragen (23 von 41, Tab. 3.5). Das zweite Aspartat dagegen ist in 113 von 114 (Tab. 3.5) Tandem-Poren Kaliumkanälen konserviert, weswegen der Knock-Out der Kanalfunktion durch die D200N Mutation weniger überraschend ist. Diese Versuche lassen darauf schließen, dass TPK4 ein Dimer bildet und dass beide Porendomänen einer Untereinheit an der Bildung der Kanalpore beteiligt sind.

Das Tyrosin, das sich zwischen den beiden Glycinen im Selektivitätsfilter befindet, wird häufig durch ein iso-sterisches Phenylalanin ersetzt, aber nur einmal in 38 pflanzlichen Tandem-Poren Kanälen. Das Tyrosin wurde oft damit in Verbindung gebracht die Selektivität von Kaliumkanälen zu bestimmen (Heginbotham *et al.*, 1994, Chapman *et al.*, 2001, Hajdu *et al.*, 2003). Bei TPK4 hingegen führte eine Mutation des Tyr198 zu Phe zur selben Präferenz für Kalium gegenüber Natrium wie beim WT. Lediglich die relative Permeabilität für Rb^+ war hoch signifikant (t-test, $\alpha \leq 0.01$) erhöht (Tab 3.4). Es scheint als ist der Verlust der Hydroxygruppe und möglichen Wasserstoffbrückenbindungen zu zwei Threoninen der anderen Untereinheit (Abb. 3.21) von untergeordneter Bedeutung für die Stabilität und Größe der Kanalpore.

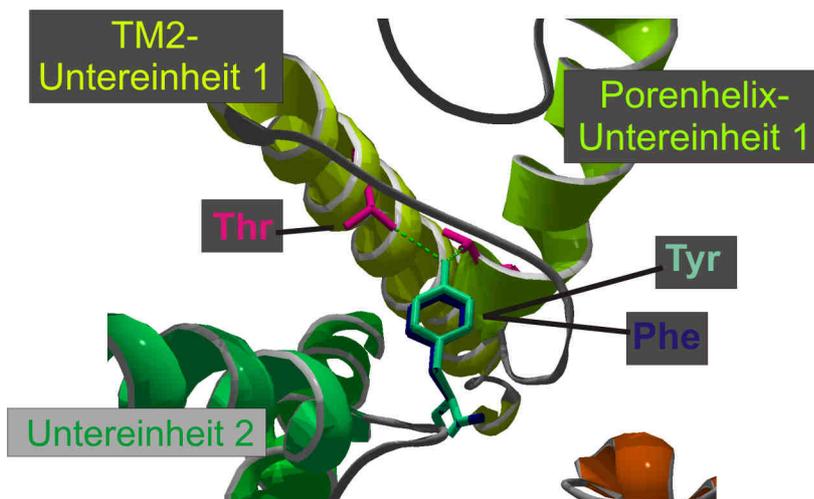


Abb. 3.21 putative Wasserstoffbrückenbindungen des Tyrosin 198 von TPK4

Nach einem Strukturmodell des TPK4 könnte das Tyrosin (198) der zweiten Porendomäne über Wasserstoffbrückenbindungen (grün-gestrichelt; Länge < 3,3Å) mit Threoninen der anderen Untereinheit die Pore stabilisieren. In das Modell wurde auch die Mutation des Tyrosins zum iso-sterischen und nicht-wasserstoffbrücken-ausbildenden Phenylalanin als Überlagerung eingearbeitet.

3.11 Die schwache Gleichrichtung von TPK4 wird durch ein Aspartat in der zweiten Transmembrane vermittelt

Die weiteren Untersuchungen fokussierten auf zwei basale Eigenschaften des TPK4. Die bis dahin untersuchten Chimären des TPK4 und der vakuolären TPKs haben sich entweder als in-funktionell herausgestellt oder wiesen keine Veränderung in der Inaktivierung durch zytoplasmatische Ansäuerung und in der schwachen Einwärtsgleichrichtung des TPK4 auf. Im Fall der säurebedingten Inaktivierung ist es leicht anzunehmen, dass der Sensor sich auf der zytoplasmatischen Seite oder in einer von dieser Seite zugänglichen Domäne des TPK4 befindet. Der Austausch der zytoplasmatischen Termini von TPK4 durch die des TPK1 führte zu in-funktionellen Kanälen und brachte in dieser Hinsicht keine neuen Erkenntnisse.

Im Gegensatz zum spannungsunabhängigen Protonblock, der durch eine Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals charakterisiert ist, ist die Einwärtsgleichrichtung durch eine instantane und spannungsabhängige Reduktion der Leitfähigkeit des Kanals bedingt (Becker *et al.*, 2004).

Nimmt man an, dass dieser instantane Block durch größere Kationen verursacht wird, die bei Depolarisation in die Pore gezogen werden, dann sollte die Bindestelle des Kations in der Pore selbst liegen.

Diese Kationenblocker-Hypothese wurde durch eine von Experiment zu Experiment unterschiedlich starke Gleichrichtung unterstützt. Neben einem variablen Gehalt an blockierenden Kationen kommt auch eine von Oozyte zu Oozyte unterschiedliche Anzahl von Kanälen in der Membran als Ursache für diese Variabilität in Frage. Mit einer Kategorisierung der Oozyten in schwach, mittel und stark exprimierend anhand der Stromamplituden ließ sich zumindest der umgekehrt proportionale Zusammenhang von Oberflächenexpression des Kanals und relativer Stärke der Einwärtsgleichrichtung nachweisen. (Abb. 3.22).

3. Ergebnisse

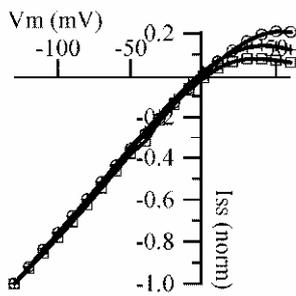


Abb. 3.22 Abhängigkeit der TPK4 Einwärtsgleichrichtung von der Expressionsstärke

Die Einwärtsgleichrichtung wurde an TPK4 exprimierende Oozyten in einer Standardlösung mit 100KCl^+ und pH 7,5 untersucht. Da unter diesen Bedingungen der gemessene Strom proportional zur Anzahl der Kanäle in der Membran ist, wurden die Oozyten anhand der Maximal-Einwärtsströme in (\square) schwach, ($+$) normal und (\circ) stark exprimierend unterschieden. $n = 3-5$

Dieses Verhalten kann also nicht mit einer spannungsabhängigen Konformationsänderung erklärt werden. Eine andere Eigenschaft dieses Blocks ist eine Abhängigkeit von der externen Kaliumkonzentration, denn bei höherer $c(\text{K}^+_{\text{ext}})$ wurde der Kanal weniger stark geblockt (Abb. 3.23). Der Ein-Poren Kanal Kir1.1 (ROMK1) zeigte dieselbe schwache Gleichrichtung und auch eine Abhängigkeit der Gleichrichtung von der extrazellulären Kaliumkonzentration.

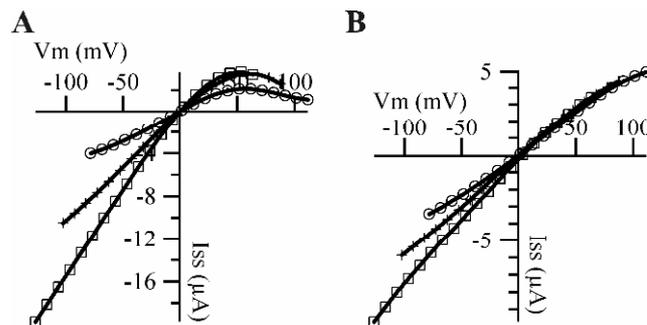


Abb. 3.23 Kaliumabhängigkeit der Leitfähigkeit von TPK4 und TPK4D110N

A Um die Kaliumabhängigkeit der TPK4 Leitfähigkeit darzustellen, wurde das Umkehrpotential gleich null gesetzt, und somit ein treibende Kraft für Kalium bei (\circ) 10mM K^+ , ($+$) 30mM K^+ and (\square) 100mM K^+ in der Standardbadlösung simuliert. **B** Auf die gleiche Weise wurde die Beziehung zwischem relativem Membranpotential und den Gleichgewichtströmen von TPK4D110N dargestellt. $n = 6-7$

Bei Kir1.1 sind die Blocker zytoplasmatisches Mg^{2+} und Polyamine (Fakler *et al.*, 1994, Lu und MacKinnon, 1994). Für Kir1.1 und andere, stärker gleichrichtende Kir Kanäle wurde gezeigt, dass der Block auf einer elektrostatischen Interaktion mit einem Asparagin (Kir1.1, ROMK1)(Lu und MacKinnon, 1994) oder einem Aspartat (Kir2.1, IRK1) (Ficker *et al.*, 1994, Wible *et al.*, 1994) in der zweiten transmembranen Domäne beruht. Es wird angenommen, dass sich die hydrophoben Reste dieser Aminosäuren in den wasser-gefüllten, inneren Porenbereich erstrecken. Wenn man von TPK4 ein Strukturmodell auf Basis der Homologie zu dem bereits kristallisierten KscA anfertigt, findet man an einer ähnlichen Position in der der TM2 von TPK4 ein Aspartat. Die ebenfalls den wasser-gefüllten Porenbereich

auskleidende TM4 weist kein Aspartat auf, weswegen TPK4 nur zwei Aspartate anstatt der vier wie im Kir1.2 besitzt (Abb. 3.24).

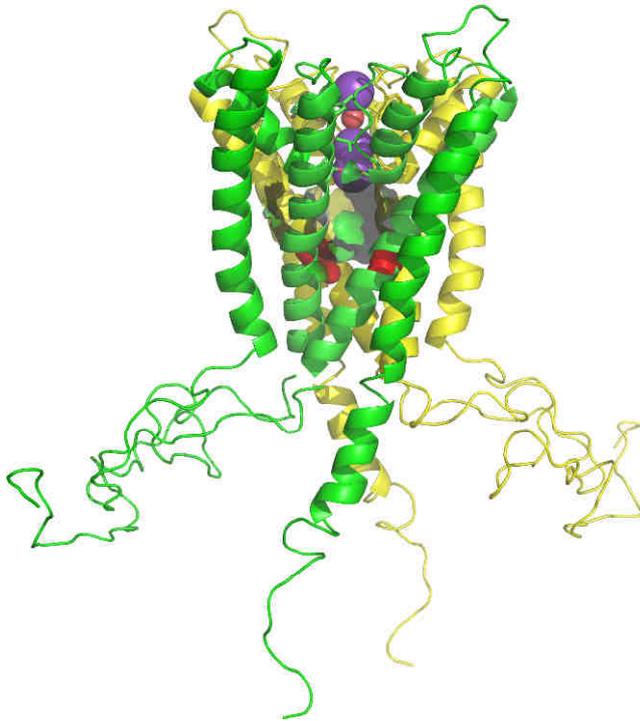


Abb. 3.24 Position des Asp 110 innerhalb des TPK4

Die Asparaginsäuren 110 (rot) von TPK4 befinden sich jeweils in der zweiten Transmembrane der beiden Untereinheiten (grünes und gelbes Rückgrat). Die Seitenkette ist in die zentrale, wassergefüllte Aussparung der Kanalpore (transparent, grau) orientiert. Die Besetzung des Selektivitätsfilters durch ein Wassermolekül (magenta) beziehungsweise Kaliumionen (lila) in Analogie zum KcsA (pdb entry 1bl8) ist ebenfalls indiziert.

Um zu sehen, ob dieses Aspartat (D110) in der TM2 von TPK4 einen Einfluss auf die Gleichrichtung hat, wurde es zum hydrophoben Alanin, zum basischen Arginin und zum hydrophilen Asparagin mutiert. Die Mutante D110A zeigte keinerlei messbaren Kaliumstrom mehr, so dass eine wichtige Rolle dieses Aspartats für die Kaliumpermeation anzunehmen ist. Die Mutante D110N hingegen leitet Kalium, aber die schwache Rektifizierung des TPK4 verschwand (Abb. 3.25) und die Leitfähigkeit von Auswärtsströmen wurde kaliumunabhängig (Abb. 3.23). Die Einwärtsgleichrichtung schien also auf der elektrostatischen Interaktion eines kationischen Blockers mit Aspartat 110 und den daraus folgenden Verschluss der Pore zu beruhen. Unter dieser Annahme sollte das Vertreten der negativen Ladung des Aspartats durch eine Positive den gleichen Effekt auf die Gleichrichtung haben. Entgegen dieser Vermutung wies die D110R Mutante eine noch stärkere Einwärtsgleichrichtung als der WT auf (Abb. 3.25). Neben dem totalen Verlust der Auswärtsströme (die schwachen Auswärtsströme in Abb. 3.25 D beruhen wahrscheinlich hauptsächlich hauptsächlich auf endogenen Chloridkanälen) war diese Mutante auch durch einen exponentiellen Anstieg der Einwärtsströme bei negativen Spannungen charakterisiert. Die Erklärung für dieses Phänomen könnte wiederum Kir1.1 (ROMK1) liefern. Eine ähnliche Mutation, N171R, in diesem Kanal führt zur selben Strom-Spannungsbeziehung. Ein Mg^{2+} -abhängiger Block des Kir1.1 konnte dabei ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde diese I-V-Beziehung dem elektrostatischen Effekt von zusätzlichen positiven Ladungen auf der inneren Porenoberfläche zugeordnet (Lu und

3. Ergebnisse

MacKinnon, 1994). Die Mutation des Aspartats in TPK4 zeigte also einmal mehr die Bedeutung dieser Aminosäure für die Rektifizierung der Kaliumströme sowie für die Kaliumpermeation im Allgemeinen.

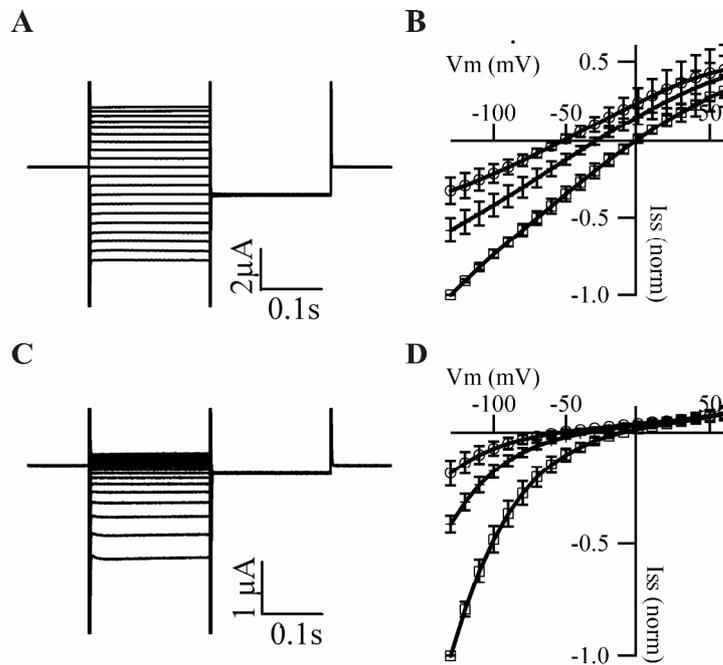


Abb. 3.25 Strom-Spannungsbeziehung zweier TPK4-Aspartat-Mutanten

Xenopus Oozyten, die **A, B** TPK4-D110N und **C, D** TPK4-D110R exprimieren wurden von einer Standardlösung perfundiert (30K^+ , pH7,5) und das Membranpotential nach dem Standardpulsprotokoll geklemmt. Das Haltepotential zu Beginn eines Pulses betrug -30mV , was nahe am Umkehrpotential liegt und deswegen als Null-Stromlinie zur Orientierung dienen kann. **B, D** Auftragung der in (\circ) 10mM K^+ , $(+)$ 30mM K^+ and (\square) 100mM K^+ gemessenen und normierten (-130mV in 100K^+) Gleichgewichtsströme (I_{ss}) gegen das Membranpotential (V_m). Mittelwert \pm SE, $n=7$

3.12 Intrazelluläre Ansäuerung führt zur Inaktivierung von TPK4

TPK4 wird wie viele andere Kaliumkanäle durch Protonen reguliert. Eine Erhöhung der Protonen- Konzentration bzw. Eine Reduktion des pH-Wertes auf cytoplasmatischer aber nicht auf extrazellulärer Seite bewirkt ein spannungsunabhängiges Schließen des Kanals (Becker *et al.*, 2004). Der Mechanismus, dem diese Inaktivierung des Kanals unterliegt, war bisher ungeklärt und konnte auch nicht durch die Diplomarbeit von Elena Jeworutzki oder die hier dokumentierten Experimente geklärt werden. Das Umschalten vom offenen, deprotonierten Zustand zum geschlossenen, protonierten Zustand findet während der Reduktion des pH_i von 7,5 zu 6.3 statt (Becker *et al.*, 2004). Auf den ersten Blick scheint es offensichtlich zu sein, dass Histidine den pH-Sensor darstellen, denn Histidin ist die einzige Aminosäure, die in wässriger Lösung einen pK_a in diesem Bereich besitzt (pK_a bei 6.6 innerhalb eines Polypeptids, Yue *et al.* (1991)). TPK4 besitzt drei Histidine die entsprechend unserem Topologie-Modell im Zytoplasma sitzen. Im N-Terminus ist das His13 im zytoplasmatischen Loop zwischen TM2 und TM3 sind das His119 und His143. In ihrer Diplomarbeit konnte Elena Jeworutzki zeigen, dass die Mutation dieser Histidine zu Alanin funktionelle Kaliumkanäle hervorbrachten, die alle Eigenschaften des wildtypischen TPK4 besaßen; auch die Inaktivierung durch zytoplasmatische Ansäuerung. Dabei kamen auch protonenselektive Elektroden zum Einsatz, mit denen es möglich ist parallel zu Ganzzell-Strommessungen den zytoplasmatischen pH-Wert aufzuzeichnen. Somit werden die Messungen auch unabhängig von dem Problem, dass man mit externen Applikation von NaAc keine absolut gleichmäßige Ansäuerung des Zytoplasmas erreicht. Andererseits bildet sich in der Oozyte während der Acetat-Beladung ein starker pH-Gradient von der Plasmamembran ins Oozyteninnere aus, der den gemessenen pH-Wert sehr stark abhängig macht von der Positionierung der pH-Elektrode. TPK4 reagiert sehr schnell auf eine Ansäuerung mit Acetat; die pH-Elektrode reagiert, wenn sie tiefer in der Oozyte platziert ist, verzögert. Eine Platzierung der Mikropipettenöffnung direkt unter der Plasmamembran ist schwierig, bewirkt aber dass die pH-Elektrode schon vor dem Kanal die Ansäuerung des Zytoplasmas misst (Abb. 3.26B). Eine exakte Messung der Protonenkonzentration wie sie der Kanal wahrnimmt ist also unmöglich. Dennoch zeigten einfache Messungen mit der pH-Elektrode, dass die pH-abhängige Inaktivierung des TPK4 einem einfachen sigmoiden Verlauf folgt (Abb. 3.26B) mit einer relativ starken pH-Abhängigkeit des „Gatings“. Ähnlich verhält sich die Inaktivierung einer TPK4 Mutante bei der der zytoplasmatische Loop größtenteils durch den des TPK1 ersetzt wurde (TPK4-loopTPK1) (Abb. 3.26A,C). Da TPK1 eine andere und schwächere pH-Abhängigkeit zeigt als TPK4 und es dazu in diesem Bereich zahlreiche Unterschiede gibt, ist davon auszugehen, dass dieser Teil des zytoplasmatischen Loops nicht als pH-Sensor oder -Schalter fungiert. Die Funktion dieser an geladenen Aminosäuren reichen Domäne könnte eher in der Membranverankerung und der Konzentration von Kalium am Poreneingang zusehen sein.

3. Ergebnisse

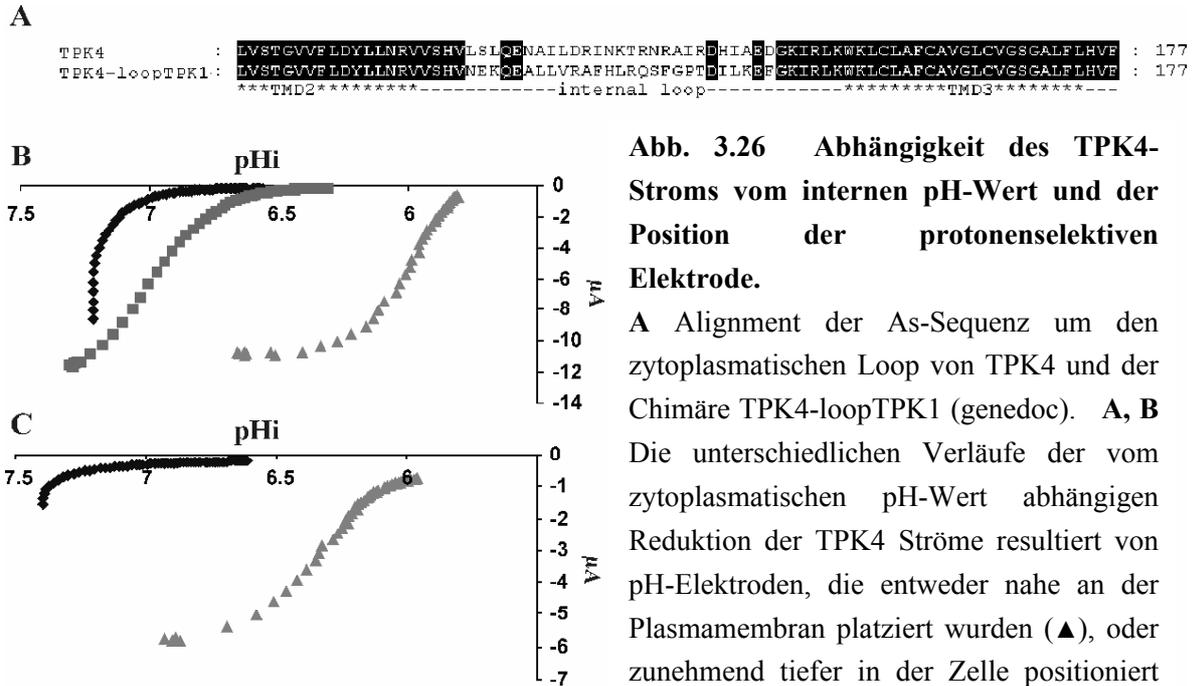


Abb. 3.26 Abhängigkeit des TPK4-Stroms vom internen pH-Wert und der Position der protonenselektiven Elektrode.

A Alignment der As-Sequenz um den zytoplasmatischen Loop von TPK4 und der Chimäre TPK4-loopTPK1 (genedoc). **A, B** Die unterschiedlichen Verläufe der vom zytoplasmatischen pH-Wert abhängigen Reduktion der TPK4 Ströme resultiert von pH-Elektroden, die entweder nahe an der Plasmamembran platziert wurden (▲), oder zunehmend tiefer in der Zelle positioniert worden sind, (■) und (◆). Dargestellt sind Einzelerperimente von TPK4 (**B**) und TPK4-loopTPK1 exprimierenden Zellen (**C**).

Ein Austausch der zytoplasmatischen N- und C-Termini führte zu infunktionellen Kanälen und konnte somit auch keinen Aufschluss über die Beteiligung der anderen zytoplasmatischen Domänen am pH-Sensor liefern. Als funktionelle Kaliumkanäle erwiesen sich aber ein Teil der bereits zuvor beschriebenen Porenchimären und auch Deletionsmutanten des TPK4 N- und C-Terminus, bei denen die distalen 16 (TPK4d1-16) bzw. 22 As (TPK4d263-284) entfernt wurden. Auch diese Mutanten zeigten keine offensichtliche Veränderung in ihrer H^+ -Sensitivität (Abb. 3.27). Mit den hier angewendeten Methoden ist es aber nicht auszuschließen, dass es bei der einen oder anderen Mutante zumindest eine geringere Verschiebung der pH-Sensitivität gab.

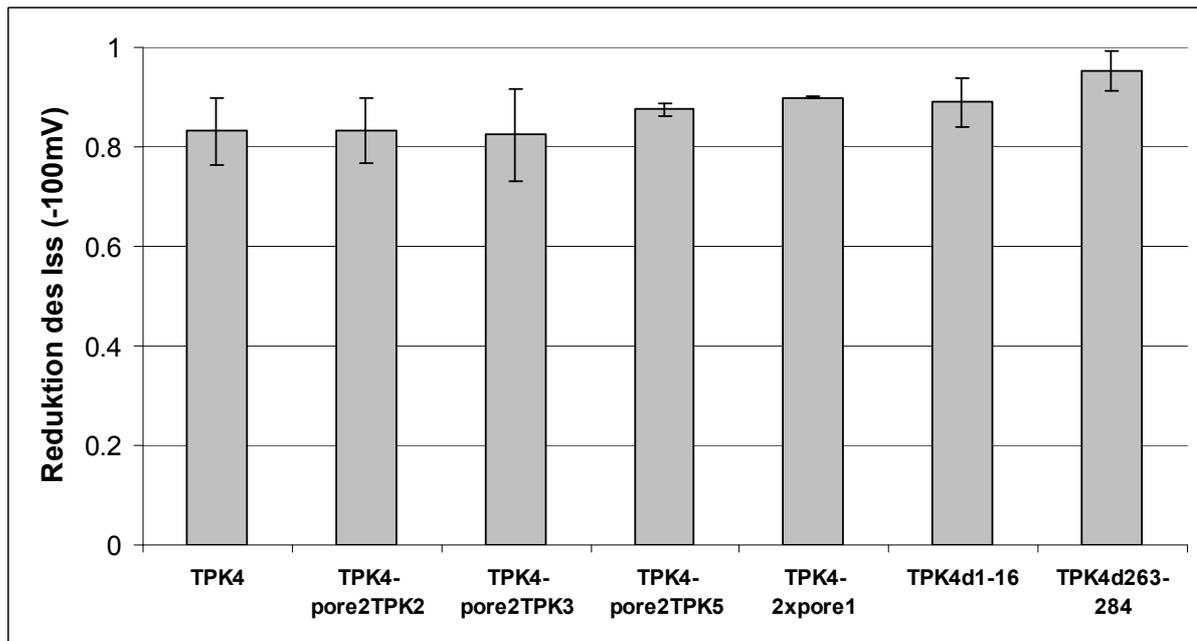


Abb. 3.27 Inaktivierung von TPK4 und TPK4 Mutanten durch zytoplasmatische Ansäuerung

Xenopus Oocyten, die TPK4 oder die entsprechenden Mutanten exprimierten wurden zuerst mit der 30K pH5,6 Standardlösung umspült, um dann 4min mit der selben Lösung plus 10mM NaAc perfundiert zu werden. Es wurden zu Anfang und zum Ende des Experiments die Gleichgewichtsströme (I_{ss}) bei einer Membranspannung von -100mV gemessen, um dann deren Reduktion zu berechnen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von jeweils 2-6 unabhängigen Messungen.

3.13 Die TPK-Kanäle interagieren in einem BiFC-Test

Kaliumkanäle formen sich aus Untereinheiten. Wenn sie an der Porenbildung beteiligt sind, werden sie α -Untereinheiten genannt und wenn sie nur regulatorische Funktion besitzen, werden sie β -Untereinheiten genannt (Gulbis *et al.*, 1999). Es ist bekannt, dass verschiedene α -Untereinheiten pflanzlicher Shaker-Kanäle fast uneingeschränkt Homo- und Heterotetramere bilden (Dreyer *et al.*, 1997b, Baizabal-Aguirre *et al.*, 1999, Zimmermann und Sentenac, 1999, Ache *et al.*, 2001, Pilot *et al.*, 2001, Pilot *et al.*, 2003a, Dreyer *et al.*, 2004, Xicluna *et al.*, 2007). Was die Assemblierung der TPK/KCO-Kanäle angeht, gibt es erst eine Studie, die zeigt, dass TPK1, TPK5 und KCO3-Untereinheiten homomerisieren, aber nicht heteromerisieren (Voelker *et al.*, 2006). Basis für die Interaktionsstudien an Shaker- und Tandemporen-Kanälen, waren bisher funktionelle Studien in *Xenopus laevis* und in Tabak (Duby *et al.*, 2008), „yeast two hybrids“, sowie FRET- und BiFC-Studien. Da die elektrophysiologische Untersuchungen der vakuolären TPKs erschwert ist und somit nicht für Interaktionsstudien wie bei den Shaker-Kanälen zur Verfügung stand, habe ich versucht die Assemblierung der TPK/KCO-Kanäle auf Basis der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) zu studieren. Dazu wurden die TPK-Kanäle N-Terminal mit jeweils einer der zwei Hälften des selben YFP fusioniert, das von Walter *et al.*, (2004)

3. Ergebnisse

und Voelker *et al.*, (2006) für die Untersuchung der Homodimerisierung der TPK/KCOs und des Transkriptionsfaktors bZIP63 verwendet wurden. Die Ausgangsvektoren waren pUC-SPYCE und pUC-SPYNE, wobei pUC-SPYCE die N-terminale Hälfte des YFP (As 1-155) und pUC-SPYNE die C-terminale Hälfte (As 156-239) unter Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors beinhaltet (Walter *et al.*, 2004). Nach der Klonierung der TPKs in beide Vektoren resultierte die Co-Transfektion von Zwiebel oder Lauchepidermiszellen in einer YFP-Komplementation (nicht gezeigt). Und wie in (Voelker *et al.*, 2006) beschrieben, war bei einer homomeren Interaktion die Fluoreszenz im Tonoplast zu sehen und bei heteromeren Interaktionen im ER (nicht gezeigt). Letzteres könnte darin begründet sein, dass eine unspezifische Selbstkomplementation des YFP zu stande kam. Da die Formation des intakten YFP irreversibel ist (Hu *et al.*, 2002), könnte das die Assemblierung von funktionellen, heteromeren Kanälen und somit auch den ER-Export verhindern.

Um eine mögliche Selbstkomplementation besser zu unterdrücken, wurden dieselben Experimente mit neuen Vektoren durchgeführt, die mir freundlicher Weise von Rainer Waadt (Universität Münster) zur Verfügung gestellt wurden. Im pUC-SPYNE wurde ein verlängertes YFP-Fragment eingefügt (As 1-173, pUC-SPYNE-173). Das C-terminale YFP-Fragment blieb in der Länge unverändert, wurde aber an einer Position mutiert (As 156-239, pUC-SPYCE(M)). Die Überlappung der YFP-Fragmente und die Mutation sollten die YFP-Selbstkomplementation abschwächen. Mit diesen neuen Vektoren konnte ebenfalls eine erfolgreiche Fluoreszenzkomplementation und somit die Interaktion von allen Untereinheiten der vakuolären TPKs nachgewiesen werden. Bis auf eine Ausnahme (TPK1-TPK3) konnte die Fluoreszenz dabei immer in der Vakuolenmembran lokalisiert werden (Abb. 3.28). Auch die Kombination von TPK1 mit dem SV-Kanal TPC1 ergab eine Fluoreszenzkomplementation in der Vakuolenmembran der Lauchepidermiszellen (Abb. 3.29). Von der Co-Expression des ER-/Plasmamembrankanals TPK4 und dem vakuolären TPK1 war eine Interaktion im BiFC-System eigentlich nicht zu erwarten. Es kam aber zu einer Interaktion im ER, wo beide Kanäle synthetisiert werden (Abb. 3.29).

Dass diese Interaktion sowie die Interaktion der vakuolären TPKs möglicherweise auf einer Selbstkomplementation des YFP, beziehungsweise auf einem Überexpressionseffekt beruhten, zeigten Negativkontrollen. Der YFP-NT und YFP-CT können für sich alleine in Lauchepidermiszellen YFP komplementieren (Abb. 3.29 E). Dabei gab es auch keine Abstufung in der Fluoreszenzintensität, die es ermöglicht hätte eine Selbstkomplementation von einer erleichterten Komplementation durch Kanaluntereinheiten zu unterscheiden, wie es in einer früheren Studie für YFP₁₋₁₅₅ und YFP₁₅₆₋₂₃₉ beschrieben wurde (Walter *et al.*, 2004). Die starke Selbstkomplementation der YFP-Hälften wurde später auch in einer Arbeit beschrieben, die sich die Selbstkomplementation für die Bestimmung der Membrantopologie von überexprimierten Membranproteinen zu nutze gemacht hat (Zamyatnin *et al.*, 2006). Unter diesen Voraussetzungen können also keine Rückschlüsse auf eine funktionelle Interaktion der TPK-Kanäle und des TPC1 gezogen werden.

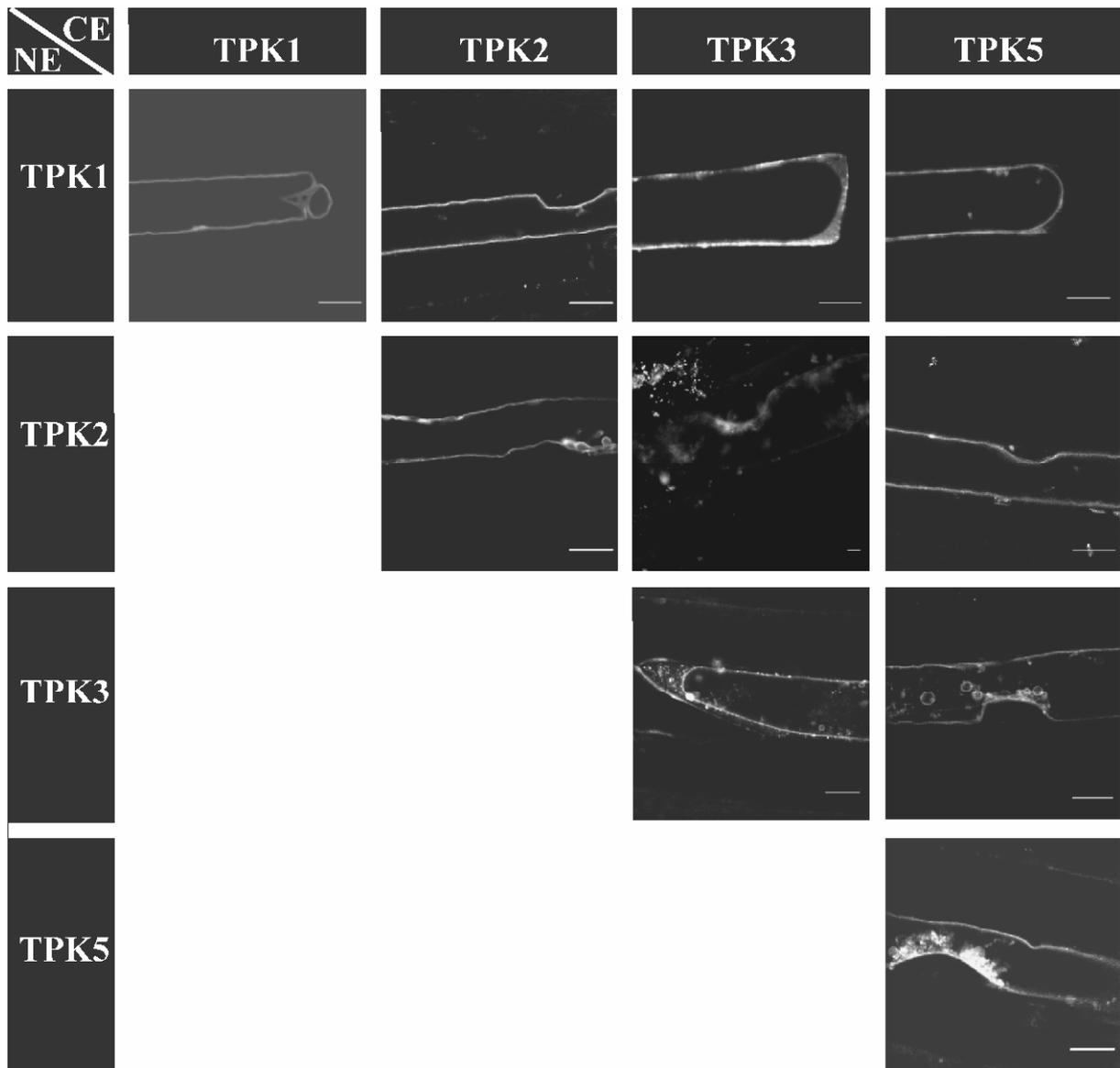


Abb. 3.28 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation durch die vakuolären TPKs

Die Co-Expression der vakuolären TPKs, fusioniert YFP-NT (NE) oder YFP-CT (CE) unter dem 35S-Promotor, führt in fast allen Kombinationen zu einer Komplementation des split-YFP in der Vakuolenmembran von Lauchepidermiszellen (Ausnahme TPK1-TPK3). Zu erkennen ist die Vakuolenexpression unter anderem an den typischen intravakuolären Vesikeln (siehe z.B. TPK3-TPK5), den Invaginationen (siehe TPK1-TPK1) sowie den Aussparungen des Zellkerns (siehe z.B. TPK1-TPK2). Maßstab = 20µm

3. Ergebnisse

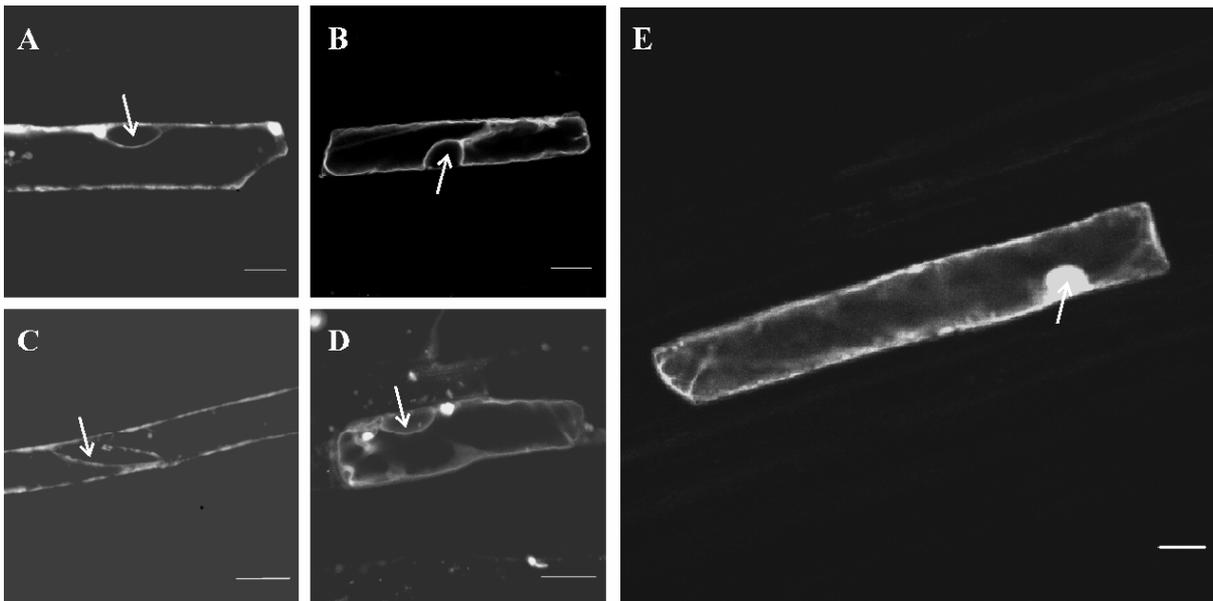


Abb. 3.29 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation von TPC1/TPK4 mit TPK1 und die Negativ-Kontrolle

A TPK1 und TPK4 komplementieren YFP im ER einer Zwiebelepidermiszelle. **B** TPK1 und TPC1 komplementieren YFP in der Vakuolenmembran. **C** Entsprechende Positiv-Kontrollen der BiFC-Komplementation des TPK4 im ER und **D** des TPC1 in der Vakuole. Der Pfeil zeigt den Sitz des Zellkerns an, an dem sehr gut zwischen ER, Plasmamembran und Vakuolenmembran unterschieden werden kann. **E** Eine von vielen Zellen die mit pUC-SPYCE(MR) und pUC-SPYNE-R173 ko-transfiziert wurden und frei im Zytoplasma und Zellkern verstreute YFP-Fluoreszenz zeigten. R (reverse) in den Vektorbezeichnungen steht für eine 3' MCS anstatt der 5'- MCS in pUC-SPYCE(M) und pUC-SPYNE-173. Ansonsten sind die Vektoren und die YFP-Hälften identisch. Maßstab = 20 μ m

3.14 Vorbereitungen zu weitergehenden elektrophysiologischen und strukturellen Untersuchungen der TPK/KCO-Kanäle *in planta*

Für eine genauere elektrophysiologische Charakterisierung der vakuolären TPKs müssen diese der patch-clamp Technik zugänglich gemacht werden. Mit dieser ist es möglich die TPK-Kanäle an isolierten Pflanzenvakuolen und auf Einzelkanalebene zu studieren. Aufgrund der einleitend beschriebenen schwachen und zum Teil gewebespezifisch begrenzten Expression der vakuolären TPKs und des KCO3 wird es schwierig sein, diese Kanäle in nativen *Arabidopsis thaliana* Vakuolen zu messen. Abgesehen davon muss man aufgrund der Redundanz der TPK-Kanäle in bestimmten Geweben und der wahrscheinlich sehr ähnlichen Eigenschaften davon ausgehen, dass diese nicht einfach so den *in planta* gemessenen Kaliumströmen zugeordnet werden können. Eine eindeutige Zuordnung kann nur erfolgen, wenn wie im Falle des SV-Kanals TPC1 eine Knockout-Mutante untersucht wird (Peiter *et al.*, 2005) oder wie im Falle des VK-Kanals TPK1 der Kanal überexprimiert wird (Gobert *et al.*, 2007). Am besten wäre aber die Kombination aus beiden Ansätzen.

In einem ersten Ansatz die elektrophysiologische und strukturelle Untersuchungen der TPK Kanäle *in planta* einzuleiten, habe ich die *TPK/KCO3*-cDNA mit einem V5-Epitop versehen und in binäre Vektoren eingebaut (pMDC32). Diese wurden in Agrobakterien vom Stamm pGV3101 transformiert. Mit diesen Agrobakterien können sowohl Tabak-pflanzen als auch *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, wie die *tpc1* und *tpk1* Knockouts, transient oder stabil transformiert werden. Mit TPK1, TPK2 und TPK5 zum Beispiel gelang die stabile Transformation von *Nicotiana tabacum*. Diese exprimieren nun die TPKs in allen Gewebetypen unter Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-CaMV Promotor (Abb. 3.30).

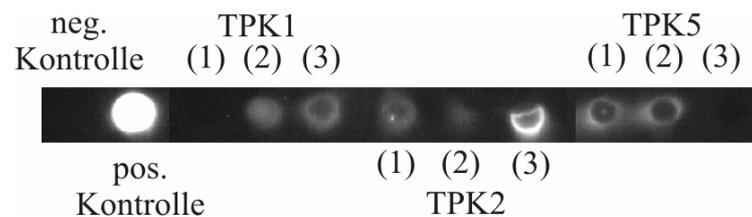


Abb. 3.30 Nachweis der TPK1, 2 und 5 Expression in *Nicotiana tabacum* SR1

Manueller Dot-Blot von Proteinextrakten je drei TPK 1, 2 und 5 exprimierender *Nicotiana tabacum* SR1 –Pflanzen, die nach Agrobakterieninfiltration von Blattgewebe herangezogen wurden. Als negativ Kontrolle diente BSA. Außerdem erwiesen sich Pflanze (1) von TPK1 und (3) von TPK5 als nicht transformiert.

Eine weitere Anwendung dieser Pflanzen neben der elektrophysiologischen Charakterisierung wären Untersuchungen zum Assembly und die Klärung der offenen Frage der Heteromerisierung. So könnten die TPK-überexprimierenden Tabakpflanzen transient mit anderen TPK-Konstrukten transformiert werden, die einen Nachweis der Heteromerisierung durch Ko-Immünpräzipitation erlauben. Möglich wäre es auch die Assemblierungsdomänen zu identifizieren, indem man, wie in einem weiteren Vorversuch geschehen (Abb. 3.31), die vorhandenen TPK-Mutanten transient in Tabak überexprimiert und die potentielle Dimerisierung anhand von Gelfiltration, Größenausschlußchromatographie (SEC), analytischer Ultrazentrifugation oder anderer Methoden untersucht.

3. Ergebnisse

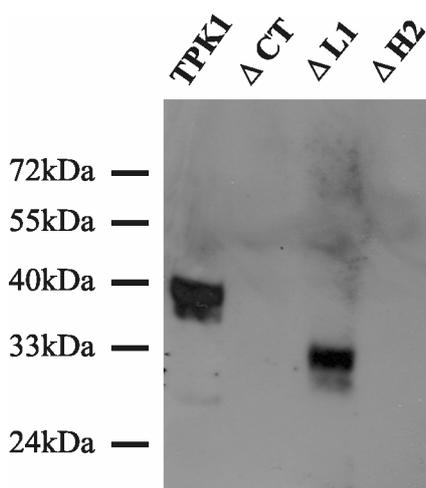


Abb. 3.31 Transiente Überexpression von TPK1 und TPK1-Mutanten in *Nicotiana benthamiana*

Western Blot von Proteinextrakten aus Tabak-Blättern. Der Nachweis des TPK1 und des TPK1ΔL1 erfolgte mittels V5- und sekundären HRP-Antikörpern. Bei TPK1ΔCT und TPK1ΔH2 infiltrierten Blättern konnte keine Expression nachgewiesen werden. Die vorhergesagten Molekulargewichte (MG) von TPK1 (40,7 kDa) und TPK ΔL1 (33,6 kDa) stimmen mit den hier abgeschätzten MG in etwa überein.

4. Diskussion

In jüngster Zeit sind die Bestandsaufnahme und Analyse des genetischen Materials, der Transkripte und Proteine zahlreicher Modellorganismen für die molekularbiologische Forschung rapide vorangeschritten. Diese sogenannten “-omik“ (Genomik-Transkriptomik-Proteomik) Ansätze generieren Unmengen an Informationen vor allem was genetische Struktur und die (post-)transkriptionelle Regulation von Genen angeht. Was die bioinformatische Analyse dieser Informationen unter anderem vermag, ist aufgrund von konservierten Sequenzen, Vorhersagen über die Funktion von Genprodukten zu machen. Auch die hier vorliegende Arbeit beruht auf einer solchen Vorhersage die durch die Identifikation von tandem-repetierten Kaliumselektivitätsmotiven im Genom/Transkriptom von *Arabidopsis thaliana* entstand. Auf Basis dieser Entdeckungen wurden die cDNAs der Tandem-Poren-Kaliumkanäle (TPK) und des Ein-Poren-Kaliumkanals KCO3 isoliert. Mit Methoden der reversen Genetik wurden dann die biophysikalische Analyse und die Analyse des Targetings dieser Kanäle initiiert.

4.1 Targeting der Tandemporen-Kaliumkanäle~Tonoplast intrinsischen Kaliumkanäle

Kaliumkanäle gleich welcher Membran klemmen, wenn sie offen sind das Membranpotential innerhalb kürzester Zeit auf das Gleichgewichtspotential von Kalium. Der Kaliumstrom in ein Kompartiment oder die Zelle könnte aber eine Depolarisation hervorrufen und z.B. die für viele Membrantransportprozesse wichtige „proton motive force“ (elektrochemisches Potential von H^+) abschwächen. Eine strikte und schnelle Regulation durch das Schalten des Kanals ist also von großer Bedeutung. Eine langsamere Regulation der Kanalaktivität kann aber auch in Form normalen zellulären Proteinumsatzes, einer Endo- und Exozytose (Hurst *et al.*, 2004) oder einer Regulation der Translokation zur Zielmembran erfolgen (Zerangue *et al.*, 1999, O’Kelly *et al.*, 2002, Yuan *et al.*, 2003, Arniges *et al.*, 2006). Die Translokation wird in zweierlei Hinsicht reguliert. Erstens werden Membranproteine des sekretorischen Apparats alle am ER synthetisiert, sollen aber dann oft nur in ein spezifisches Kompartiment transloziert werden. Zweitens braucht es ein ER-Kontrollsystem, das den Export von falsch gefalteten Proteinen verhindert (Ellgaard und Helenius, 2003). Die Arbeiten am Targeting der TPK-Kanäle haben genau diese beiden Punkte bestätigt, indem sie gezeigt haben, dass es unterschiedliche Mechanismen für das Targeting des Plasmamembran-ständigen TPK4 und des vakuolären TPK1 gibt, es sogar Unterschiede zwischen den vakuolären TPKs gibt und dass viele Chimären, die in *Xenopus* Oozyten keine funktionellen Kaliumkanäle bilden können, im ER zurückgehalten werden.

4.1.1 14-3-3 Bindung aktiviert TPK1, aber nicht über die Translokation

Als ein ER-Kontrollmechanismus für die TPK-Translokation kam zum Beispiel das Maskieren von ER-Retentionssignalen in richtig gefalteten Proteinen wie beim tierischen

4. Diskussion

$K_{(ATP)}$ -Kanal in Frage (Zerangue *et al.*, 1999, Cartier *et al.*, 2001). Das Maskieren eines Retentionssignals spielt auch für die Oberflächenexpression des tierischen Tandem-Poren Kaliumkanals KCNK3 eine Rolle. Die Maskierung eines basischen Retentionsignals erfolgt dabei über die 14-3-3 Bindung an den Kanal (O'Kelly *et al.*, 2002). Auch TPK1 weist im N-Terminus eine 14-3-3 Bindestelle und eine basische Domäne auf, die sich noch dazu überlappen. Aber weder der Austausch des NT durch den des TPK4, noch die gezielte Mutation des Serins im 14-3-3 Bindemotiv führten zu einer ER-Retention des TPK1 (Latz *et al.*, 2007b). Somit ist davon auszugehen, dass das 14-3-3 Motiv wie an Hefevakuolen gezeigt den Kanal öffnet (Latz *et al.*, 2007b), aber nicht die Translokation reguliert. Der Shakerkanal KAT1 hingegen scheint eine solche duale Aktivierung durch 14-3-3 Proteine zu erfahren (Sottocornola *et al.*, 2008). Diese wurde durch den Einsatz von 14-3-3 Proteinen und 14-3-3 Blockern in *Xenopus* Oozyten gezeigt. Versuche den TPK1 über die Injektion rekombinanter, pflanzlicher 14-3-3 in *Xenopus* Oozyten zu aktivieren scheiterten.

4.1.2 Golgi-abhängige Translokation des TPK1

Die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen machte es nicht nur möglich die TPK-Kanäle in der Vakuolenmembran zu lokalisieren, sondern sie ermöglichten es die so markierten TPK-Kanäle von ihrer Synthese über die Translokation bis hin zur Vakuolenmembran zu verfolgen. Eine wichtige Rolle hierfür spielt auch die transiente Transformation, bei der nur innerhalb eines kurzen Zeitfensters die Expression des eingebrachten Konstruktes stattfindet. Auf diese Weise wurde festgestellt, dass die vakuolären TPK-Kanäle am ER- synthetisiert und dann über den Golgi als Zwischenkompartiment zur Vakuolenmembran transloziert wurden. Das Auflösen des Golgi mit Brefeldin A verhinderte dementsprechend das „Trafficking“ des TPK1 zur Vakuole. Der Golgi-abhängige Weg zur Vakuole ist aber nicht der einzige bisher beschriebene Weg zur Vakuole. Für α -TIP wurde eine Golgi-unabhängige Translokation zur Vakuole nachgewiesen (Jiang und Rogers, 1998, Park *et al.*, 2004, Oufattole *et al.*, 2005), wobei es sich allerdings um Proteinspeichervakuolen und nicht um die lytische Zentralvakuole vegetativer Organe handelt.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch TPK1 sich in anderen Vakuolentypen wie die kleinen neutralen Vakuolen oder in PSVs wieder findet. Wie aus Mikroarray-Daten hervorgeht ist TPK1 auf jedenfall in PSV besitzenden Samen exprimiert (Abb.1.6)(Zimmermann *et al.*, 2004). Auch die Heterologe Expression des TPK1 in Tabak unterstreicht die Möglichkeit, dass TPK1 auch in kleine, neutrale Vakuolen integriert wird (Voelker *et al.*, 2006).

4.1.3 Die Rolle des CT für die Sortierung des TPK1

Mit C-terminalen Deletionsmutanten des TPK1 wurde die Domäne des TPK1, die für das Vakuolentargeting notwendig ist, auf 24 As eingegrenzt (As 285-308). Interessanterweise war das Targeting aller Deletionsmutanten langsamer als das des WT-TPK1 und schien mit der Länge der Deletion in Verbindung zu stehen. Eine ähnliche Korrelation von Länge der Deletion und Geschwindigkeit des Targetings wurde auch in anderen Fällen mit dem Verlust

von Sortierungsdomänen in Verbindung gebracht (Cervelli *et al.*, 2004, Hanton *et al.*, 2005, Mason *et al.*, 2006). Die TPK1-Mutanten Δ CT und Δ H1 wurden im ER zurückgehalten und die Mutanten Δ L3 and Δ H3 zeigten einen deutlich verzögerten Export aus dem Golgi. Zusammengenommen deutet das daraufhin, dass eine aktive Sortierung für den Export über einen rein passiven Massenstrom dominierte.

Auch wenn der TPK1 CT für das vakuoläre Targeting des TPK1 notwendig ist, so ist er nicht ausreichend dafür. Dies hat sich mehrfach bei den Chimären TPK4-TPK1CT und TPK4-P1-TPK1-P2 und bei den Deletionsmutanten NT-TPK1-P2 und TPK1TM4+CT gezeigt, die allesamt im ER zurückgehalten wurden. Das kann bedeuten, dass die Funktion der C-terminalen Sortierungssignale von Struktur und Position abhängig sind, oder dass bei den Mutanten keine korrekte Membranintegration stattfand. Für letzteres spricht, dass zum Beispiel für den Shaker-Kanal *AtKAT1* eine kooperative Funktion der Transmembranen bei der Membranintegration gezeigt wurde (Sato *et al.*, 2002).

4.1.4 Funktion des di-azidischen Motivs in TPK1

Nachdem klar war, dass es im TPK1 C-terminus vakuoläre Sortierungssignale geben muss, wurde dieser Bereich nach bekannten Sortierungsmotiven abgesucht. Der TPK1 CT besitzt mehrere di-azidische Motive, von denen aber nur eines, 296-DLE-298, für den ER-Export notwendig ist. Dieses Motiv sitzt in der helikalen Domäne H1, die auch durch die CT-Deletionen als die für den ER-Export verantwortliche Domäne identifiziert wurde. Die di-azidischen Motive, die außerdem im TPK1 CT zu finden, aber nicht am ER-Export beteiligt sind, sind Teil des EF-Hand Loops (L1). Dort sind sie wahrscheinlich direkt für die Ca^{2+} -Bindung verantwortlich. Das di-azidische ER-Exportmotiv von TPK1 setzt sich aus den Aminosäuren DLE zusammen und ist damit exakt dasselbe wie das von Sys1p, CASP and GONST1 (Votsmeier und Gallwitz, 2001, Hanton *et al.*, 2005), aber unterscheidet sich von dem im KAT1 (DLD) (Mikosch *et al.*, 2006). Zumindest für Pflanzen scheint also eine Präferenz für Leucin an der zweiten Position des Motivs gegeben zu sein. Da CASP und GONST1 im Golgi, KAT1 in der Plasmamembran und TPK1 in der Vakuolenmembran lokalisieren, scheint dieses Motiv außerdem nicht an der *post*-Golgisortierung beteiligt zu sein.

Für den Mechanismus des ER-Exports ist anzunehmen, dass TPK1 mit COPII Proteinen (Sec23/Sec24-Komplex) interagiert, wie es für Sys1p in Hefe berichtet wurde (Votsmeier und Gallwitz, 2001). Durch diese Interaktion könnte TPK1 wie andere Membranproteine die COPII Hüllkomponenten aus dem Zytoplasma rekrutieren und die Neubildung von ERES („ER export sites“) bewirken (Hanton *et al.*, 2007). TPK1 würde somit seinen eigenen ER-Export beschleunigen.

4.1.5 Dimerisierung: Voraussetzung für ER-Export?

Die fehlende Co-Lokalisation der DAI-Mutante und des wildtypischen TPK1 warf die Frage auf, ob die Dimerisierung für den ER-Export notwendig ist und ob das di-azidische Motiv an

4. Diskussion

der Dimerisierung beteiligt ist. Ich habe gezeigt, dass andere, C-terminale Deletionsmutanten, die ein intaktes di-azidisches Motiv besaßen, ebenfalls eine unterschiedliche Kompartimentierung aufwiesen. Im Gegensatz zur DAI-Mutante wurden diese aus dem ER und mit einer Verzögerung zum Tonoplast transloziert. Wenn diese Mutanten, so wie es die Lokalisationstudien nahe legen, keine Dimere bilden, dann ist die korrekte Assemblierung keine Voraussetzung den ER-Export und das di-azidische Motiv ein ER-Exportmotiv der nicht assemblierten Untereinheiten. Denkbar wäre aber auch, dass es im ER auch beim WT zu keiner permanenten Dimerisierung der Kanaluntereinheiten kommt, denn wahrscheinlich basiert die Assemblierung auch bei anderen Kanälen nicht auf einer kovalenten Verknüpfung der Kanaluntereinheiten wie bei TWIK-1 (Lesage *et al.*, 1996b), sondern vorwiegend auf intermolekularen Wechselwirkungen von zytoplasmatischen Domänen und Transmembranen. (Shen und Pfaffinger, 1995, Tu *et al.*, 1996, Sheng *et al.*, 1997, Phelps und Gaudet, 2007, Wehling *et al.*, 2007, Wiener *et al.*, 2008). Relativ unwahrscheinlich ist es, dass die fehlende Dimerisierung auf einen inhibitorischen Effekt des angehängten GFPs zurückgeht, denn TPK1-FP Fusionen zeigen sowohl Dimerisierung als auch volle Funktionalität in der Vakuolenmembran (Voelker *et al.*, 2006, Gobert *et al.*, 2007).

4.1.6 Wie funktioniert der Golgi-Export der TPK Kanäle?

Vieles deutet daraufhin, dass der Mechanismus des Golgi-Exports von Membranproteinen im Prinzip dem des ER-Exports ähnelt. Nämlich indem er auf der Interaktion von zytoplasmatischen Domänen mit Vesikel spezifischen Faktoren beruht. Von tierischen Membranrezeptoren wurde zum Beispiel gezeigt, dass sie im cytoplasmatischen CT ein Tyrosin-basiertes Motiv besitzen. Dieses Motiv vermittelt durch die Interaktion mit den Hüllproteinen von Clathrin „coated“ Vesikeln (AP-Komplexe) die Sortierung in den lysosomal/endosomal Zyklus (Canfield *et al.*, 1991, Jadot *et al.*, 1992, Matter *et al.*, 1992, Matter und Mellman, 1994, Ohno *et al.*, 1995, Ohno *et al.*, 1998). In Pflanzen sind CCV-Vesikel am *post*-Golgi-Transport zur Vakuole beteiligt. Dementsprechend besitzt auch *Arabidopsis thaliana* AP-Komplexe (Sanderfoot und Raikhel, 2003) und für den vakuolären Sortierungsrezeptor AtELP wurde auch schon eine Interaktion mit dem Mammalia AP-1-Komplex *in vitro* gezeigt (Sanderfoot *et al.*, 1998). Vorstellbar wäre auch eine Interaktion cytoplasmatischer Domänen mit SNARE-Proteinen, die für jeden Vesikeltyp und Vesikeltransportweg spezifisch sind.

Wie könnte ein vakuoläres Sortierungssignal von TPK1 aussehen? Die Deletionsmutanten haben gezeigt, dass die L1-Domäne (ADLDEDGVV) dem TPK1 zu einer Lokalisation in der Vakuolenmembran verhilft. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass ein sehr kleiner Teil der Δ L1-Mutanten auch die Vakuole erreicht. Dass man diese Mutanten nicht im Tonoplast sieht, könnte dann an einem verzögerten ER-Export und der zeitlichen Limitierung des Beobachtungsfensters liegen. Denn nach dem „Particle Bombardment“ sterben die Zwiebelzellen nach 2-3 Tagen, was am Versiegen des Zytoplasmastroms und der Organellenbewegung erkennbar ist. In diesem Fall muss das Vakuolensortierungssignal nicht

in der L1-Domäne liegen, sondern könnte sich auch in einem Teil N-terminal zum ER-Exportmotiv befinden. In jedem Fall wurde durch die Deletionsmutanten, die transient im Golgi akkumulieren, deutlich dass der C-Terminus zumindest einen strukturellen Einfluss auf ein Vakuolensortierungssignal besitzt. Um das Vakuolensortierungssignal des TPK1 beim Namen zu nennen, ist noch sehr viel Arbeit in die Mutagenese des proximalen TPK1-CT oder in die Targetinganalyse der TPK1 Orthologen zu setzen.

4.1.7 Die Rolle der Transmembranen für die Lokalisation

Nachdem für TPK3 ein C-Terminus unabhängiges Targeting gezeigt wurde, und weil bei TPK3 und den restlichen vakuolären TPK/KCO-Kanälen das di-azidische Motiv nicht konserviert ist, war klar, dass es andere Signale geben muss, welche die Translokation dieser Kanäle zur Vakuolenmembran vermitteln. Für TypI Membranproteine kann zum Beispiel auch die Transmembrane alleine ausreichend für das Targeting sein (Jiang und Rogers, 1998), indem sie sich allein durch ihre Länge eher in einer Membran bestimmter Dicke einfügen. Nachdem die Membranen eher an Dicke zunehmen passen längere Transmembranen besser in die späten sekretorische Kompartimente (Brandizzi *et al.*, 2002). In einer zugegeben nicht umfassenden Analyse der Targeting-Fähigkeit der TPK Transmembranen wurde gezeigt, dass die letzte transmembrane Domäne von TPK1, obwohl sie nach Brandizzi (Brandizzi *et al.*, 2002) mit 22 aa die Länge für eine Golgi-Akkumulation besitzt, dort nicht erscheint. Im Gegensatz dazu vermag das gleiche TPK3-Konstrukt (TM= 21 aa) wie erwartet im Golgi zu akkumulieren, erscheint aber nicht in der Vakuolen- oder Plasmamembran. Letzteres ist vermutlich die Standardzielmembran von TypI Membranproteinen denen ein Sortierungssignal fehlt (Brandizzi *et al.*, 2002). Auffällig ist das die Einzeltransmembrane von TPK1 sich so verhält wie der TPK1, wenn ihm das di-azidische ER-Exportmotiv fehlt. Das Anhängen des C-Terminus mit dem di-azidischen Motiv an das TPK1 TM4 Konstrukt bewirkte dennoch keine Golgi- oder Vakuolenlokalisierung wie beim WT. Somit ist das di-azidische Motiv in diesem Kontext wirkungslos. Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass das TM4-Konstrukt für sich alleine eine andere topogene Funktion hat als bei einer konzertierten Faltung mit den anderen Transmembranen und das di-azidische Motiv somit nicht zytoplasmtisch orientiert ist. Gegen einen komplett fehlenden Einbau der Konstrukte in die Membran spricht, dass ER-luminale Proteine denen ein Sortierungssignal fehlt normalerweise sekretiert werden (Denecke *et al.*, 1990, Bednarek und Raikhel, 1992). Das ist hier nicht der Fall gewesen.

4.2 Regulation und Funktion der TPK-Kanäle

4.2.1 TPKs: vakuoläre, Ca²⁺ und 14-3-3 regulierte Kaliumkanäle

Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* besitzt fünf Gene, die für Tandem-Poren Kaliumkanäle kodieren. Unter diesen sind die ersten und bisher einzigen elektrophysiologisch untersuchten pflanzlichen Tandem-Poren Kaliumkanäle, TPK1 und TPK4 (Becker *et al.*,

4. Diskussion

2004, Bihler *et al.*, 2005, Gobert *et al.*, 2007, Latz *et al.*, 2007b). Bis zu dieser Arbeit war die Annahme der Kaliumkanal-Funktion des TPK2, TPK3 und TPK5 nur auf Sequenzhomologie begründet. In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass die zweiten Porendomänen von TPK2, TPK3 und TPK5 in einen funktionellen Kaliumkanal integriert werden können, welcher dieselben instantanen Ströme, pH-Regulation und Rektifizierung aufweist wie TPK4. Damit legen diese Untersuchungen nahe, dass TPK2, TPK3 und TPK5 vakuoläre Kaliumkanäle mit TPK4 ähnlicher Selektivität darstellen. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass sie aufgrund eines fehlenden Spannungssensors, wie bei den Kv-Kanälen, spannungsunabhängig sind, und dass sie aufgrund eines konservierten Aspartats in der zweiten TM eine Einwärtsgleichrichtung ähnlich der des TPK4 zeigen. Die Präsenz von 14-3-3 Bindestellen in allen drei Kanälen und die Präsenz von putativen Ca^{2+} -bindenden EF-Hand im TPK2 und TPK3 lässt schließlich auch eine TPK1-ähnliche Regulation des Schaltverhaltens durch 14-3-3 Proteine und zytoplasmatisches Ca^{2+} vermuten (Bihler *et al.*, 2005, Latz *et al.*, 2007b). Somit zeichnet sich ein ungefähres Bild von der Regulation dieser Kanäle ab, dass die Identifikation dieser Kanäle *in planta* erleichtern könnte.

4.2.2 Homomere oder Heteromere?

Das Ausknocken des TPK4 mit einer einzelnen Mutation wie die der Asparaginsäuren im Selektivitätsfilter zeigt, dass beide Untereinheiten an der Porenbildung beteiligt sind und untermauert somit die Hypothese, dass die TPK-Untereinheiten zu einem Dimer assemblieren.

Die Formation von heterogenen, aber funktionellen Kaliumkanalporen innerhalb des TPK4 lässt uns vermuten, dass die Bildung von heterodimeren TPK-Kanälen in der Vakuolenmembran sehr wohl möglich ist. Es ist außerdem anzunehmen, dass eine solche heteromere Assemblierung wahrscheinlicher unter TPK2, TPK3 und TPK5 auftritt, die untereinander höhere Sequenzübereinstimmung zeigen als zu TPK1 und die TPK4 komplementieren konnten. Diese Vermutung widerspricht somit auch nicht der Erkenntnis von Voelker *et al.* (2006), dass in einer FRET-Analyse des TPK1, TPK5 und KCO3 nur Homomere nachgewiesen werden können. Nicht zuletzt lässt auch die Co-Expression der TPKs in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana* eine Heteromerisierung nicht ausschließen.

Untersuchungen der Dimerisierung von TPK-Kanälen und TPC1 mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation konnten die Co-Lokalisation dieser Kanäle in der Vakuolenmembran zeigen, ließen aber keine Aussage über eine Kanal vermittelte und physiologisch relevante Proteininteraktion zu. Der Grund hierfür waren BiFC-Negativkontrollen, die entgegen der Erwartung Fluoreszenzkomplementation zeigten.

Aufgrund dieser Negativkontrolle ist anzunehmen, dass, sobald die YFP-Hälften überexprimiert werden, deren Dichte in der Zelle so groß ist, dass es zwangsläufig zu vorübergehenden Interaktionen kommt, die sogleich durch die irreversible YFP-Komplementation stabilisiert werden können. Für den Nutzen der BiFC-Technik bei der

Untersuchung von Proteininteraktionen wird es daher von entscheidender Bedeutung sein falsch-positive Signale noch besser zu unterdrücken. Dies könnte durch den Einsatz von schwächeren Promotoren geschehen. Dabei ist zu bedenken, dass der Aufenthaltsort von Membranproteinen zwei-dimensional begrenzt ist, also auch bei schwächeren Promotoren eine erhöhte Dichte gegenüber im Zytoplasma frei beweglichen Proteinen erreicht wird. Es können also nicht mehr die nackten YFP-Hälften als Negativ-Kontrollen dienen, sondern es müssen Membranproteine gefunden werden, bei denen eine Interaktion unwahrscheinlich ist. Eine andere Negativkontrolle könnte aber auch der Knock-out von Interaktionsdomänen liefern. Ein Problem, welches durch den Einsatz von schwächeren Promotoren hervorgerufen wird, könnte für die Bildgebung entstehen, da zwangsläufig ein schwächeres Signal detektiert werden muss. Neben diesen Schwierigkeiten liegen aber auch der Nutzen und die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten dieser Technik auf der Hand. Zum einen kann man BiFC für genetische Interaktionstest ähnlich der Hefe-Zwei-Hybrid Tests oder des Split-Ubiquitin Tests einsetzen. Dabei kann man einen fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS) für die Selektion von Zellen mit interagierenden Proteinen heranziehen (Morell *et al.*, 2008). Außerdem bietet BiFC in Verbindung mit der FRET-Technik die Möglichkeit zur *in vivo* Untersuchung ternärer Proteinkomplexe (Shyu *et al.*, 2008).

4.2.3 Mechanismus und Funktion der Einwärtsgleichrichtung des TPK4

Kaum ein Kaliumkanal leitet Kaliumionen in beiden Richtungen gleich gut; schließlich sind Kanäle entlang der Membranachse nicht symmetrisch gebaut. In vielen Fällen wird die sogenannte Gleichrichtung aber nicht durch Asymmetrie, sondern durch ein Spannungs- oder Ligandenabhängiges Öffnen und Schließen, das „gating“, des Kanals verursacht. Da solche Kanäle oft schließen, wenn das Umkehrpotential von Kalium in die eine oder andere Richtung vom Membranpotential überschritten wird, ergibt sich eine Gleichrichtung des Kaliumstroms. TPK4 besitzt nicht wie die Shaker-Kaliumkanäle einen Spannungssensor in einer Transmembrane, der das „gating“ des Kanals steuert und er zeigt auch nicht eine perfekte Einwärtsgleichrichtung wie die Shaker-Kanäle KAT1 oder KAT2 (Schachtman *et al.*, 1992, Pilot *et al.*, 2001). Die schwache Gleichrichtung des TPK4 wird durch einen schnellen, spannungsabhängigen Block von zytoplasmatischer Seite her verursacht. Damit ähnelt die Einwärtsgleichrichtung des TPK4, der des Kir1.1 (ROMK) und des tierischen Tandemporen-Kanals TWIK-1 (HsKCNK1), welche durch einen Mg^{2+} -Block hervorgerufen werden (Lu und MacKinnon, 1994, Lesage *et al.*, 1996a). Ähnlich wie bei Kir1.1 und dem starken Einwärtsgleichrichter Kir2.1 (IRK1) wird der Block bei TPK4 durch eine polare Aminosäure in der TM2 vermittelt. Während aber bei Kir1.1 diese Aminosäure ein Asparagin ist, ist sie bei TPK4 und Kir2.1 ein Aspartat (Lu und MacKinnon, 1994, Wible *et al.*, 1994). Wie kann es dann sein, dass TPK4 ein schwacher Einwärtsgleichrichter und Kir2.1 ein starker Einwärtsgleichrichter ist? Das lässt sich leicht damit erklären, dass es sich bei TPK4, um einen Tandem-Poren-Kanal handelt, der deswegen zwei Aspartate in der Wasser-gefüllten

4. Diskussion

Höhle des Kanals exponiert. Kir2.1 als Tetramer aber vier Aspartate exponiert. Desweiteren bedeutet das, dass die vier Asparagine des Kir1.1 die gleiche Wirkung für den spannungsabhängigen Block besitzen wie die zwei Aspartate des TPK4. Aus der Kenntnis heraus, dass die Stärke des Blocks und der Einwärtsgleichrichtung mit der Polarität der Kanaloberfläche in der wassergefüllten Höhle korreliert, war auch zu erwarten, dass die Mutation des Aspartats zu Asparagin in TPK4, wie gesehen, die Einwärtsgleichrichtung schwächt oder vollends aufhebt. Und wie in einer anderen Studien gezeigt hebt die Einführung einer apolaren Aminosäure wie Alanin die Kanalfunktion auf und führt ein gegensätzlich geladenes Arginin zu einer starken Einwärtsgleichrichtung, die aber wahrscheinlich nicht von einem Block hervorgerufen wird (Lu und MacKinnon, 1994). Somit besitzt diese Position nicht nur eine wichtige Funktion für die Gleichrichtung, sondern auch für die Kaliumpermeation. Letztere könnte darin bestehen Kalium anzuziehen und es in der Porenhöhle so unterhalb des Selektivitätsfilters zu zentrieren, dass der Eintritt in den Selektivitätsfilter erleichtert und beschleunigt wird.

Von dem Alignment der 68 Tandemporen Kaliumkanäle ist ersichtlich, dass mindestens 16 weitere pflanzliche TPKs ein Aspartat an dieser Position in TM2 besitzen, unter ihnen auch die vakuolären AtTPK2, AtTPK3, AtTPK5, aber nicht AtTPK1. Man könnte also sich also vorstellen, dass diese Kanäle ähnlich dem TPK4 eine einwärtsgleichrichtende Eigenschaft besitzen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass auch Polyamine als Blocker jener einwärtsgleichrichtenden Kir-Kanäle identifiziert wurden (Lopatin *et al.*, 1994). Polyamine sind mehrfach positiv geladene aliphatische Kohlenwasserstoffe, die aufgrund ihrer Struktur sehr gut von zytoplasmatischer Seite in die Kanalpore eindringen und diese verschließen können. Außerdem eignen sie sich besonders als Kanalregulatoren, weil sie nicht toxisch sind und in mikromolaren bis millimolaren Konzentrationen in der Zelle vorliegen (Flores und Galston, 1982, Evans und Malmberg, 1989, Galston und Sawhney, 1990, Reggiani *et al.*, 1992). So ist es nicht verwunderlich, dass Polyamine in Pflanzen als Kanalregulatoren identifiziert wurden (Bruggemann *et al.*, 1998, Dobrovinskaya *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 2000, Shabala *et al.*, 2007). Dabei gibt es unterschiedliche Mechanismen der Regulation, die aber alle zu einer Hemmung der Kanalaktivität führen. Während zytoplasmatische Polyamine bei nicht selektiven Kationen-kanälen der Plasmamembran und beim vakuolären FV-Kanal spannungsunabhängig, sowohl Ein- als auch Auswärtsströme blockieren (Bruggemann *et al.*, 1998, Dobrovinskaya *et al.*, 1999, Shabala *et al.*, 2007), führen sie beim SV-Kanal ähnlich wie bei den Kir-Kanälen zu einem spannungsabhängigen Block der Auswärtsströme, indem sie in die Pore eindringen (Dobrovinskaya *et al.*, 1999). Da SV und FV-Kanäle darüber hinaus eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen geladenen Polyaminen besitzen (Dobrovinskaya *et al.*, 1999) kann die Pflanze durch eine Veränderung der Polyamin-Pegel die SV- und FV-Kanäle und möglicherweise auch die TPK-Kanäle unterschiedlich regulieren und somit die Leitfähigkeit des Tonoplasten für verschiedene Kationen entsprechend veränderten Umweltbedingungen anpassen. Zu diesen Umweltbedingungen gehören Kaliummangel, Trockenheit, osmotische Schocks und Salzstress, die alle zu einer Erhöhung

der Polyaminkonzentrationen in der Zelle führen (Richards und Coleman, 1952, Young und Galston, 1984, Evans und Malmberg, 1989). So können Polyamine bei Trockenstreß den Einstrom von Kalium und damit das Öffnen der Schließzellen verhindern (Liu *et al.*, 2000). Unter akutem Salzstreß könnten sie den starken Kaliumefflux über nicht selektive Kationenkanäle (Shabala *et al.*, 2007) oder den Natriuminflux aus der Vakuole über den FV-Kanal reduzieren (Dobrovinskaya *et al.*, 1999) und somit die Salztoleranz erhöhen. Unter Kaliummangelbedingungen, wenn die Pflanze versucht die Kaliumkonzentration im Zytoplasma auf Kosten von vakuolärem Kalium hochzuhalten (Walker *et al.*, 1996) könnten sie wiederum den Kaliumefflux in die Vakuole reduzieren.

Im Fall des TPK4 ist es fraglich, ob der spannungsabhängige Block durch einen kationischen und zytoplasmatischen Blocker von Relevanz für die Pollenphysiologie ist, denn schließlich konnte der Block in Oozyten nur bei sehr starker Depolarisation den Kaliumauswärtsstrom entscheidend reduzieren. Bei schwacher Depolarisation dagegen würde es sehr schnell zum Einstellen des Kaliumgleichgewichts kommen, da TPK4 sowohl Ein- als auch Auswärtsströme zulässt. Denkbar wäre, dass die ist die Einwärtsgleichrichtung des TPK4 nur eine Nebenwirkung der Funktion des Poren-Aspartats für die Kaliumpermeation ist, die darin bestehen könnte Kalium in die Pore zu ziehen und es so in der Porenhöhle zu zentrieren, dass der Eintritt in den Selektivitätsfilter erleichtert und beschleunigt wird. Andererseits könnte der Blocker in Pollen von anderer Natur sein als in den *Xenopus* Oozyten oder in anderer Konzentration vorliegen, so dass es zu einer stärkeren Einwärtsgleichrichtung kommt. Elektrophysiologische Untersuchungen an wachsenden Pollenschläuchen hingegen zeigen dass in *tpk4-1* Knock-Out-Pflanzen sowohl instantane Ein- als auch Auswärtsströme reduziert sind (Becker *et al.*, 2004). Will man diese Reduktion dem Verlust von TPK4 zuschreiben, dann wurde zumindest unter jenen Bedingungen von TPK4 Kaliumausstrom vermittelt.

4.2.4 Die pH-Abhängigkeit des TPK4

Der einzige Weg den „offen“-gleichrichtenden TPK4 zu schließen, ist die Erhöhung der Protonenkonzentration im Zytoplasma. Da TPK4 ausschließlich im Pollen exprimiert wird, muß es auch Zusammenhänge zwischen seiner pH-Regulation und der spezifischen Pollenphysiologie geben. Das Pollenkorn ist der männliche Gametophyt und besteht aus zwei oder drei Zellen, einer großen vegetativen Zelle, die den Pollenschlauch ausbildet und zuerst einer, dann zwei kleinen generativen Zellen die innerhalb des Pollenschlauchs zur Eizelle gelangen und diese befruchtet. Sobald das Pollenkorn auf die Narbe eines Fruchtblatt trifft kommt es zur Pollenquellung und keimung; der Pollenschlauch bildet sich. Durch chemische Botenstoffe wie GABA (γ -Aminobuttersäure) wird der Pollenschlauch durch Narbe und Griffel des Fruchtblatts hin zum Embryosack geleitet (Palanivelu *et al.*, 2003). Das Pollenschlauchwachstum ist ein Spitzenwachstum und ist mit einem starken Kalzium- und pH-Gradienten sowie Kalzium- und pH-Oszillationen verbunden. Während es in der „clear zone“, hinter der Spitze des wachsenden Pollenschlauches, ein alkalisches Band gibt, kommt es im Apex des Pollenschlauchs, zu einer Ansäuerung durch Protonenaufnahme (Feijo *et al.*,

4. Diskussion

1999), die das Schließen des TPK4 bewirken kann. Das Schließen des Hintergrundkanals TPK4 könnte somit die Plasmamembran im Apex empfänglich für eine Depolarisation durch die Aktivierung von Kalziumkanälen machen (Becker *et al.*, 1996).

Wie nimmt aber TPK4 die pH-Veränderung wahr und wie führt sie zum Schließen des Kanals?

Wahrscheinlich beruht die pH-Regulation des TPK4 auf der (De-)Protonierung einer oder mehrerer Aminosäurereste und einer dadurch energetisierten Konformationsänderung. Histidine, welche in vielen Untersuchungen als „pH-Sensoren“ von Kaliumkanälen identifiziert wurden (Hoth *et al.*, 1997, Steidl und Yool, 1999, Rajan *et al.*, 2000, Xu *et al.*, 2001, Geiger *et al.*, 2002), sind im TPK4 nicht an der pH-Regulation beteiligt. Allen diesen Kanälen ist aber gemeinsam, dass sie durch extrazelluläre Protonen reguliert werden. Im Gegensatz dazu werden wie TPK4 die tierischen Tandem-Poren Kanäle TWIK1 und 2 und der Hefe-Tandem-Poren Kanal TOK1 nur durch zytoplasmatische Ansäuerung inhibiert (Lesage *et al.*, 1996a, Bertl *et al.*, 1998, Chavez *et al.*, 1999). Und ähnlich wie bei TPK4 ist auch bei diesen drei Kanälen der „pH Sensor“ bisher noch nicht identifiziert worden.

Als weitere im physiologischen Bereich protonierbare Aminosäuren neben Histidin sind bisher nur noch die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin identifiziert worden. Während der Argininrest in Proteinen einen typischen pKa von 12,5 besitzt (Stryer, 1995) scheint er innerhalb des TASK2 (Niemeyer *et al.*, 2007) um pH 8,0 protoniert bzw. neutralisiert zu werden. Zu erklären ist diese Verschiebung des pKa mit der Platzierung des Arginins in ein schwaches Dielektrikum wie die Lipidmembran (Cymes *et al.*, 2005, Niemeyer *et al.*, 2007).

Der Einwärtsgleichrichter Kir1.1 ist anders als TASK2 und ebenso wie TPK4 sensitiv für zytoplasmatische Ansäuerung, noch dazu im selben physiologischen Bereich (~ pH7,6- pH 6,3) (Becker *et al.*, 1996, Fakler *et al.*, 1996). Bei Kir1.1 wurde ein N-terminales Lysin als die titrierbare Aminosäure identifiziert (Fakler *et al.*, 1996). Die Verschiebung des pKa der Lysinseitenkette, der in Proteinen normalerweise ~10,8 beträgt (Stryer, 1995), ist hier wohl durch die Dreieckstruktur aus diesem Lysin 80 mit zwei Argininen bedingt (Schulte *et al.*, 1999). Das Lysin 80 sitzt direkt an der TM1 von Kir1.1 und die Arginine stammen aus den zytoplasmatischen N- (R40) und C-Termini (R311).

TPK4 besitzt ebenfalls Lysine und Arginine am zytoplasmatischen Ende von TM1 und TM3, die einen sehr auffälligen basischen Ring um die zytoplasmatische Öffnung der Kanalpore bilden. Diese Aminosäuren kommen ebenso wie die in Abbildung 4.1 markierten ionisierbaren Aminosäuren als pH-Sensoren in Frage, weil sie in den TPK4-Chimären und CT-Deletionen mit wildtypischer pH-Regulation unverändert vorhanden waren. Ob eine dieser Aminosäuren tatsächlich an der pH-Regulation des TPK4 beteiligt ist, müssen weitere Mutagenesen zeigen.

Um dann auch kleine Veränderungen in der pH Sensitivität aufzuzeichnen, muss man den pH-Wert genau kontrollieren können. Diese Kontrolle erlangt man entweder beim Entfernen eines Membranflecken aus der Oozyten-Plasmamembran und „patch-clamping“ oder indem

man über externe NaAcetat-Applikation in Badlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert den pH_i von intakten Oozyten auf verschiedene Werte einstellt.

```

      *           20           *           40           *           60           *
TPK4 : MEEENLLNENLLHPNESSPEETQVTTVSKSKWTILVLA M I L L L V Y L T F G V C T Y S F F R D Q F S G T E T N L F V D A F Y F S I V : 77
      -----NT-----*****TM1*****-----pore

      80           *           100          *           120           *           140           *
TPK4 : TFSTVGYGDIVPSTSTTKILTIVLVSTGVVFLDYLLNRV V S H V L S L Q E N A I L D R I N K T R N R A I R D H I A E D G K I R L K W : 154
      -region1-----*****TM2*****-----cytoplasmic-loop-----*

      160          *           180           *           200           *           220           *
TPK4 : KLCLAFCAVGLCVGSGALFLHVFERLDWLDVYLSVISVTTVGYGDKTFKTVEGRGFAVFWLLSTIAMATLFLYLA : 231
      *****TM3*****-----pore-region2-----*****TM4*****

      240          *           260           *           280
TPK4 : EMRIDRTTVMKLPPESEEFIVFKLRESGRISEDDIKQIVREFENLEEVPSGS : 284
      -----CT-----

```

Abb. 4.1 Putative „pH-Sensoren“ des TPK4

Mit Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D), Histidin (H), Cystein (C), Tyrosin (Y), Lysin (K), und Arginin (R) gibt es sieben ionisierbare Aminosäurereste in Proteinen wie TPK4, die einen in derselben Reihenfolge ansteigenden pKa-Wert besitzen. In diesem Alignment sind nur die nach den Arbeiten an den TPK4-Chimären und -Deletionen putativen „pH-Sensoren“ im Einbuchstaben-Code farbig dargestellt.

5. Zusammenfassung

- Die Modellpflanze der Pflanzenphysiologen, *Arabidopsis thaliana*, besitzt mindestens 15 verschiedene kaliumselektive Kanäle, von denen 5 der Strukturklasse der Tandemporen-Kaliumkanäle angehören und daher TPK-Kanäle genannt werden.
- Tandemporenkanäle findet man nur bei eukaryontischen Organismen. Die pflanzlichen Tandemporen Kaliumkanäle haben einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung und unterscheiden sich von den tierischen und denen der Pilze und Einzeller. Die pflanzlichen TPK-Kanäle lassen sich wiederum in die TPK1-Unterfamilie und die TPK2-Unterfamilie unterteilen. Die weitere Evolution der TPK2-Unterfamilie von *A. thaliana*, TPK2, TPK3, TPK4 und TPK5, lässt sich eindeutig auf bestimmte Duplikationsereignisse im Genom von *A. thaliana* und dessen Ahnen zurückführen. Auch der Ein-Poren Kaliumkanal KCO3 geht sehr wahrscheinlich auf die Duplikation des TPK2 und einer anschließenden Deletion und nicht auf einen der prokaryontischen Ein-Poren-Kaliumkanal-Prototypen zurück.
- Vier der *A. thaliana* TPK-Kanäle (TPK1, 2, 3 und 5) lokalisieren in der Vakuolenmembran, während einer, TPK4, zum großen Teil im ER, aber auch in der Plasmamembran zu finden ist. Die Translokation des TPK1 folgt dem sekretorischen Pfad vom ER, durch den Golgi und möglichen intermediären Kompartimenten hin zur Membran der lytischen Vakuole. Von entscheidender Bedeutung ist dabei der zyttoplasmatische Carboxy-Terminus (CT) des TPK1. Deletionsmutanten des TPK1 CT zeigen, dass die Translokation mindestens zwei Sortierungsschritten, am Ausgang des ER und des Golgi, unterliegt. Fehlt der CT komplett bleibt der Kanal im ER. Die Sortierungssignale des TPK1 CT konnten auf die EF-Hand Domäne I eingegrenzt werden. Anschließende Punktmutationen in diesem Bereich konnten zeigen, dass TPK1 in der eigentlich für die Ca^{2+} Bindung zuständigen Domäne ein di-azidisches ER-Export Motiv bestehend aus Asparaginsäure, Leucin und Glutaminsäure enthält. Andere Arbeiten legen nahe, dass der Mechanismus des ER-exports von TPK1 auf der Interaktion mit COPII Vesikelhüllproteinen beruht; TPK1 also in Vesikel sortiert wird, die sich am ER abschnüren und mit dem cis-Golgi fusionieren. Der Vergleich mit anderen pflanzlichen TPK Kanälen lässt vermuten, dass TPK1 Orthologe, nicht aber die *A. thaliana* Homologen ein di-azidisches ER-Exportmotiv besitzen. Die Translokation des TPK3 erwies sich dementsprechend als unabhängig von dessen CT. Weitere Experimente schließen außerdem eine Beteiligung der 14-3-3 Bindung an der Translokation aus.
- TPK4 ist der einzige TPK der heterolog in *Xenopus* Oozyten funktionell exprimiert werden kann. Wie Mutationen an einem essentiellen Aspartat (Asp86, Asp200) in der Pore zeigten, sind beide tandem repetierten Porendomänen einer Kanaluntereinheiten an der Porenbildung beteiligt. Somit formt sich TPK4 ähnlich wie die tierischen TPK-

Kanäle voraussichtlich aus zwei Untereinheiten. Ein Austausch der zweiten Porendomäne von TPK4 konnte zeigen, dass TPK2, TPK3 und TPK5, mit ihrer zweiten Porendomäne und TPK4 mit seiner ersten Porendomäne den TPK4 zu einem funktionellen Kaliumkanal komplementieren können. Da keine der TPK4 Eigenschaften, außer geringfügig die relative Permeabilität für Rb^+ , verändert wurde, kann man absehen, dass die homologen TPK2, TPK3 und TPK5 als instantan aktivierte, spannungsunabhängige Kaliumkanäle der Vakuolenmembran fungieren. Dazu kommt wahrscheinlich ähnlich wie bei TPK1 ein 14-3-3 und Ca^{2+} abhängiges Öffnen und Schließen.

- Weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen am TPK4 zeigten eine Beteiligung einer transmembranen Asparaginsäure (Asp110) an der Kaliumpermeation und der schwachen Einwärtsgleichrichtung. Der Aspartatrest ist in die wassergefüllte Aussparung der zytoplasmatischen Porenhälfte orientiert. Damit kann er über ionische Wechselwirkungen sowohl Kalium in der Pore konzentrieren als auch potentielle Kanalblocker wie Mg^{2+} oder Polyamine binden. Die Konservierung des Aspartats unter anderem bei TPK2, TPK3 und TPK5 deutet daraufhin, dass auch die vakuolären TPK-Kanäle eine Einwärtsgleichrichtung vermitteln, die auf einem spannungsabhängigen Block von zytoplasmatischer Seite basiert.
- Im Gegensatz zum zytoplasmatischen Block ist das Schließen des TPK4 durch zytoplasmatische Ansäuerung spannungsunabhängig und ist daher von einer Protonierungsreaktion abhängig. Über zahlreiche Deletionen und Chimären des TPK4 wurde der Bereich, in dem sich pH-Sensor und pH-Tor befinden, auf den Bereich zwischen transmembranen und zytoplasmatischen Domänen eingegrenzt. Darüber hinaus fungieren Histidine nicht als pH-Sensor.

6. Summary

- The model plant *Arabidopsis* harbours 15 genes encoding potassium selective channels. Five of them belong to the structural class of tandem-pore K⁺ channels and are therefore called TPK channels.
- Blast searches revealed the occurrence of TPK channels in many eucaryots, but not in procaryots. Plant TPK channels cluster in a phylogenetic analysis and branch into a TPK1- and a TPK2-subfamily. The evolution *Arabidopsis* TPK2-subfamily members (TPK2, TPK3, TPK4, and TPK5) can be attributed to distinct large-scale duplication events in ancestral genomes. Further more phylogenetic analysis showed the relatedness of the one-pore potassium channel KCO3 to TPK2.
- The trafficking of the four vacuolar membrane intrinsic TPK channels (TPK1, TPK2, TPK3, and TPK5) utilizes the secretory path, from the endoplasmic reticulum (ER), via Golgi apparatus and maybe intermediate compartments to the lytic vacuole. The carboxy terminus (CT) of TPK1 was critically involved in both ER and Golgi sorting steps. The minimal requirement for vacuolar localisation was the proximal CT up to the Ca²⁺-binding EF-hand I. Due to mutational analyses one of several di-acidic motifs consisting of aspartate, leucin, and glutamate (aa 296-298) could be identified as the essential ER-export motif. By this TPK1 likely interacts with the coat of COPII vesicles, which adopt the ER to Golgi transport. Like TPK1 the orthologs of the TPK1-subfamily, but not the *Arabidopsis* homologs, exhibit the same di-acidic motif. In agreement vacuolar trafficking of TPK3 was independent of its CT.
- TPK4 is the solely plasma membrane integral *At*TPK channel and thus its currents can be recorded at the plasma membrane of *Xenopus leavis* oocytes. Mutation of in plant TPK channels perfectly conserved pore aspartates (D86N; D200N) knock-out TPK4 channel function and suggest a dimeric assembly similar to that of animal tandem-pore channels. Employing TPK4 as matrix for the expression of the pore domains of the vacuolar TPKs in *Xenopus* oocytes, I could show the capability of TPK2, TPK3 and TPK5 to complement TPK4. Therefore these channels probably form instantaneous, voltage-independent and potassium selective channels in the vacuolar membrane. Existence of one 14-3-3 binding motif each and one EF-hand (except TPK5) implicates Ca²⁺ and 14-3-3 dependent activation of those channels like seen for TPK1.
- Further combination of structural, mutational and electrophysiological analyses led to the identification of another pore aspartat (Asp 110) essential for the potassium permeation

and responsible for the inward rectification. The charged side chain of this Asp 110 faces the water cavity and thus could concentrate and coordinate potassium in the pore as well as interact with cationic blockers like e.g. Mg^{2+} or polyamine. Again, conservation among the *Arabidopsis* TPK2-subfamily members suggests that the vacuolar TPKs (except TPK1) are regulated by cytoplasmic blockers and exhibit weak inward rectifying properties, too.

- In contrast to inward rectification current reduction due to cytoplasmic acidification is voltage-independent and thus likely protonation dependent. Due to chimera and deletion mutants of TPK4 the possible sites of the pH-Sensor as well as the gate could be narrowed down to a few residues in the transition zone of transmembrane and cytoplasmic domains, but the essential residues remain elusive.

7. Anhang

7.1 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,

.....
Marcel Dunkel

7.2 Danksagung

Geschafft! Mit der Doktorarbeit geht auch das letzte Kapitel meines Studiums zu Ende. Leider bedeutet das aber auch das Ende meiner Zeit am Julius-von-Sachs-Institut, meiner Arbeit im Sonderforschungsbereich 487 und der Zusammenarbeit mit meinen Kollegen am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik von Prof. Rainer Hedrich. Deswegen sei an dieser Stelle noch einmal denjenigen, die mich während dieser Zeit begleitet und in Rat und Tat unterstützt haben ein besonderer Dank gesagt.

Meinem Doktorvater Prof. Rainer Hedrich, danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können, für die Finanzierung und die intensive Betreuung derselben.

Außerdem möchte ich Prof. Erhard Wischmeyer als Experte auf dem Feld der tierischen Tandem-Poren Kaliumkanäle dafür danken, die Mühen eines Zweitgutachters auf sich genommen zu haben.

Ferner bin ich Dr. Dirk Becker und Dr. Dietmar Geiger für die vielen Ideen, die vielfältige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit sehr dankbar.

Ein besonderer Dank gebührt auch unseren technischen Assistentinnen. Julia Schwarz und Kerstin Neuwinger, die immer wieder an unserem SFB-Teilprojekt mitgewirkt haben. Kerstin Neuwinger für die schnelle Abwicklung der Materialbeschaffung. Susanne Michel, Ute Neef, Elke Baumeister und Brigitte Neumann für die unzähligen DNA-Sequenzierungen.

Prof. Thomas Müller danke ich für die Modellierungen der TPK-Kanalstrukturen, hilfreichen Diskussionen und die Mitwirkung an den Veröffentlichungen.

Prof. Karin Schumacher danke ich für ihre Expertise des TPK-Targeting-Manuskripts.

Den Professoren Chris Hawes (Oxford Brookes Universität) und Barbara G. Pickard (Universität Washington) danke ich für die Bereitstellung der Marker sekretorischer Kompartimente.

Schließlich danke ich auch Prof. Jörg Kudla und Rainer Waadt (Universität Münster), sowie allen die sonst noch an der Synthese der BiFC-Vektoren für die Pflanzenexpression beteiligt waren.

7.3 Lebenslauf

Name: Marcel Dunkel
Geburtsdatum: 1. November 1978
Geburtsort: Schweinfurt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung an Schulen und Universitäten:

1985-1989: Besuch der Grundschule Oberthulba-Thulba
1989-1998: Besuch des Frobenius-Gymnasium in Hammelburg
Juni 1998: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Oktober 1999-
Dezember 2004: Studium der Biologie an der Universität Würzburg
November 2003 bis
September 2004: Anfertigung der Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. R. Hedrich mit dem Thema "Regulation und Lokalisation pflanzlicher Ionenkanäle" am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
November 2004 bis
Februar 2008: Durchführung der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation; wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. R. Hedrich

7.4 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. Latz A., Bertl A., Hekman M., Fischer A., Rapp U., **Dunkel M.**, Müller T., Becker, D. and Hedrich R. (2007) TPK1, a Ca(2+)-regulated Arabidopsis vacuole two-pore K(+) channel is activated by 14-3-3 proteins. *The Plant Journal* 52: 449-459.
3. Ranf S., Wünnenberg P., Lee J., Becker D., **Dunkel M.**, Hedrich R., Scheel D., and Dietrich P. (2008) Loss of the vacuolar calcium channel, AtTPC1, does not impair Ca²⁺-signals induced by abiotic and biotic stresses. *The Plant Journal* 53: 287-299.
4. **Dunkel M.**, Latz A., Becker D., Schumacher K., Müller T., and Hedrich R. (2008) Targeting of vacuolar membrane localized members of the TPK channel family. *Molecular Plant*. In press.
5. **Dunkel M.**, Müller T. and Hedrich R. (2008) K⁺-Transport through the Plasma Membrane Tandem-Pore Channel TPK4 and Pore Chimera with Vacuolar Homologs *The Plant Journal*. Submitted.

7.5 Poster

- | | |
|--------------------------|--|
| SFB487-Begutachtung 2005 | Latz A., Dunkel M. , Becker D. and Hedrich R.
Targeting und Regulation der Tandem-Poren-Kanäle in <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| SFB487-Symposium 2007 | Dunkel M. , Latz A., Becker D. and Hedrich R. Biology of Green Two-Pore Channels |
| Botanikertagung 2007 | Dunkel M. , Latz A., Becker D. and Hedrich R. Targeting of plasma and vacuolar membrane localized members of the TPK channel family |

7.6 Vorträge

- | | |
|--|---|
| SFB487-Klausurtagung 2006 | Dunkel M. , Latz A., Becker D. and Hedrich R. Targeting of tandem-pore ion channels |
| Tagung-Molekularbiologie der Pflanzen 2007 | Dunkel M. , Latz A., Beyhl D., Becker D. and Hedrich R. Regulation und Funktion der TPK-Kanäle |

7.7 Synthetische Oligonukleotide

gerichtete Mutagenesen	
Name	Sequenz des Primers von 5' nach 3'
D296G-E298G	ACAAACAATGGTCTCGGAGCAGCTGATC
D300G-D302G	GAAGCAGCTGGTCTCGGTGAAGATGGA
TPK4Y198F	ACGACGGTTGGTTTCGGAGATAAAACGT
TPK4D86N	CAGTCGGTTACGGGAACATTGTCCCGTCAACTTC
TPK4D200N	CGACGGTTGGTTACGGAAATAAAACGTTTAAGACGG
TPK4D110A	GCGTCGTATTTCTTGCTTATCTACTCAACCG
TPK4D110N	GCGTCGTATTTCTTAACTATCTACTCAACCG
TPK4D110R	GCGTCGTATTTCTTCGATATCTACTCAACCG
TPK4-AgeI	GGTCTCTGCGTCGGAACCGGTGCTTTGTTTCTT
TPK4-NaeI	GGGAGAGGCTTCGCCGGCTTTTGGCTTCTTC
TPK4-BamHI	ACCATCGTCTTGGGATCCACCGGCGTCGTA
TPK4-Bst1107I	GATCCTCCTCTTGGTATACTTAACCTTCGGGG
TPK-Deletionen	
TPK1 Δ CT	CCTCTATGTAGCTGAGGTTAACACAGAAAACAAACAGAG
TPK1 Δ H1	GAAAACAAACAGAGGGCGTTGGTGCCACCTGTTAAC
TPK1 Δ L1	AGCGCTTGCTTCGAGATCATTGTTT
TPK1 Δ H2	AGCGCTAACAACCTCCATCTTCATCGAG
TPK1 Δ L2	AGCGCTCATTTCCTTTCAGTTTATACACAATAAAC
TPK1 Δ H3	AGCGCTTTTCTCATCAATCTTACCCATTTC
TPK1 Δ L3	AGCGCTTTGCTCGAACTCATCCA
TPK3 Δ CT	GTAACTCTCGCCTCAGCCAAGTAC
TPK4 Δ 1-16s	GCCCCGGGATGTCCTCACCGGAAGAACTCAAG
TPK4 Δ 263-284as	CGGTAAACACTAATCCTCCCACCTTCTCTAAG
TPK1/TPK4-Chimären und Ein-Poren-Mutanten	
TPK1-TM3s	CAGACATTCTCAAGGAATTCCATACTAACAAGTTG
TPK1-TM3as	GAATTCCTTGAGAATGTCTGTTGGACC
TPK4-TM3s	GAGATCACATTGCCGAATTCGGCAAGATAAGG
TPK4-TM3as	CCTTATCTTGCCGAATTCGGCAATGTGATCTC

TPK4-TM2as	CGTTTTCTTGAAGACTGTAAACGTGACTCACGACGC
TPK1-TM2s	CGAGCGGCGGATTATGTAAACGAGAAACAAGAGG
TPK-Vollängen	
TPK1s	CACCCGGGATGTCGAGTGATGCAGCT
TPK1as	TTAAGCGCTCCTTTGAATCTGAGACGTG
TPK4s	CACCCGGGATGGAAGAAGAGAACC
TPK4as	TTAAGCGCTTGATCCGCTTGATGG
TPK3s	ATATCTAGAATGGCCAACGAAGGAAGTGACCCTT
TPK/KCO-Porechimären	
TPK1-P2s	CCTCTTCATTACCGGTACGATTTTCCTT
TPK1-P2as	AGATCCAAAAGCCGGCAAAAAGGCGT
TPK2-P2s	ATGCCTTGGAACCGGTGTTTTGATTAT
TPK2-P2as	AACCACATGCCGGCAAGAAGCCTAC
TPK3-P2s	ATGCATTGCTACCGGTGTTGGGATTA
TPK3-P2as	GCAGCCATATGCCGGCGAAAAGCCTA
TPK5-P2s	TGTATCGGTACCGGTGCTTTGGTTT
TPK5-P2as	GTAGCCAAACGCCGGCAAAAAGCCT
KCO3-P2s	GTTGTAACATTTACCGGTTTTTTAATTGTG
KCO3-P2as	CAACCAAACGCCGGCAAGAAACGTAC
TPK1-P1s	GTTCTTGGCTGTATACCTTACCATTGGTACGC
TPK1-P1as	ACCATTCCCAGGATCCGAAGGCACAAG
TPK4-P1s	GGTCTACTTAACCACCGGTGTTTGCACATACTCAT
TPK4-P1as	GATACCAAGACGCCGGCCAAGATCTTGGT
TPK4-P2s	GCCGTTGGTGTATACGTCCGGAAGTGGAG
TPK4-P2as	GCAATAGTTGAAAGGGATCCCCAAAACACTGCGAAG
Sonstige	
V5-watson	CACCAGCGCTGGAGGCGGTGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTC TCCTCGGTCTCGATTCTACGTAAGGTACCGGGCCC
V5-crick	GGGCCCGGTACCTTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGG TTAGGGATAGGCTTACCACCGCCTCCAGCGCTGGTG

7.8 Chemikalienliste

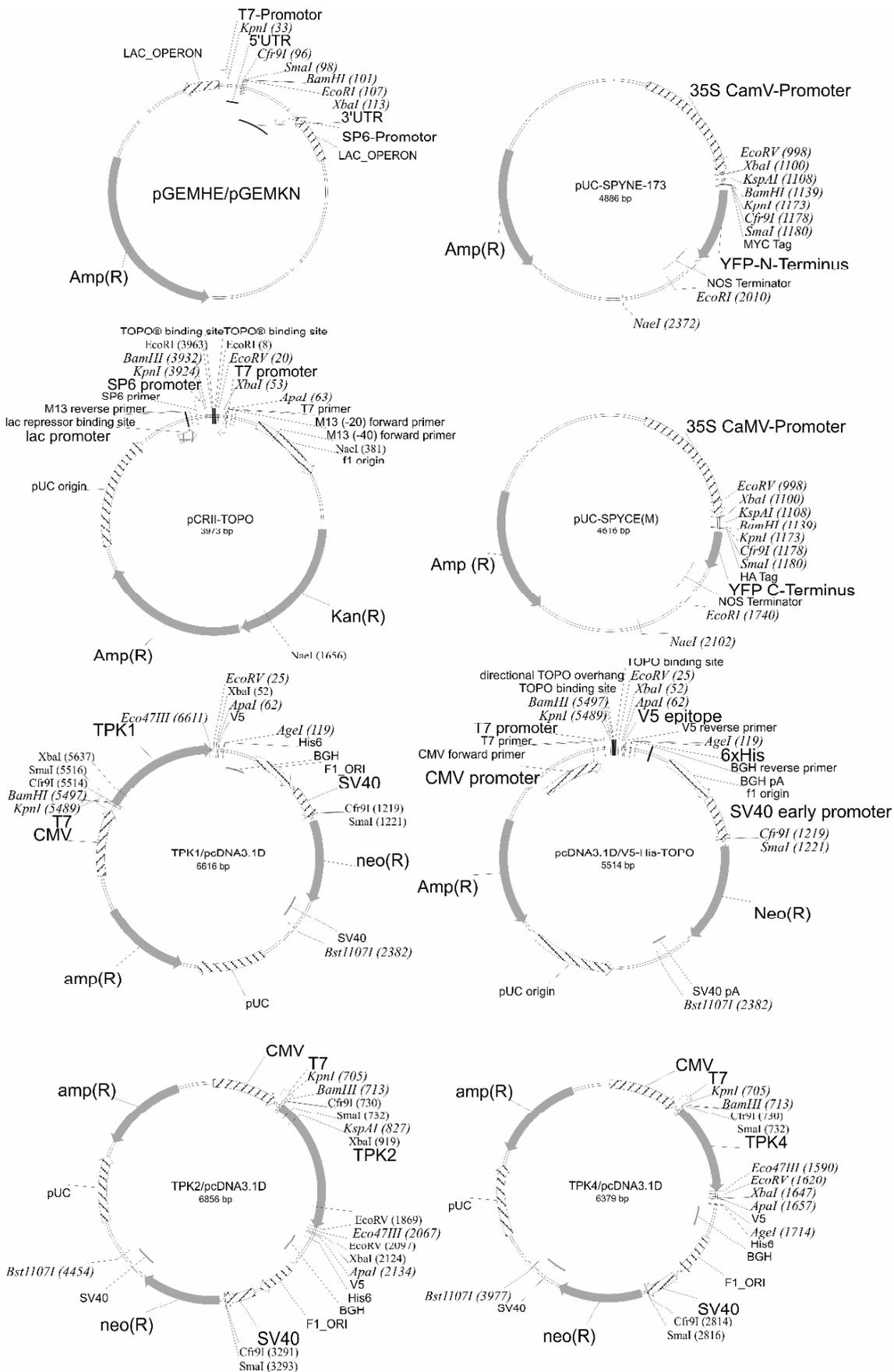
Name	Hersteller
Acetosyringone	Sigma
Agar-Agar dänisch	Roth
Agar-Agar Kobel	Roth

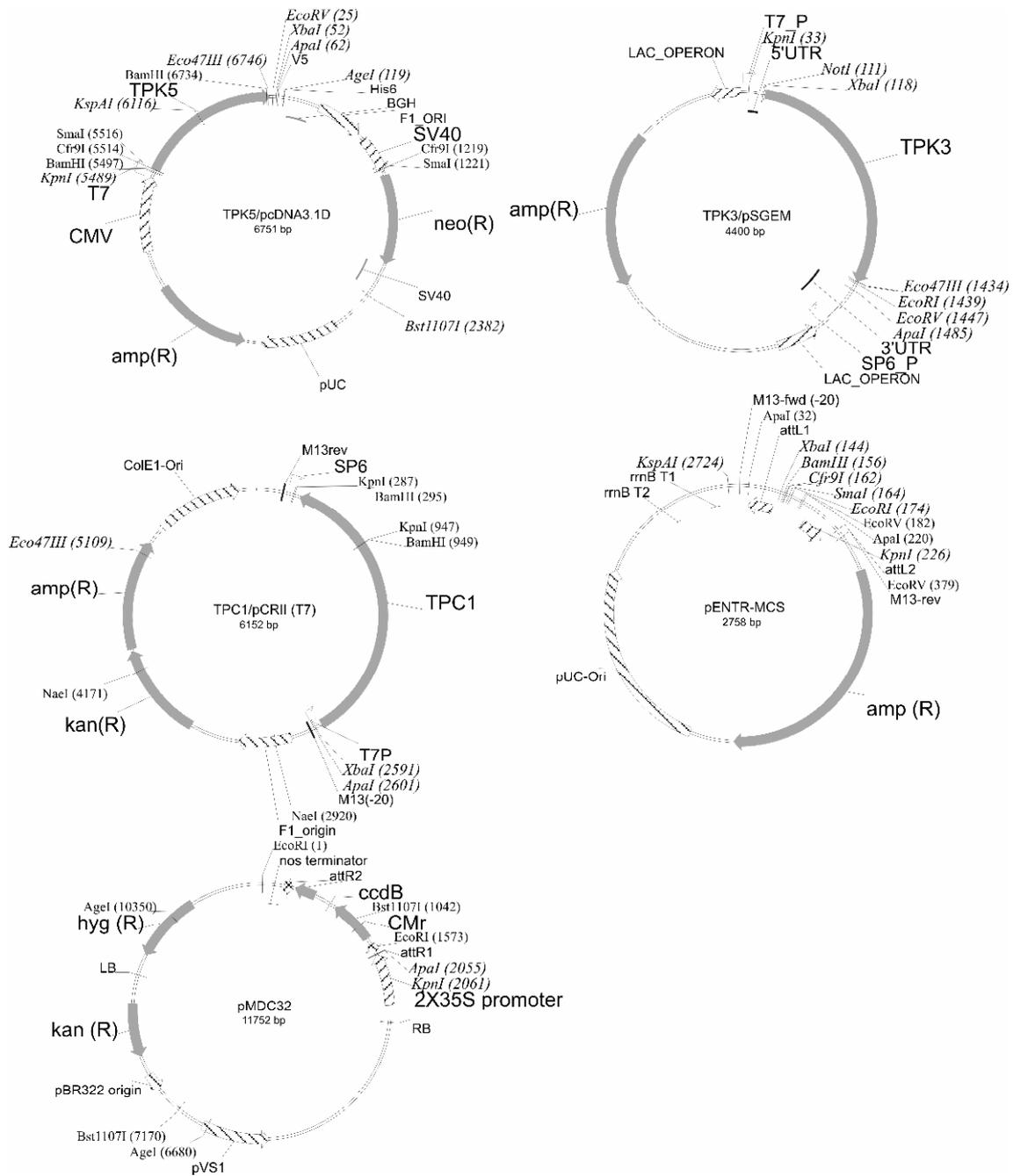
7. Anhang

Agarose Biozym LE	Biozym
Ammoniumacetat	Ambion
Ammoniumchlorid	Merck
Ampicillin	Roth
Bariumchlorid Dihydrate	Sigma
Benzylaminopurine Solution	Sigma
Borsäure	Roth
Brefeldin A	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA = Bovine Albumin Fraktion V	Applichem
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma
Cefotaxime sodium salt	Duchefa
Cäsiumchlorid	Sigma
Collagenase NB 4	Serva
D(+)-Glucose = Dextrose	Sigma
Dimethyldichlorosilane	Fluka
DMSO = Dimethylsulfoxide	Roth
DTT (Dithiothreitol)	Biomol
EDTA-Titriplex III natrium salt	Merck
Essigsäure	Fluka
Ethanol	Roth
Ethidiumbromide Lsg.	Merck
Formaldehyde 37%ige Lsg.	Sigma
Gentamycin sulfate salt hydrate	Sigma
Glycerin = Glycerol anhydrous	Merck
Glycine	Sigma
Hepes	Merck
Hydrogen Ionophore II - Cocktail A	Sigma
Hygromycin B	Sigma
Isopropanol	AppliChem
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid Plätzchen	Merck
Kanamycin solution	Sigma
Lithiumchlorid	Sigma
Magnesium Sulfate heptahydrate	Sigma
Magnesiumchlorid hexahydrat	Sigma
MES	Sigma
Methanol	Merck
MS Medium (basal saltmixture incl. MES)	Duchefa
myo-Inositol	Sigma

Naphthaleneacetic acid =1-NAA	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Applichem
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck
Natriumhypochloridslg.	Sigma
Natronlauge	Roth
N-Methyl-D-glucamine =NMDG	Fluka
Phytigel	Sigma
Ribonuclease = RNase	Roth
Rifampicin	Sigma
Rotiphorese Gel40 29:1	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
Saccharose = Sucrose	Sigma
Salzsäure 32%	Merck
SDS-Pellets	Roth
Sorbitol = D-Sorbit	Roth
Spermidine trihydrochloride	Sigma
Suberic acid bis(N-hydroxysuccinimide ester) = DSS	Sigma
TEMED	Roth
Thiamine	Sigma
Tricaine = Aminobenzoic acid 3- Ethyl ester*methanes	Sigma
Tris ultrapure	Applichem
Triton X-100	Sigma
Trypsin - EDTA-Soln cell culture tested	Sigma
Tryptone	Applichem
Tween 20	Sigma
Water BPC-grade	Sigma
Xylencyanol	Roth
Yeast Extrakt	Applichem

7.8 Ausgangsvektoren





7.9 putative Doppelporen-Kaliumkanäle

Abkürzung	Organismus	Datenbank Accession
Af	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ref XP_754857.1
Am1	<i>Apis mellifera</i>	ref XM 394509.1
An1	<i>Aspergillus niger</i> An09g04840	ref XP_001393797.1
An2	<i>Aspergillus niger</i>	ref XM 001396408.1
An3	<i>Aspergillus niger</i>	ref NW 001594311.1
AtTPK1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ref NP_851196.1
AtTPK2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ref NP_199449.1
AtTPK3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ref NP_193550.1
AtTPK4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ref NP_171752.1
AtTPK5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ref NP_192093.1
Auran1	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	jgi Auran1 70498
Auran2	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	jgi Auran1 66065
Auran3	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	jgi Auran1 67074
Auran4	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	jgi Auran1 67645
Bf	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	ref XM 001547681.1
Bm	<i>Brugia malayi</i>	gb EDP36550.1
Br	<i>Brassica rapa</i>	gb AC189621.1
Bt1	<i>Bos taurus</i>	ref XP_874483.2
Bt2	<i>Bos taurus</i>	ref XP_603455.2
Cb1	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	ref XP_001678367.1
Cb2	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	ref XM 001675913.1
Ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ref NP_507480.1
CeSUP9	<i>Caenorhabditis elegans</i>	sp O17185.2
Cf	<i>Canis familiaris</i>	ref XP_547944.2
Cg	<i>Candida glabrata</i>	ref XP_448924.1
Ci1	<i>Cichorium intybus</i>	gb EH691600.1
Ci2	<i>Cichorium intybus</i>	gb EH697996.1
DmORK1	<i>Drosophila melanogaster</i>	sp Q94526.2
DmTASK6	<i>Drosophila melanogaster</i>	emb CAI72672.1
Dp	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	ref XP_001359014.1
Dr1	<i>Danio rerio</i>	ref XP_001342876.1
Dr2	<i>Danio rerio</i>	ref XP_001344669.1
Dr3	<i>Danio rerio</i>	ref XP_693994.2
EcTPK1	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	sp Q9LLM5
Eqca	<i>Equus caballus</i>	ref XP_001493719.1
Gg1	<i>Gallus gallus</i>	ref XM 421431.1
Gg2	<i>Gallus gallus</i>	emb BX950698.2
Gr1	<i>Gossypium raimondii</i>	gb CO127482.1
Gr2	<i>Gossypium raimondii</i>	gb CO097678.1
HsKCNK1	<i>Homo sapiens</i>	sp O00180.1
HsKCNK10	<i>Homo sapiens</i>	ref NP_066984.1
HsKCNK12	<i>Homo sapiens</i>	ref NP_071338.1
HsKCNK13	<i>Homo sapiens</i>	ref NP_071337.2

HsKCNK15	Homo sapiens	sp Q9H427.2
HsKCNK16	Homo sapiens	ref NP_115491.1
HsKCNK2	Homo sapiens	ref NP_055032.1
HsKCNK3	Homo sapiens	ref NP_612191.1
HsKCNK4	Homo sapiens	ref NP_201567.1
HsKCNK5	Homo sapiens	ref NP_003731.1
HsKCNK6	Homo sapiens	ref NP_004814.1
HsKCNK7	Homo sapiens	ref NP_258416.1
HsKCNK9	Homo sapiens	ref NP_057685.1
Hv1	Hordeum vulgare ssp. vulgare	gb ABB76278.1
Hv2	Hordeum vulgare ssp. vulgare	gb AAX08090.1
Kl	Kluyveromyces lactis	ref XP_455718.1
Le	Lodderomyces elongisporus	ref XM 001524261.1
Md	Monodelphis domestica	ref XP_001372207.1
MmKCNK3	Mus musculus	sp O35111.2
Monbr	Monosiga brevicollis	jgi Monbr1 32738
Naegr1	Naegleria gruberi	jgi Naegr1 73953
Naegr2	Naegleria gruberi	jgi Naegr1 78006
Necha1	Nectria haematococca	jgi Necha2 91373
Necha2	Nectria haematococca	jgi Necha2 98338
Nf	Neosartorya fischeri	ref XP_001263691.1
NfTPK1	Nicotiana tabacum	dbj AB353341.1
Oc	Oryctolagus cuniculus	ref NP_001076205.1
Ol	Ostreococcus lucimarinus	ref XM 001418291.1
Os1	Oryza sativa	gb EAZ08520.1
Os2	Oryza sativa	gb EAZ44138.1
Os3	Oryza sativa	gb EAY75481.1
Os4	Oryza sativa	ref NP_001043966.1
Os5	Oryza sativa	ref NP_001058719.1
Os6	Oryza sativa	ref NP_001051298.1
Os7	Oryza sativa	gb EAZ13200.1
Ot	Ostreococcus tauri	emb CAL57090.1
Pg	Picea glauca	gb CO242494.1
Phatr1	Phaeodactylum tricornutum	jgi Phatr2 32332
Phatr2	Phaeodactylum tricornutum	jgi Phatr2 15685
Phchr	Phanerochaete chrysosporium	jgi Phchr1 3875
Phyra	Phytophthora ramorum	jgi Phyra1_1 80350
Pigu	Pichia guilliermondii	ref XP_001485695.1
Pp1	Physcomitrella patens ssp patens	jgi Phypa1_1 151296
Pp2	Physcomitrella patens ssp patens	jgi Phypa1_1 14413
Pp3	Physcomitrella patens ssp patens	jgi Phypa1_1 114065
Ps	Pichia stipitis	ref XP_001383990.2
Pt	Pan troglodytes	ref XP_001136938.1
Rn	Rattus norvegicus	ref NP_446256.2
Sc	Saccharomyces cerevisiae	gb EDN63485.1

7. Anhang

ScTOK1	Saccharomyces cerevisiae	emb CAA89386.1
Sp	Strongylocentrotus purpuratus	ref XP_785246.1
SsSPOCK1	Samanea saman	gb AAD16279.1
StKCO1a	Solanum tuberosum	emb CAA73483.1
StKCO1b	Solanum tuberosum	sp Q9AR58
Tc1	Tribolium castaneum	ref XP_973392.1
TcOrk1	Tribolium castaneum	ref XP_969255.1
Thaps1	Thalassiosira pseudonana	jgi Thaps3 8576
Thaps2	Thalassiosira pseudonana	jgi Thaps3 3590
Tn	Tetraodon nigroviridis	emb CAG10407.1
Vp	Vanderwaltozyma polyspora	ref XP_001643315.1
Vv1	Vitis vinifera	emb CAO45114.1
Vv10	Vitis vinifera	emb CAO66906.1
Vv11	Vitis vinifera	emb AM443159.1
Vv2	Vitis vinifera	emb CAO45112.1
Vv3	Vitis vinifera	emb CAO17775.1
Vv4	Vitis vinifera	emb CAN67132.1
Vv5	Vitis vinifera	emb CAO70011.1
Vv6	Vitis vinifera	emb CAO39938.1
Vv7	Vitis vinifera	emb CAO45113.1
Vv8	Vitis vinifera	emb CAO70013.1
Vv9	Vitis vinifera	emb CAO40235.1
Xl1	Xenopus laevis	ref NP_001088981.1
Yl	Yarrowia lipolytica	ref XP_502461.1
Yl2	Yarrowia lipolytica	ref XP_503490.1
Zm	Zea mays	gb DR793510.1

7.10 Proteinsequenzalignment der TPK/KCO-Kanäle

```

                *           20           *           40           *           60
TPK4 : -----MEEENLLNENL----- : 11
TPK5 : M-----EPLISPQPRFRLQPIPENPSSSSSSASITIPRSISNTSFFHEISQERLL : 50
KCO3 : MTPS-----EF-----KNRLIFGSL- : 15
TPK1 : MSSD-----AARTPLLPTE-KIDTMAQDFN : 24
TPK2 : MANDGNGDNNDDPLRQYLMNPRINPPPSLLTLPENNDVTIPMPTPPELKNRLIFGFSV : 60
TPK3 : MANEGS-----DPLLQYMISPRLKPPQLLFPLPEDNEVAIPMPMTPSEFKERLIFGPF : 55

                *           80           *           100          *           120
TPK4 : ----- : -
TPK5 : LHHQD-----LEQ----SVQDDKEDQDSDSDETNRFLS-----QT : 81
KCO3 : --PRSS-----SDPTDL--Q--FTEPNVPP--SL-----FS : 38
TPK1 : LNSRTS-----SSRKRR----- : 36
TPK2 : RSRKESSLPIDALSQ-NPSTSSSATT-SFSDSTDL--LLPLTEPNKPVRKSK-----PT : 110
TPK3 : CSPRDSSSHFIDSMKQSPSSSSTAVNNPFSDSSTLDPLLPPPPQPEPWLSDQTSSHCQG : 115

                *           140          *           160           *           180

```

TPK4 : --LHPNESSEETQV-----TTVSKSKWTILVLAMILLIVYLTFGVCTY : 53
 TPK5 : RPLHRSRTAFAMVIKDLRT-----KPPET-KKPSPVSKSIIRQAFILLIVYLTLGVSTY : 135
 KCO3 : LPEHNDDTATDMA-----PD---QETEQSVSKSIARQAIALLVVYLSLGVLIY : 83
 TPK1 : --LRRSRSAERGDVYNDVVKIDEPPPHPSKIPMFSDLNPNLRRVIMFLALYLTICTLCF : 94
 TPK2 : INFHRSKTAFAMAAINNIS-----HPNDPKTDQQSDSKTIVNQAVALLVVYLSLGVLIY : 164
 TPK3 : HALHRSKTAFAMAVINDLH-----HPIRQK-DPTETSRSVVRQAFALLVVYLSLGVLIY : 168

14-3-3

* 200 * 220 * 240
 TPK4 : SFFRDQFSGTEINLNVDAFYFSIVTFSVVGYGDI VPSSTTKILTIVL VSTGVVFLDYLL : 113
 TPK5 : SFNRDHYSGIEHPVVDALYFCIVTMCITIGYGDIAPLTPWTKIFAVVFLVFGFGLDILL : 195
 KCO3 : WLTLSDNAYQTHPVAVALYFVVTFC----- : 110
 TPK1 : YLVRDQISGHKISGVVDALYFCIVTMTVVGYGDI VENSASRL LACAFVFSGMVLVGHLL : 154
 TPK2 : WLNRDSYNVKQTHPVVDALYFCIVTMCITIGYGDITPDSVVTKLFSIFFVLVFGFMDILL : 224
 TPK3 : WLNRDHYVVNQTHPVVDALYFCIVTMCITIGYGDITPNSVVTKLFSIMFVLVFGFIDILL : 228

pore-1

* 260 * 280 * 300
 TPK4 : NRVVSHVLSIQENALIDRINKTRN-----RAIRDHTAE--DGKIRLKWKLCLAFCA-A : 162
 TPK5 : SGVVNYVLDLQESMILTGIQTRQHQQHHHHRFSAKDYI IDFEKGRMIRMKVCLALC-V : 254
 KCO3 : ----- : -
 TPK1 : SRAADYLVEKQHALVRAFHLRQ-----SFGPTDIKELHTNKLRYK---CYATCLV : 203
 TPK2 : SGMVTYVLDLQENYMETARNES---LNLNDRDKVRSYI IDVKKGRMIRLKVGLALG-V : 280
 TPK3 : SGMVSYVLDLQESYMLDSAKRR-----DEPEKRRSYI IDVKKGRMIRLKVVALALG-V : 280

* 320 * 340 * 360
 TPK4 : VGLCVGSCALFLHVFERLDWLDSVYLSVISVTTVVGYGDKTFKIVEGRGFVAVFWLLISTIA : 222
 TPK5 : VVLCIGVCAVLHVFVEELCFVDSVYLSVMSVTTVVGYGDRAFKTLQGRFLFAAVWLLVSTLA : 314
 KCO3 : -----CFILVHFVVKICWLDSECFVSMVTTVVGFGDRAFNWLGTFLAAVWLLVSTLA : 163
 TPK1 : LVVLFIVCTIFLVMVEKMPVLSAFYCVCSVTTTLGYGDKSFNSEAGRLFVAVFWILTSSIC : 263
 TPK2 : VVLCIGVCAVLHVFVEELCFVDSVYLSVMSVTTVVGYGDRAFNLAGRLLAAMWLLVSTLA : 340
 TPK3 : VVLCIAVCAVGLHVFVEELCFVDSVYLSVMSVTTVVGYGDRAFKTLPCGRFLFAAVWLLVSTLA : 340

pore-2

* 380 * 400 * 420
 TPK4 : MATLFLYLAEMRIDRTTVMKLP-----SESEFTVFKLRESGR : 260
 TPK5 : VARAFLYLAEARIDRRHKAVKLANREITVDDLLKADTYQHGFISKSEYIVLKLKEMGK : 374
 KCO3 : VARAFLFLADARADKRNRERAKVLGESISISQFFAADIDNDGRLSLAEFAIYKCLKQMEK : 223
 TPK1 : LAQFELYVAELNTENKQALVWVITRRITINNLEAADLDEDCVVGAAEFIVYKCLKEMGK : 323
 TPK2 : VARAFLFLAASRVDKRNRERAKVLGESMSISQFLDADIDCNCVSKAEFVIYKCLKMDK : 400
 TPK3 : VARAFLYLAEARVDKRNRERAKVL CETMSVSQFFAADIDNNGCVSKAEYVIYKCLKEMEK : 400

DAI *****EF1*****

* 440 * 460
 TPK4 : ISEDDIKQIVREHEMEEVPSSGS----- : 284
 TPK5 : ITQKDIIDQVVIQFEKLEPNQICKITLPDLLGDP-----L : 408
 KCO3 : ITQEDFIQICNOFDKLEDRTQSCRITLVDTTATSV----- : 258
 TPK1 : IDEKDISGIMDEFEQLEDESCITLTSDIVLAQTTSQIQ---R : 363
 TPK2 : ITEKDIINPITGFEKLEDRTNSCRITLLDLLESSTKDLPTATSI : 443
 TPK3 : ITDKDILPISKQFDKLEDRCSNCKITLLDLLEGGSGD----- : 436

*****EF2*****

8. Referenzen

- Ache, P., Becker, D., Deeken, R., Dreyer, I., Weber, H., Fromm, J. and Hedrich, R. (2001) VFK1, a *Vicia faba* K⁺ channel involved in phloem unloading. *Plant Journal*, **27**, 571-580.
- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R. 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, G.J., Amtmann, A. and Sanders, D. (1998) Calcium-dependent and calcium-independent K⁺ mobilization channels in *Vicia faba* guard cell vacuoles. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 305-318.
- Allen, G.J. and Sanders, D. (1995) Calcineurin, a Type 2B Protein Phosphatase, Modulates the Ca²⁺-Permeable Slow Vacuolar Ion Channel of Stomatal Guard Cells. *Plant Cell*, **7**, 1473-1483.
- Allen, G.J. and Sanders, D. (1996) Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *Plant Journal*, **10**, 1055-1069.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Andreeva, A.V., Zheng, H., Saint-Jore, C.M., Kutuzov, M.A., Evans, D.E. and Hawes, C.R. (2000) Organization of transport from endoplasmic reticulum to Golgi in higher plants. *Biochem Soc Trans*, **28**, 505-512.
- Arniges, M., Fernandez-Fernandez, J.M., Albrecht, N., Schaefer, M. and Valverde, M.A. (2006) Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J Biol Chem*, **281**, 1580-1586.
- Ashley, M.K., Grant, M. and Grabov, A. (2006) Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 425-436.
- Baizabal-Aguirre, V.M., Clemens, S., Uozumi, N. and Schroeder, J.I. (1999) Suppression of inward-rectifying K⁺ channels KAT1 and AKT2 by dominant negative point mutations in the KAT1 alpha-subunit. *Journal of Membrane Biology*, **167**, 119-125.
- Bar-Peled, M. and Raikhel, N.V. (1997) Characterization of AtSEC12 and AtSAR1. Proteins likely involved in endoplasmic reticulum and Golgi transport. *Plant Physiol*, **114**, 315-324.
- Barlowe, C. (2003) Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol*, **13**, 295-300.
- Barrieu, F., Marty-Mazars, D., Thomas, D., Chaumont, F., Charbonnier, M. and Marty, F. (1999) Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1 in cauliflower cells. *Planta*, **209**, 77-86.
- Becker, D., Dreyer, I., Hoth, S., Reid, J.D., Busch, H., Lehnen, M., Palme, K. and Hedrich, R. (1996) Changes in voltage activation, Cs⁺ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K⁺ channel KAT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8123-8128.
- 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 U S A*, **101**, 15621-15626.
- Bednarek, S.Y. and Raikhel, N.V. (1992) Intracellular trafficking of secretory proteins. *Plant Mol Biol*, **20**, 133-150.
- Bertl, A., Bihler, H., Reid, J.D., Kettner, C. and Slayman, C.L. (1998) Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J Membr Biol*, **162**, 67-80.
- Bihler, H., Eing, C., Hebeisen, S., Roller, A., Czempinski, K. and Bertl, A. (2005) TPK1 is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar cation channel. *Plant Physiol*, **139**, 417-424.

- Blanc, G., Hokamp, K. and Wolfe, K.H.** (2003) A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the Arabidopsis genome. *Genome Res*, **13**, 137-144.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A. and Hawes, C.** (1998) Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J*, **15**, 441-447.
- Brandizzi, F., Frangne, N., Marc-Martin, S., Hawes, C., Neuhaus, J.M. and Paris, N.** (2002) The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell*, **14**, 1077-1092.
- Bruggemann, L.I., Pottosin, I.I. and Schonknecht, G.** (1998) Cytoplasmic polyamines block the fast-activating vacuolar cation channel. *Plant Journal*, **16**, 101-105.
- Bruggemann, L.I., Pottosin, I.I. and Schonknecht, G.** (1999) Selectivity of the fast activating vacuolar cation channel. *Journal of Experimental Botany*, **50**, 873-876.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. and Tsien, R.Y.** (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7877-7882.
- Canfield, W.M., Johnson, K.F., Ye, R.D., Gregory, W. and Kornfeld, S.** (1991) Localization of the Signal for Rapid Internalization of the Bovine Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Insulin-Like Growth Factor-I Receptor to Amino-Acids 24-29 of the Cytoplasmic Tail. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 5682-5688.
- Cartier, E.A., Conti, L.R., Vandenberg, C.A. and Shyng, S.L.** (2001) Defective trafficking and function of KATP channels caused by a sulfonylurea receptor 1 mutation associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2882-2887.
- Cervelli, M., Di Caro, O., Di Penta, A., Angelini, R., Federico, R., Vitale, A. and Mariottini, P.** (2004) A novel C-terminal sequence from barley polyamine oxidase is a vacuolar sorting signal. *Plant J*, **40**, 410-418.
- Chapman, M.L., Krovetz, H.S. and VanDongen, A.M.** (2001) GYGD pore motifs in neighbouring potassium channel subunits interact to determine ion selectivity. *J Physiol*, **530**, 21-33.
- Chavez, R.A., Gray, A.T., Zhao, B.B., Kindler, C.H., Mazurek, M.J., Mehta, Y., Forsayeth, J.R. and Yost, C.S.** (1999) TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J Biol Chem*, **274**, 7887-7892.
- Cheeseman, J.M. and Hanson, J.B.** (1979) Mathematical-Analysis of the Dependence of Cell Potential on External Potassium in Corn Roots. *Plant Physiology*, **63**, 1-4.
- Chung, S.M., Frankman, E.L. and Tzfira, T.** (2005) A versatile vector system for multiple gene expression in plants. *Trends Plant Sci*, **10**, 357-361.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G. and Ward, W.W.** (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry*, **32**, 1212-1218.
- Cole, K.S.** (1949) Dynamic Electrical Characteristics of the Squid Axon Membrane. *Archives Des Sciences Physiologiques*, **3**, 253-258.
- Contreras, I., Yang, Y., Robinson, D.G. and Aniento, F.** (2004) Sorting signals in the cytosolic tail of plant p24 proteins involved in the interaction with the COPII coat. *Plant Cell Physiol*, **45**, 1779-1786.
- 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.
- Cymes, G.D., Ni, Y. and Grosman, C.** (2005) Probing ion-channel pores one proton at a time. *Nature*, **438**, 975-980.
- Czempinski, K., Frachisse, J.M., Maurel, C., Barbier-Brygoo, H. and Mueller-Roeber, B.** (2002) Vacuolar membrane localization of the Arabidopsis 'two-pore' K⁺ channel KCO1. *Plant J*, **29**, 809-820.
- Czempinski, K., Gaedeke, N., Zimmermann, S. and Muller-Roeber, B.** (1999) Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *Journal of Experimental Botany*, **50**, 955-966.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T. and Muller-Roeber, B.** (1997) New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *Embo J*, **16**, 2565-2575.

8. Referenzen

- daSilva, L.L., Snapp, E.L., Denecke, J., Lippincott-Schwartz, J., Hawes, C. and Brandizzi, F. (2004) Endoplasmic reticulum export sites and Golgi bodies behave as single mobile secretory units in plant cells. *Plant Cell*, **16**, 1753-1771.
- Denecke, J., Botterman, J. and Deblaere, R. (1990) Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell*, **2**, 51-59.
- Deutsch, C. (2003) The birth of a channel. *Neuron*, **40**, 265-276.
- Dietrich, P., Sanders, D. and Hedrich, R. (2001) The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 1959-1967.
- Dobrovinskaya, O.R., Muniz, J. and Pottosin, II (1999) Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *J Membr Biol*, **167**, 127-140.
- Dolan, L. and Davies, J. (2004) Cell expansion in roots. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 33-39.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69-77.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Muller-Rober, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B. and Hedrich, R. (1997a) Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophys J*, **72**, 2143-2150.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., MullerRober, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B. and Hedrich, R. (1997b) Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophysical Journal*, **72**, 2143-2150.
- Dreyer, I., Poree, F., Schneider, A., Mittelstadt, J., Bertl, A., Sentenac, H., Thibaud, J.B. and Mueller-Roeber, B. (2004) Assembly of plant Shaker-like K(out) channels requires two distinct sites of the channel alpha-subunit. *Biophys J*, **87**, 858-872.
- Duby, G., Hosy, E., Fizames, C., Alcon, C., Costa, A., Sentenac, H. and Thibaud, J.B. (2008) AtKCl1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels. *Plant Journal*, **53**, 115-123.
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C. and Lazdunski, M. (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *Embo J*, **16**, 5464-5471.
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 181-191.
- Evans, H.J. and Sorger, G.J. (1966) Role of Mineral Elements with Emphasis on Univalent Cations. *Annual Review of Plant Physiology*, **17**, 47-&.
- Evans, P.T. and Malmberg, R.L. (1989) Do Polyamines Have Roles in Plant Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**, 235-269.
- Fakler, B., Brandle, U., Bond, C., Glowatzki, E., Konig, C., Adelman, J.P., Zenner, H.P. and Ruppertsberg, J.P. (1994) A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K⁺ channels to intracellular spermine. *FEBS Lett*, **356**, 199-203.
- Fakler, B., Schultz, J.H., Yang, J., Schulte, U., Brandle, U., Zenner, H.P., Jan, L.Y. and Ruppertsberg, J.P. (1996) Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *Embo Journal*, **15**, 4093-4099.
- Feijo, J.A., Sainhas, J., Hackett, G.R., Kunkel, J.G. and Hepler, P.K. (1999) Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *Journal of Cell Biology*, **144**, 483-496.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
- Ferrando, A., Farras, R., Jasik, J., Schell, J. and Koncz, C. (2000) Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in Agrobacterium-transformed plant cells. *Plant J*, **22**, 553-560.
- Ficker, E., Tagliatalata, M., Wible, B.A., Henley, C.M. and Brown, A.M. (1994) Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science*, **266**, 1068-1072.
- Fiedler, K. and Rothman, J.E. (1997) Sorting determinants in the transmembrane domain of p24 proteins. *J Biol Chem*, **272**, 24739-24742.

- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C. and Lazdunski, M.** (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *Embo J*, **15**, 6854-6862.
- Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M. and Lazdunski, M.** (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *Embo J*, **17**, 3297-3308.
- Finkel, A. and Gage, P.** (1985) Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. In *Voltage and Patch Clamping With Microelectrodes* (Smith, T.G.L.H.R.S.J.G.P.W. ed: An American Physiological Society Book; New Ed edition (November 30, 1984), pp. 47-94.
- Flores, H.E. and Galston, A.W.** (1982) Polyamines and Plant Stress - Activation of Putrescine Biosynthesis by Osmotic Shock. *Science*, **217**, 1259-1261.
- Fricke, W., Leigh, R.A. and Tomos, A.D.** (1994) Concentrations of Inorganic and Organic Solutes in Extracts from Individual Epidermal, Mesophyll and Bundle-Sheath Cells of Barley Leaves. *Planta*, **192**, 310-316.
- Galston, A.W. and Sawhney, R.K.** (1990) Polyamines in Plant Physiology. *Plant Physiology*, **94**, 406-410.
- Geiger, D., Becker, D., Lacombe, B. and Hedrich, R.** (2002) Outer pore residues control the H⁺ and K⁺ sensitivity of the Arabidopsis potassium channel AKT3. *Plant Cell*, **14**, 1859-1868.
- Gifford, J.L., Walsh, M.P. and Vogel, H.J.** (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal*, **405**, 199-221.
- Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K. and Maathuis, F.J.** (2007) The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10726-10731.
- Grabarek, Z.** (2006) Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, **359**, 509-525.
- Grabov, A.** (2007) Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: Single family - Multiple functions. *Annals of Botany*, **99**, 1035-1041.
- Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K. and Navia, M.A.** (1995) X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, **82**, 507-522.
- Guex, N. and Peitsch, M.C.** (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Gulbis, J.M. and Doyle, D.A.** (2004) Potassium channel structures: do they conform? *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 440-446.
- Gulbis, J.M., Mann, S. and MacKinnon, R.** (1999) Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit. *Cell*, **97**, 943-952.
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R. and Marbaix, G.** (1971) Use of Frog Eggs and Oocytes for Study of Messenger Rna and Its Translation in Living Cells. *Nature*, **233**, 177-&.
- Hajdu, P., Ulens, C., Panyi, G. and Tytgat, J.** (2003) Drug- and mutagenesis-induced changes in the selectivity filter of a cardiac two-pore background K⁺ channel. *Cardiovasc Res*, **58**, 46-54.
- Hamilton, C.M., Frary, A., Lewis, C. and Tanksley, S.D.** (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9975-9979.
- Hanton, S.L., Chatre, L., Renna, L., Matheson, L.A. and Brandizzi, F.** (2007) De novo formation of plant endoplasmic reticulum export sites is membrane cargo induced and signal mediated. *Plant Physiol*, **143**, 1640-1650.
- Hanton, S.L., Renna, L., Bortolotti, L.E., Chatre, L., Stefano, G. and Brandizzi, F.** (2005) Diacidic motifs influence the export of transmembrane proteins from the endoplasmic reticulum in plant cells. *Plant Cell*, **17**, 3081-3093.
- Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C. and Hodge, S.** (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2122-2127.
- Hedrich, R. and Neher, E.** (1987) Cytoplasmic Calcium Regulates Voltage-Dependent Ion Channels in Plant Vacuoles. *Nature*, **329**, 833-836.

8. Referenzen

- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. and MacKinnon, R.** (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J*, **66**, 1061-1067.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T.** (1994) Efficient Transformation of Rice (*Oryza-Sativa* L) Mediated by *Agrobacterium* and Sequence-Analysis of the Boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, **6**, 271-282.
- Hille, B.** (1992) *Ionic channels of excitable membranes* 2nd edition edn. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- 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.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. and Katz, B.** (1949) Ionic Currents Underlying Activity in the Giant Axon of the Squid. *Archives Des Sciences Physiologiques*, **3**, 129-150.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. and Katz, B.** (1952) Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of *Loligo*. *Journal of Physiology-London*, **116**, 424-448.
- Hofte, H., Hubbard, L., Reizer, J., Ludevid, D., Herman, E.M. and Chrispeels, M.J.** (1992) Vegetative and Seed-Specific Forms of Tonoplast Intrinsic Protein in the Vacuolar Membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **99**, 561-570.
- Hoth, S., Dreyer, I., Dietrich, P., Becker, D., Muller-Rober, B. and Hedrich, R.** (1997) Molecular basis of plant-specific acid activation of K⁺ uptake channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4806-4810.
- Hoth, S., Geiger, D., Becker, D. and Hedrich, R.** (2001) The pore of plant K(+) channels is involved in voltage and pH sensing: domain-swapping between different K(+) channel alpha-subunits. *Plant Cell*, **13**, 943-952.
- Hu, C.D., Chinenov, Y. and Kerppola, T.K.** (2002) Visualization of interactions among bZip and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, **9**, 789-798.
- Huang, W. and Levitt, D.G.** (1977) Theoretical Calculation of Dielectric-Constant of a Bilayer Membrane. *Biophysical Journal*, **17**, 111-128.
- Hurst, A.C., Meckel, T., Tayefeh, S., Thiel, G. and Homann, U.** (2004) Trafficking of the plant potassium inward rectifier KAT1 in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant J*, **37**, 391-397.
- Jadot, M., Canfield, W.M., Gregory, W. and Kornfeld, S.** (1992) Characterization of the Signal for Rapid Internalization of the Bovine Mannose 6-Phosphate Insulin-Like Growth Factor-I Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 11069-11077.
- Jauh, G.Y., Fischer, A.M., Grimes, H.D., Ryan, C.A., Jr. and Rogers, J.C.** (1998) delta-Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12995-12999.
- Jiang, L. and Rogers, J.C.** (1998) Integral membrane protein sorting to vacuoles in plant cells: evidence for two pathways. *J Cell Biol*, **143**, 1183-1199.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R.** (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, **417**, 515-522.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R.** (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**, 33-41.
- Kang, D. and Kim, D.** (2006) TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*, **291**, C138-146.
- Kang, D., Mariash, E. and Kim, D.** (2004) Functional expression of TRESK-2, a new member of the tandem-pore K⁺ channel family. *J Biol Chem*, **279**, 28063-28070.
- Kappeler, F., Klopfenstein, D.R., Foguet, M., Paccaud, J.P. and Hauri, H.P.** (1997) The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII. *J Biol Chem*, **272**, 31801-31808.
- Kenrick, P. and Crane, P.R.** (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, **389**, 33-39.
- Kim, D., Fujita, A., Horio, Y. and Kurachi, Y.** (1998) Cloning and functional expression of a novel cardiac two-pore background K⁺ channel (cTBAK-1). *Circ Res*, **82**, 513-518.
- Kirsch, G.E., Pascual, J.M. and Shieh, C.C.** (1995) Functional role of a conserved aspartate in the external mouth of voltage-gated potassium channels. *Biophys J*, **68**, 1804-1813.

- Klein, T.M., Fromm, M., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M. and Sanford, J.C. (1988a) Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 4305-4309.
- Klein, T.M., Harper, E.C., Svab, Z., Sanford, J.C., Fromm, M.E. and Maliga, P. (1988b) Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8502-8505.
- Klüsener, B., Boheim, G., Liss, H., Engelberth, J. and Weiler, E.W. (1995) Gadolinium-sensitive, voltage-dependent calcium release channels in the endoplasmic reticulum of a higher plant mechanoreceptor organ. *EMBO J*, **14**, 2708-2714.
- Kuo, A., Gulbis, J.M., Antcliff, J.F., Rahman, T., Lowe, E.D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F.M., Ezaki, T. and Doyle, D.A. (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science*, **300**, 1922-1926.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, **227**, 680-&.
- Lassmann, T. and Sonnhammer, E.L. (2005) Kalign--an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. *BMC Bioinformatics*, **6**, 298.
- Lassmann, T. and Sonnhammer, E.L. (2006) Kalign, Kalignvu and Mumsa: web servers for multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res*, **34**, W596-599.
- Latz, A. (2007) Dissertation: Lokalisation, Funktion und Regulation pflanzlicher Tandem-Poren-Kaliumkanäle in *Arabidopsis thaliana*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg. <http://www.opus-bayern.de/uni-wuerzburg/volltexte/2007/2491/>
- Latz, A., Becker, D., Hekman, M., Muller, T., Beyhl, D., Marten, I., Eing, C., Fischer, A., Dunkel, M., Bertl, A., Rapp, U.R. and Hedrich, R. (2007a) TPK1, a Ca(2+)-regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore K(+) channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J*.
- Latz, A., Becker, D., Hekman, M., Muller, T., Beyhl, D., Marten, I., Eing, C., Fischer, A., Dunkel, M., Bertl, A., Rapp, U.R. and Hedrich, R. (2007b) TPK1, a Ca(2+)-regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore K(+) channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J*, **52**, 449-459.
- Latz, A., Ivashikina, N., Fischer, S., Ache, P., Sano, T., Becker, D., Deeken, R. and Hedrich, R. (2007c) In planta AKT2 subunits constitute a pH- and Ca²⁺-sensitive inward rectifying K⁺ channel. *Planta*, **225**, 1179-1191.
- Lebaudy, A., Very, A.A. and Sentenac, H. (2007) K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *Febs Letters*, **581**, 2357-2366.
- Leigh, R.A. and Jones, R.G.W. (1984) A Hypothesis Relating Critical Potassium Concentrations for Growth to the Distribution and Functions of This Ion in the Plant-Cell. *New Phytologist*, **97**, 1-13.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. and Barhanin, J. (1996a) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *Embo J*, **15**, 1004-1011.
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E. and Lazdunski, M. (1996b) Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *Embo J*, **15**, 6400-6407.
- Liman, E.R., Tytgat, J. and Hess, P. (1992) Subunit Stoichiometry of a Mammalian K⁺ Channel Determined by Construction of Multimeric Cdnas. *Neuron*, **9**, 861-871.
- 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.
- Liu, K., Fu, H., Bei, Q. and Luan, S. (2000) Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol*, **124**, 1315-1326.
- Lopatin, A.N., Makhina, E.N. and Nichols, C.G. (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, **372**, 366-369.
- Lu, Z. and MacKinnon, R. (1994) Electrostatic tuning of Mg²⁺ affinity in an inward-rectifier K⁺ channel. *Nature*, **371**, 243-246.
- Lynch, M. and Conery, J.S. (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, **290**, 1151-1155.
- Lynch, M. and Conery, J.S. (2003) The evolutionary demography of duplicate genes. *J Struct Funct Genomics*, **3**, 35-44.

8. Referenzen

- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y.F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (2001) Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science*, **291**, 316-319.
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A.J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M. and Honore, E.** (2000) TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *Embo J*, **19**, 2483-2491.
- Malkus, P., Jiang, F. and Schekman, R.** (2002) Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *J Cell Biol*, **159**, 915-921.
- Marmont, G.** (1949) Studies on the Axon Membrane. I. A New Method. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, **34**, 351-382.
- Marty-Mazars, D., Clemencet, M.C., Dozolme, P. and Marty, F.** (1995) Antibodies to the tonoplast from the storage parenchyma cells of beetroot recognize a major intrinsic protein related to TIPs. *Eur J Cell Biol*, **66**, 106-118.
- Marty, F.** (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell*, **11**, 587-600.
- Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A. and Guerinot, M.L.** (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol*, **126**, 1646-1667.
- Mason, A.B., Allen, K.E. and Slayman, C.W.** (2006) Effects of C-terminal truncations on trafficking of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem*, **281**, 23887-23898.
- Matter, K., Hunziker, W. and Mellman, I.** (1992) Basolateral Sorting of Ldl Receptor in Mdkc Cells - the Cytoplasmic Domain Contains 2 Tyrosine-Dependent Targeting Determinants. *Cell*, **71**, 741-753.
- Matter, K. and Mellman, I.** (1994) Mechanisms of Cell Polarity - Sorting and Transport in Epithelial-Cells. *Current Opinion in Cell Biology*, **6**, 545-554.
- Meinke, D. and Koornneef, M.** (1997) Community standards: A new series of guidelines for plant science - Community standards for Arabidopsis genetics. *Plant Journal*, **12**, 247-253.
- Mikosch, M., Hurst, A.C., Hertel, B. and Homann, U.** (2006) Diacidic motif is required for efficient transport of the K⁺ channel KAT1 to the plasma membrane. *Plant Physiol*, **142**, 923-930.
- Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L. and Schekman, R.** (2003) Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*, **114**, 497-509.
- Moran, N.** (2007) Osmoregulation of leaf motor cells. *Febs Letters*, **581**, 2337-2347.
- Morell, M., Espargaro, A., Aviles, F.X. and Ventura, S.** (2008) Study and selection of in vivo protein interactions by coupling bimolecular fluorescence complementation and flow cytometry. *Nat Protoc*, **3**, 22-33.
- Moshelion, M. and Moran, N.** (2000) Potassium-efflux channels in extensor and flexor cells of the motor organ of *Samanea saman* are not identical. Effects of cytosolic calcium. *Plant Physiology*, **124**, 911-919.
- Müntz, K.** (2007) Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 2391-2407.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M. and Shaw, A.S.** (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, **84**, 889-897.
- Neher, E., Sakmann, B. and Steinbach, J.H.** (1978) Extracellular Patch Clamp - Method for Resolving Currents through Individual Open Channels in Biological-Membranes. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, **375**, 219-228.
- Neuhaus, J.M. and Rogers, J.C.** (1998) Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol*, **38**, 127-144.
- Niemeyer, M.I., Gonzalez-Nilo, F.D., Zuniga, L., Gonzalez, W., Cid, L.P. and Sepulveda, F.V.** (2007) Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 666-671.
- Nilsson, T., Jackson, M. and Peterson, P.A.** (1989) Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **58**, 707-718.
- Nishimura, N. and Balch, W.E.** (1997) A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science*, **277**, 556-558.
- Nothwehr, S.F., Conibear, E. and Stevens, T.H.** (1995) Golgi and vacuolar membrane proteins reach the vacuole in vps1 mutant yeast cells via the plasma membrane. *J Cell Biol*, **129**, 35-46.

- Nothwehr, S.F., Roberts, C.J. and Stevens, T.H. (1993) Membrane protein retention in the yeast Golgi apparatus: dipeptidyl aminopeptidase A is retained by a cytoplasmic signal containing aromatic residues. *J Cell Biol*, **121**, 1197-1209.
- Nothwehr, S.F. and Stevens, T.H. (1994) Sorting of membrane proteins in the yeast secretory pathway. *J Biol Chem*, **269**, 10185-10188.
- Nufer, O., Guldbrandsen, S., Degen, M., Kappeler, F., Paccaud, J.P., Tani, K. and Hauri, H.P. (2002) Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *J Cell Sci*, **115**, 619-628.
- O'Kelly, I., Butler, M.H., Zilberberg, N. and Goldstein, S.A. (2002) Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell*, **111**, 577-588.
- Ohno, H., Aguilar, R.C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T. and Bonifacino, J.S. (1998) The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 25915-25921.
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M.C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T. and Bonifacino, J.S. (1995) Interaction of Tyrosine-Based Sorting Signals with Clathrin-Associated Proteins. *Science*, **269**, 1872-1875.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. and Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, **273**, 1392-1395.
- Oufattole, M., Park, J.H., Poxleitner, M., Jiang, L. and Rogers, J.C. (2005) Selective membrane protein internalization accompanies movement from the endoplasmic reticulum to the protein storage vacuole pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**, 3066-3080.
- Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L. and Rogers, J.C. (1996) Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell*, **85**, 563-572.
- Park, M., Kim, S.J., Vitale, A. and Hwang, I. (2004) Identification of the protein storage vacuole and protein targeting to the vacuole in leaf cells of three plant species. *Plant Physiol*, **134**, 625-639.
- Park, M.R., Leber, W. and Klee, M.R. (1981) Single Electrode Voltage Clamp by Iteration. *Journal of Neuroscience Methods*, **3**, 271-283.
- Patel, A.J., Honore, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F. and Lazdunski, M. (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *Embo J*, **17**, 4283-4290.
- Peiter, E., Maathuis, F.J., Mills, L.N., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A.M. and Sanders, D. (2005) The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature*, **434**, 404-408.
- Petrussa, E., Casolo, V., Braidot, E., Chiandussi, E., Macri, F. and Vianello, A. (2001) Cyclosporin A induces the opening of a potassium-selective channel in higher plant mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, **33**, 107-117.
- Phelps, C.B. and Gaudet, R. (2007) The role of the N terminus and transmembrane domain of TRPM8 in channel localization and tetramerization. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 36474-36480.
- Phillipson, B.A., Pimpl, P., daSilva, L.L., Crofts, A.J., Taylor, J.P., Movafeghi, A., Robinson, D.G. and Denecke, J. (2001) Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell*, **13**, 2005-2020.
- Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Cherel, I. and Sentenac, H. (2003a) Regulated expression of *Arabidopsis* Shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Molecular Biology*, **51**, 773-787.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 3215-3221.
- Pilot, G., Pratelli, R., Gaymard, F., Meyer, Y. and Sentenac, H. (2003b) Five-group distribution of the shaker-like K⁺ channel family in higher plants. *Journal of Molecular Evolution*, **56**, 418-434.
- Plant, L.D., Rajan, S. and Goldstein, S.A.N. (2005) K2P channels and their protein partners. *Current Opinion in Neurobiology*, **15**, 326-333.
- Plugge, B., Gazzarrini, S., Nelson, M., Cerana, R., Van Etten, J.L., Derst, C., DiFrancesco, D., Moroni, A. and Thiel, G. (2000) A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1. *Science*, **287**, 1641-1644.

8. Referenzen

- Pottosin, I.I., Dobrovinskaya, O.R. and Muniz, J.** (2001) Conduction of monovalent and divalent cations in the slow vacuolar channel. *Journal of Membrane Biology*, **181**, 55-65.
- Pottosin, I.I., Tikhonova, L.I., Hedrich, R. and Schonknecht, G.** (1997) Slowly activating vacuolar channels can not mediate Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *Plant Journal*, **12**, 1387-1398.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Liu, G.X., Muller, R.P., Daut, J., Karschin, A. and Derst, C.** (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel - An extracellular histidine as pH sensor. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 16650-16657.
- Ranf, S., Wunnenberg, P., Lee, J., Becker, D., Dunkel, M., Hedrich, R., Scheel, D. and Dietrich, P.** (2008) Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca(2+) signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J*, **53**, 287-299.
- Reggiani, R., Zaina, S. and Bertani, A.** (1992) Plasmalemma Atpase in Rice Coleoptiles - Stimulation by Putrescine and Polyamines. *Phytochemistry*, **31**, 417-419.
- Reifarh, F.W., Weiser, T. and Bentrup, F.W.** (1994) Voltage-Dependent and Ca²⁺-Dependent of the K⁺ Channel in the Vacuolar Membrane of *Chenopodium-Rubrum* L Suspension Cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1192**, 79-87.
- Reyes, R., Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Salinas, M., Farman, N. and Lazdunski, M.** (1998) Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem*, **273**, 30863-30869.
- Richards, F.J. and Coleman, R.G.** (1952) Occurrence of putrescine in potassium-deficient barley. *Nature*, **170**, 460.
- Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K.A., Grabov, A., Dolan, L. and Hatzopoulos, P.** (2001) TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell*, **13**, 139-151.
- Ritzenthaler, C., Nebenfuhr, A., Movafeghi, A., Stussi-Garaud, C., Behnia, L., Pimpl, P., Staehelin, L.A. and Robinson, D.G.** (2002) Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell*, **14**, 237-261.
- Rojo, E., Gillmor, C.S., Kovaleva, V., Somerville, C.R. and Raikhel, N.V.** (2001) VACUOLELESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, **1**, 303-310.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R. and Jones, J.D.** (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *Embo J*, **20**, 5556-5567.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987) The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Sanderfoot, A.A., Ahmed, S.U., Marty-Mazars, D., Rapoport, I., Kirchhausen, T., Marty, F. and Raikhel, N.V.** (1998) A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9920-9925.
- Sanderfoot, A.A. and Raikhel, N.V.** (2003) The Secretory System of *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>, 1-24.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463-5467.
- Sato, K., Sato, M. and Nakano, A.** (2003) Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol Biol Cell*, **14**, 3605-3616.
- Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T. and Uozumi, N.** (2002) Integration of Shaker-type K⁺ channel, KAT1, into the endoplasmic reticulum membrane: synergistic insertion of voltage-sensing segments, S3-S4, and independent insertion of pore-forming segments, S5-P-S6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 60-65.
- Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J., Anderson, J.A. and Gaber, R.F.** (1992) Expression of an Inward-Rectifying Potassium Channel by the *Arabidopsis* Kat1 Cdna. *Science*, **258**, 1654-1658.
- Schönknecht, G., Hedrich, R., Junge, W. and Raschke, K.** (1988) A Voltage-Dependent Chloride Channel in the Photosynthetic Membrane of a Higher-Plant. *Nature*, **336**, 589-592.
- Schönknecht, G., Spormaker, P., Steinmeyer, R., Bruggeman, 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.

- Schulte, U., Hahn, H., Konrad, M., Jeck, N., Derst, C., Wild, K., Weidemann, S., Ruppertsberg, J.P., Fakler, B. and Ludwig, J. (1999) pH gating of ROMK (K(ir)1.1) channels: Control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 15298-15303.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flugge, U.I. and Kunze, R. (2003) ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiol*, **131**, 16-26.
- Scott, D.B., Blanpied, T.A., Swanson, G.T., Zhang, C. and Ehlers, M.D. (2001) An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci*, **21**, 3063-3072.
- Sevier, C.S., Weisz, O.A., Davis, M. and Machamer, C.E. (2000) Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs. *Mol Biol Cell*, **11**, 13-22.
- Shabala, S., Cuin, T.A. and Pottosin, I. (2007) Polyamines prevent NaCl-induced K⁺ efflux from pea mesophyll by blocking non-selective cation channels. *FEBS Lett*, **581**, 1993-1999.
- Sharma, N., Crane, A., Clement, J.P.t., Gonzalez, G., Babenko, A.P., Bryan, J. and Aguilar-Bryan, L. (1999) The C terminus of SUR1 is required for trafficking of KATP channels. *J Biol Chem*, **274**, 20628-20632.
- Shen, N.V. and Pfaffinger, P.J. (1995) Molecular Recognition and Assembly Sequences Involved in the Subfamily-Specific Assembly of Voltage-Gated K⁺ Channel Subunit Proteins. *Neuron*, **14**, 625-633.
- Sheng, Z.F., Skach, W., Santarelli, V. and Deutsch, C. (1997) Evidence for interaction between transmembrane segments in assembly of Kv1.3. *Biochemistry*, **36**, 15501-15513.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*, **59**, 223-239.
- Shyu, Y.J., Suarez, C.D. and Hu, C.D. (2008) Visualization of AP-1 NF-kappaB ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 151-156.
- Sonnewald, U., Studer, D., Rochasosa, M. and Willmitzer, L. (1989) Immunocytochemical Localization of Patatin, the Major Glycoprotein in Potato (*Solanum-Tuberosum*-L) Tubers. *Planta*, **178**, 176-183.
- Sottocornola, B., Gazzarrini, S., Olivari, C., Romani, G., Valbuzzi, P., Thiel, G. and Moroni, A. (2008) 14-3-3 proteins regulate the potassium channel KAT1 by dual modes. *Plant Biology*, **10**, 231-236.
- Staswick, P.E. (1990) Novel Regulation of Vegetative Storage Protein Genes. *Plant Cell*, **2**, 1-6.
- Steidl, J.V. and Yool, A.J. (1999) Differential sensitivity of voltage-gated potassium channels Kv1.5 and Kv1.2 to acidic pH and molecular identification of pH sensor. *Molecular Pharmacology*, **55**, 812-820.
- Stryer, L. (1995) *Biochemistry* 4th edn. New York: W.H. Freeman.
- Swanson, S.J., Bethke, P.C. and Jones, R.L. (1998) Barley aleurone cells contain two types of vacuoles. Characterization Of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell*, **10**, 685-698.
- Takeuchi, M., Ueda, T., Sato, K., Abe, H., Nagata, T. and Nakano, A. (2000) A dominant negative mutant of sar1 GTPase inhibits protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in tobacco and Arabidopsis cultured cells. *Plant J*, **23**, 517-525.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Tikhonova, L.I., Pottosin, I.I., Dietz, K.J. and Schonknecht, G. (1997) Fast-activating cation channel in barley mesophyll vacuoles. Inhibition by calcium. *Plant Journal*, **11**, 1059-1070.
- Tu, L.W., Santarelli, V., Sheng, Z.F., Skach, W., Pain, D. and Deutsch, C. (1996) Voltage-gated K⁺ channels contain multiple intersubunit association sites. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 18904-18911.
- Uemura, T., Sato, M.H. and Takeyasu, K. (2005) The longin domain regulates subcellular targeting of VAMP7 in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett*, **579**, 2842-2846.

8. Referenzen

- van den Wijngaard, P.W., Bunney, T.D., Roobeek, I., Schonknecht, G. and de Boer, A.H. (2001) Slow vacuolar channels from barley mesophyll cells are regulated by 14-3-3 proteins. *FEBS Lett*, **488**, 100-104.
- Vision, T.J., Brown, D.G. and Tanksley, S.D. (2000) The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science*, **290**, 2114-2117.
- Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B. and Czempinski, K. (2006) Members of the *Arabidopsis* AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta. *Plant J*, **48**, 296-306.
- Votsmeier, C. and Gallwitz, D. (2001) An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *EMBO J*, **20**, 6742-6750.
- Walker, D.J., Leigh, R.A. and Miller, A.J. (1996) Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10510-10514.
- Wallace, I.M., O'Sullivan, O., Higgins, D.G. and Notredame, C. (2006) M-Coffee: combining multiple sequence alignment methods with T-Coffee. *Nucleic Acids Res*, **34**, 1692-1699.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. and Kudla, J. (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal*, **40**, 428-438.
- Wang, J.M., Zhang, L., Yao, Y., Viroonchatapan, N., Rothe, E. and Wang, Z.Z. (2002) A transmembrane motif governs the surface trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Neurosci*, **5**, 963-970.
- Wang, X., Matteson, J., An, Y., Moyer, B., Yoo, J.S., Bannykh, S., Wilson, I.A., Riordan, J.R. and Balch, W.E. (2004) COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J Cell Biol*, **167**, 65-74.
- Ward, J.M. and Schroeder, J.I. (1994) 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*, **6**, 669-683.
- Wehling, C., Beimgraben, C., Gelhaus, C., Friedrich, T., Saftig, P., Grotzinger, J. and Schwake, M. (2007) Self-assembly of the isolated KCNQ2 subunit interaction domain. *Febs Letters*, **581**, 1594-1598.
- Wible, B.A., Taglialatela, M., Ficker, E. and Brown, A.M. (1994) Gating of inwardly rectifying K⁺ channels localized to a single negatively charged residue. *Nature*, **371**, 246-249.
- Wiener, R., Haitin, Y., Shamgar, L., Fernandez-Alonso, M.C., Martos, A., Chomsky-Hecht, O., Rivas, G., Attali, B. and Hirsch, J.A. (2008) The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 5815-5830.
- Xicluna, J., Lacombe, B., Dreyer, I., Alcon, C., Jeanguenin, L., Sentenac, H., Thibaud, J.B. and Cherel, I. (2007) Increased functional diversity of plant K⁺ channels by preferential heteromerization of the shaker-like subunits AKT2 and KAT2. *J Biol Chem*, **282**, 486-494.
- Xu, H.X., Wu, J.P., Cui, N.R., Abdulkadir, L., Wang, R.P., Mao, J.Z., Giwa, L.R., Chanchevalap, S. and Jiang, C. (2001) Distinct histidine residues control the acid-induced activation and inhibition of the cloned K-ATP channel. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 38690-38696.
- Yang, Y.D., Elamawi, R., Bubeck, J., Pepperkok, R., Ritzenthaler, C. and Robinson, D.G. (2005) Dynamics of COPII vesicles and the Golgi apparatus in cultured *Nicotiana tabacum* BY-2 cells provides evidence for transient association of Golgi stacks with endoplasmic reticulum exit sites. *Plant Cell*, **17**, 1513-1531.
- Young, N.D. and Galston, A.W. (1984) Physiological Control of Arginine Decarboxylase Activity in K-Deficient Oat Shoots. *Plant Physiol*, **76**, 331-335.
- Yuan, H., Michelsen, K. and Schwappach, B. (2003) 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol*, **13**, 638-646.
- Yuasa, K., Toyooka, K., Fukuda, H. and Matsuoka, K. (2005) Membrane-anchored prolyl hydroxylase with an export signal from the endoplasmic reticulum. *Plant J*, **41**, 81-94.
- Yue, K.T., Lee, M., Zheng, J. and Callender, R. (1991) The determination of the pK_a of histidine residues in proteins by Raman difference spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, **1078**, 296-302.

- Zamyatnin, A.A., Solovyev, A.G., Bozhkov, P.V., Valkonen, J.P.T., Morozov, S.Y. and Savenkov, E.I.** (2006) Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. *Plant Journal*, **46**, 145-154.
- Zarei, M.M., Eghbali, M., Alioua, A., Song, M., Knaus, H.G., Stefani, E. and Toro, L.** (2004) An endoplasmic reticulum trafficking signal prevents surface expression of a voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel splice variant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10072-10077.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron*, **22**, 537-548.
- Zhou, Y. and MacKinnon, R.** (2003) The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol*, **333**, 965-975.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A. and MacKinnon, R.** (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, **414**, 43-48.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W.** (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, **136**, 2621-2632.
- Zimmermann, S. and Sentenac, H.** (1999) Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 477-482.
- Zuckerkindl, E. and Pauling, L.** (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In *Evolving genes and proteins* (Bryson, V. and Vogel, H.J. eds). New York: Academic Press, pp. 97-166.