

**Transport der Hauptosmotika an der vakuolären Membran  
von Schließzellen**

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

vorgelegt von  
Diana Krause

geboren in Schweinfurt

Nüdlingen, 2012



Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Transportprozesse an Biomembranen .....	1
1.2	Stomata.....	3
1.2.1	Stomaöffnung .....	4
1.2.2	Stomaschluss .....	6
1.3	Die pflanzliche Vakuole .....	7
1.3.1	Kaliumtransport an der vakuolären Membran .....	7
1.3.2	Calciumtransport an der vakuolären Membran .....	10
1.3.3	Anionentransport an der vakuolären Membran.....	11
1.3.4	Protonentransport an der vakuolären Membran .....	12
1.3.5	Zuckertransport an der vakuolären Membran .....	14
1.4	Zielsetzung der Arbeit .....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1	Elektrophysiologische Methoden .....	18
2.1.1	Anzucht und Kultivierung von <i>A. thaliana</i> Pflanzen .....	18
2.1.2	Isolierung von Protoplasten.....	18
2.1.2.1	Mesophyllprotoplasten .....	18
2.1.2.2	Schließzellprotoplasten .....	19
2.1.3	Freisetzung der Vakuolen aus Protoplasten .....	19
2.1.4	Patch-Clamp-Experimente .....	20
2.1.4.1	Patch-Clamp-Technik.....	20
2.1.4.2	Aufbau des Messplatzes .....	20
2.1.4.3	Messprinzip .....	21
2.1.4.4	Herstellung von Elektroden, Patch- und Perfusionspipetten.....	22
2.1.4.5	Seal- und Messkonfigurationen.....	22
2.1.4.6	Elektrische Eigenschaften der makroskopischen-Stromableitung .....	24
2.1.5	Vorzeichenkonvention .....	25
2.1.6	Bestimmung des <i>Liquid-Junction</i> -Potentials .....	25
2.1.7	Spannungspulsprotokolle .....	26
2.1.7.1	Einfachspannungspulsprotokolle .....	27
2.1.7.2	Doppelspannungspulsprotokoll .....	27
2.1.8	Datenauswertung .....	28
2.1.8.1	Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit .....	28
2.1.8.2	Bestimmung der absoluten Offenwahrscheinlichkeit .....	29
2.1.8.3	Bestimmung der relativen Offenwahrscheinlichkeit.....	30
2.1.8.4	Bestimmung des Gleichgewichtsstroms.....	31

2.1.8.5	Bestimmung des Umkehrpotentials .....	32
2.1.9	Bestimmung der relativen Permeabilitäten .....	33
2.1.10	Messlösungen .....	33
2.1.10.1	Messlösung zur SV-Kanalregulation mit 14-3-3 Proteinen .....	35
2.1.10.2	Messlösungen für Experimente an der <i>fou2</i> -Mutante .....	35
2.1.10.3	Messlösungen für SV-Kanal-Messungen an Schließzellvakuolen.....	36
2.1.10.4	Messlösungen für die Bestimmung von Pumpströmen.....	38
2.1.10.5	Messlösungen für die Charakterisierung von Zuckertransportern .....	39
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.1	Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA) .....	39
2.2.1.1	Isolierung von mRNA .....	39
2.2.1.2	Reverse Transkription .....	39
2.2.2	Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA).....	40
2.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
2.2.2.2	Gelelektrophorese von DNA.....	41
2.2.2.3	Aufreinigung von DNA.....	41
2.2.2.4	Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	42
2.2.2.5	Quantitative Echtzeit-PCR .....	43
2.3	Energiedispersive Röntgenspektroskopie .....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	V-ATPase und Pyrophosphatase .....	45
3.1.1	ATP- und Pyrophosphat-induzierte Pumpströme bei <i>A. thaliana</i> WT- Vakuolen .....	45
3.1.2	Unterschiedliche V-ATPase Pumpströme beim WT und der <i>vha-a2-vha-</i> <i>a3</i> -Mutante .....	48
3.1.3	Pyrophosphat und ATP-induzierte Pumpströme bei WT- und <i>vha-a2-vha-</i> <i>a3</i> -Vakuolen .....	50
3.1.4	Expressionsrate der V-ATPase und deren Pumpströme in Schließzellvakuolen von <i>A. thaliana</i> .....	51
3.2	Charakterisierung der AtINT1-Transporteigenschaften.....	52
3.3	Charakterisierung der AtSUC4-Transporteigenschaften .....	56
3.4	Charakterisierung des SV-Kanals in Mesophyllvakuolen .....	61
3.4.1	<i>fou2</i> -Mutante mit einer Mutation im TPC1-Gen .....	63
3.4.1.1	Aktivierung des <i>fou2</i> SV-Kanals aus Arabidopsis Mesophyllvakuolen.....	64
3.4.1.2	Semi-quantitative Bestimmung der Elemente in WT- und <i>fou2</i> -Vakuolen...	65
3.4.1.3	Einfluss von luminalem Ca <sup>2+</sup> und pH-Wert auf die SV- Einzelkanalaktivität.....	66
3.4.1.4	Einfluss des luminalen pH-Wertes auf die SV-Einzelkanalleitfähigkeit .....	69
3.4.1.5	Aktivierung des WT- und <i>fou2</i> -SV-Kanals durch cytosolisches Ca <sup>2+</sup> .....	70
3.4.1.6	Spannungsabhängige Aktivierung des WT- und <i>fou2</i> -SV-Kanals unter K <sup>+</sup> - und Ca <sup>2+</sup> -Gradienten.....	72
3.4.2	Regulation der SV-Kanäle durch 14-3-3-Proteine .....	74

---

3.5	Charakterisierung des Schließzell-SV-Kanals .....	76
3.5.1	SV-Kanalstromdichte bei Schließzellvakuolen.....	77
3.5.2	Einzelkanalleitfähigkeit und absolute Offenwahrscheinlichkeit des Schließzell-SV-Kanals .....	79
3.5.3	Expressionsniveau des SV-Kanals von Schließzellen und Mesophyllzellen .....	80
3.5.4	Aktivierungskinetik des Schließzell-SV-Kanals.....	81
3.5.5	Cytosolische Ca <sup>2+</sup> -Abhängigkeit des Schließzell- und Mesophyllzell-SV-Kanals.....	82
3.5.6	Vakuoläre Ca <sup>2+</sup> -Sensitivität der Schließzell-SV-Kanäle.....	83
3.5.7	Ionenleitfähigkeit des Schließzell-SV-Kanals .....	84
3.5.8	Zelltypspezifische SV-Kanal-Eigenschaften hervorgerufen durch unterschiedliches RNA-Splicing? .....	87
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
4.1	Protonenpumpen in Mesophyll- und Schließzellvakuolen.....	89
4.2	V-ATPase- und Pyrophosphatase-Aktivität der <i>vha-a2-vha-a3</i> -Doppelmutante .....	90
4.3	Rolle der vakuolären Protonenpumpen bei Schließzellbewegungen .....	92
4.4	Vakuoläre Zuckertransporter.....	93
4.4.1	AtINT1 – ein vakuolärer H <sup>+</sup> /myo-Inositol-Symporter.....	93
4.4.2	ATSUC4 – ein vakuolärer H <sup>+</sup> /Saccharose-Symporter .....	95
4.4.3	Rolle von Saccharose und deren Transporter bei Schließzellbewegungen....	96
4.5	Regulation und Funktion des SV-Kanals .....	97
4.5.1	Regulatorische Proteine des SV-Kanals.....	98
4.5.2	<i>fou2</i> -SV-Kanäle aktivieren bei physiologischen Membranspannungen .....	100
4.5.3	Höhere Toleranz der <i>fou2</i> -SV-Kanäle gegenüber vakuolärem Ca <sup>2+</sup> .....	101
4.6	Schließzell- und Mesophyllzell-spezifische SV-Kanal-Eigenschaften.....	103
4.6.1	Zelltyp-spezifische SV-Kanal-Eigenschaften werden nicht durch posttranskriptionale Modifikation hervorgerufen .....	103
4.6.2	Hohe SV-Kanal-Stromdichte bei Schließzellvakuolen .....	103
4.6.3	Na <sup>+</sup> -Ionenleitfähigkeit des Schließzell-SV-Kanals .....	104
4.6.4	Rolle des SV-Kanals am vakuolären Ca <sup>2+</sup> -Transport.....	106
4.7	Rolle des SV-Kanals bei der Stomabewegung.....	107
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>117</b>
9.1	Literaturverzeichnis.....	117

9.2	Publikationen.....	135
9.3	Abkürzungsverzeichnis .....	136
9.4	Lebenslauf .....	140
9.5	Danksagung .....	142
9.6	Erklärung.....	143



# 1 Einleitung

## 1.1 Transportprozesse an Biomembranen

Die pflanzliche Zelle ist in verschiedene Kompartimente unterteilt, welche von Biomembranen umschlossen werden. Diese semipermeablen Membranen sind aus einer Lipid-Doppelschicht, Proteinen und Kohlenhydraten aufgebaut und weisen eine Stärke von 4-10 nm auf. Die Lipide sind polar angeordnet, wobei die hydrophoben Acylketten zueinander und die hydrophilen Phosphoglycerolreste zur wässrigen Seite hin orientiert vorliegen (Abbildung 1). Schon 1972 erkannten Singer und Nicolson, dass Biomembranen keine starren Gebilde darstellen und entwickelten das Flüssig-Mosaik-Modell, mit dem die laterale Bewegungsfreiheit der Membranbestandteile beschrieben wurde. Eine Biomembran ist undurchlässig für die meisten Moleküle mit Ausnahme von Wasser und niedermolekularen ungeladenen Stoffen und wirkt daher als Diffusionsbarriere zwischen den verschiedenen Kompartimenten. In die Doppellipidschicht sind Proteine eingebettet, welche die Funktion von Transportproteinen, Rezeptoren, Enzymen oder Strukturkomponenten wahrnehmen und periphere, verankerte oder integrierte Membranproteine darstellen (Abbildung 1).

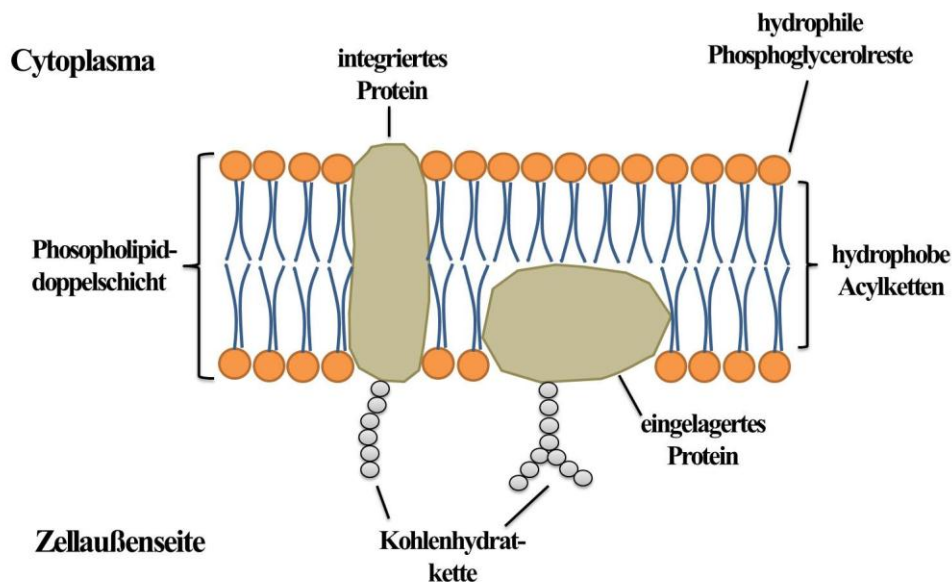


Abbildung 1: Aufbau einer Biomembran. Die Plasmamembran und andere Endomembrane der pflanzlichen Zelle bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht, in die Proteine integriert und eingelagert sind.

Die Transportproteine können aufgrund ihres Transportmechanismus in Kanäle, Pumpen und Carrier unterteilt werden, wobei man weiter zwischen aktiven, sekundär aktiven und passiven Transportprozessen unterscheidet.

Pumpen bezeichnet man als **primär aktive** Membranproteine. Sie transportieren Ionen aktiv unter Energieverbrauch entgegen dem Konzentrationsgradienten. Ihr Transportmechanismus wird als primär aktiv bezeichnet, da er direkt an eine Energiequelle gekoppelt ist. Pumpen können aber auch als elektrogen oder elektroneutral klassifiziert werden. Beim elektrogenen Transport, findet eine Nettoladungsverlagerung über die Membran statt, während beim elektroneutralen Transport keine netto Ladungsverlagerung erfolgt ( $H^+/K^+$ -ATPase, Sachs und Shin, 1995). Die vakuoläre V-ATPase und  $H^+$ -PPase (Pyrophosphatase) arbeiten elektrogen und transportieren unter ATP- bzw.  $PP_i$ -Verbrauch  $H^+$  über die vakuoläre Membran (Hedrich et al., 1989). Dadurch wird neben einem  $H^+$ -Gradienten ein elektrisches Potential generiert, was als treibende Kraft (engl.: *proton motive force*) für sekundär aktive Transporter dient oder den Zustand von spannungsabhängigen Kanälen reguliert.

Beim Carrier-vermittelten **sekundär aktiven** Transport wird ein Substrat entlang dem Konzentrationsgradienten transportiert, wodurch Energie für einen zweiten Transportvorgang entgegen dem Konzentrationsgradienten frei wird. Die Transportrate eines Carrierproteins ist mit  $10^2$  bis  $10^4$  Teilchen pro Sekunde (vgl. Hille, 1984) wesentlich geringer als die eines Kanalproteins. An der vakuolären oder cytoplasmatischen Membran kann der sekundär aktive Transportprozess z. B. durch einen  $H^+$ -Gradienten energetisiert werden. Dabei transportieren Symporter ihr Substrat entlang und Antiporter entgegen dem  $H^+$ -Gradienten. Caspari et al. beschrieb 1994 einen Hexose/ $H^+$ -Symporter der Alge *Chlorella kessleri*, welcher Zucker und Protonen im Verhältnis von 1:1 transportiert. Der vakuoläre CLCa-Antiporter von *A. thaliana* hingegen verlagert Nitrat im Austausch mit  $H^+$  über den Tonoplast und bewirkt damit eine Akkumulation von Nitrat in der Vakuole (De Angeli et al., 2006).

Beim **passiven Transport** dagegen werden Moleküle entlang eines elektro-chemischen Gradienten ohne Aufwendung von zusätzlicher Energie verlagert. Dies wird über spezielle Transportproteine, die Ionenkanäle, vermittelt, welche im offenen oder geschlossenen Zustand vorliegen können. Die Selektivität von Ionenkanälen hängt von der Porengröße, der Oberflächenladung und der inneren Auskleidung des Kanalproteins ab. Befindet sich ein Kanalprotein im offenen Zustand, sind Transportraten von mehr als  $10^6$  Ionen pro Sekunde möglich (Hille, 1984). Durch diesen schnellen Ionen transport kann die Membranspannung verändert werden, was wiederum zum Öffnen oder Schließen von spannungsabhängigen Kanälen führen kann.

Im Gegensatz zu den Kanalproteinen binden die sogenannten Carrier ihr(e) Substrat(e) an eine spezifische Seite des Carrierproteins, was zu einer Konformationsänderung des

Transportproteins führt. Infolgedessen wird das Substrat über die Membran verlagert und auf der anderen Seite entlassen. Die Ablösung des Substrats bewirkt eine erneute Konformationsänderung, so dass sich das Carrierprotein im Ausgangszustand wiederfindet. Transportieren Carrier ihr Substrat im Uniport passiv entlang eines Konzentrationsgradienten, wird dies auch als erleichterte Diffusion bezeichnet.

## 1.2 Stomata

Pflanzen sind photoautotrophe Organismen. Während der Photosynthese wird die Energie des Sonnenlichts in ATP und Reduktionsäquivalente umgewandelt, deren Energie für die Fixierung und Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu Kohlenstoffverbindungen wie Zucker genutzt wird.  $\text{CO}_2$  gelangt über regelbare Öffnungen (Stomata) in der Blattepidermis aus der Atmosphäre ins Blattinnere und ist häufig der limitierende Faktor der Photosynthese. Für die Reduktion des  $\text{CO}_2$  zu Zucker wird Wasser als Elektronendonator genutzt. Dieses wird über die Wurzel aufgenommen, mit Hilfe des Transpirationssogs in die Blätter transportiert und zum Teil über die Blattoberfläche verdunstet. Um den Wasserverlust durch Verdunstung möglichst gering zu halten, sind die Blätter mit einer Schutzschicht aus Wachs, der so genannten Kutikula, überzogen. Die Aufnahme von  $\text{CO}_2$  und Abgabe von Wasser über die Stomata kann über deren Öffnungsweite in Abhängigkeit von den jeweiligen Wasser- und  $\text{CO}_2$ -Bedürfnissen der Pflanze reguliert werden. Stomata haben somit einen großen Einfluss auf die Photosyntheserate und den Wasserstatus der Pflanze.

Die ersten Stomata tauchten vor etwa 400 Millionen Jahren bei terrestrischen Pflanzen auf und variierten seitdem stark in ihrer Größe und der Dichte auf der Blattoberfläche (Hetherington und Woodward, 2003). Die Fähigkeit der Pflanzen sich an wechselnde klimatische Bedingungen anzupassen, verschaffte Ihnen einen evolutionären Vorteil. Die Stomata können unterschiedlich auf der Blattoberfläche verteilt sein. Hypostomatische Blätter haben Spaltöffnungen nur auf der Blattunterseite. Bei amphistomatischen Blättern verteilen sie sich sowohl auf der Blattunter- als auch auf der Blattoberseite. Dieser Typ kommt bei einigen krautigen Pflanzen vor. Hingegen befinden sich bei epistomatischen Blättern die Spaltöffnungen nur auf der Blattoberseite, z. B. bei Schwimmblättern von Wasserpflanzen. Am häufigsten sind jedoch Spaltöffnungen in der unteren Epidermis von Pflanzenblättern zu finden (hypostomatischer Typ). Die Spaltöffnung, auch Pore oder Stoma genannt, kann aus zwei Schließzellen bestehen, oder mit den angrenzenden Nebenzellen einen Stomakomplex oder Spaltöffnungsapparat bilden. Der Porus stellt die Verbindung der Atemhöhle zur Atmosphäre dar. Die Zellwände der Schließzellen sind mit radial verlaufenden Zellulosefibrillen durchsetzt, wodurch beim Anschwellen der Schließzellen nur eine longitudinale Ausdehnung mög-

lich ist (Shope et al., 2003). Die hantelförmigen Schließzellen von Gräsern (Gramineentyp) und die bohnenförmigen Schließzellen von ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen (Helleborustyp) sind die beiden am weitesten verbreiteten Stomatypen (Abbildung 2; Hetherington und Woodward, 2003).

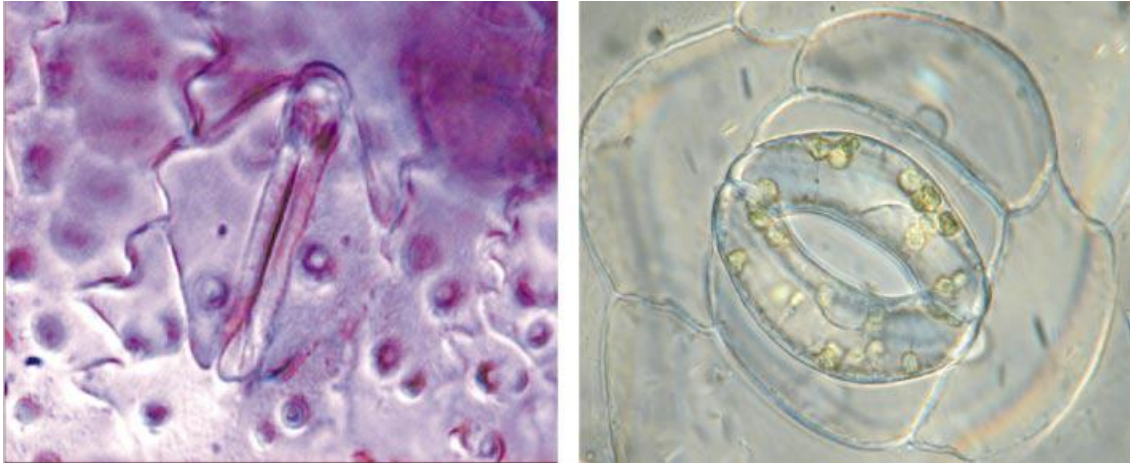


Abbildung 2: Stomatypen. Die hantelförmigen Schließzellen von Reis sind typisch für alle Gräserarten (links), während die Schließzellen von Arabidopsis und Comelina (rechts) nierenförmig sind (Hetherington und Woodward, 2003).

Die Öffnung der Pore hängt von inneren und äußeren Faktoren ab, wie der Wasserversorgung der Pflanze, der  $\text{CO}_2$ -Konzentration sowie der Lichtqualität und Lichtstärke, wird aber auch über die Phytohormone Auxin und Abscisinsäure (ABA) in ihrer Weite reguliert (Roelfsema und Hedrich, 2005). Osmotisch aktive Substanzen werden in die Schließzelle transportiert oder ausgeschleust, wodurch sich der Turgordruck und infolgedessen die Öffnungsweite der Stomata ändert. Als Hauptosmotika spielen neben  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen auch Malat und - abhängig von der Pflanzenart - verschiedene Zucker eine wichtige Rolle. Da Schließzellen keine Plasmodesmen aufweisen (Wille und Lucas, 1984), kann der Ionengehalt in den Schließzellen entweder über Ionenabgabe an den Apoplast oder über Ionenaufnahme aus dem Apoplast in die Schließzellen variiert werden.

### 1.2.1 Stomaöffnung

Sind Pflanzen ausreichend mit Wasser versorgt, ist Licht das dominierende Umweltsignal, welches die Stomaöffnungsweite reguliert. Eine Öffnung der Stomata kann durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen induziert werden. Die Perzeption von Rotlicht wird über das Chlorophyll vermittelt, während blaues Licht über Phototropine wahrgenommen wird (Fan et al., 2004). Rotes Licht fördert im Mesophyllgewebe die Photosynthese und lässt dadurch den  $\text{CO}_2$ -Gehalt absinken. Dies wirkt sich wiederum auf die Schließzellen aus und führt zu einer Stomaöffnung. Blaues Licht wird direkt von den Schließzellen über den Photorezeptor Phototropin registriert, welcher die P-Typ  $\text{H}^+$ -

ATPasen in der Plasmamembran von Schließzellen über eine Signalkaskade aktiviert. Dies bewirkt ein starkes Ansäuern des Apoplasten und eine Hyperpolarisation der Plasmamembran von -100 mV auf -150 bis -210 mV (Thiel et al., 1992; Roelfsema et al. 2001). Die Reaktion steht offenbar mit der Beobachtung von Lohse und Hedrich (1992) in direktem Zusammenhang, da *Vicia faba* Schließzellen eine doppelt so hohe  $H^+$ -ATPase-Aktivität als Mesophyllzellen aufweisen. Infolge der  $H^+$ -ATPase-induzierten Hyperpolarisation werden spannungsabhängige einwärtsgerichtete  $K^+$ -Kanalproteine aktiviert, die aufgrund des vorherrschenden elektrochemischen  $K^+$ -Gradienten einen Einstrom von  $K^+$ -Ionen aus dem Apoplast in die Schließzelle vermitteln (Schroeder et al., 1987; Schroeder und Fang, 1991). Die  $K^+$ -Konzentration in der Schließzelle steigt dabei abhängig von der Pflanzenart von 100 mM auf 400-800 mM an (Niklas und Spatz, 2012). Als  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter wurde der plasmamembranständige KAT1-Kanal (Schachtman et al., 1992) identifiziert, der auch in Schließzellen exprimiert wird. KAT1-Mutanten waren jedoch weiterhin zur Stomaöffnung in der Lage (Szyroki et al., 2001). Offenbar kann die  $K^+$ -Aufnahme durch weitere  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter in der Schließzell-Plasmamembran von *A. thaliana* - wie KAT2 und AKT1 – vermittelt werden. Diese wiesen jedoch im Vergleich zu KAT1 eine schwächere Genexpression in den Schließzellen auf (Szyroki et al., 2001).

Um  $K^+$  in Schließzellen akkumulieren zu können, wird ein Gegenion zur Erhaltung des negativen Membranpotentials benötigt. So berechneten Humble und Raschke (1971) ein theoretisches Membranpotential von  $10^4$  V, wenn keine Ladungskompensation der Kaliumionen durch entsprechende Anionen erfolgt. Daher wird von den Zellen in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen (Talbot und Zeiger, 1996)  $Cl^-$  aufgenommen (Penny et al., 1976; Van Kirk und Raschke, 1978; MacRobbie, 1980) oder aber Malat synthetisiert (Allaway, 1973; Raschke et al., 1988). Roelfsema und Hedrich (2005) zeigten anhand von Berechnungen, dass entweder die notwendige  $K^+$ -Konzentration für das Öffnen der Stomata in früheren Berichten zu gering abgeschätzt wurde oder andere organische Stoffe zusätzlich zu Ionen in den Schließzellen akkumuliert werden. So demonstrierten Aufnahmestudien an *Pisum sativum*, dass signifikante Mengen von Glukose, Fruktose und Saccharose in den Schließzellprotoplast transportiert werden (Ritte et al., 1999).

Schließzellen von *Vicia faba* durchlaufen während des Tages zwei definierte osmoregulatorische Phasen (Talbot und Zeiger, 1996). Während der ersten Phase (morgens) korrelierte das Öffnen der Stomata mit der Aufnahme von  $K^+$ -Ionen, während Saccharose eine eher untergeordnete Rolle spielte. In der zweiten Phase (nachmittags), in der die Stomata eine maximale Öffnung erreichten, nahm die  $K^+$ -Konzentration in den Schließzellen ab und Saccharose wurde zum dominierenden Osmotikum (Talbot und Zeiger, 1996). Saccharose kann über eine erhöhte Photosyntheserate generiert oder über den Abbau von Stärke gewonnen werden (Talbot und Zeiger 1993). Dies ist jedoch nicht

bei allen Pflanzenarten der Fall. In Schließzellen von *A. thaliana* wird Stärke während des Tages synthetisiert und während der Nacht abgebaut (Stadler et al., 2003). Demzufolge können Zucker nur über Hexosetransporter wie STP1 (Stadler et al., 2003) oder Saccharosetransporter wie SUC1 (Carpaneto et al., 2005) im Symport mit  $H^+$  in die Schließzelle aufgenommen werden.

Die osmotisch aktiven Stoffe verbleiben nur teilweise im Cytoplasma der Schließzelle. Der größte Anteil wird weiter in die Vakuole transportiert. Die Zunahme der Osmotika in den Schließzellen bewirkt eine Erniedrigung des Wasserpotentials. Infolgedessen strömt Wasser in das Cytoplasma und das vakuoläre Lumen ein, wodurch sich der Turgordruck der Schließzelle erhöht. Die Schließzellen, die den stomatären Spalt umschließen, schwellen an und biegen sich dabei auseinander, was zu einer Vergrößerung des stomatären Spaltes bzw. zum Öffnen der Stomata führt.

### 1.2.2 Stomaschluss

Das Schließen der Stomata wird durch Wasserstress oder einen hohen  $CO_2$ -Partialdruck induziert. Dabei werden osmotisch aktiven Stoffe vorwiegend durch passive Ionenkanäle aus der Zelle transportiert, wodurch der Stomaschluss schneller generiert werden kann als die Stomaöffnung (Roelfsema und Hedrich, 2005). Dem Stomaschluss geht häufig eine Erhöhung der cytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration in den Schließzellen voraus (Felle 1988; Irving et al., 1992). Dieser wird beispielsweise über das Stresshormon Abscisinsäure (ABA) induziert, welches in der Wurzel und zu einem geringeren Teil in Blättern synthetisiert wird. Das  $Ca^{2+}$ -Signal bewirkt eine Inaktivierung der einwärts-gleichrichtenden  $K^+$ -Kanäle (Schroeder und Hagiwara, 1989). Durch ABA und der erhöhten  $Ca^{2+}$ -Konzentration werden plasmamembrangebundene  $H^+$ -ATPasen gehemmt und auswärtsgerichtete R- und S-Typ-Anionenkanäle aktiviert (Roelfsema et al., 2004; Roelfsema et al., 2012). Der Anionenausstrom aus dem Cytosol in den Apoplasten führt zur Depolarisierung der Plasmamembran und infolge dessen zu einer spannungsabhängigen Aktivierung des  $K^+$ -Kanals GORK. GORK (engl.: *gated outwardly-rectifying  $K^+$* ) kodiert für auswärtsgerichtete  $K^+$ -Kanäle in Schließzellen (Ache et al., 2000). Ein Funktionsverlust von GORK führt zur vollständigen Abwesenheit von auswärtsgerichteten  $K^+$ -Strömen in der Plasmamembran von Schließzellen (Hosy et al., 2003). Aufgrund des veränderten osmotischen Potentials fließt Wasser aus der Zelle. Der Turgordruck der Schließzellen wird geringer und der stomatäre Spalt wird geschlossen.

Vermutlich ändert sich beim Stomaschluss die Membranspannung an der vakuolären Membran, so dass auch darüber spannungsabhängige Kanäle reguliert werden könnten. Jedoch war eine Messung der Vorgänge an der vakuolären Membran von intakten Schließzellen bisher nicht möglich.

## 1.3 Die pflanzliche Vakuole

In pflanzlichen Zellen nimmt die Vakuole bis zu 70-80% des Zellvolumens ein (Martinoia et al., 2007). Sie wird von einer Membran, dem Tonoplasten umschlossen, welche Teil des Endomembransystems ist (Becker, 2007; Surpin und Raikhel, 2004). In Zusammenarbeit mit der Zellwand generiert die pflanzliche Vakuole den Turgordruck, welcher essentiell für die hydraulische Festigkeit der Zelle und das Wachstum der Pflanze ist (Marty, 1999). Neben der Kompartimentierung von Xenobiotika sowie zelltoxischen freien Schwermetallen (Zink, Eisen) erfüllen Vakuolen eine wichtige Funktion in der Speicherung von Zuckern, Peptiden, anderen organischen Verbindungen und anorganische Ionen. Zu den wichtigsten Ionen gehören  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$  und organische Säuren wie z. B. Malat. Die pflanzliche Vakuole ist an der Aufrechterhaltung des zellulären pH-Werts beteiligt (Martinoia et al., 2007). Typischerweise liegt der physiologische pH-Wert des vakuolären Lumens bei Pflanzen im Bereich von pH 5,0 und damit um etwa zwei pH-Wert-Einheiten saurer im Vergleich zum Cytosol. In Vakuolen von Zitrusfrüchten kann der pH-Wert bis auf 2,5 absinken (Taiz, 1992). Der niedrigste pH-Wert (pH 0,8) wurde bei der Braunalge *Desmarestia* gemessen (McClintock et al., 1982).

Vakuolen sind in den hochspezialisierten Schließzellen an der Regulation der osmotischen Wasseraufnahme und der Ausbildung des Turgordrucks maßgeblich beteiligt (vgl. Kap. 1.2.1). In der Funktion als intrazellulärer  $Ca^{2+}$ - und  $H^+$ -Speicher sind sie außerdem an der Ausbildung von Signalkaskaden während der Stomabewegungen involviert (Schroeder et al., 2001). In Abhängigkeit der Stomaöffnung liegen Vakuolen in unterschiedlicher Anzahl und Größe in Schließzellen vor. Während geöffneter Stomata weisen Schließzellen wenige große Vakuolen auf, die sich beim Stomaschluss in viele kleine Vakuolen teilen (Diekmann et al., 1993; Roelfsema und Hedrich, 2005; Gao et al., 2009). Obwohl bis dato in der vakuolären Membran eine Vielzahl von Carriern, Pumpen und Kanälen beschrieben wurden, ist über die Funktion und Regulation der Transportsysteme bei Schließzellbewegungen verhältnismäßig wenig bekannt.

### 1.3.1 Kaliumtransport an der vakuolären Membran

In Schließzellvakuolen können große Mengen an Kaliumionen (bis zu 500 mM) akkumuliert werden (Taiz, 1992). Bislang wurden an der vakuolären Membran drei Kanäle und ein Antiporter identifiziert, welche eine wichtige Rolle im  $K^+$ -Transport übernehmen könnten. Gaxiola et al. (1999) beschrieben den NHX-Transporter, welcher  $Na^+$ -Ionen im Antiport mit  $H^+$  transportiert. Dieser wird über die vakuoläre V-ATPase und  $H^+$ -Pyrophosphatase energetisiert. Der NHX-Transporter ist jedoch auch in der Lage, einen  $H^+$ -gekoppelten  $K^+$ -Transport zu vermitteln (Venema et al., 2003; Cellier et al., 2004). Neben diesem Carrier wurden drei unterschiedliche Typen von  $K^+$ -permeablen

Kanälen in Schließzellvakuolen beschrieben (Allen et al., 1998; Allen und Sanders, 1996; Schulz-Lessdorf et al., 1994; Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995), welche sich in ihrer Spannungsabhängigkeit, Aktivierungskinetik,  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit und Ionenpermeabilität unterscheiden.

Der **FV-Kanal** (engl.: *fast vacuolar channels*) wurde als erstes von Hedrich und Neher (1987) in Zuckerrüben beschrieben. Dieser Kanal zeigt eine instantane Aktivierungskinetik bei cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $<10 \mu\text{M}$  (Hedrich und Neher, 1987) bzw.  $<200 \text{ nM}$  in *Vicia faba* (Allen und Sanders 1996) auf. In Gegenwart höherer cytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen konnte keine FV-Kanalaktivität mehr nachgewiesen werden (Hedrich und Neher, 1987). Hedrich und Neher (1987) beschrieben den FV-Kanal als schwach spannungsabhängigen Kanal mit einer geringen Selektivität von Kationen über Anionen im Verhältnis von 6:1. Unter symmetrischen  $\text{K}^+$ -Bedingungen (200 mM) wurde beim FV-Kanal von *Beta vulgaris* eine Einzelkanalleitfähigkeit von 30-40 pS festgestellt. Die Permeabilität und Leitfähigkeit des FV Kanals für einwertige Kationen nimmt von  $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ = \text{Rb}^+ = \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ \leq \text{Li}^+$  ab, wobei für zweiwertige Ionen wie  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  keine Leitfähigkeit nachgewiesen werden konnte (Tikhonova, 1998).

Der **VK-Kanal** (engl.: *vacuolar potassium channel*) wurde als erstes in Schließzellvakuolen von *Vicia faba* beschrieben (Ward und Schroeder, 1994). Der spannungsunabhängige Kanal zeigt eine hohe Selektivität von  $\text{K}^+$  über  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Rb}^+$  (Gobert et al., 2007). Die Leitfähigkeit des VK-Kanals mit 100 mM  $\text{K}^+$  auf beiden Seiten der vakuolären Membran beträgt 70 pS (Ward und Schroeder, 1994). Gobert et al. (2007) zeigten, dass das TPK1-Gen (*two-pore K 1*) für den VK-Kanal kodiert. TPK1 weist wie auch alle anderen vier Mitglieder der TPK-Familie vier Transmembrandomänen mit zwei Porenregionen auf (Becker et al., 2004). Darüber hinaus besitzen alle TPK-Proteinsequenzen neben einem  $\text{K}^+$ -selektiven Strukturmotiv (GYGD) ein bzw. zwei C-terminale EF-Hände (Gobert et al., 2007). Während TPK1, TPK2, TPK3 und TPK5 in der vakuolären Membran vorliegen, wurde TPK4 in der Cytoplasmamembran von Pollenschläuchen lokalisiert (Becker et al., 2004; Dunkel et al., 2008). Nach heterologer Expression von TPK1 in Hefevakuolen wurde der Kanal als spannungsunabhängiger, instantan aktivierender und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Kanal, mit einer hohen Selektivität für  $\text{K}^+$  über  $\text{Na}^+$  charakterisiert (Latz et al., 2007). Der TPK1-Kanal zeigt eine starke Abhängigkeit bezüglich der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und des cytoplasmatischen pH-Werts, wobei der VK-Kanal ab einer cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $>5 \mu\text{M}$  aktiviert und eine maximale Offenwahrscheinlichkeit bei pH 6,7 zeigt (Gobert et al., 2007). Eine Bindung von 14-3-3-Proteinen an den N-Terminus des TPK1-Proteins führt zu einer starken Zunahme der Kanalaktivität (Latz et al., 2007). Dagegen konnte der TPK1-vermittelte  $\text{K}^+$ -Strom durch  $\text{Ba}^{2+}$ , Tetraethylammonium und Chinin effektiv geblockt werden (Gobert et al., 2007). TPK1 scheint zum einen eine wichtige Rolle in der



zweiten Phase der Samenkeimung im Zusammenhang mit der Zellexpansion zu übernehmen (Gobert et al., 2007). Zum anderen wird vermutet, dass TPK1-Kanäle am vakuolärem  $K^+$ -Ausstrom während des Stomaschlusses beteiligt sind, welche direkt oder indirekt über ABA aktiviert werden (Gobert et al., 2007).

Der **SV-Kanal** ist der am besten charakterisierte Kationenkanal im Tonoplasten. Das TPC1-Gen (*two-pore channel 1*) kodiert für den SV-Kanal. Dies konnte Peiter et al. (2005) durch vergleichende *Patch-Clamp*-Messungen an *A. thaliana* Mesophyllvakuolen des Wildtyps, der TPC1-Verlustmutante *tpc1-2*, und einer TPC1-überexprimierenden Mutante (*35S::TPC1*-Überexprimierer) nachweisen. Während bei der *tpc1-2*-Mutante keine SV-Kanal-Ströme beobachtet wurden, zeigte die überexprimierende Mutante eine hohe SV-Kanalaktivität auf. TPC1 wird der Zweikanal-Poren (TPC)-Familie (*two-pore channel family*) zugeordnet. Ishibashi et al. (2000) beschrieb erstmalig ein Protein aus dem tierischen System, der Rattenniere, welches zwei Domänen mit jeweils sechs Segmenten ausbildete. Ein Jahr später gelang es der Arbeitsgruppe um Takuya Furuchi, das erste pflanzliche TPC1-Gen aus *A. thaliana* (*AtTPC1*) zu klonieren (Furuchi et al., 2001). Die TPC-Kanäle werden als evolutionäres Bindeglied der  $K^+$ -Shaker-Kanäle, mit einer Domäne, und den aus vier Domänen bestehenden spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ - und  $Na^+$ -Kanälen, gesehen (Ishibashi et al., 2000).

Das TPC1-Kanalprotein von *A. thaliana* wird aus 12 putativen Transmembrandomänen (1-12) aufgebaut, welche zwei homologe Domänen (1-6 und 7-12) ausbilden (Abbildung 3). Sowohl der N-, als auch der C-Terminus des Proteins befinden sich auf der cytosolischen Seite. Die cytoplasmatische Schleife, die sich zwischen der 6. und 7. transmembranen Domäne befindet, weist zwei  $Ca^{2+}$ -bindende EF-Hand-Motive auf. Die Transmembrandomänen 4 und 10 beinhalten mehrere geladene Aminosäuren, welche vermutlich den Spannungssensor des Kanalproteins ausbilden. Die beiden Porenregionen P1 und P2 des Kanals befinden sich zwischen der Transmembrandomäne 5 und 6, sowie 11 und 12.

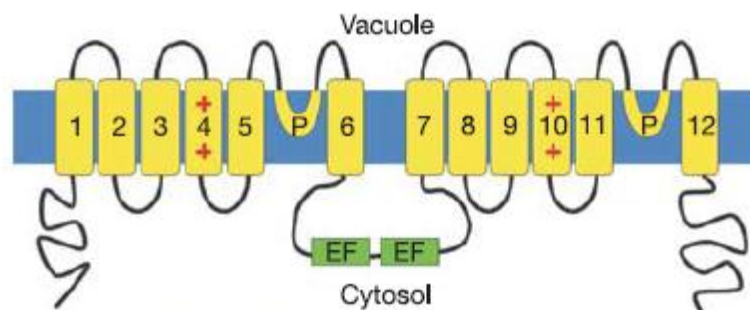


Abbildung 3: Topologiemodell des *Arabidopsis* TPC1-Proteins (Peiter et al., 2005). Die 12 putativen Transmembrandomänen sind mit den Zahlen 1-12, die beiden Porenregionen mit P gekennzeichnet. Die beiden  $Ca^{2+}$ -bindenden EF-Hände sind in der cytosolischen Schleife lokalisiert (grün).

Im tierischen und pflanzlichen System sind die TPC-Kanäle besonders im Bereich der Porenregionen hoch konserviert (White et al., 2002). Das Genom von *A. thaliana* und *Oryza sativa* enthält jeweils nur eine Kopie des *TPC1*-Gens (Peiter et al., 2005; Kurusu et al., 2004). In BY-2 Zellkulturzellen von *Nicotiana tabacum* hingegen wurden von Kadota et al. (2004) zwei stark homologe Gene der TPC-Familie mit 97,1% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz entdeckt.

Der SV-Kanal ist in der vakuolären Membran der Kationenkanal mit der höchsten Kanalleitfähigkeit. Er wird durch cytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  und depolarisierende Membranspannungen aktiviert und zeigt eine langsame, zeitabhängige Aktivierungskinetik auf. In *Vicia faba* Schließzellvakuolen war eine cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $10^{-4}$  M nötig, um SV-Kanäle zu aktivieren (Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995). In den meisten Publikationen zum SV-Kanal wurde jedoch mit weit höheren cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen gearbeitet. Ein Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ - als auch  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration verschiebt die Spannungsabhängigkeit des SV-Kanals zu negativeren Membranpotentialen (Hedrich und Neher 1987; Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995; Pottosin et al., 1997; Pei et al., 1999; Carpaneto et al., 2001), was sich positiv auf die Kanalaktivität auswirkt. Pei et al. (1999) postulierte zwei hoch affine, der cytosolischen Seite zugewandte Bindestellen des SV-Kanalproteins. Während die erste Bindestelle selektiv  $\text{Ca}^{2+}$ -, die zweite  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen bindet, wird der SV-Kanal stabilisiert und im offenen Zustand gehalten. Neben cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  wurden reduzierende Verbindungen wie Glutathion oder Dithiothreitol als weitere regulatorische Faktoren des SV-Kanals beschrieben, welche stimulierend auf die Offenwahrscheinlichkeit des SV-Kanals wirken (Carpaneto et al., 1999; Scholz-Starke et al., 2004).

Der SV-Kanal weist gegenüber den physiologisch relevanten Kationen wie  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , sowie auch gegenüber  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^+$  und  $\text{Cs}^+$  nur eine schwache Selektivität auf (Amodeo et al., 1994; Pottosin et al., 2001; Pottosin und Schönknecht, 2007). Die Anionenpermeabilität des SV-Kanals ist hingegen zu vernachlässigen (Pottosin et al., 2001).

### 1.3.2 Calciumtransport an der vakuolären Membran

In der pflanzlichen Zelle stellt die Vakuole den größten intrazellulären Calciumspeicher dar. Calcium ist ein wichtiges Signalmolekül in der Zelle. Bereits sehr geringe Änderungen in der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration können sich stark auf die Funktion und Aktivität von Enzymen, regulatorischen Proteinen oder Transportproteinen auswirken. Aufgrund dessen wird die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol genauestens reguliert und auf einem niedrigem Niveau im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-9}$  M gehalten (Pottosin und Schönknecht, 2007), während die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Apoplasten, sowie in

intrazellulären Speicherorganellen mit  $10^{-3}$  M weitaus höher ist. In der Vergangenheit wurden zwei unterschiedliche Transportsysteme identifiziert, welche  $\text{Ca}^{2+}$  aktiv aus dem Cytoplasma in die Vakuole transportieren. ACA-Pumpen werden direkt über ATP energetisiert (Sze et al., 2000), während die CAX-Antiporter (Hirschi et al., 1996; Shigaki und Hirschi, 2006)  $\text{Ca}^{2+}$  im Austausch gegen  $\text{H}^+$  in das vakuoläre Lumen transportieren. Dabei vermitteln  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen der ACA-Genfamilie in Arabidopsis eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme mit hohen Affinität ( $K_m = 0,2 - 1,0 \mu\text{M}$ ) und kleiner Transportkapazität. Dagegen weisen  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter der CAX-Genfamilie in Arabidopsispflanzen eine geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität ( $K_m = \sim 10-15 \mu\text{M}$ ) mit einer hohen Transportkapazität auf. Pittman und Hirschi (2003) postulierten aufgrund der unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase für die Feinabstimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration rund um die Vakuole verantwortlich ist, während CAX-Transporter dagegen bei hohen cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, wie z. B. bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen, einspringen. Der  $\text{Ca}^{2+}$  Eintritt aus der Vakuole in das Cytosol kann dagegen passiv über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erfolgen. Aufgrund des elektrochemischen Gradienten ist nach dem Öffnen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine rasche Erhöhung der cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration möglich, was auch als  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal bezeichnet wird. In der Literatur wurden zwei ligandengesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in Schließzellvakuolen beschrieben. Diese zeigten sich sensitiv für zyklische-ADP-Ribose (Leckie et al., 1998) sowie für  $\text{IP}_6$  (Inositol Hexaphosphat; Lemtiri-Chlieh et al., 2003). Ward und Schroeder stellten 1994 den SV-Kanal als *Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release channel (CICR channel)* vor. Dem wurde jedoch in darauffolgenden Arbeiten heftig widersprochen (Pottosin et al., 1997; Ivashikina und Hedrich, 2005; Ranf et al., 2008). Der VVCA-Kanal (engl.: *voltage-gated Ca<sup>2+</sup>-channel*) wurde von Allen und Sanders (1994) als weiterer spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in der Membran von Schließzellvakuolen genannt, welcher jedoch von Pottosin und Schönknecht (2007) als SV-Kanal identifiziert wurde.

### 1.3.3 Anionentransport an der vakuolären Membran

Während der Stomaöffnung werden große Mengen von Chlorid- und Malationen in die Schließzellvakuole aufgenommen (Raschke, 1979; MacRobbie 1990), welche als Gegenionen für die kompartimentierten  $\text{K}^+$ -Ionen fungieren. Die Wahl des Gegenions (Malat oder  $\text{Cl}^-$ ) scheint abhängig von den Umweltbedingungen zu sein (Talbot und Zeiger, 1996). Dabei können in der pflanzlichen Vakuole sehr hohe Malatkonzentrationen ( $>300 \text{ mM}$ ) erreicht werden (Winter et al., 1994). Die Malatkonzentration im Cytoplasma dagegen muss gering gehalten werden, da die PEP-Carboxylase durch Malat inhibiert wird (Schnabl und Kottmeier, 1984b). Beim Stomaschluss können die Anionen die Vakuole über Anionenkanäle verlassen. Dies setzt allerdings eine Depolarisierung der vakuolären Membran voraus (Roelfsema und Hedrich, 2005). 1996 wurde von Pei et al. der erste Anionenkanal in Schließzellvakuolen beschrieben. Der VCL-Kanal

(engl.: *vacuolar chlorid*) zeigte sich permeabel für  $\text{Cl}^-$ -Ionen und Malat. Er wird durch CDPKs (engl.: *calcium dependent protein kinases*) und die Protein Kinase A aktiviert. VCL-Kanäle aktivieren hauptsächlich bei negativem Membranpotential. Der Anionenfluss wird dabei unterstützt durch das vorliegende vakuoläre Membranpotential, was hauptsächlich durch vakuoläre Protonenpumpen (V-ATPase und Pyrophosphatase) generiert wird. 2007 gelang es den vakuolären Malatkanal AtALMT9 der ALMT Genfamilie (engl.: *aluminium-activated malate transporter*) zu identifizieren (Kovermann et al., 2007). Durch heterologe Expression des vakuolären *A. thaliana* Kanalproteins in *Xenopus* Oozyten und Blättern von *Nicotiana benthamiana* wurde der Malatkanal charakterisiert, wobei er neben dem Hauptsubstrat Malat eine schwache Leitfähigkeit für  $\text{Cl}^-$ -Ionen aufwies. Bei der Verlustmutante *Atalmt9* wurde kein klarer Phänotyp offensichtlich. Es wurde deshalb vermutet, dass das Fehlen des Anionenkanals AtALMT9 durch eine höhere Transportaktivität des Malattransporters AtTDT (*Arabidopsis thaliana* Tonoplast Dicarboxylat Transporter) kompensiert wird (Emmerlich et al. 2003; Hurth et al., 2005; Kovermann et al., 2007). Neben Malat wurde in der pflanzlichen Vakuole eine hohe  $\text{NO}_3^-$ -Konzentration von bis zu 50 mM angereichert (Cookson et al., 2005; Zifarelli und Pusch, 2010). Dafür könnte das AtCLC-a Transportprotein verantwortlich sein, welches einen  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  Antiporter in der vakuolären Membran von *A. thaliana* ausbildet (De Angeli et al., 2006). AtCLC-a ist einer der sieben Mitglieder der CLC Proteinfamilie (von der Fecht-Bartenbach, 2010).

### 1.3.4 Protonentransport an der vakuolären Membran

In der vakuolären Membran befinden sich zwei verschiedene Protonenpumpen, die V-Typ  $\text{H}^+$ -ATPase und die Pyrophosphatase (Hedrich et al., 1986 und 1989), welche einen elektrochemischen Gradienten über die vakuoläre Membran aufbauen und das vakuoläre Lumen ansäuern. Der erste Hinweis für die Existenz einer V-ATPase im vakuolären System wurde im tierischen System gefunden, als Kirshner (1962) zeigte, dass die Aufnahme von Catecholaminen abhängig von ATP ist. Die erste pflanzliche ATPase wurde 1973 aus Rübenmikrosomen von Rungie und Wiskich beschrieben. Im Laufe der Zeit wurden die ATPasen in drei unterschiedliche Familien, den F-, P-, und V-Typ-ATPasen eingeteilt. Dabei ähneln sich V-Typ- und F-Typ-ATPasen in ihrer Struktur und Funktion (Nishi und Forgac, 2002). F-Typ-ATPasen synthetisieren ATP, während V-Typ-ATPasen ATP verbrauchen. Hirata et al. (2000) konnten zeigen, dass die Funktion beider ATPasen reversibel ist. Da alle eukaryotischen V-Typ-ATPasen als gemeinsames Merkmal Protonen unter ATP-Verbrauch in ein anderes Kompartiment transportierten, wurden die V-Typ-ATPasen auch  $\text{H}^+$ -ATPasen oder auch V-Typ- $\text{H}^+$ -ATPasen genannt. Die Entdeckung von Vanadate (D'Auzac, 1975; Walker und Leigh, 1981) und Bafilomycin (Bowman et al., 1988) als spezifischer Inhibitor der P-Typ bzw. V-Typ  $\text{H}^+$ -ATPase machte eine schnelle Zuordnung der Familien möglich.

Das Protein der V-ATPase ist aus bis zu 14 Untereinheiten aufgebaut und bildet zwei Hauptringstrukturen  $V_1$  und  $V_0$  aus (Abbildung 4). Der  $V_1$ -Komplex (Untereinheiten A-H) besitzt eine Größe von 400-600 kDa, liegt im Cytoplasma und interagiert mit ATP, ADP oder anorganischem Pyrophosphat (Beyenbach und Wiczorek, 2006). Der für den  $H^+$ -Transport verantwortliche  $V_0$ -Komplex (Untereinheiten a, c, c', c'', d und e) hingegen ist in die Membran integriert und mit 150-350 kDa bedeutend kleiner.  $V_1$  weist einen sphärisch aufgebauten Ring aus 2 x 3 Untereinheiten (A, B) auf, welcher die ATP-Hydrolyse vermittelt. Der Ring ist verbunden mit einem rotierenden Stiel, welcher aus den Untereinheiten D und F gebildet wird. Diese stehen wiederum in Kontakt mit den Untereinheiten C, E, G und H, welche peripher die Form eines weiteren Stiels aufzeigen. Beide Stiele stellen die Verbindung des  $V_1$ - zum  $V_0$ -Komplex dar. Die Untereinheiten B und C fixieren den  $V_1$ -Komplex durch Bindung an Aktin. Der  $V_0$ -Komplex enthält ebenfalls eine Ringstruktur aus c-Untereinheiten. Zusammen mit den Untereinheiten D und F bilden sie den sogenannten „Rotor“ der V-ATPase. Alle weiteren Strukturen werden als „Stator“ zusammengefasst. In Abbildung 4B ist dargestellt, wie der Transport von  $H^+$  über die Membran zustande kommen könnte (Beyenbach und Wiczorek, 2006). Die aus der Hydrolyse von ATP freigesetzte Energie ermöglicht die Rotation der c-Ring-Untereinheit. Die Untereinheit a bildet einen Halbkanal aus, worüber die Protonen an den c-Ring herangeführt, an eine c-Untereinheit gebunden, um  $360^\circ$  gedreht und wieder über den äußeren Halbkanal der a-Untereinheit in das Lumen oder den extrazellulären Raum entlassen werden. Die  $V_0$ - und  $V_1$ -Komplexe können als zusammengesetzter Komplex oder aber als freie Einzelkomplexe vorliegen. Der Aufbau und Zerfall steht in einem dynamischen Gleichgewicht, welches bei Insekten oder Hefen durch extrazelluläre Bedingungen reguliert werden (Kane, 2000).

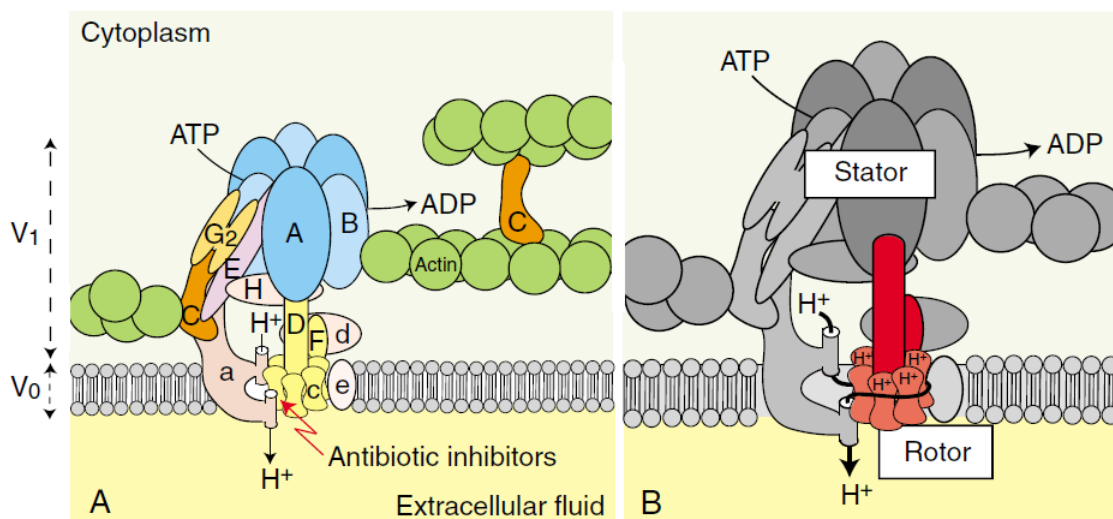


Abbildung 4: Modell einer eukaryotischen V-Typ- $H^+$ -ATPase. Aus Beyenbach und Wiczorek (2006). Nähere Erläuterungen siehe bitte Text.

Für die V-ATPase wurden in Abhängigkeit des Zelltyps und des Organismus unterschiedliche Stöchiometrien, mit 1 H<sup>+</sup> pro ATP (Müller und Taiz, 2002) bis zu mehr als 3 H<sup>+</sup> pro ATP (Davies et al., 1994) ermittelt.

Neben der V-ATPase wurde 1975 eine weitere Protonenpumpe an der vakuolären Membran, die Pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase) von Karlsson erstmalig beschrieben. Sie trägt ebenfalls zum Aufbau des H<sup>+</sup>-Gradienten am Tonoplasten bei. Mittels der Hydrolyse von anorganischem Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) werden H<sup>+</sup> in das vakuoläre Lumen gepumpt. Durch viele Stoffwechselforgänge wie z. B. die Acetylierung des Coenzym A während der Fettsäuresynthese, wird PP<sub>i</sub> in der pflanzlichen Zelle gebildet, was anschließend als alleinige Energiequelle für die H<sup>+</sup>-PPase zur Verfügung steht (Rea und Poole, 1986). Im Cytosol wurde eine PP<sub>i</sub>-Konzentration von 0,2 bis 0,3 mM bestimmt (Weiner et al., 1987).

In *A. thaliana* codiert das AVP1-Gen (engl.: *Arabidopsis Vacuolar Pyrophosphatase*) für die vakuoläre Pyrophosphatase (Sarafian et al., 1992). Das Protein besteht aus 770 Aminosäuren mit einer Größe von 81 kDa (Rea et al., 1992). Daneben beinhaltet das Arabidopsis Genom das AVP2/AVPL1 Gen, welches im Golgi-Apparat exprimiert wird (Mitsuda et al., 2001). Es weist in der Aminosäuresequenz eine Ähnlichkeit von 35% zu AVP1 auf (Li et al., 2005). Neben der Aufrechterhaltung des vakuolären pH-Werts wird AVP1 eine Aufgabe bei der Kontrolle des Auxintransports zugeschrieben (Li et al., 2005). Inwieweit die Pyrophosphatase eine Rolle bei der Schließzellbewegung übernimmt, ist bisher unbekannt.

### 1.3.5 Zuckertransport an der vakuolären Membran

In den pflanzlichen Blättern liegt eine hohe Konzentration von Saccharose und aber auch von Fruktose und Glukose vor (ap Rees, 1994). Diese Zucker erfüllen eine Vielzahl von Funktionen im pflanzlichen Metabolismus. Während sie als Energielieferant zur Verfügung stehen, wird aus ihnen auch Stärke und Cellulose gebildet. Zucker sind darüber hinaus Ausgangsstoffe für die Synthese von organischen Verbindungen wie z. B. Aminosäuren oder Carbonsäuren (Heldt, 2005). Deshalb muss der Zuckergehalt in der pflanzlichen Zelle reguliert und in endogenen Organellen wie die Vakuole kompartimentiert werden.

Im Genom von *A. thaliana* wurden mehr als 60 Gene für potentielle Monosaccharidtransporter identifiziert (Büttner 2007; Neuhaus 2007), welche Zucker wie Glukose oder Fruktose über die Plasmamembran und diverse Endomembrane verlagern. Dazu zählen auch die vakuolären Transportproteine TMT1 und TMT2 (engl.: *Tonoplast Monosaccharid Transporter*), sowie VGT1 (engl.: *Vacuolar Glucose Transporter*). TMT1 und TMT2 spielen eine wesentliche Rolle während der pflanzlichen Stressantwort. Während bei Salzstress das Expressionslevel von TMT1 und TMT2 signifikant zunahm, zeigte

ausschließlich TMT1 auf Kälte eine Erhöhung der Transkriptrate (Wormit et al., 2006). Analysen der *Atvgt1*-Verlustmutante deuten darauf hin, dass VGT1 bei der Samenkeimung und Blütenausbildung eine wichtige Funktion übernimmt (Aluri und Büttner, 2007).

Darüber hinaus wurde in der vakuolären Membran AtINT1 (engl.: *Inositol Transporter*) lokalisiert (Schneider et al. 2008) Das Transportprotein gehört zur Familie der AtINTs (Abbildung 5), wobei AtINT2 und AtINT4 bereits als plasmamembranständige Symporter für den Zuckeralkohol *myo*-Inositol identifiziert wurden (Schneider et al., 2006, 2007).

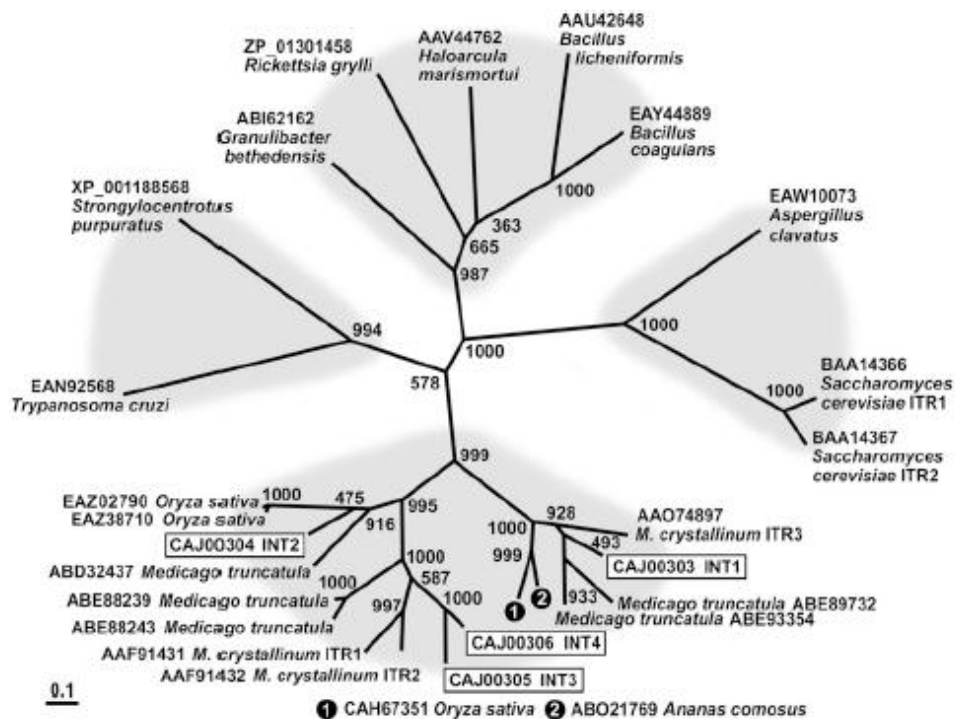


Abbildung 5: Phylogenetischer Baum der INT-Familie von *A. thaliana* Inositol-Transportern und verwandten Transportproteinen anderer Spezies. Der Baum ist in vier verschiedene Bereiche unterteilt: Metazoa und Protozoa links, Pilze rechts, Bakterien und Archaeobakterien oben und Pflanzen mit zwei Untergruppen unten. Es wurde jeweils die Genbank-Zugangsnummer des Transporters, der Name des Organismus und eingerahmt der publizierte Name des Transporters angegeben. Die Abbildung wurde aus Schneider et al. (2008) entnommen.

Für den Transport des Disaccharids Saccharose weist das Genom weitere neun SUC-Gene - (SUCROSE TRANSPORTER, Synonym für SUC: SUT) auf (Sauer et al., 2004), welche für putative Saccharosetransporter kodieren (Abbildung 6). Während AtSUC6 und AtSUC7 als Pseudogene identifiziert wurden, kodieren AtSUC8 und AtSUC9 für funktionsfähige Saccharosetransporter, welche in der Blüte von *A. thaliana* exprimiert werden (Sauer et al., 2004). AtSUC3 wurde ebenfalls als funktionsfähiger Saccharosetransporter identifiziert, welcher in Blättern und Stängeln ausgebildet wird

(Meyer et al., 2000). Eine klare physiologische Funktion konnte bisher nur drei Transportern der SUC-Familie zugewiesen werden. AtSUC1 ist an der Regulation der Anthocyan synthese (Hoth et al., 2010), der Entwicklung der Staubbeutel und dem Pollenschlauch (Stadler et al., 1999) beteiligt. Dagegen scheint AtSUC2 eine Rolle bei der Phloembeladung zu spielen (Schneiderei et al., 2008). AtSUC5 wird im Endosperm exprimiert und übernimmt Aufgaben bei der Samenentwicklung (Baud et al., 2005). Während die genannten Transportproteine plasmamembranständig sind wird AtSUC4 als einziges in der vakuolären Membran exprimiert (Endler et al. 2006; Schneider et al., 2011). Auch in anderen Pflanzenfamilien wie *Brassicaceae*, *Curbitaceae* und *Solanaceae* wurden SUC4-Transportproteine ausschließlich in der vakuolären Membran lokalisiert (Schneider et al., 2011). In Arabidopsis-Pflanzen wird AtSUC4 in Vakuolen des zentralen Wurzeleitgewebes, der Antheren und allen meristematischen Geweben exprimiert (Schneider et al., 2011).

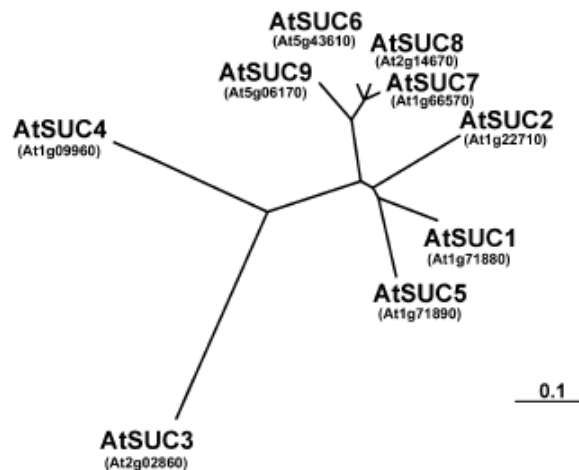


Abbildung 6: Phylogenetischer Baum der neun putativen Saccharose-Transporter von *A. thaliana*. Aus Sauer et al., 2004.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Transpirationsrate und der Gasaustausch einer Pflanze werden durch die Öffnungsweite der Stomata reguliert. Die pflanzliche Vakuole ist durch Aufnahme und Abgabe osmotisch aktiver Stoffe maßgeblich am Vorgang der Stomaöffnung sowie des Stomaschlusses beteiligt. Das Wissen über die Transportvorgänge an der vakuolären Membran von Schließzellen ist jedoch unvollständig.

In der vorliegenden Dissertation sollten vor allem der Transport von Protonen, Zuckern und Kaliumionen am Tonoplasten von *A. thaliana* erforscht werden:

1. Im ersten Teil der Arbeit sollte der Protonentransport an der vakuolären Membran durch die zwei Protonenpumpen, V-ATPase und die H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase näher un-



tersucht werden. Die V-ATPase ist ein Enzymkomplex, welcher aus zahlreichen Untereinheiten aufgebaut ist. Mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik sollte die Auswirkung des vollständigen Verlusts der V-ATPase Untereinheit VHA-a, Teil des  $V_0$ -Komplexes, auf die Funktion der V-ATPase aufgezeigt werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die Pyrophosphatase einen verminderten  $H^+$ -Transport der V-ATPase kompensieren kann. Des Weiteren sollte die Bedeutung der V-ATPase an der vakuolären Membran von Schließzellen mittels Expressionsstudien und *Patch-Clamp*-Messungen herausgearbeitet werden.

2. Im Gegensatz zum vakuolären  $H^+$ -Transport konnte bislang kein vakuolärer Zuckertransporter im nativen System von *A. thaliana* charakterisiert werden. In Kooperation mit Dr. Sabine Schneider (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Norbert Sauer, Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg) wurden AtSUC4 und AtINT1 als mögliche Saccharose- bzw. Inositol-spezifische Zuckertransporter an der vakuolären Membran identifiziert. Mit Hilfe von Verlustmutanten und Protein überexpremierenden Pflanzen sollte der Transportvorgang beider Zuckertransporter an der vakuolären Membran mittels *Patch-Clamp*-Technik elektrophysiologisch beschrieben werden.
3. Der dritte Teil dieser Arbeit hatte zum Ziel, die elektrophysiologische Charakterisierung des nicht-selektiven Kationen-SV-Kanals von *A. thaliana* weiterzuführen. Zahlreiche Publikationen gaben bisher Aufschluss über die Regulation des SV-Kanals durch die Membranspannung sowie diverse cytosolische und vakuoläre Faktoren wie z. B. die  $Ca^{2+}$ -,  $Mg^{2+}$ -Konzentration oder der Kaliumgradient. Trotzdem blieb die physiologische Bedeutung des SV-Kanals bis dato weitgehend unverstanden. Untersuchungen am WT sowie der *fou2*-Mutante von *A. thaliana* sollten Hinweise auf die Lokalisation von luminalen Regulationsstellen des Membranproteins geben. Erstmalig sollten auch vergleichende Studien des SV-Kanals an Mesophyll- und Schließzellvakuolen von *A. thaliana* durchgeführt werden. Dabei sollte geprüft werden, ob der SV-Kanal in den beiden unterschiedlichen Gewebetypen ein verändertes Kanalverhalten auf verschiedene regulatorische Faktoren aufzeigt. Darüber hinaus sollte die Rolle des SV-Kanals bei Schließzellbewegungen näher beleuchtet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Elektrophysiologische Methoden

#### 2.1.1 Anzucht und Kultivierung von *A. thaliana* Pflanzen

Die Experimente wurden an Mesophyll- oder Schließzellvakuolen von *A. thaliana* Eco-typ Columbia-0 (WT) Pflanzen durchgeführt. Die Pflanzen wurden auf Einheitserde P ausgesät und unter Kurztagbedingungen (Tag/Nachtrhythmus von 8:16h, Temperaturen von 22:16°C) angezogen. Die Luftfeuchte betrug etwa 75%. Als Lichtquellen dienten Philips Neonröhren mit einer Beleuchtungsstärke von 800 lx.

#### 2.1.2 Isolierung von Protoplasten

##### 2.1.2.1 Mesophyllprotoplasten

Für die Gewinnung von Vakuolen aus Mesophyllgewebe wurde die untere Epidermis eines Blattes von 4-6 Wochen alten Pflanzen mit Hilfe eines sehr feinen Schmirgelpapiers entfernt. Daraufhin wurden die Blätter mit der behandelten Seite nach unten in eine Petrischale ( $\varnothing = 35$  mm) mit 3 ml Enzymlösung gelegt. Die Enzymlösung enthielt

1% BSA	1 mM $\text{CaCl}_2$
0,05% Pectolyase Y-23 (ICN)	10 mM Mes/Tris (pH 5,6)
0,5% Cellulase R-10 (Yakult)	$\pi = 400$ mosmol $\text{kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)
0,5% Mazerozym R-10 (Yakult)	

Zum enzymatischen Abbau der Zellwand wurden die Mesophyllblätter für 45 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 50 U/min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch ein 50  $\mu\text{M}$  großes Nylonnetz filtriert und das Protoplasten enthaltende Filtrat mit 45 ml Waschlösung (1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 400 mM D-Sorbitol) aufgefüllt. Die Protoplasten wurden in einer Zentrifuge bei 4°C und 100 g für 10 min ohne Bremse sedimentiert (Beckmann Gs-15R Zentrifuge, Beckmann Instruments Inc., Palo Alto, USA). Das Pellet wurde dann in 4 ml Waschlösung aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 2.1.2.2 Schließzellprotoplasten

Zur Protoplastierung von *A. thaliana*-Schließzellen wurde ein abgeändertes Übernachtprotokoll aus Pandey et al. (2002) angewendet. In einem Mixer (MX32, Braun, Kronberg, Deutschland) wurden etwa 10 Blätter von 6-8 Wochen alten Arabidopsispflanzen für 2 mal 90 s in eiskaltem Wasser gemixt, die Gewebefragmente mit Hilfe eines 250  $\mu\text{M}$  Nylonnetzes gesammelt und auf dem Nylonnetz mit eiskaltem Wasser gespült. Die Gewebestreifen wurden in 3 ml folgender Enzymlösung überführt und 18 h bei 16-18°C ohne Schütteln inkubiert.

0,65% Cellulase R10 (Serva, Heidelberg, D)	5 mM Ascorbinsäure
0,35% Mazerozym R10 (Serva, Heidelberg, D)	0,05% Kanamycinsulfat
0,25% BSA	10 mM Mes/Tris (pH 5,6)
0,05 mM KCl	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)
0,05 mM $\text{CaCl}_2$	

Anschließend wurden die Schließzellprotoplasten durch leichtes Schütteln (50U/min) aus dem aufgelockerten Zellwandgerüst herausgelöst. Die Schließzellprotoplasten wurden mit Waschpuffer (1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 400 mM D-Sorbitol) durch ein Nylonnetz mit 100  $\mu\text{M}$  Maschenweite gespült und durch Zentrifugation aufkonzentriert. Die Zentrifugationsparameter entsprachen denen der Herstellung von Mesophyllprotoplasten (Kap. 2.1.2.1), die Zentrifugationsdauer wurde jedoch auf 20 min verlängert. Unmittelbar nach dem Zentrifugieren war es wichtig den Überstand zu dekantieren, um ein erneutes Aufsteigen der sehr kleinen Schließzellprotoplasten zu verhindern. Die Zellen wurden auf Eis gelagert und mussten mindestens 1 h vor den *Patch-Clamp*-Experimenten in saubere Messküvetten mit 50  $\mu\text{l}$  Waschlösung überführt werden, damit sie sich auf dem Glas der Messküvette ablagerten.

### 2.1.3 Freisetzung der Vakuolen aus Protoplasten

Die Vakuolen wurden aus den Protoplasten mit Hilfe eines hypoosmotischen Schocks freigesetzt. Dazu wurden die Mesophyllprotoplasten in die mit Lysispuffer angefüllte Messkammer überführt. Nach etwa 10 min Inkubation wurde der Lysispuffer wieder gegen die jeweilige externe Messlösung ausgetauscht. Bei den vorbereiteten, abgelagerten Schließzellprotoplasten wurde der Lysispuffer für 12 min über ein Perfusionssystem direkt in der Messkammer gespült. Der Lysispuffer enthielt:

10 mM EGTA
10 mM Hepes /Tris (pH 7,4)
$\pi = 200 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)

## 2.1.4 Patch-Clamp-Experimente

### 2.1.4.1 Patch-Clamp-Technik

Mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik ist es möglich, das elektrische Verhalten von membranständigen Proteinen zu charakterisieren. Die *Patch-Clamp*-Technik wurde 1976 erstmals von Erwin Neher und Bert Sakmann vorgestellt. Für ihre Arbeit zur Funktion einzelner zellulärer Ionenkanäle erhielten sie 1991 den Nobelpreis. Die Technik erhielt ihren Namen von der Umschließung eines einzelnen Membranflecks (engl.: *patch*) mit der Patch-Pipette, wobei die Membran bei einer bestimmten Spannung geklemmt (engl.: *clamp*) wird.

### 2.1.4.2 Aufbau des Messplatzes

Der Messplatz bestand aus einem über Druckluft schwingungsgedämpften Tisch. Dieser wurde von einem Faraday'schen Käfig umgeben, der vor elektrostatischen Einflüssen aus der Umgebung abschirmte. Auf dem Tisch war ein inverses Mikroskop angebracht, das eine Halterung für die Messküvette aufwies. Um während den Messungen die Ionenkonzentration konstant zu halten, wurde die Messküvette permanent mit Badlösung durchspült. Dafür wurde mit Hilfe von Peristaltikpumpen eine konstante Durchflussrate von 100-150  $\mu\text{l}/\text{min}$  eingestellt.

Um definierte Spannungen an die vakuoläre Membran anlegen zu können, wurde ein EPC-7 *Patch-Clamp*-Verstärker von HEKA (Lambrecht, Deutschland) für Messungen an Mesophyllvakuolen verwendet. Das analoge Signal wurde 10 kHz vorgefiltert und zusätzlich durch einen „*low-pass*“ Bessel-Filter mit 5 kHz bei Ganzzelleableitung bzw. mit 1 kHz bei Einzelkanalmessungen und 40 Hz bei Messungen an Zuckertransportern gefiltert. Die Daten wurden mit Hilfe eines DA/AD-Wandlers (ITC-16; Instrutech Corp., Elmont, NY, USA) digitalisiert und mit einem Computer der Firma Maxdata (Marl, Deutschland) gespeichert.

Für Experimente an Schließzellvakuolen wurde ein EPC-10 Verstärker von Heka herangezogen. Dieser war an einen TIB 14S Wandler gekoppelt, welcher die Daten an einen Lenovo-Computer übertrug. Das ankommende Signal wurde 10 kHz mit einem analogen 3-Pol-Filter vorgefiltert und anschließend mit einem zweiten in Serie geschalteten 4-Pol-Filter gefiltert (5 kHz bei Ganzzelleableitung, 1 kHz bei Einzelkanalmessungen).

Datenpunkte wurden bei Ganzzellmessungen von Schließzellvakuolen alle 200  $\mu\text{s}$ , bei allen weiteren Ganzzellmessungen alle 500  $\mu\text{s}$  aufgezeichnet. Bei den Einzelkanalexperimenten mit 14-3-3 Proteinen (Kap. 3.4.2) wurde alle 100  $\mu\text{s}$  ein Datenpunkt registriert. Für alle weiteren Einzelkanalmessungen wurde eine Aufnahmezeit von 50  $\mu\text{s}$  gewählt. Bei Messungen mit dem EPC-7 *Patch-Clamp*-Verstärker wurde Pulse (Heka Elektronik,

Lambrech, Deutschland) als Softwareprogramm verwendet, während der EPC-10 auf Patchmaster (Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland) als Softwareprogramm zurückgriff. Über Pulse bzw. Patchmaster wurden Spannungspulse generiert, die über die Messpipette auf die Membran übertragen wurden. Die Messpipette, die an den Vorverstärker gekoppelt war, wurde mit Hilfe eines Grob- und Feinmanipulators von rechts an die Vakuole herangeführt. Darüber hinaus wurde eine zusätzliche Perfusionspipette an der linken Seite des Messplatzes platziert, welche eine genaue Applikation von Substraten direkt an die Vakuole ermöglichte.

### 2.1.4.3 Messprinzip

Bei der *Patch-Clamp*-Technik wird die Membran im *Voltage-Clamp*-Modus (Spannungsklemme) bei einer bestimmten Spannung geklemmt und die darüber abfallenden Ströme gemessen. Dies geschieht, indem Änderungen in der Kommandospannung  $V_{cmd}$  registriert werden und entsprechend solange Strom injiziert wird, bis die Spannungsänderung kompensiert ist. Dabei stellt der *Patch-Clamp*-Verstärker einen speziellen Typ von Rückkopplungsverstärker dar. So können abfallende Spannungen z. B. durch veränderte Kanalaktivitäten ausgelöst werden. Der benötigte Kompensationsstrom wird in den *Voltage-Clamp*-Messungen dargestellt und aufgezeichnet. Ein stark vereinfachtes Schaltbild eines *Patch-Clamp*-Vorverstärkers ist in Abbildung 7 zu sehen.

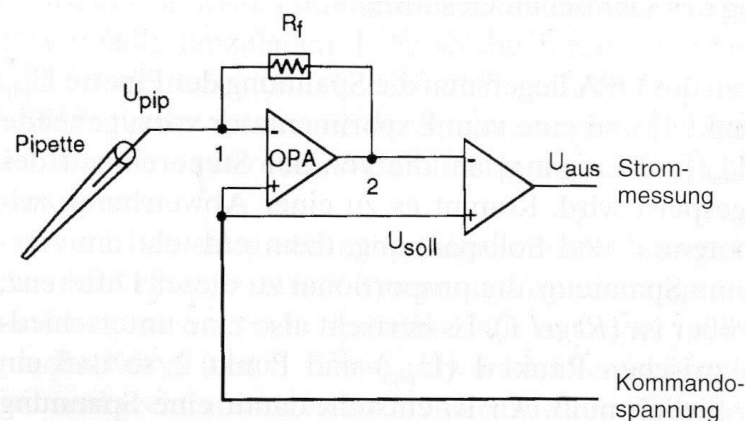


Abbildung 7: Vereinfachtes Schaltbild eines *Patch-Clamp*-Vorverstärkers. OPA: Operationsverstärker, + / -: Eingangsspannungen am Operationsverstärker,  $R_f$ : Rückkopplungswiderstand,  $U_{soll}$ : Kommando- oder Sollspannung,  $U_{pip}$ : Pipettenspotential,  $U_{aus}$ : Ausgangsspannung proportional zum Strom. (Numberger und Draguhn, 1996)

Der Operationsverstärker OPA gibt am Ausgang eine Spannung vor, die proportional zur Differenz der Eingangsspannungen  $U_{soll}$  (+) und der Pipettenspannung  $U_{pip}$  (-) ist, allerdings extrem verstärkt. Es liegen also unterschiedliche Spannungen an Punkt 1 und Punkt 2 an, so dass ein Strom durch den Rückkopplungswiderstand  $R_f$  fließen muss. An  $R_f$  entsteht eine Spannung proportional zum Strom ( $U_f = R_f \cdot I$ ). Der Strom kann nur in die Pipette fließen, jedoch nicht in den Operationsverstärker, da er einen sehr hohen

Eingangswiderstand hat. Der Strom ändert das Potential an Punkt 1 und fließt solange weiter, bis die Differenz an den beiden Eingängen + und – aufgehoben ist. Aufgrund des Funktionsprinzips wird der Vorverstärker auch als Strom-Spannungs-Wandler bezeichnet.

#### 2.1.4.4 Herstellung von Elektroden, Patch- und Perfusionspipetten

Bei der *Patch-Clamp*-Technik finden eine Mess- und eine Referenzelektrode Verwendung. Diese wurden aus 0,5 mm starken Silberdrähten (WPI, Sarasota, USA) gefertigt und elektrolytisch in 1 M KCl-Lösung mit einer AgCl-Schicht überzogen.



Um eine konstante Chloridionenkonzentration der Badlösung sicherzustellen, wurde die Referenzelektrode mit einem Polyvenylschlauch überzogen, der eine 3 M KCl-Lösung enthielt. Dieser wurde mit einem Agarpfropfen (3 M KCl, 2% Agarose) verschlossen, um ein Auslaufen und damit eine Kontamination der Badlösung zu verhindern.

Die Patchpipetten und zusätzlichen Perfusionspipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren hergestellt (1,5–1,8 x 70 mm, Kimax-51, Kimble Products, Vineland, N.Y., USA). Zuerst wurden die Kapillaren auf der Innenseite mit einem Silikonfilm (Sigmacote<sup>®</sup>, Sigma, München, Deutschland) beschichtet, und anschließend in einem Pipettenziehgerät (Narishige PP-83, Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japan) zu zwei zugespitzten Pipetten gezogen.

Für die Experimente wurden Patchpipetten hergestellt, die einen Widerstand von 3-12 MΩ in den jeweiligen Lösungen aufwiesen. Mit Hilfe einer *Microforge*-Apparatur (Zeiss ID03, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden sie zuerst bis kurz vor der Spitze mit einer hydrophoben Silikonmasse (Sylgard<sup>®</sup> 184 silicon elastomer kit, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA) überzogen. Anschließend wurden die Pipettenspitzen an einem feinen Platin-Iridium-Draht hitzepoliert und damit die Ränder der Pipettenspitze rundgeschmolzen.

#### 2.1.4.5 Seal- und Messkonfigurationen

Die *Patch-Clamp*-Technik ermöglicht das Ausbilden verschiedener Messkonfigurationen (Abbildung 8). Um die Etablierung der jeweiligen Konfiguration elektrisch verfolgen zu können, wurde ein fortlaufender Testpuls von  $U = \pm 10$  mV über die Patchpipette angelegt. Durch die gemessene Stromamplitude  $I$  kann der Patchpipetten-Widerstand  $R_{\text{pip}}$  über das Ohm'sche Gesetz, bezogen auf die Bad- und Pipettenlösung berechnet werden.

$$U = R_{\text{pip}} * I \quad [2]$$

Die Patchpipette wurde auf die Membran aufgesetzt und leicht angedrückt. Durch Anlegen eines geringen Unterdrucks konnte ein hoher Abdichtwiderstand zwischen der Pipette und der Membran ausgebildet werden. Dieser Widerstand bewegte sich im Bereich von einem bis mehreren  $G\Omega$  ( $10^9$  Ohm), weshalb dies auch als die Ausbildung eines „Gigaseals“ (engl.: *seal* = Abdichtung) bezeichnet wird. Man befindet sich nun in der *Cell-attached*-Konfiguration, wobei das Membranstück unterhalb der Pipette von der Umgebung elektrisch isoliert ist. Der elektrische Zugang zur gesamten Membranoberfläche (*Whole-cell*-Konfiguration) wurde durch einen elektrischen Impuls von +/- 800 mV und/oder durch Anlegen eines kurzen Saugpulses an die Membran erreicht. Dabei wurde die Membran unterhalb der Pipettenspitze zerstört und die Zellinnenlösung mittels Diffusion durch die Pipettenlösung ersetzt. Das vorsichtige Zurückziehen der Patchpipette aus der Ganzzelleableitung führt zum Abreißen und Refusionieren der an der Pipette verbleibenden Membranfragmente in der ursprünglichen Membranorientierung. Die Badlösung in der sogenannten *Outside-out*-Konfiguration entspricht dabei dem extrazellulären Raum. Bei der *Inside-out*-Konfiguration ist die luminale Oberfläche dem Badmedium zugewendet, die extrazelluläre Oberfläche dem Pipettenmedium. Es besteht also eine umgekehrte Membranorientierung. Diese Konfiguration kann erreicht werden, indem die Patchpipette aus der *Cell-attached*-Konfiguration axial abgezogen und ein kleines Stück aus der Membran heraus gerissen wird.

Bei Messungen an Endomembrane, wie z. B. dem Tonoplast werden die Messkonfigurationen konvertiert, da das vakuoläre Lumen als extrazelluläres Kompartiment und das Cytosol als intrazelluläres betrachtet wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente in der *Whole-vacuolar*-Konfiguration und der *Outside-out*-Konfiguration durchgeführt. Dabei war bei beiden Konfigurationen die cytosolische Membranseite dem Badmedium zugewandt und die vakuoläre Membranseite der Pipettenlösung.

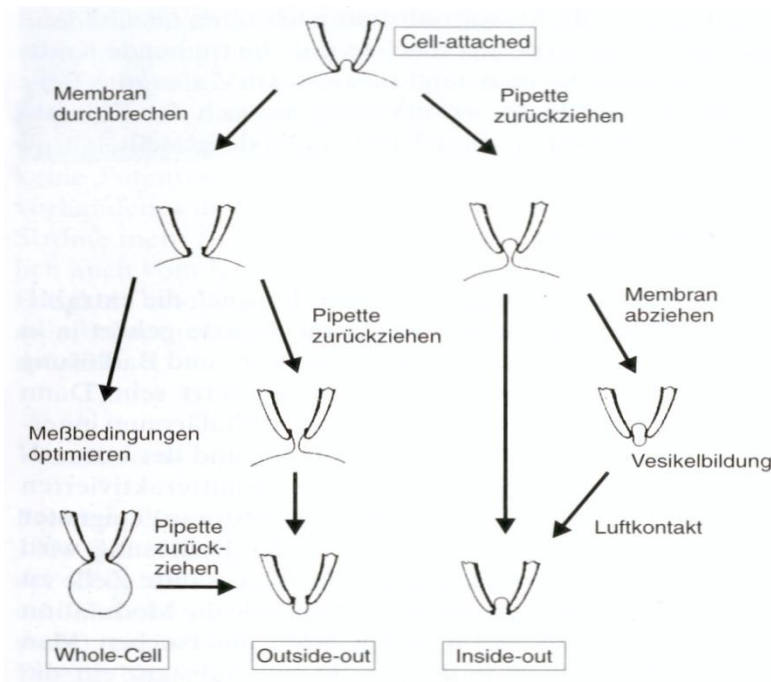


Abbildung 8: Messkonfigurationen der *Patch-Clamp*-Technik. In der Abbildung sind die vier Messkonfigurationen der *Patch-Clamp*-Technik *Cell-attached*, *Whole-Cell*, *Outside-out* und *Inside-out* und ihre Einstellung in der Praxis aufgezeigt (Numberger und Draguhn, 1996). Die hier dargestellten Messkonfigurationen beziehen sich auf die Plasmamembran und müssen bei Endomembrane wie z. B. dem Tonoplasten konvertiert werden.

#### 2.1.4.6 Elektrische Eigenschaften der makroskopischen-Stromableitung

Biomembrane bestehen aus einer Doppellipidschicht mit eingelagerten Transportproteinen. Aufgrund der elektrischen Eigenschaften werden sie als parallel geschalteter Widerstand und Kondensator betrachtet. Wird über die Patchpipette die Spannung über der Membran instantan geändert, findet eine Umladung der Membrankapazitäten statt. Die kapazitiven Ströme, die an der Glaswandung der Patchpipette auftreten, wurden durch Beschichtung der Glaskapillare mit Silikonelastomeren (Kap. 2.1.4.4) möglichst gering gehalten. Das Auftreten der kapazitiven Ströme konnte anhand der dargestellten Stromantwort auf den Testpuls von  $U = \pm 10$  mV beobachtet werden und manuell beim EPC7-, bzw. softwaregesteuert beim EPC10-Verstärker kompensiert und quantifiziert werden. Die ermittelten Werte für die Membrankapazität  $C_m$  wurden in der Datenanalyse zur Normierung der gemessenen Ströme auf die Membranoberfläche genutzt. Dies ist möglich, da die spezifische Membrankapazität von Biomembranen nach Hille (1992) ca.  $1 \mu\text{F cm}^{-2}$  entspricht. Die Membrankapazitäten  $C_m$  einer Mesophyllvakuole lagen zwischen 10 und 90 pF, was einem Vakuolen-Durchmesser von 18-53  $\mu\text{m}$  entspricht. Im Vergleich dazu lag die Kapazität von Schließzellvakuolen bei nur 0,5-1,5 pF, und damit deren Durchmesser lediglich bei 2-3,5  $\mu\text{m}$ .

Die Patchpipette ist in der *Whole-Vacuole*-Konfiguration leitend mit dem Zellinneren verbunden. Zwischen dem Silberdraht und der Zelle liegt ein Serienwiderstand  $R_s$  an



(Abbildung 9), der im besten Falle dem Pipettenwiderstand entspricht. Beim Durchbruch der Membran in die *Whole-Vacuole*-Konfiguration können allerdings Membranfragmente und anderes Zellmaterial in die Pipettenöffnung gesaugt werden, die den Serienwiderstand erhöhen. Wenn der Serienwiderstand zu groß ist, kommt es zu einem starken Abfall der Membranspannung an der Pipettenspitze und die Messung sollte abgebrochen werden.

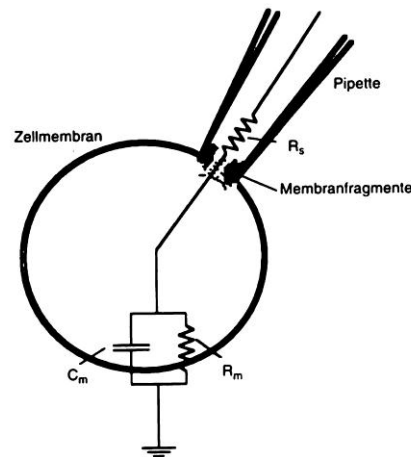


Abbildung 9: Schaltbild der makroskopischen Stromableitung.  $R_m$ : Membranwiderstand,  $C_m$ : Membrankapazität,  $R_s$ : Serienwiderstand. (Numberger und Draguhn, 1996)

### 2.1.5 Vorzeichenkonvention

Bei Spannungsklemmen-Experimenten mit Zellmembranen bezieht sich das Membranpotential immer auf die cytosolische Seite. Das Potential der Membranaußenseite (extrazelluläre Potential) wird dabei auf Null gesetzt. Bei Messungen an isolierten Vakuolen wird das Vakuolenlumen seit 1992 als Extrazellularraum angesehen und somit das Potential auf der cytosolischen Seite relativ zur vakuolären Seite angegeben (Bertl et al. 1992). Unter Berücksichtigung der verwendeten Konvention für die durchgeführten Spannungsklemmen-Messungen entspricht ein positiver Strom einem Ausstrom von Kationen aus dem Cytosol, bzw. einem Einstrom von Anionen in das Cytosol. Ein negativer Strom ist hingegen als Einstrom von Kationen in das Cytosol bzw. als Ausstrom von Anionen aus dem Cytosol zu interpretieren. Wird eine negative Spannung an die Membran angelegt, ist das Potential im Cytosol negativ gegenüber dem vakuolären Lumen.

### 2.1.6 Bestimmung des *Liquid-Junction-Potentials*

Das *Offset*-Potential ( $V_{\text{off}}$ ) des *Patch-Clamp*-Verstärkers wird nach dem Eintauchen der Patchpipette in die Badlösung und vor dem Aufsetzen auf die Membran abgeglichen und somit auf 0 mV gesetzt. Dabei wird vorgegeben, dass zwischen der Pipette und der Badelektrode kein Strom fließt. *Offset*-Potentiale können an Übergängen innerhalb der

Messkette entstehen. Dabei sind Polarisierungen an der Silber/Silberchlorid-Elektrode und Übergangspotentiale zwischen verschiedenen Lösungen, sogenannte Diffusionspotentiale von Bedeutung. Das Diffusionspotential oder *Liquid-Junction-Potential* ( $V_{LJP}$ ) entsteht an der Grenzfläche von zwei unterschiedlichen Elektrolytlösungen und ist abhängig von den Konzentrationen und der Mobilität der Ionen. Werden identische Lösungen in der Pipette und dem Bad verwendet, kann sich kein Diffusionspotential aufbauen. Nach Erreichen des Gigaohm-Abdichtwiderstandes fällt das Diffusionspotential zwischen Bad- und Pipettenlösung weg. Aufgrund der anfänglichen durchgeführten *Offset*-Kompensation stimmt somit die an der Membran anliegende Spannung ( $U_m$ ) bei Gebrauch von unterschiedlichen Lösungen nicht mehr mit der applizierten Kommandospannung ( $U_{cmd}$ ) überein. Deshalb ist vor dem Ausbilden des Gigaohm-Abdichtwiderstandes das ermittelte *Liquid-junction-Potential* elektronisch mit dem *Offsetpotential* zu verrechnen, sodass das echte Nullstrompotential anliegt. Zu diesem Zweck wurde das *Liquid-junction-Potential* experimentell bestimmt, das +6,5 mV (Pipette: 150 mM NaCl / Bad: 30 mM KCl) bzw. -1,4 mV (Pipette: 150 mM KCl / Bad: 30 mM NaCl) betrug. Die Kommandospannung wurde unter diesen Bedingungen entsprechend der folgenden Gleichung korrigiert:

$$U_m = U_{cmd} - U_{LJP} \quad [3]$$

### 2.1.7 Spannungspulsprotokolle

Der Widerstand und damit der Öffnungsdurchmesser der Patchpipette, sowie der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Membran konnte durch Applizieren eines Testpulses aufgezeigt und überprüft werden (Kap. 2.1.4.5). Die beim *Seal*-Prozess auftretenden schnellen kapazitiven Ströme konnten manuell bzw. elektronisch kompensiert werden. Der Übergang in die *Whole-vacuole*-Konfiguration wurde durch die Zunahme von langsamen kapazitiven Strömen angezeigt, die ebenfalls kompensiert wurden. Der Zeitpunkt des Übergangs in die *Whole-vacuole*-Konfiguration wurde als  $t = 0$  festgelegt. Daraufhin wurde das Kanalverhalten des SV-Kanals in der Ganzzelleableitung anhand von verschiedenen Spannungspulsen und der resultierenden Stromantworten untersucht. Dabei wurden Einfach- und Doppelspannungspulsprotokolle verwendet, die in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben werden. Zusätzlich wurden *Patch-Clamp*-Messungen an Einzelkanälen in der *Outside-out*-Konfiguration durchgeführt. Der Übergang in die *Outside-out*-Konfiguration wurde hier als  $t=0$  festgelegt. Für die Aufzeichnung der Einzelkanalereignisse wurde die vorgegebene Spannung stets konstant gehalten. Genaue Angaben über die angelegte Spannung und die Zeitdauer der einzelnen Pulse sind den jeweiligen Ergebnisteilen zu entnehmen.

### 2.1.7.1 Einfachspannungspulsprotokolle

Ein Einfachspannungspulsprotokoll bestand aus drei Segmenten. Ausgehend von der Haltespannung ( $U_H$ ), bei der die Kanäle im geschlossenen Zustand vorlagen, wurde zu verschiedenen Messspannungen ( $U_M$ ) zur Aktivierung der Kanäle gesprungen. Anschließend wurde wieder die Haltespannung angelegt, um die Kanäle erneut in den geschlossenen Zustand zu überführen. Diese Pulsabfolge wurde in Intervallen von 10 s durchgeführt. Dies sollte gewährleisten, dass die SV-Kanäle bis zum folgenden Spannungspuls wieder in den ursprünglichen Aktivitätszustand vorlagen. Die Messspannung ( $U_M$ ) wurde bei jeder Wiederholung um 10 mV bzw. 15 mV erhöht, was im Ergebnisteil angegeben wird.

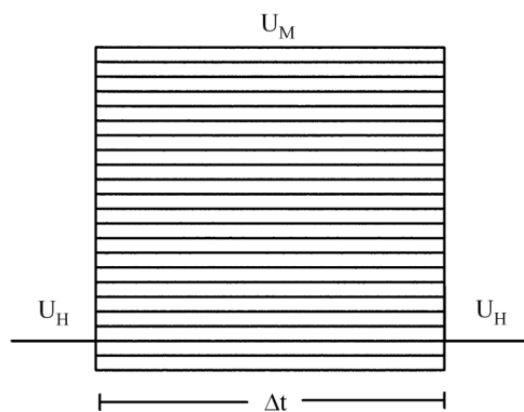


Abbildung 10: Einfachspannungspulsprotokoll. Ausgehend von einer Haltespannung  $U_H$  wurde die Messspannung  $U_M$  instantan angelegt. Anschließend wurde erneut die Haltespannung  $U_H$  appliziert. Die Zeitdauer der angelegten Messspannung  $U_M$  wurde den jeweiligen Experimenten angepasst.

### 2.1.7.2 Doppelspannungspulsprotokoll

Doppelspannungspulsprotokolle zeichneten sich durch ein zusätzliches Pulssegment, der Vorpulsspannung  $U_{VP}$  aus. Diese Spannung sollte eine ausreichende Anzahl an Kanälen in den aktiven Zustand überführen, bevor die eigentliche Messspannung  $U_M$  angelegt wurde. Anhand dieses Doppelspannungspulsprotokolls konnte z. B. das Umkehrpotential bei langsam deaktivierenden Kanälen ermittelt werden.

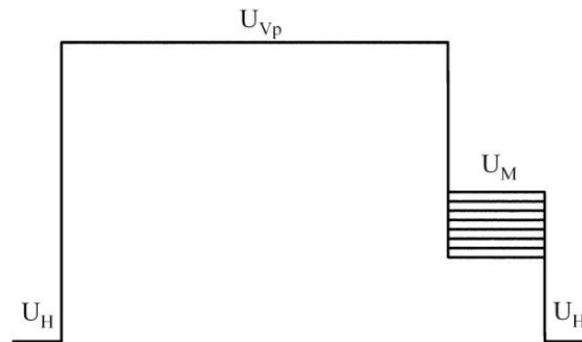


Abbildung 11: Doppelspannungspulsprotokoll. Nach Anlegen einer Haltespannung  $U_H$  wurden die Kanäle über einen depolarisierenden Vorpuls  $U_{Vp}$  aktiviert. Daraufhin wurden verschiedene Messspannungen zur Kanal-Deaktivierung angelegt, bevor man wieder zur Haltespannung zurückkehrte.

## 2.1.8 Datenauswertung

### 2.1.8.1 Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit

Zur Ermittlung der Einzelkanalleitfähigkeit eines Ionenkanals wurden Einzelkanalereignisse bei verschiedenen Membranspannungen aufgezeichnet und die jeweilige Einzelkanalamplitude  $i$  ermittelt (Abbildung 12).

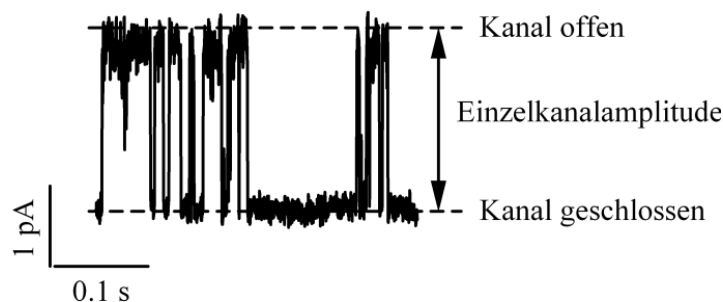


Abbildung 12: Einzelkanalereignisse in Mesophyllvakuolen. Einzelkanal-Fluktuationen des SV-Kanals bei einer Membranspannung von +30 mV gemessen in der *Outside-out*-Konfiguration.

Dazu wurde das Analyseprogramm TAC V3.0 (Bruyton Corporation, Seattle, WA, USA) verwendet. Die Einzelkanalereignisse wurden per Hand ermittelt und über ein Amplitudenhistogramm ausgewertet. Die Einzelkanalstrom-Amplituden wurden anschließend gegen die Spannung aufgetragen (Abbildung 13). Die Abhängigkeit der Ströme  $i$  von der Spannung wurde über eine lineare Geradengleichung ( $y = mx + b$ ) beschrieben, aus deren Steigung  $m$  die Einzelkanalleitfähigkeit  $\gamma$  des Kanals ermittelt werden konnte.

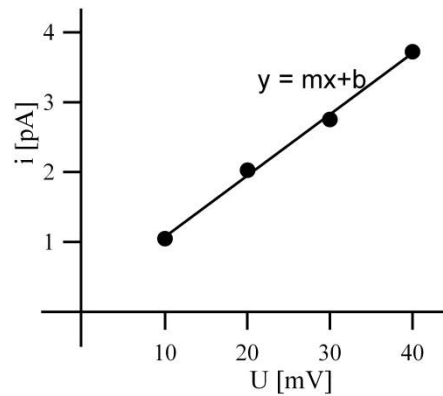


Abbildung 13: Ermittlung der Einzelkanalleitfähigkeit. Die Stromamplituden  $i$  wurden gegen die jeweilige angelegte Spannung  $U$  aufgetragen. Anhand der Geradensteigung  $m$  kann die Einzelkanalleitfähigkeit  $\gamma$  des Kanals bestimmt werden.

### 2.1.8.2 Bestimmung der absoluten Offenwahrscheinlichkeit

Für die Bestimmung der absoluten Offenwahrscheinlichkeit wurden Einzelkanalspuren (Abbildung 14, rechts) für eine Zeitdauer von mindestens 30 s aufgezeichnet.

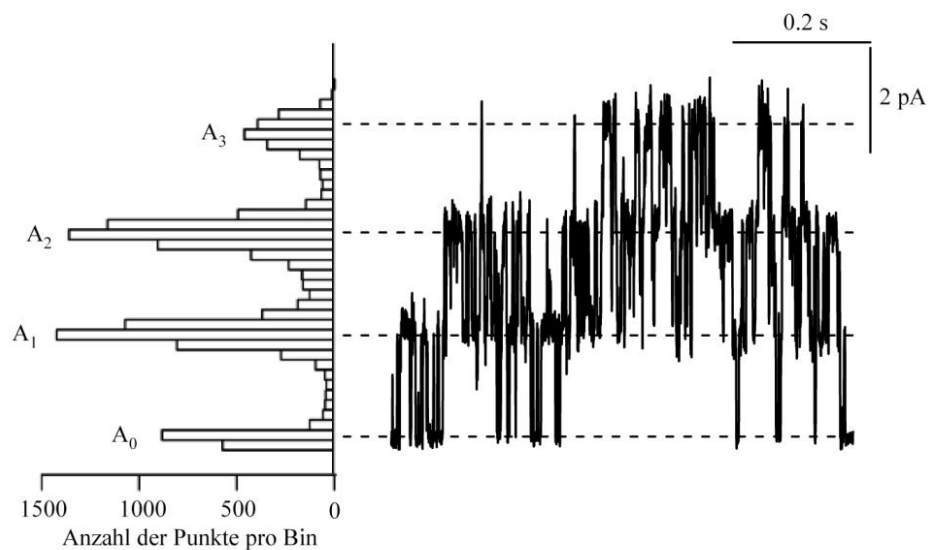


Abbildung 14: Bestimmung der absoluten Offenwahrscheinlichkeit über Amplitudenhistogramme. Die Einzelkanalfluktuationen (rechts) wurden bei +30 mV aufgezeichnet. Darauf aufbauend wurde ein Amplitudenhistogramm (links) erstellt, aus dem hervorgeht, wie häufig die Kanäle geschlossen bzw. geöffnet waren.

Die Anzahl der Ereignisse wurden mit Igor Pro Version 5.0 (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, USA) durch ein *All-point*-Amplitudenhistogramm dargestellt (Abbildung 14, links) und - wie in Bertl und Slayman (1990) beschrieben - die absolute Offenwahrscheinlichkeit  $P_0$  über die folgende Formel berechnet:

$$P_0 = (A_1 + 2A_2 + 3A_3 + \dots + nA_n) / n (A_0 + A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n) \quad [4]$$

Dabei stellt  $A_0, A_1, A_2, A_3, \dots, A_n$  die Fläche unter dem zweiten, dritten, n-ten Peak dar, welche für die Grundlinie (alle Kanäle sind geschlossen), ein, zwei, drei oder n offenen Kanälen steht. Die Flächen der jeweiligen *Peaks* wurden durch Integration mit Hilfe von Igor Pro Version 5.0 (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, USA) bestimmt.

### 2.1.8.3 Bestimmung der relativen Offenwahrscheinlichkeit

Um die relative Offenwahrscheinlichkeit (rel.  $P_o$ ) des SV-Kanals zu bestimmen, wurden Einfachspannungspulse (Kap. 2.1.7.1) an die Membran angelegt. Diese sollten die geschlossenen Kanäle aktivieren, bis sich die Kanalpopulation in einem für die jeweilige Spannung charakteristischen Gleichgewichtszustand (engl.: *steady state*) vorlagen. Anschließend wurde eine hyperpolarisierende Spannung (meist die Haltespannung  $U_H$ ) instantan appliziert, bei der die Kanäle erneut in den geschlossenen Zustand überführt wurden und somit relaxierende Ströme auftraten. Deren instantane Stromamplitude wird dabei als *Tail*-Strom  $I_{tail}$  bezeichnet (Abbildung 15). Da die Änderung der treibenden Kraft für den Ionenfluss bei Rückkehr zur Haltespannung unmittelbar erfolgt, und das Schaltverhalten der Kanäle (z. B. Schließen der Kanäle) jedoch zeitabhängig verläuft, kann die relative spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle  $G/G_{max}(U_M) = P/P_{max}(U_M) = \text{rel. } P_o(U_M)$  bei einer bestimmten Spannung  $U_M$  über den *Tail*-Strom ( $I_{tail}$ ) bei einer nachfolgenden konstanten, deaktivierenden Membranspannung ermittelt werden (Abbildung 15). Die Tailströme werden an der markierten Stelle bestimmt und auf die maximale Offenwahrscheinlichkeit normiert.

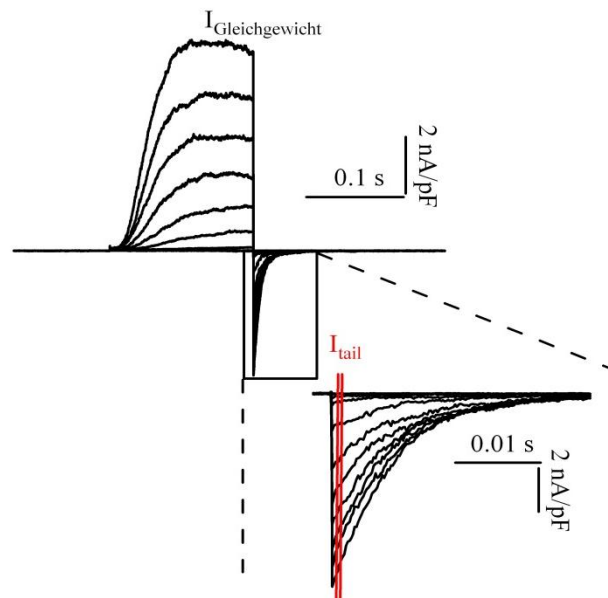


Abbildung 15: Tail-Ströme des SV Kanals: Abgebildet sind die Stromantworten des SV-Kanals auf mehrere depolarisierende Einfachspannungspulse im Bereich von -80 bis +100 mV. Die Spannungspulse wurden in 15 mV Schritten erhöht. Zum Pulsende hat sich ein Gleichgewichtszustand in der Stromamplitude eingestellt ( $I_{\text{Gleichgewicht}}$ ). Die Tail-Ströme  $I_{\text{tail}}$  (rechts unten vergrößert dargestellt), induziert durch die Rückkehr zur deaktivierenden Haltespannung von -60 mV, wurden

an der rot markierten Stelle abgegriffen und deren Amplitude in Abhängigkeit von der vorhergehenden depolarisierenden Spannung  $U_M$  bestimmt.

Nach Auftragung der Tailströme  $I_{tail}$  gegen die Messspannung  $U_M$ , wurden die Werte mit einer einfachen Boltzmann-Funktion beschrieben:

$$\text{rel. } P_o(U_M) = s * (1 / (1 + \exp(-z * (U_M - U_{1/2}) / (F/RT)))) \quad [5]$$

Nach Normierung der ermittelten Werte auf die maximale Leitfähigkeit  $G/G_{max}$  kann der Sättigungswert ( $s$ ), die apparenten Elementarladungsäquivalente ( $z$ ) und die Spannung  $U_{1/2}$  bei halbmaximaler relativer Offenwahrscheinlichkeit aus der Boltzmannverteilung ermittelt werden.

#### 2.1.8.4 Bestimmung des Gleichgewichtsstroms

Beim Gleichgewichtsstrom ( $I_{ss}$ , engl.: *steady state*) sind immer eine gleiche Anzahl von Kanälen in der Membran aktiv. Dabei wird der Gesamtstromfluss ( $I_{ges}$ ) von der Anzahl der in der Membran vorliegenden Kanäle  $N$ , die von der Spannung  $U$  und dem Nernst-Potential  $E_x$  abhängigen Einzelkanalstromamplitude ( $i(U - E_x)$ ) sowie der spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle ( $P_o(U)$ ) bestimmt:

$$I_{ges} = N * i(U - E_x) * P_o(U) \quad [6]$$

Nach Anlegen von Einfachspannungspulsen (Kap. 2.1.7.1) an die Membran wurde der gemittelte und auf die Größe der Zelle normierte Gleichgewichtsstrom  $I_{ss}$  (Abbildung 16A) gegen die applizierte Spannung zu einer Strom-Spannungs-Kennlinie (Abbildung 16B) aufgetragen.

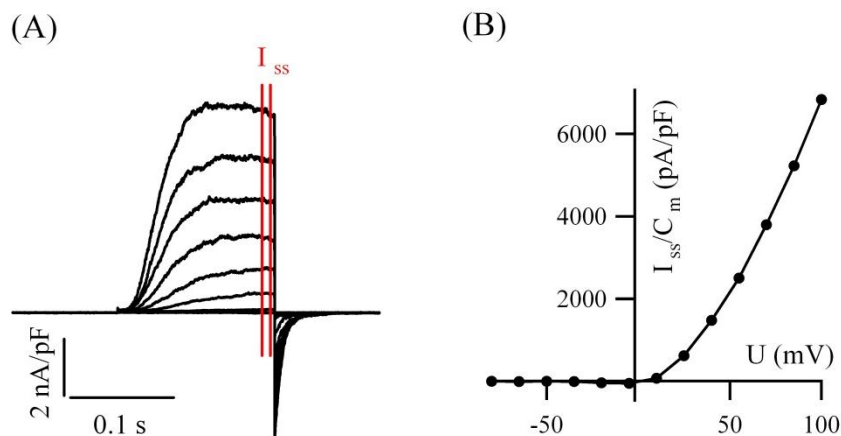


Abbildung 16: Gleichgewichtsströme des SV-Kanals. (A) Stromspuren des SV-Kanals auf Einfachspannungspulse. Die Gleichgewichtsströme wurden rot markiert. (B) Strom-Spannungs-Kennlinie des SV-Kanals. Die auf die Größe der Zelle normierten Gleichgewichtsströme wurden gegen die jeweilig angelegte Messspannung aufgetragen.

### 2.1.8.5 Bestimmung des Umkehrpotentials

Das Gleichgewichtspotential ( $U_{rev}$ ) gibt die Spannung an, bei der kein Strom mehr zwischen zwei Kompartimenten fließt und sich der Ionen-Influx und -Efflux ausgleicht. Für Kaliumionen kann dieses Gleichgewichtspotential  $E_{Kalium}$  theoretisch mit Hilfe der Nernst-Gleichung ermittelt werden, wenn der Ionenkonzentrationsgradient über die Membran bekannt ist:

$$E_{Kalium} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} * \ln \frac{K_{au\beta en}^+}{K_{innen}^+} \quad [7]$$

Dabei steht R für die allgemeine Gaskonstante, T für die absolute Temperatur, z für die Wertigkeit des Ions und F für die Faraday-Konstante. Das Nernstpotential  $E_{Kalium}$  ändert sich linear mit der absoluten Temperatur (T) und logarithmisch mit dem Verhältnis der Ionenkonzentrationen der inter- und extrazellulären Seite.

Das Umkehrpotential dagegen wird experimentell bestimmt. Dafür wurden die Kanäle - wie beim Doppelspannungspulsprotokoll (Kap. 2.1.7.2) beschrieben - voraktiviert. Anschließend wurden unterschiedliche Spannungen appliziert, die nahe dem Umkehrpotential lagen. Bei der Analyse des Umkehrpotentials wurde wie auch bei der relativen Offenwahrscheinlichkeit die Eigenschaft der Ionenkanäle ausgenutzt, langsam mit einer Deaktivierung auf eine Spannungsänderung zu reagieren. In einem definierten Zeitintervall  $\Delta t$  wurde die Steigung der relaxierenden *Tail*-Ströme ( $I_{tail}$ ) analysiert (Abbildung 17A) und gegen die applizierte Messspannung  $U_M$  aufgetragen (Abbildung 17B). Der Schnittpunkt der Ausgleichsgerade mit der x-Achse zeigt das Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) an.

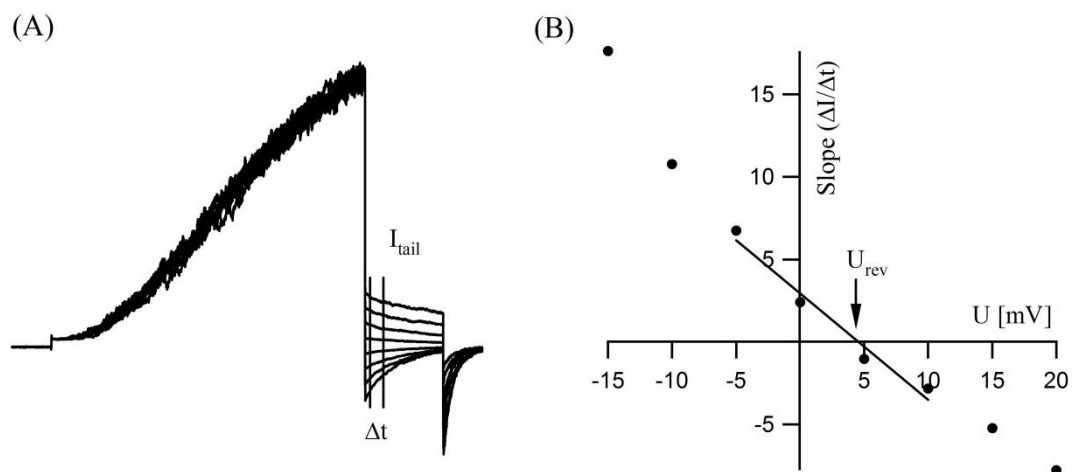


Abbildung 17: Bestimmung des Umkehrpotentials. (A) Dargestellt sind die *Tail*-Ströme ( $I_{tail}$ ) der SV-Kanäle nach deren Voraktivierung. Im Zeitintervall  $\Delta t$  wurde die Steigung (*Slope*) der relaxierenden Ströme bestimmt. (B) Die ermittelte Steigung wurde gegen die Spannung aufgetragen und die Punkte nahe der x-Achse mit einer Geradengleichung interpoliert. Der Schnittpunkt der x-Achse gibt das Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) an.



Liegt das experimentell ermittelte Umkehrpotential im Vergleich mit dem berechneten Nernstpotential nahe zusammen, ist dies ein Hinweis darauf, dass der Kanal für das Ion permeabel ist.

### 2.1.9 Bestimmung der relativen Permeabilitäten

Die relative Permeabilität für einwertige Kationen  $P_{Na^+}/P_{K^+}$  wurde unter der Annahme von biionischen Bedingungen aus den Umkehrpotentialen  $U_{rev}$  mit Hilfe der Goldman-Hodgin-Katz Spannungsgleichung (Goldman, 1943) berechnet.

$$U_{rev} = (RT/F) * \ln \left[ \frac{P_{Na^+}[Na^+]_a + P_{K^+}[K^+]_a}{P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{K^+}[K^+]_i} \right] \quad [8]$$

Die relativen Permeabilitäten des SV-Kanals für  $P_{Ca^{2+}}:P_{K^+}$  wurden ebenso mit der Goldman-Hodgin-Katz Spannungsgleichung (Goldman, 1943) berechnet. Fairley-Grenot und Assmann (1992) modifizierten diese Gleichung für Kanäle, die für monovalente als auch für divalente Ionen permeabel sind:

$$U_{rev} = (RT/F) * \ln \left[ \frac{- (K_i - K_a) + \sqrt{(K_i - K_a)^2 - 4 (K_i + 4 (P_{Ca}/P_K) * Ca_i) * (-K_a - 4 (P_{Ca}/P_K) * Ca_a)}}{2 * (K_i + 4 (P_{Ca}/P_K) * Ca_i)} \right] \quad [9]$$

Dabei steht R für die allgemeine Gaskonstante, T für die absolute Temperatur und F für die Faraday-Konstante.  $K_{i(Cytosol)}$ ,  $K_{a(Vakuole)}$ ,  $Ca_{i(Cytosol)}$  und  $Ca_{a(Vakuole)}$  stehen jeweils für die  $K^+$  und  $Ca^{2+}$  Konzentrationen, die bei der Bestimmung des Umkehrpotentials verwendet wurden (Kap. 2.1.8.5).

### 2.1.10 Messlösungen

Für die Herstellung der Messlösungen wurde ausschließlich entsalztes Wasser verwendet. Alle Bad- und Pipettenlösungen für Versuche an Mesophyll- oder Schließzellvakuolen von *A. thaliana* wurden auf eine Osmolalität von  $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$  eingestellt. Die Osmolalität wurde anhand eines Osmometers (Vapor Pressure Osmometer, 5520, Wescor, Vapro) überprüft. Zum Einstellen des pH-Wertes wurde ein digitales pH-Messgerät (Digital-pH-Meter 646, Knick) verwendet. Die verwendeten Chemikalien hatten p.A.-Qualität und wurden von den Firmen Sigma (München, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Die gewünschte freie  $Ca^{2+}$ -Konzentration wurde mit Hilfe der Website WEBMAXC standard (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.html>) berechnet. Durch die Auswahl eines bestimmten  $Ca^{2+}$ -EGTA-Verhältnisses wurden die Lösungen entsprechend eingestellt. Für die Einstellung der freien  $Ca^{2+}$ -Konzentration wurden

Stocklösungen herangezogen (100 mM und 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , Sigma; 5 mM EGTA/Tris pH 7,5), welche zur Vermeidung von Pipettierfehlern auf einer Feinwaage eingewogen wurden. Dabei wurde bei einem pH-Wert von 7,5 die in Tabelle 1 aufgeführten  $\text{CaCl}_2$ - und EGTA-Konzentrationen gewählt.

Tabelle 1:  $\text{CaCl}_2$ - und EGTA-Konzentrationen zum Einstellen der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in den Messlösungen bei pH 7,5

freie $[\text{Ca}^{2+}]$ mM	$[\text{CaCl}_2]$ mM	$[\text{EGTA}]$ mM
0	0	2,0
0,01	4,9	4,912
0,05	4,9	4,855
0,1	5,0	4,9
0,2	4,2	4,0
0,3	4,3	4,0
0,5	4,5	4,0
1,0	5,0	4,0

Bei Messlösungen mit einem pH-Wert von 5,5 wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten  $\text{CaCl}_2$ - und EGTA-Konzentrationen eingesetzt:

Tabelle 2:  $\text{CaCl}_2$ - und EGTA-Konzentrationen zum Einstellen der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in den Messlösungen bei pH 5,5

freie $[\text{Ca}^{2+}]$ mM	$[\text{CaCl}_2]$ mM	$[\text{EGTA}]$ mM
0	0	2
0,1	5	4,5

Die genaue Zusammensetzung der Messlösungen ist in den nachfolgenden Kapiteln 2.1.10.1 bis 2.1.10.5 aufgeführt.

**2.1.10.1 Messlösung zur SV-Kanalregulation mit 14-3-3 Proteinen**Badlösung

50 mM KCl  
 1 mM freies  $\text{Ca}^{2+}$  (siehe Kap. 2.1.10)  
 10 mM Hepes/Tris pH 7,4  
 2 mM DTT  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$  (D-Sorbitol)

Pipettenlösung

100 mM KCl  
 100  $\mu\text{M}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$  (siehe Kap. 2.1.10)  
 2 mM  $\text{MgCl}_2$   
 10 mM Hepes/Tris pH 7,4  
 2 mM DTT  
 $\pi = 420 \text{ mosmol kg}^{-1}$  (D-Sorbitol)

**2.1.10.2 Messlösungen für Experimente an der fou2-Mutante**(A) Badlösung

100 mM KCl  
 1 mM freies  $\text{Ca}^{2+}$   
 (siehe Kap. 2.1.10)  
 10 mM Hepes/Tris pH 7,5  
 2 mM DTT  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$  (D-Sorbitol)

Pipettenlösung

100 mM KCl  
 0, 100  $\mu\text{M}$  oder  
 1000  $\mu\text{M}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$  (siehe Kap. 2.1.10)  
 2 mM  $\text{MgCl}_2$   
 10 mM Hepes/Tris pH 7,5  
 2 mM DTT  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$  (D-Sorbitol)

(B) Badlösung

100 mM KCl  
 1 mM freies  $\text{Ca}^{2+}$   
 (siehe Kap. 2.1.10)  
 10 mM Hepes/Tris pH 7,5  
 2 mM DTT  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$  (D-Sorbitol)

Pipettenlösung

100 mM KCl  
 100  $\mu\text{M}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$  (siehe Kap. 2.1.10)  
 2 mM  $\text{MgCl}_2$   
 10 mM Mes/Tris pH 5,5  
 2 mM DTT  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$  (D-Sorbitol)

(C) Badlösung

100 mM KCl  
 1 mM freies  $\text{Ca}^{2+}$   
 (siehe Kap. 2.1.10)  
 10 mM Hepes/Tris pH 7,5  
 2 mM DTT  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$  (D-Sorbitol)

Pipettenlösung

100 mM KCl  
 100  $\mu\text{M}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$  (siehe Kap. 2.1.10)  
 2 mM  $\text{MgCl}_2$   
 10 mM Hepes/Tris pH 7,5 oder  
 10 mM Mes/Tris pH 6,5 oder 5,5 oder  
 1 mM Citrat/Tris pH 4,5  
 2 mM DTT  
 $\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$  (D-Sorbitol)

(D) <u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
100 mM KCl	100 mM KCl
1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ oder	100 $\mu\text{M}$ freies $\text{Ca}^{2+}$ (siehe Kap. 2.1.10)
0,2 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ oder	2 mM $\text{MgCl}_2$
0,3 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ oder	10 mM Hepes/Tris pH 7,5
0,5 mM freies $\text{Ca}^{2+}$	2 mM DTT
(siehe Kap. 2.1.10)	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	
2 mM DTT	
$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)	

(E) <u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
150 mM KCl oder	150 mM KCl
30 mM KCl oder	2 mM EGTA
14 mM $\text{CaCl}_2$	2 mM $\text{MgCl}_2$
1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$	10 mM Hepes/Tris pH 7,5
(siehe Kap. 2.1.10)	2 mM DTT
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)
2 mM DTT	
$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)	

### 2.1.10.3 Messlösungen für SV-Kanal-Messungen an Schließzellvakuolen

(A) <u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
150 mM KCl oder	150 mM KCl
30 mM KCl	2 mM EGTA
1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$	2 mM $\text{MgCl}_2$
(siehe Kap. 2.1.10)	10 mM Hepes/Tris pH 7,5 oder
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	10 mM Mes/Tris pH 5,5
2 mM DTT	2 mM DTT
$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)

(B) <u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
100 mM KCl	100 mM KCl
1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$	2 mM EGTA
(siehe Kap. 2.1.10)	2 mM $\text{MgCl}_2$
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	10 mM Hepes/Tris pH 7,5
2 mM DTT	2 mM DTT
$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)
(C) <u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
150 mM KCl	150 mM KCl
1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$	2 mM EGTA
(siehe Kap. 2.1.10)	2 mM $\text{MgCl}_2$
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	10 mM Hepes/Tris pH 7,5 oder
2 mM DTT	10 mM Mes/Tris pH 5,5
$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)	2 mM DTT
	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)
(D) <u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
100 mM KCl	100 mM KCl
1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ oder	100 $\mu\text{M}$ freies $\text{Ca}^{2+}$ (siehe Kap. 2.1.10)
0,5 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ oder	2 mM $\text{MgCl}_2$
0,3 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ oder	10 mM Hepes/Tris pH 7,5
0,2 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ oder	2 mM DTT
0,1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ oder	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)
0,05 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ oder	
0,01 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ oder	
0 mM freies $\text{Ca}^{2+}$	
(siehe Kap. 2.1.10)	
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	
2 mM DTT	
$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)	

(E) <u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
100 mM KCl	100 mM KCl
1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ (siehe Kap. 2.1.10)	2 mM EGTA oder 1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ (siehe Kap. 2.1.10)
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	2 mM $\text{MgCl}_2$
2 mM DTT	10 mM Hepes/Tris pH 7,5
$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)	2 mM DTT
	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)
(F) <u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
15 mM $\text{CaCl}_2$	150 mM KCl
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	2 mM EGTA
2 mM DTT	2 mM $\text{MgCl}_2$
$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)	10 mM Hepes/Tris pH 7,5 oder 10 mM Mes/Tris pH 5,5
	2 mM DTT
	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)
(G) <u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
30 mM KCl oder 30 mM NaCl	150 mM KCl oder 150 mM NaCl
1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ (siehe Kap. 2.1.10)	2 mM EGTA
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	2 mM $\text{MgCl}_2$
2 mM DTT	10 mM Hepes/Tris pH 7,5
$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)	2 mM DTT
	$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (D-Sorbitol)

#### 2.1.10.4 Messlösungen für die Bestimmung von Pumpströmen

<u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
100 mM KCl	100 mM KCl
1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ (siehe Kap. 2.1.10)	1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ (siehe Kap. 2.1.10)
5 mM $\text{MgCl}_2$	5 mM $\text{MgCl}_2$
10 mM Hepes/Tris pH 7,5	10 mM Hepes/Tris pH 7,5
2 mM DTT	2 mM DTT

$$\pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1} \text{ (D-Sorbitol)} \quad \pi = 400 \text{ mosmol kg}^{-1} \text{ (D-Sorbitol)}$$

Die Messlösungen wurden mit 5 mM MgATP und 150  $\mu$ M Pyrophosphat aus Stocklösungen versetzt und der pH-Wert überprüft. Die Stocklösungen bestanden aus 0,5 M MgATP und 0,5 M Tris bzw. 100 mM Kaliumpyrophosphat, welche zuvor in der Badlösung gelöst wurden.

#### 2.1.10.5 Messlösungen für die Charakterisierung von Zuckertransportern

<u>Badlösung</u>	<u>Pipettenlösung</u>
190 mM KCl	190 mM KCl
1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ (siehe Kap. 2.1.10)	1 mM freies $\text{Ca}^{2+}$ (siehe Kap. 2.1.10)
2 mM $\text{MgCl}_2$	2 mM $\text{MgCl}_2$
10 mM Hepes/Tris pH 7,5 oder 10 mM Mes/Tris pH 5,5	10 mM Hepes/Tris pH 7,5 oder 10 mM Mes/Tris pH 5,5

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)

Bei der Arbeit mit Ribonukleinsäuren wurden ausschließlich sterile Materialien, sowie RNase-freie Lösungen verwendet. Das Wasser wurde mit 1 ml/l DEPC behandelt und autoklaviert.

#### 2.2.1.1 Isolierung von mRNA

Die Isolierung von mRNA aus Mesophyllzellen oder Schließzellen erfolgte mit Hilfe des Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> Kit (Dyna, Carlsbad, Californien, USA). Die mRNA wurde nach Anweisung des Herstellers zweifach mit Dynabeads aufgereinigt. Das dabei verwendete Pflanzenmaterial wurde wie unter Kapitel 2.1.2.1 und Kapitel 2.1.2.2 beschrieben aufbereitet und in einem vorbereitetem 1,5 ml Reaktionsgefäß, welches 2 Mörserkugeln enthielt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurde das Material in einer Schwingmühle (MM300, Retsch, Haan, Deutschland) für 2 mal 90 s gemahlen.

#### 2.2.1.2 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription (RT) wurde eine komplementäre cDNA (engl.: *copy DNA*) hergestellt. Dabei wurde ein Oligo-dT-Primer verwendet, der mit dem 3'-PolyA-Bereich der isolierten mRNA hybridisierte. Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase aus

Retroviren schrieb die Information der mRNA in cDNA um. Dafür wurde folgender Standardreaktionsansatz verwendet:

6,7 µl mRNA	0,5 µl dNTPs (10 mM)
0,4 µl Oligo-dT-Primer (100 µM)	2,0 µl RT-Puffer (5x, Promega)

Die mRNA wurde bei 70°C für 2 min denaturiert und danach sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurde 0,4 µl M-MLV-Reverse Transkriptase (100 U/µl, engl.: *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, Promega, Mannheim, Deutschland) hinzupipettiert und der Ansatz für 60 min bei 42°C inkubiert. Nach der Synthese wurde die cDNA bei -80°C gelagert.

## 2.2.2 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

### 2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion können *in vitro* spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Sie basiert auf drei Reaktionsschritten, die vielfach wiederholt ablaufen. Dabei wird ein Reaktionsansatz, der eine Mischung von DNA-Molekülen sowie die zu amplifizierende DNA enthält, bei 94°C denaturiert. Nach Abkühlung auf die Primer-Hybridisierungstemperatur hybridisieren diese mit den komplementären Basensequenzen der Ausgangs-DNA. Beim dritten Reaktionsschritt füllt die DNA-Polymerase (PfuX, Stratagene, CA, USA), beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers, die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Dieser Schritt wird als Elongation oder Amplifikation bezeichnet. Am Ende erhält man eine exponentielle Amplifikation der Ausgangs-DNA. In dieser Arbeit wurde folgender Standardreaktionsansatz verwendet:

1 µl DNA-Template (~10 ng)	2,5 µl antisense Primer (10 µM)
5 µl Reaktionspuffer (10x)	0,25 U DNA-Polymerase
1 µl dNTPs (10 mM)	Ad 50 µl H <sub>2</sub> O
2,5 µl sense Primer (10 µM)	

Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden folgende Bedingungen gewählt:



Tabelle 3: PCR-Programm des Thermocyclers

Initiale Denaturierung	2 min	96°C	
Denaturierung	30 s	96°C	} 22-35 x
Primer-Hybridisierung	30 s	spez. für Primerpaar	
Amplifikation	je nach Länge	72°C	
Finale Elongation	5 min	72°C	

### 2.2.2.2 Gelelektrophorese von DNA

Die Größenfraktionierung von DNA im Agarosegel mittels Elektrophorese beruht auf der Wanderung der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld zur Anode. Maßgebend für die Trennschärfe ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente, die von der Größe der Moleküle und dem Vernetzungsgrad des Trägermaterials abhängt. Bei den Trägersystemen handelt es sich um Agarosegele, deren Agarosegehalt je nach Fragmentlänge variiert. Fragmente von 400-800 Bp wurden in einem 2%igen Gel aufgetrennt, kleinere Fragmente in einem 3%igen und größere in einem 1%igen Agarosegel. Um die DNA-Fragmente sichtbar machen zu können, wurden die Agarosegele mit 100 ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelix der DNA und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 260-360 nm. Zur Fraktionierung der DNA wurde die Probe mit 5x DNA-Gel-Ladungspuffer versetzt:

0,25 % Bromphenolblau (w/v)	50 % Glycerin (w/v)
0,25 % Xylencyanol (w/v)	100 mM EDTA

Als Laufpuffer und Gelpuffer wurde 1x TBE (**T**ris-**B**orat-**E**DTA) verwendet.

100 mM Tris-HCl (pH 8,3)

90 mM Borsäure

1 mM EDTA

Die Dokumentation der DNA-Banden im Agarosegel erfolgte photographisch unter UV-Licht (Intas UV Imager, Intas UV-Systeme). Als Größenstandard diente  $\lambda$ -DNA (Fermentas), die vollständig mit PstI verdaut worden war ( $\lambda$ -PST-Standard).

### 2.2.2.3 Aufreinigung von DNA

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld können gewünschte Banden aus dem Agarosegel eluiert werden. Die Stücke wurden auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgetrennt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNA erfolgte nach dem Protokoll für das „Gel Extraction

Kid“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Wenn bei der Kontrolle von PCR-Produkten nur eine Bande im Agarosegel sichtbar war, erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produktes direkt aus dem PCR-Ansatz mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Die DNA wurde in sterilem Wasser aufgenommen und zur Abschätzung der Konzentration ein verdünntes Aliquot mittels Elektrophorese im Agarosegel aufgetrennt.

#### **2.2.2.4 Sequenzierung und Sequenzanalyse**

Die Sequenzierungsreaktionen beruhen auf der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Bei der nicht-radioaktiven Sequenzierung wird die DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, durch einen Laser angeregt und gemessen. Dieses Verfahren wird auch ALF-Verfahren (engl.: *automated laser fluoreszenz*) genannt. Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Melanie Pappenfuß und Brigitte Neumann im Sequenzierlabor der Botanik I des Julius-von-Sachs-Instituts an einem automatischen Sequenzierer (3100-/Avant/ Genetic Analyzer; APPLIED BIOSYSTEMS, <http://www.appliedbiosystems.com>) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden zuvor konstruierte Primer verwendet, die entsprechend der jeweiligen DNA komplementär waren (Tabelle 4). Alle Sequenzierungen erfolgten mit aufgereinigter DNA. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm VectorNTI (Invitrogen, InforMax, Karlsruhe).

Tabelle 4: Sequenzierprimer

Name	Sequenz	T °C
TPC1 user fwd	GGCTTAATATGGAAGACCCGTTGATTGG	63
TPC1 user rev	GGTTTAATTCATGTGTCAGAAGTGAACACTC	57
TPC1 1-594 rev	CCAAAAGATTTCGGGAACCTTCA	63
TPC1 250-843 fwd	CCTTAACTTCTTCGAGCAACCATTGTGG	63
TPC1 250-843 rev	GCTGCGTGTCTCAAACATAACAAAAGC	55
TPC1 496-1089 fwd	GTTGATGTGCTGGTTGACTTTCTG	56
TPC1 496-1089 rev	GCTTTGCGAGCTGTTCTTTGAA	58
TPC1 708-1245 fwd	TTGTTATGTTTGAGGACACGCAGC	56
TPC1 708-1245 rev	GAGGTCAGCAAACATCCTTGTT	60
TPC1 1090-1683 fwd	AGACTCAGACAAAAACGGGGAGATTG	55
TPC1 1090-1683 rev	CGGATCCATTCTCCATTTGAGA	55
TPC1 1486-2079 fwd	GAGAGGGTGCTAACCGATTTGAT	56
TPC1 1486-2079 rev	CCGTCAAATCTTTGTAGCTCTCCA	61
TPC1 1684-2218 fwd	GCCATATTTAGGGACCATTTTCTGCG	62

### 2.2.2.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (engl.: *real-time-PCR*, RT-PCR) ermöglicht die quantitative Darstellung der Kinetik und des Ergebnisses einer PCR-Reaktion (Rasmussen et al., 1998). Die Menge der Amplifikate wird über eine Fluoreszenz-Detektion bestimmt. Aufgrund selektiver Interkalierung von SYBR<sup>®</sup> Green I (ABgene<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific Inc.) in die während der PCR entstehenden DNA-Doppelstränge nimmt die Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der PCR proportional zur DNA-Konzentration zu. Somit können Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der Transkripte gezogen werden.

Die Primer für die quantitative PCR wurden freundlicherweise von Dr. Peter Ache entworfen und anschließend von der Firma TIBMolBiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Die Messungen wurden von Melanie Pappenfuß und Brigitte Neumann im LightCyclerlabor der Botanik I des Julius-von-Sachs-Instituts der Universität Würzburg durchgeführt. Als Matrize für die RT-PCR wurde cDNA aus Schließzellen und Meso-

phyllzellen verwendet (Kap. 2.2.1.1 und 2.2.1.2), die vorher 1:10 mit PCR-H<sub>2</sub>O verdünnt wurden.

Zur Quantifizierung der erhaltenen Daten wurden die genspezifischen Signale auf die in den Proben enthaltenen Ausgangsmengen an konstitutiv exprimiertem Aktin bezogen. Dafür wurden in jeder Probe zusätzlich zu den genspezifischen Primern Fragmente der Aktine AtAct2 und AtAct8 amplifiziert.

Tabelle 5: RT-PCR Primer

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> °C
TPC1fwd	5'-CTGTGTATCTACTGCTC-3'	29
TPC1rev	5'-ACGAAATATGTAATGCTC-3'	36
VHA-a2 LCfw	5'-TGTTCCGATGTATCAGA-3'	37
VHA-a2 LCrv	5'-CAAATGGGAATTTTACCT-3'	41

### 2.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX; engl.: *energy dispersive X-ray spectroscopy*) nutzt emittierte Röntgenstrahlung um die Zusammensetzung von Geweben zu bestimmen. Jedes in der Probe enthaltene Element lenkt auftreffende Elektronen unterschiedlich ab und generiert somit spezifische Signale. Anhand dieser Signale können enthaltene Elemente semi-quantitativ bestimmen werden.

Analysiert wurde die elementare Zusammensetzung von Schließzell- und Mesophyllzellvakuolen sowie des Cytosols. Dazu wurden 7-8 Wochen alte intakte Mesophyllblätter in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet (Alpha 1-2, Christ, Osterode, Deutschland). Die EDX-Analysen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jörg Fromm der Universität Hamburg, Zentrum Holzwirtschaft, Deutschland durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 V-ATPase und Pyrophosphatase

#### 3.1.1 ATP- und Pyrophosphat-induzierte Pumpströme bei *A. thaliana* WT-Vakuolen

In der pflanzlichen Vakuolen wird ein pH-Gradient und ein elektrisches Potential durch die Protonenpumpen V-ATPase und Pyrophosphatase (PPase) über die Membran aufgebaut (Rea und Sanders, 1987; Hedrich und Schroeder 1989). Unter Verbrauch von ATP und Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) werden dabei Protonen (H<sup>+</sup>) aus dem Cytosol in die Vakuole transportiert. In früheren *Patch-Clamp*-Experimenten wurden entsprechende durch ATP und PP<sub>i</sub> induzierte Pumpströme an Zuckerrübenvakuolen gemessen. Dabei konnte für ATP ein K<sub>m</sub>-Wert von 0,6 mM, für PP<sub>i</sub> ein K<sub>m</sub>-Wert von 15-20 μM bestimmt werden (Hedrich et al., 1989).

In dieser Arbeit sollten ebenfalls ATP- und PP<sub>i</sub>-induzierte Pumpströme mittels *Patch-Clamp*-Technik an Vakuolen von *A. thaliana* studiert werden. Dazu wurden Mesophyllprotoplasten von fünf Wochen alten Arabidopsispflanzen isoliert (Kap. 2.1.2.1) und die Vakuolen mittels eines osmotischen Schocks freigesetzt (Kap. 2.1.3). Nach Durchbruch von der *Vacuole-attached*-Konfiguration in die *Whole-vacuolar*-Konfiguration (Kap. 2.1.4.5) äquilibriert die Pipettenlösung mit dem Vakuoleninneren. Durch den Einsatz von gleicher Bad- und Pipettenlösung (100 mM KCl, 1 mM Ca<sup>2+</sup>, 5 mM Mg<sup>2+</sup>, pH 7,5; Kap. 2.1.10.4) wurde kein Ionengradient vorgegeben und somit Ionenströme durch geöffnete Ionenkanäle ausgeschlossen. Die Stromantworten wurden bei einer angelegten Membranspannung von 0 mV aufgezeichnet. Das zu applizierende Substrat (MgATP und Kaliumpyrophosphat) wurde mittels Peristaltikpumpen in die Messkammer gespült und so an die Vakuole appliziert. Nach Zugabe von 150 μM PP<sub>i</sub> bzw. 5 mM ATP konnte eine Zunahme der makroskopischen Stromamplitude beobachtet werden (Abbildung 18), welche nach Auswaschen des PP<sub>i</sub> und ATP reversibel war und vollständig auf das Ausgangsniveau zurückging (Daten nicht gezeigt).

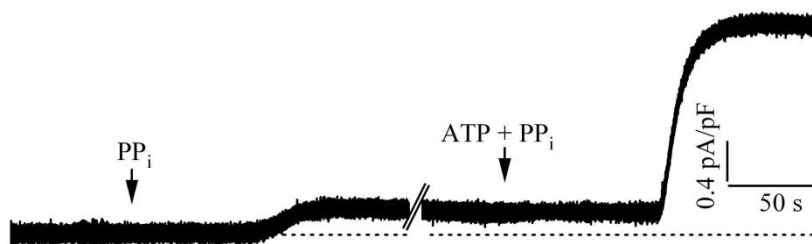


Abbildung 18:  $\text{PP}_i$ - und ATP-induzierte makroskopische Ströme bei *A. thaliana* WT-Vakuolen. Die makroskopischen Ganzzellströme wurden vor und nach der Zugabe von  $150 \mu\text{M}$  Pyrophosphat ( $\text{PP}_i$ ) und  $5 \text{ mM}$  ATP bei einer Spannung von  $0 \text{ mV}$  aufgezeichnet. Die Pfeile geben den Zeitpunkt des Perfusionsstarts an. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.4.

Um unterschiedlich große Vakuolen miteinander vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Stromdichten ( $I/C_m$ ) ermittelt, indem die Substrat(ATP/ $\text{PP}_i$ )-induzierte Nettostromzunahme ( $I_{\text{netto}} = I_{+\text{Substrat}} - I_{\text{Substrat}}$ ) ermittelt und durch die am Verstärker bestimmten Membrankapazitäten ( $C_m$ ) dividiert wurden (Kap. 2.1.4.6). Wie schon zuvor von Hedrich et al. (1989) beschrieben, fielen die durch  $150 \mu\text{M}$  Pyrophosphat-induzierten Nettostrome geringer aus als die durch  $5 \text{ mM}$  ATP hervorgerufenen Ströme. Die durchschnittliche Nettostromzunahme bei einer Membranspannung von  $0 \text{ mV}$  betrug nach Applikation von  $5 \text{ mM}$  ATP  $2,3 \pm 0,3 \text{ pA/pF}$ , während nach Zugabe von  $150 \mu\text{M}$   $\text{PP}_i$  lediglich eine Stromzunahme von  $0,19 \pm 0,03 \text{ pA/pF}$  ermittelt wurde (Abbildung 19).

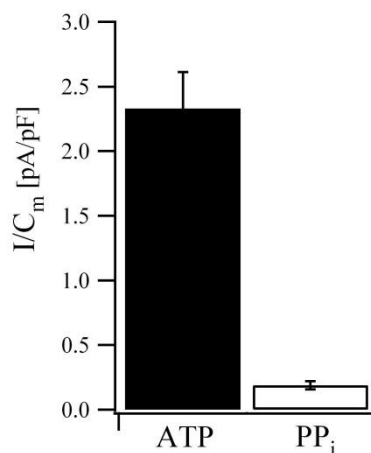


Abbildung 19: Vergleich der durch  $5 \text{ mM}$  ATP- und  $150 \mu\text{M}$   $\text{PP}_i$ -induzierten Stromdichte bei *A. thaliana* WT-Vakuolen. Die mittleren Stromdichten wurden aus fünf separaten ATP- und drei  $\text{PP}_i$ -Messungen berechnet. Die Fehlerbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen wieder.

Die Applikation von sowohl ATP als auch von  $\text{PP}_i$  auf die cytoplasmatische Seite der Vakuole induzierte einen positiven Strom (Abbildung 18), welcher nach Bertl et al. (1992) durch den Ausstrom von positiv geladenen Teilchen (z. B.  $\text{H}^+$ -Ionen) aus dem Cytosol in den Außenraum, in diesem Fall in die Vakuole, vermittelt werden kann (Kap.

2.1.5). In früheren Studien wurde neben einer Zunahme der Stromantwort ein Ansäuern des vakuolären Lumens aufgezeigt (Hedrich et al., 1989; Leigh und Pope, 1987), was ebenfalls auf einen Transport von  $H^+$ -Ionen in das vakuoläre Lumen schließen lässt. Um zu beweisen, dass es sich bei den ATP-induzierten Strömen tatsächlich um einen  $H^+$ -Transport vermittelt durch die V-ATPase handelt, wurde ein spezifischer V-ATPase-Inhibitor, Concanamycin A (ConA), nach Perfusion von 5 mM ATP zugegeben. Concanamycin A ist ein Plecomacrolid Antibiotikum. Es bindet an die Ionen-translozierende C Untereinheit des  $V_0$ -Komplexes und inhibiert die V-ATPase bereits ab mikromolaren Konzentrationen effektiv (Dröse et al., 1993; Dröse und Altendorf, 1996; Huss et al., 2002) Der Pumpstrom der V-ATPase von *Manduca sexta* wurde bereits durch 10 nM cytosolisches Concanamycin A um 50% gehemmt (Huss et al., 2002). Um eine vollständige Inhibition der V-ATPase zu erreichen, wurde in den weiterführenden Experimenten eine höhere Konzentration von Concanamycin A (2 mal 10  $\mu$ M) eingesetzt. Der experimentelle Aufbau wurde so gestaltet, dass die Messlösung mit 5 mM ATP mittels Peristaltikpumpe in die Messkammer gespült und ein permanenter ATP-Fluss aufrechterhalten wurde. Nachdem das ATP die Vakuole erreichte wurde eine schnelle Zunahme des Pumpstroms sichtbar (Abbildung 20). Anschließend wurde bei ausgesetzter Badperfusion mittels einer Eppendorfpipette Concanamycin A in die Badlösung nahe der zu messenden Vakuole zugegeben. Nach zweifacher cytosolischer Applikation von 10  $\mu$ M Concanamycin A ging der Strom vollständig auf das Ausgangsniveau zurück.

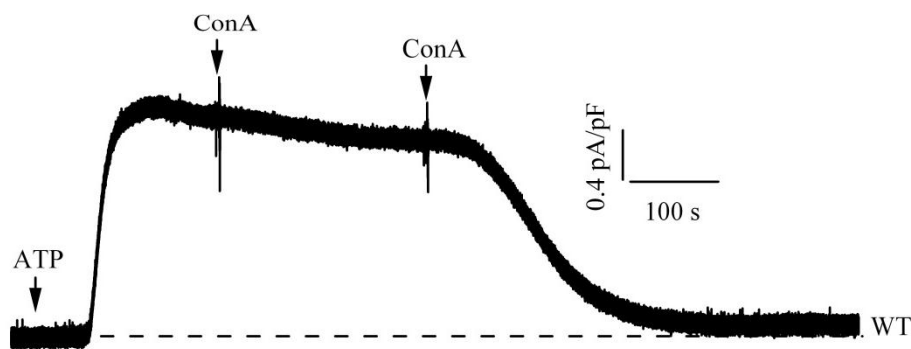


Abbildung 20: Concanamycin A-abhängige Hemmung der V-ATPase-Aktivität von WT-Vakuolen. Nach Zugabe von 20  $\mu$ M Concanamycin A (ConA) fielen die ATP-induzierten Ströme nahezu auf die Höhe des Ausgangstroms (gestrichelte Linie) vor ATP (5 mM)-Zugabe ab. Die Pfeile kennzeichnen den Beginn der ATP-Perfusion sowie die Zeitpunkte bei denen jeweils 10  $\mu$ M Concanamycin A in die Messkammer pipettiert wurde. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.4. Die angelegte Membranspannung lag bei 0 mV.

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei *A. thaliana* Mesophyllvakuolen nach Zugabe von ATP und  $PP_i$  Pumpströme generiert werden. Der durch ATP induzierte positive Strom konnte vollständig durch den V-ATPase-Inhibitor Concanamycin A geblockt werden.

### 3.1.2 Unterschiedliche V-ATPase Pumpströme beim WT und der *vha-a2-vha-a3*-Mutante

Im Genom von *A. thaliana* werden die V-ATPase Untereinheiten von verschiedenen Genfamilien kodiert (Hanitzsch et al., 2007; Sze et al., 2002). Die Isoformen der VHA-a Genfamilie werden ubiquitär exprimiert, sind aber in verschiedenen Geweben und Kompartimenten lokalisiert. VHA-a1 bleibt im Golgiapparat (Brüx et al., 2008), während VHA-a2 und VHA-a3 in die vakuoläre Membran transportiert werden (Dettmer et al., 2006). Der *A. thaliana* Doppelmutante *vha-a2-vha-a3* fehlen beide Isoformen der vakuolären VHA-a Untereinheiten des  $V_0$ -Komplexes (Krebs et al., 2010). Unter Kurztag-Anzuchtbedingungen (Kap. 2.1.1) weist diese Doppelmutante einen ausgeprägten Phänotyp mit einem stark reduzierten Rosettendurchmesser auf (Abbildung 21).



Abbildung 21: Phänotyp der *vha-a2-vha-a3*-Mutante. Es sind sechs Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen abgebildet (WT links; *vha-a2-vha-a3*-Mutante rechts), welche unter Kurztag-Anzuchtbedingungen kultiviert wurden (siehe Kap. 2.1.1).

Um zu überprüfen, inwieweit die *vha-a2-vha-a3*-Mutante eine V-ATPase-Aktivität aufweist, wurden erneut *Patch-Clamp*-Experimente in der *Whole-vacuolar*-Konfiguration durchgeführt und ATP-induzierte Pumpströme aufgezeichnet. Die Experimente wurden in Analogie zu denen in Kapitel 3.1.1 vorgestellten Versuchen durchgeführt. Unter symmetrischen Lösungsbedingungen (Kap. 2.1.10.4) wurde eine Membranspannung von 0 mV angelegt und die Stromantwort aufgezeichnet. Nach Erreichen einer stabilen Stromantwort wurde die Vakuole über das Perfusionssystem mit einer 5 mM ATP-haltigen Badlösung umspült. Sowohl bei Vakuolen des Wildtyps als auch der *vha-a2-vha-a3* Mutante konnte eine Zunahme der Stromantwort verzeichnet werden (Abbildung 22 A). Bei Vakuolen der *vha-a2-vha-a3* Mutante stieg die Stromantwort jedoch nur sehr gering an. Die mittleren ATP-induzierten  $H^+$ -Ströme der Doppelmutante ( $0,3 \pm 0,1$  pA/pF) betragen im Vergleich zum WT ( $2,3 \pm 0,3$  pA/pF) nur noch 13% (Abbildung 22B).



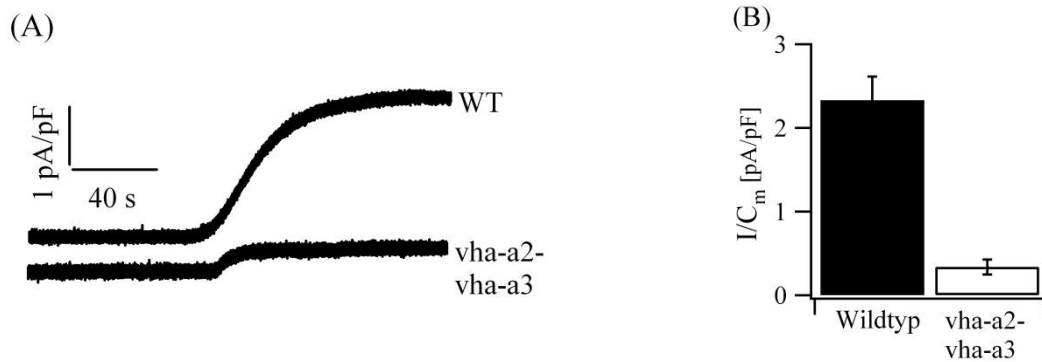


Abbildung 22: ATP-induzierte  $H^+$ -Ströme von WT- und *vha-a2-vha-a3*-Mesophyllvakuolen. (A) Die Ganzzellstromantworten von WT- und *vha-a2-vha-a3*-Vakuolen wurden während der Perfusion mit 5 mM ATP aufgezeichnet. Der Startpunkt der ATP-Perfusion liegt außerhalb der Darstellung. Die Messungen wurden bei einer Membranspannung von 0 mV durchgeführt. Lösungsbedingungen siehe Kapitel Kap. 2.1.10.4 durchgeführt. (B) Das Balkendiagramm repräsentiert die mittleren Stromdichten der ATP-induzierten  $H^+$ -Ströme von WT- und *vha-a2-vha-a3*-Vakuolen. Die mittleren Stromdichten wurden von Messungen ermittelt, welche denen aus Abbildung 22A vergleichbar waren. Die jeweiligen Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen aus  $n_{WT}=5$  und  $n_{vha-a2-vha-a3}=6$  durchgeführten Experimenten.

Zur weiteren Charakterisierung der *vha-a2-vha-a3*-Mutante wurde die Aktivität der V-ATPase auf die Applikation des V-ATPase-Inhibitors Concanamycin A hin untersucht. Im Gegensatz zu den ATP-induzierten Pumpströmen von WT-Vakuolen (Kap. 3.1.1, Abbildung 20) konnte der relativ geringe durch 5 mM ATP-induzierte positive Strom der *vha-a2-vha-a3* Mutante nicht durch 10  $\mu$ M des spezifischen V-ATPase Blockers Concanamycin A inhibiert werden. Selbst nach erneuter Applikation von 10  $\mu$ M Concanamycin A wurde kein Rückgang des ATP-ausgelösten makroskopischen Stroms beobachtet (Abbildung 23).

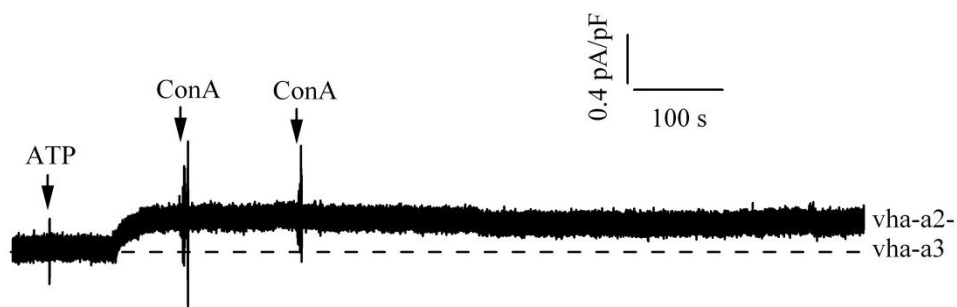


Abbildung 23: ATP-induzierte vakuoläre Ströme von der V-ATPase-Mutante *vha-a2-vha-a3* werden nicht durch eine zweifache Applikation von 10  $\mu$ M Concanamycin A (ConA) in das Badlumen inhibiert. Die gestrichelte Linie gibt die Höhe des Ausgangsstroms wieder. Die Pfeile zeigen den Startpunkt der Badperfusion mit 5 mM ATP bzw. die Zugabe von jeweils 10  $\mu$ M Concanamycin A in das Badlumen mittels einer Eppendorfpipette an. Die Stromaufzeichnung erfolgte bei einer Haltespannung von 0 mV. Lösungsbedingungen siehe Kap. 2.1.10.4.

### 3.1.3 Pyrophosphat und ATP-induzierte Pumpströme bei WT- und *vha-a2-vha-a3*-Vakuolen

Neben der V-ATPase verfügt die pflanzliche Vakuole über eine weitere  $H^+$ -Pumpe, die Pyrophosphatase. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die vakuoläre Pyrophosphatase die stark limitierten ATP-vermittelten Pumpströme der V-ATPase-Mutante *vha-a2-vha-a3* kompensieren kann. Aufgrund dessen wurden erneut *Patch-Clamp*-Experimente an isolierten Mesophyllvakuolen vom WT und der *vha-a2-vha-a3*-Mutante in der *Whole-vacuolar*-Konfiguration durchgeführt. Nach Äquilibration der Pipettenlösung mit dem Vakuoleninneren wurden die Ströme bei einer Haltespannung von 0 mV kontinuierlich abgeleitet. Zunächst wurden mit Hilfe der Badperfusion 150  $\mu$ M Pyrophosphat an die Vakuole appliziert. Nach Erreichen der maximalen Stromantwort wurden der Badlösung zusätzlich zu den 150  $\mu$ M Pyrophosphat 5 mM ATP zugesetzt. Die Pyrophosphatase der *vha-a2-vha-a3*-Mutante generierte einen Pumpstrom von  $0,23 \pm 0,02$  pA/pF, der mit dem von WT-Vakuolen vergleichbar war ( $0,19 \pm 0,03$  pA/pF, Abbildung 24A, B). Die *vha-a2-vha-a3*-Mutante zeigte jedoch nach anschließender Perfusion mit 150  $\mu$ M  $PP_i$  und 5 mM ATP keinen weiteren Anstieg der Stromantwort (Abbildung 24A). Bei alleiniger Zugabe von 5 mM ATP wurde dagegen eine Zunahme des Pumpstroms verzeichnet (vgl. Kap. 3.1.2, Abbildung 22).

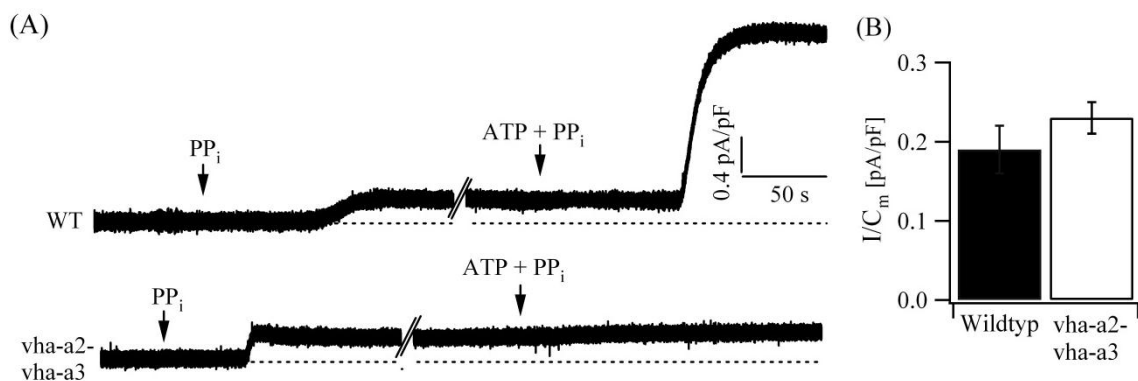


Abbildung 24:  $PP_i$ - und ATP-induzierte  $H^+$ -Ströme der Pyrophosphatase und V-ATPase von WT und der *vha-a2-vha-a3*-Mutante. (A) Makroskopische Ströme von WT (oben) und *vha-a2-vha-a3*-Vakuolen (unten) vor und nach der Zugabe von 150  $\mu$ M Pyrophosphat ( $PP_i$ ) und 5 mM ATP. Die Pfeile geben den Perfusionszeitpunkt mit  $PP_i$  bzw. ATP und  $PP_i$  an. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.4. (B) Das Balkendiagramm zeigt die durch  $PP_i$ -induzierten mittleren Stromdichten von WT- und *vha-a2-vha-a3*-Vakuolen. Die Mittelwerte wurden aus  $n_{WT}=3$  und  $n_{vha-a2-vha-a3}=5$  Experimenten berechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweiligen Standardabweichungen.

Zusammenfassend konnte mittels der *Patch-Clamp*-Messungen gezeigt werden, dass die vakuoläre Pyrophosphatase der *vha-a2-vha-a3*-Doppelmutante im Vergleich zum WT keine signifikant höhere Aktivität aufweist und somit nicht in der Lage ist, den V-ATPase-Defekt zu kompensieren.

### 3.1.4 Expressionsrate der V-ATPase und deren Pumpströme in Schließzellvakuolen von *A. thaliana*

Die vakuoläre V-ATPase in *A. thaliana* wird ubiquitär in allen Zelltypen und damit auch in den Schließzellvakuolen exprimiert. Dort wird die Stomaweite durch den Turgordruck vorgegeben, welcher unter anderem abhängig ist von der Konzentration der osmotisch aktiven Stoffe in der Vakuole. Da die V-ATPase maßgeblich daran beteiligt ist, den Protonengradient und das Membranpotential über die vakuoläre Membran zu generieren, könnte eine veränderte Transportaktivität der vakuolären V-ATPase in Schließzellvakuolen zu einer veränderten Funktion von membranständigen Kanälen und Transportern führen. Um dies zu überprüfen, wurde in den weiterführenden Experimenten zunächst die Transkriprate der vakuolären V-ATPase von Schließzellvakuolen im Vergleich zu Mesophyllvakuolen bestimmt. Hierzu wurden intakte Schließzell- und Mesophyllzellprotoplasten aus Blättern von acht Wochen alten Pflanzen gewonnen (Kap. 2.1.2). Die RNA wurde aus beiden Zelltypen isoliert und in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.2.1). Anschließend wurde die Anzahl der Transkripte des VHA-a2-Allels quantitativ über Echtzeit-PCR bestimmt (Kap. 2.2.1.1, 2.2.1.2 und 2.2.2.5). Da die V-ATPase aus mehreren Untereinheiten besteht, wurde das im Tonoplasten exprimierte VHA-a2-Allel stellvertretend für alle weiteren V-ATPase-Untereinheiten für die Quantifizierung ausgewählt. Dabei wurde eine 20,3-fach höhere Expressionsrate des VHA-a2-Allels in Vakuolen von Schließzellen ( $2461 \pm 880$  Transkripte pro 10000 Molekülen Aktin) im Vergleich zu Mesophyllzellen ( $121 \pm 27$  Transkripte pro 10000 Molekülen Aktin) ermittelt (Abbildung 25A). Dieser große Unterschied in der Expressionsstärke lässt eine höhere Pumpstromdichte vermuten. Deshalb wurden entsprechend dem Kapitel 3.1.2 *Patch-Clamp*-Messungen in der *Whole-vacuolar*-Konfiguration unter Einsatz symmetrischer Bad- und Pipettenlösungen (Kap. 2.1.10.4) an Schließzellvakuolen durchgeführt und mit den Messungen an Mesophyllvakuolen (Abbildung 22) verglichen. Nach Erreichen der *Whole-vacuolar*-Konfiguration und Äquilibration der Pipettenlösung wurden die Ganzzellströme bei einer Membranspannung von 0 mV abgeleitet. Nach Perfusion mit 5 mM ATP wiesen Schließzellvakuolen einen etwa 1,5-fach höheren mittleren Pumpstrom ( $3,5 \pm 0,1$  pA/pF, n=3) auf im Vergleich zu Mesophyllvakuolen ( $2,3 \pm 0,3$  pA/pF, n=5; Abbildung 25B). Dies lässt vermuten, dass in den spezialisierten Schließzellen die vakuoläre Membran mit Hilfe der V-ATPase stärker polarisiert werden kann.

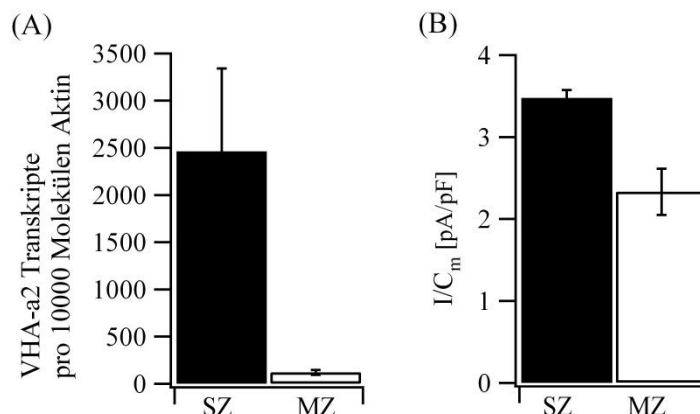


Abbildung 25: VHA-a2-Expression und Pumpstromdichte von Schließzell- und Mesophyllzellvakuolen. (A) Die Anzahl der VHA-a2-Transkripte pro 10000 Molekülen Aktin wurde von intakten Schließzellen (SZ) und Mesophyllzellen (MZ) mittels Echtzeit-PCR aus je  $n=3$  Messungen bestimmt. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen als Fehlerbalken angegeben. (B) Die Pumpstromdichte von Mesophyll- und Schließzellvakuolen wurde nach Perfusion mit 5 mM haltiger ATP-Messlösung in der *Whole-vacuole*-Konfiguration bestimmt. Lösungsbedingungen siehe Kapitel Kap. 2.1.10.4. Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus  $n_{SZ}=3$  und  $n_{MZ}=5$  Messungen.

## 3.2 Charakterisierung der AtINT1-Transporteigenschaften

Die V-ATPasen und Pyrophosphatasen nehmen nicht nur Einfluss auf die Funktionsweise von membranständigen Transportproteinen durch die Veränderung des Membranpotentials. Sie energetisieren durch den Aufbau eines  $H^+$ -Gradienten über die vakuoläre Membran auch sekundär aktive Transportsysteme. Diese gespeicherte Energie wird genutzt, um selektiv organische Verbindungen (z.B. Saccharose, Glukose) oder Ionen (z.B.  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ -Ionen) entgegen eines Konzentrationsgradienten zu transportieren. Sekundär aktive Transportproteine wie AtCLCa, ein  $NO_3^-/H^+$ -Antiporter (de Angeli et al., 2006) oder der  $K^+/H^+$ - und  $Na^+/H^+$ -Antiporter AtNHX1 (Leidi et al., 2010) konnten bereits an der vakuolären Membran identifiziert und charakterisiert werden.

In den weiterführenden Experimenten sollte nun erstmals der Transportmechanismus des putativen Inositoltransporters AtINT1 an isolierten Mesophyllvakuolen mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik elektrophysiologisch analysiert werden. Dabei wurden Messungen an *A. thaliana* WT sowie zweier Mutantenlinien *Atint1.1* und *Atint1.2*<sup>1</sup> durchgeführt, in denen kein funktionsfähiges AtINT1-Protein exprimiert wird. *Atint1.1* (SALK\_085400) und *Atint1.2* (SALK\_018591) beinhalten eine T-DNA-Insertion im INT1-Gen (Abbildung 26; Schneider et al. 2008). Während die T-DNA-Insertion der

<sup>1</sup> Die *Atint1*-Mutanten wurden freundlicherweise von Prof. Sauer (Universität Erlangen) zur Verfügung gestellt.

<sup>2</sup> Die *AtSUC4*-Überexprimierer und *Atsuc4.1*-Verlustmutanten wurden freundlicherweise von Prof.

*Atint1.2*-Mutante im ersten Exon liegt, ist die T-DNA-Insertion der *Atint1.1*-Mutante im dritten Intron des *AtINT1*-Gens lokalisiert. Beide T-DNA-Insertionen bewirken einen Verlust der vollständigen *AtINT1*-cDNA. Weitere RNA-Analysen zeigten jedoch, dass bei *Atint1.1*-Pflanzen *AtINT1*-mRNA bis hin zur T-DNA-Insertion synthetisiert und ein Teil des AtINT1-Proteins gebildet wird (Schneider et al., 2008). Wie die *Atint1.1*-Mutante wies auch die *Atint1.2*-Mutante eine verkürzte mRNA auf, welche *downstream* der Insertion mit der *AtINT1*-Sequenz übereinstimmt. Die *Atint1.2*-Transkriptmenge war jedoch geringer im Vergleich zum WT (Schneider et al., 2008).

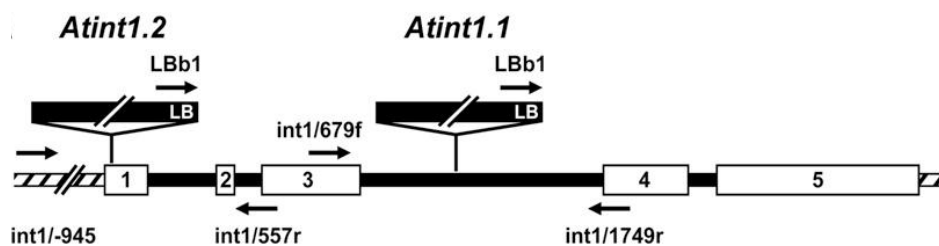
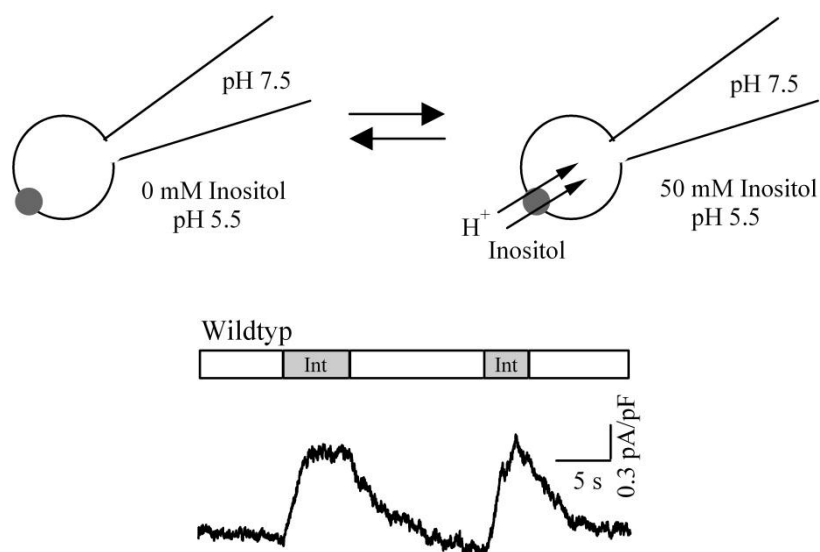


Abbildung 26: Schematische Darstellung des INT1-Gens. Durch weiße Kästchen wurden die Exons und durch schwarze Linien die Introns gekennzeichnet. Die gestrichelten Linien stellen die 5' und 3' flankierenden Regionen des INT1-Gens dar. Über dem Gen wurden die Positionen der T-DNA-Insertionen der *Atint1.1*-Pflanzen und der *Atint1.2*-Pflanzen vermerkt und die Bindestellen der für die Analysen verwendeten Primer aufgezeigt. Die Abbildung wurde der Publikation Schneider et al. (2008) entnommen.

Für die *Patch-Clamp*-Messungen wurden Protoplasten aus fünf Wochen alten Mesophyllblättern enzymatisch isoliert (Kap. 2.1.2.1) und die Vakuolen über einen osmotischen Schock freigesetzt (Kap. 2.1.3). Während den Messungen wurden die Vakuolen kontinuierlich über eine Peristaltikpumpe mit Badlösung gespült. Seitlich der Vakuole war eine dünne Glaskapillare an der Messapparatur angebracht, welche mit *myo*-inositolhaltiger Messlösung befüllt war und als zusätzliche Perfusionspipette diente (Kap. 2.1.4.2, 2.1.4.4). Das hintere Ende der Perfusions-Glaskapillare war über einen Schlauch mit einem Mundstück verbunden, so dass über manuelles Anlegen eines Überdrucks während der Messungen *myo*-inositolhaltige Lösung direkt an die Vakuole appliziert werden konnte.

Die elektrophysiologische Charakterisierung des AtINT1-Transporters wurde in der *Whole-vacuolar*-Konfiguration durchgeführt. Da in dieser Messkonfiguration weder der pH-Wert noch die Substratmenge im vakuolären Lumen zum Aufbau eines Gradienten und damit Antrieb des Inositol/ $H^+$ -Symports verändert werden konnte, wurden die Stromantworten auf *myo*-Inositolgabe unter inversen konstanten pH-Wert-Bedingungen (pH 5,5<sub>Cyt</sub>/pH 7,5<sub>Vak</sub>) gemessen. So demonstrierten frühere Studien (Marger und Saier, 1993), dass  $H^+$ -gekoppelte Symporter auch unter inversem Gradienten arbeiten können. Dies bedeutet, dass bei einem vakuolären Symporter unter entsprechenden Lösungsbe-

dingungen der  $H^+$ -gekoppelte Substratfluss nicht mehr natürlicherweise aus der Vakuole ins Cytosol, sondern aus dem Cytosol in die Vakuole gerichtet ist. Demzufolge kann über Variation des Badmediums ein substratgetriebener  $H^+$ -Fluss erzeugt werden. Eine hohe *myo*-Inositolkonzentration sollte somit den  $H^+$ -Symport von der cytosolischen auf die vakuoläre Seite ermöglichen. Nach Erreichen der *Whole-vacuole*-Konfiguration und Austausch der Pipettenlösung mit dem Vakuoleninneren wurde eine Spannung von 0 mV an die Membran angelegt und eine konstante Stromantwort zunächst in Abwesenheit von *myo*-Inositol abgewartet. Nach Applikation von 50 mM *myo*-Inositol über die Perfusionspipette auf die cytosolische Seite der vakuolären Membran konnte unmittelbar eine positive Stromantwort bei WT-Vakuolen aufgezeichnet werden, welche nach Beendigung der *myo*-Inositolgabe erneut auf das Ausgangsniveau zurückging (Abbildung 27, Mitte). Unter Berücksichtigung der Versuchsbedingungen und der Stromrichtung deutet dieses Ergebnis auf einen Inositol/ $H^+$ -gekoppelten Symport aus dem Cytosol in die Vakuole hin. Im Folgenden wurden unter identischen Bedingungen *Patch-Clamp*-Experimente an den Vakuolen der beiden Insertionsmutanten durchgeführt. Bei Vakuolen der *Atint1.1*-Mutante konnten keine entsprechenden Stromantworten gemessen werden. Demzufolge bestätigen die vorliegenden *Patch-Clamp*-Messungen die Vorhersagen von Schneider et al. (2008), dass die Insertionsmutation in der *Atint1.1*-Linie zu einem vollständigen Verlust des Inositoltransports führt (Abbildung 27, unten links). Vakuolen der Insertionslinie *Atint1.2* zeigten eine schwache positive Stromantwort nach Perfusion mit 50 mM *myo*-Inositol, welche jedoch im Vergleich zum WT signifikant kleiner ausfiel (Abbildung 27, unten rechts). Dies lässt darauf schließen, dass im Gegensatz zu *Atint1.1*- die *Atint1.2*-Mutante keine Verlustmutante, sondern eine *knockdown*-Mutante mit eingeschränkter Transportfunktion ist.



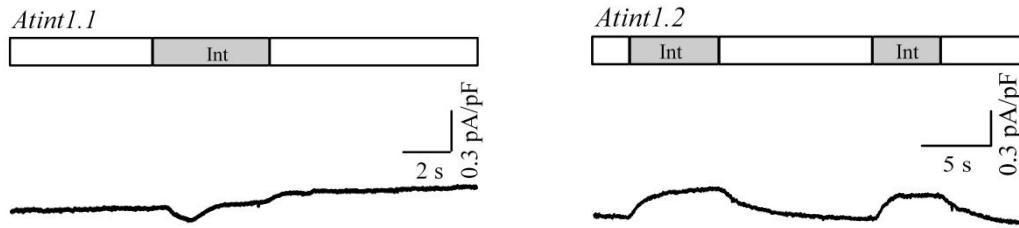
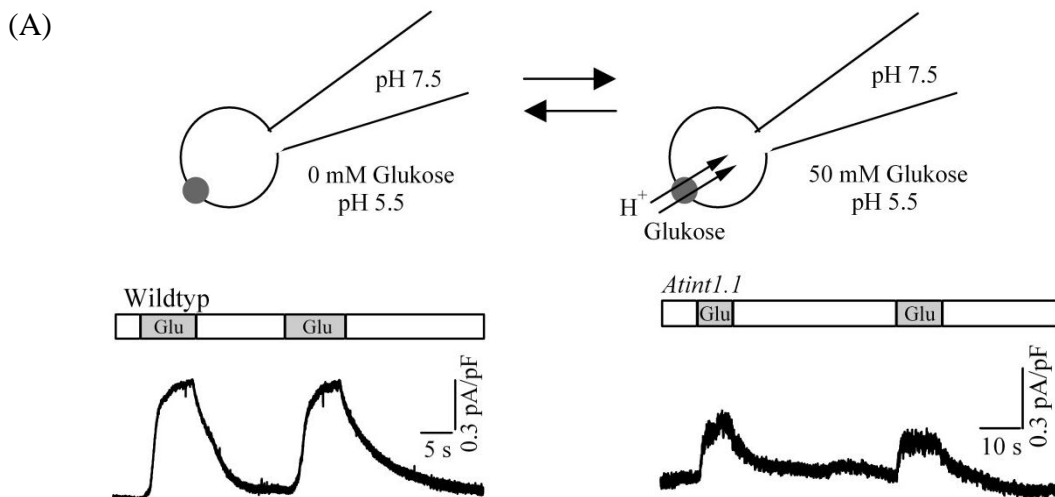


Abbildung 27: *myo*-Inositol-induzierte  $H^+$ -Ströme von WT-, *Atint1.1*- und *Atint1.2*-Mesophyllvakuolen. Die bildlich dargestellten Vakuolen mit Patchpipette geben die experimentellen Bedingungen wieder, wobei die Messungen ohne (weißer Balken) oder mit 50 mM *myo*-Inositol (grauer Balken) im Badmedium durchgeführt wurden. Die cytosolische Applikation von 50 mM *myo*-Inositol resultierte beim WT in eine Zunahme von positiven Strömen, während keine bzw. signifikant kleinere *myo*-Inositol induzierte Stromänderungen bei *Atint1.1*- und *Atint1.2*-Mutanten und bei *Atint1.2*-Mutanten induzierte  $H^+$ -Ströme beobachtet wurden. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.5.

In Ethanolextrakten der Rosettenblätter von WT und den Mutantenlinien *Atint1.1* sowie *Atint1.2* liegen Glukose, Fruktose und Saccharose in vergleichbaren Konzentrationen vor (Schneider et al. 2008, Abb. 7C). Allerdings wich die *myo*-Inositolkonzentration der Mutantenlinien signifikant vom WT ab, was auf einen inositol-spezifischen Transport des AtINT1-Proteins schließen lässt. Um diese Vermutung weiter zu untermauern, wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen zusätzliche *Patch-Clamp*-Messungen am WT und der Verlustmutante-Mutante *Atint1.1* mit Glukose als Substrat durchgeführt. Während den Messungen wurde 50 mM Glukose mit der Perfusionspipette an die Vakuolen appliziert und die makroskopische Stromantwort aufgezeichnet. (Abbildung 28A). Sowohl WT- als auch *Atint1.1*-Vakuolen zeigten einen Anstieg in der Stromantwort, was auf eine Glukosetransportaktivität hindeutet. Bei der *Atint1.1*-Mutante fiel die Stromantwort auf Glukose jedoch etwas geringer aus als beim WT (Abbildung 28A, B). Diese Messergebnisse untermauern die Annahme, dass AtINT1 an der vakuolären Membran den *myo*-Inositol-Transport mit hoher Spezifität  $H^+$ -getrieben vermittelt.



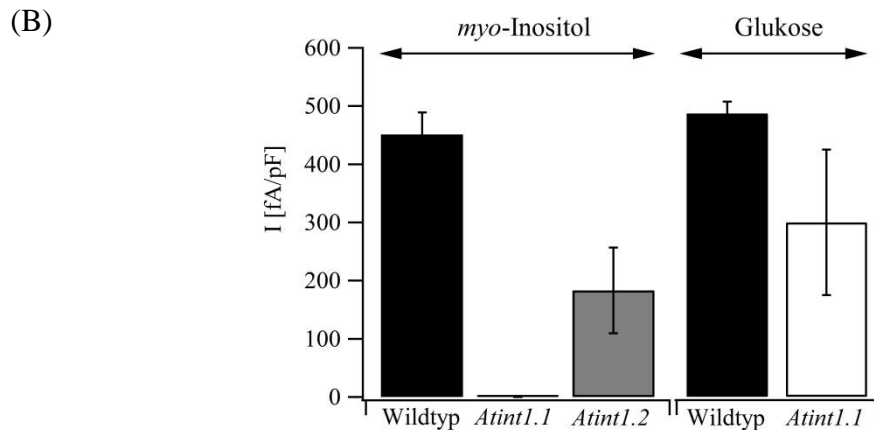


Abbildung 28: Zucker-induzierte Ströme in Mesophyllvakuolen von WT, *Atint1.1*- und *Atint1.2*-Mutanten. (A) Glukose-induzierte  $H^+$ -Ströme wurden von WT- und *Atint1.1*-Vakuolen aufgezeichnet. Die bildlich dargestellten Vakuolen und Pipetten geben die Lösungsbedingungen wider. Die grauen Balken geben den Zeitraum an, in dem 50 mM Glukose über die Zusatzpipette an die Vakuolen appliziert wurde. (B) Das Balkendiagramm gibt die mittleren *myo*-Inositol- und Glukose-induzierten  $H^+$ -Ströme von jeweils  $n=3$  Experimenten wieder. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.5.

### 3.3 Charakterisierung der AtSUC4-Transporteigenschaften

Nach der elektrophysiologischen Untersuchung des vakuolären Transportproteins AtINT1 sollte in dieser Arbeit ein weiterer Zuckertransporter, AtSUC4, aus Vakuolen des Mesophyllgewebes mittels *Patch-Clamp*-Technik analysiert werden. Neben WT-Pflanzen wurden zusätzlich *AtSUC4*-Überexprimierer (*AtSUC4*-ÜE) und *Atsuc4.1*-Verlustmutanten (*Atsuc4.1*)<sup>2</sup> untersucht. Die *AtSUC4*-Überexprimierer (*p35S::AtSUC4*) Pflanzen wurden durch stabile Pflanzentransformation generiert (Schneider et al., 2011). Die vom Nottingham Stock Centre bezogene *Atsuc4.1*-Mutante (WiscDs-Lox450E10) enthält nach den Analysen von Schneider et al. (2011) eine T-DNA-Insertion kurz vor Ende des vierten Introns (Abbildung 29), welche in homozygoten Pflanzen zum vollständigen Verlust der Vollängen-*AtSUC4*-mRNA führt (Schneider et al., 2011).

<sup>2</sup> Die *AtSUC4*-Überexprimierer und *Atsuc4.1*-Verlustmutanten wurden freundlicherweise von Prof. Sauer (Universität Erlangen) zur Verfügung gestellt.



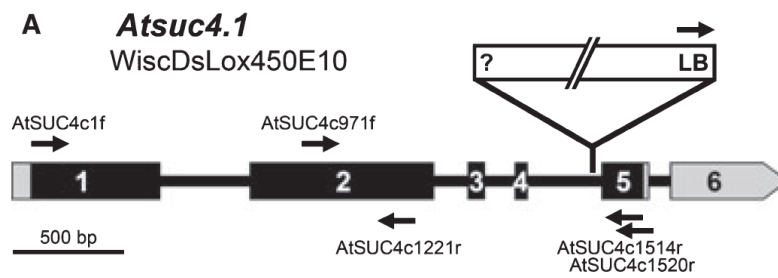
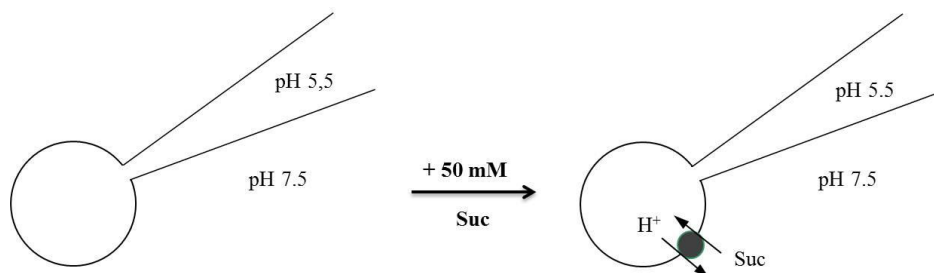


Abbildung 29: Schematische Darstellung des AtSUC4-Gens. Die Introns sind durch nummerierte Kästchen, die Exons durch schwarze Linien und nicht translatierte angrenzende Bereiche in grau dargestellt. Die T-DNA-Insertion liegt nahe dem 3'-Ende des vierten Introns. Die Pfeile stellen Bindestellen der Primer dar, welche für die Genanalyse verwendet wurden. Die Abbildung wurde der Publikation Schneider et al. (2011) entnommen.

Zu Beginn wurden *Patch-Clamp*-Experimente an *A. thaliana* Mesophyllvakuolen von fünf Wochen alten WT-Pflanzen unter einem physiologischen Protonengradienten durchgeführt (pH 5,5<sub>Vak</sub>/pH 7,5<sub>Cyt</sub>; Kap. 2.1.10.5; Abbildung 30A). Die makroskopischen Stromantworten wurden in der *Whole-vacuolar*-Konfiguration bei einer Haltespannung von 0 mV aufgezeichnet, während die Vakuolen kontinuierlich mit einer Badlösung (Kap. 2.1.4.2) umspült wurden. Über eine zusätzliche Perfusionspipette (vgl. Kap. 3.2) wurde auf der cytosolischen Seite eine mit 50 mM Saccharose versetzten Badlösung appliziert, was bei allen WT-Messungen (n=7) in einer negativen Stromantwort resultierte. In Abbildung 30B ist exemplarisch eine Saccharose-induzierte Stromabnahme (-0,4 pA/pF) während der cytosolischen Perfusion mit 50 mM Saccharose dargestellt. Unter den vorgegebenen Lösungsbedingungen stellten sowohl der H<sup>+</sup>-Gradient als auch die Saccharose-Konzentration treibende Kräfte für den Protonentransport dar. Deswegen wird vermutet, dass die negative Stromantwort durch einen Antiporter hervorgerufen wird, der bei cytosolischer Applikation von Saccharose aktiv wird und Protonen im Austausch mit Saccharose aus dem vakuolären Lumen in das Cytosol transportiert.

(A)



(B)

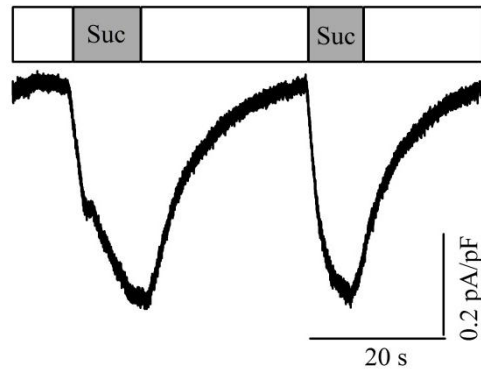


Abbildung 30: Saccharose-induzierte  $H^+$ -Ströme von Mesophyllvakuolen des Wildtyps. (A) Die experimentellen Lösungsbedingungen sind schematisch dargestellt. Die Messungen wurden unter einem physiologischen pH-Gradient ( $pH\ 5.5_{Vak}$ ,  $pH\ 7.5_{Cyt}$ ) durchgeführt. (B) Ganzzellströme einer WT-Vakuole unter Applikation von 50 mM Saccharose bei einer Membranspannung von 0 mV. Die Dauer der Saccharoseapplikation (Suc) über eine Perfusionspipette ist durch einen grauen Balken gekennzeichnet, worauf negative Ströme gemessen wurden. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.5.

Frühere Studien am SUC4-Protein von *A. thaliana* (AtSUT4) und *Solanum tuberosum* (StSUT4) wiesen jedoch auf einen anderen Transportmechanismus hin. Weise et al. (2000) konnte zeigen, dass SUC4 pH-Wert-abhängig den Transport von Saccharose aus der Hefezellwand in das Cytosol katalysiert, was auf einen Saccharosetransport im Symport mit Protonen schließen lässt. Um zu überprüfen, ob AtSUC4 als Saccharose-symporter arbeitet, wurde ein Versuchsaufbau ähnlich den AtINT1-Experimenten (Kap. 3.3) gewählt. So wurden erneut Messungen in Gegenwart eines inversen pH-Gradienten ( $pH\ 7.5_{Vak}/pH\ 5.5_{Cyt}$ ) durchgeführt (Abbildung 31A). Dabei wurde davon ausgegangen, dass AtSUC4 als potentieller  $H^+$ -getriebenen Symporter vom  $H^+$ -getriebenen Substratfluss auf den substratgetriebenen  $H^+$ -Fluss umschalten kann. Nach Äquilibrierung der 50 mM Saccharose enthaltenden Pipettenlösung mit dem Vakuoleninneren wurde bei einer Membranspannung von 0 mV die Stromantwort während cytosolischer Applikation von 50 mM Saccharose aufgezeichnet. Bei fünf von acht Messungen an *AtSUC4* überexprimierenden Vakuolen konnte eine positive Stromantwort auf 50 mM Saccharose verzeichnet werden, wie in Abbildung 31B mit einer Stromzunahme von 0,7 pA/pF exemplarisch dargestellt. Die Vermutung liegt nahe, dass positive Ströme immer dann hervorgerufen werden, wenn die Aktivität des *AtSUC4*-Symporters die des Antiporters übersteigt. Aufgrund dessen weisen die positiven Saccharose-induzierten Stromantworten auf einen  $H^+$ -getriebenen, auswärtsgerichteten Symportmechanismus des *AtSUC4*-Proteins hin.

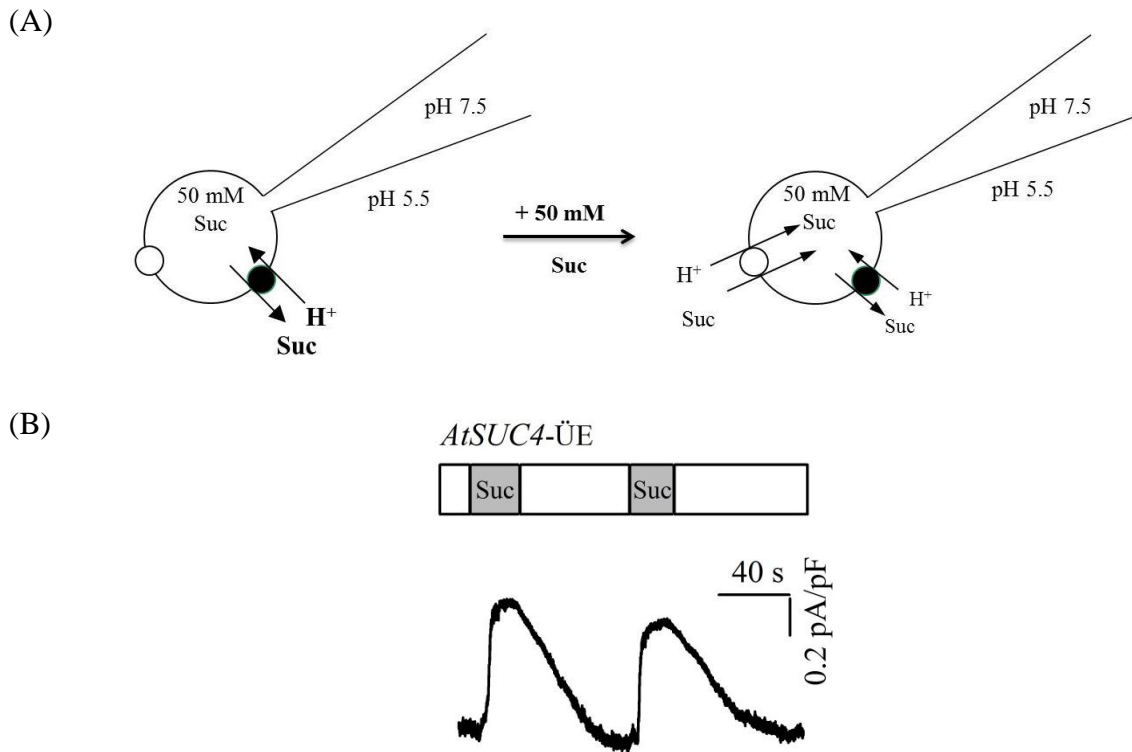


Abbildung 31: Saccharose-induzierte  $H^+$ -Ströme in *AtSUC4*-ÜE Mesophyllvakuolen. (A) Die schematisch dargestellten Vakuolen geben die experimentellen Lösungsbedingungen mit einem inversen pH-Gradienten ( $pH\ 7.5_{vak}$ ;  $pH\ 5.5_{cyt}$ ), 50 mM vakuolärer Saccharose und die Zugabe von 50 mM Saccharose auf der cytosolischen Seite wider. (B) Die Ganzzellmessungen an *AtSUC4*-überexprimierenden Vakuolen zeigt Saccharose vermittelte positive  $H^+$ -Ströme. Die grauen Balken markieren den Zeitraum der cytosolischen Applikation von 0 mM Saccharose (weißer Balken = keine Saccharose). Die Zugabe von Saccharose auf die cytosolische Seite resultierte bei *AtSUC4*-Vakuolen in einer Zunahme des Ausgangstroms. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.5.

Messungen mit der *Atsuc4.1*-Verlustmutante wurden wie auch beim *AtSUC4*-ÜE unter physiologischem sowie unter inversem pH-Wert-Gradienten durchgeführt. Dabei konnten im Gegensatz zu *AtSUC4*-ÜE bei *Atsuc4.1*-Mutanten unter inversem pH-Gradienten ( $pH\ 7,5_{vak}/pH\ 5,5_{cyt}$ ) und einer cytosolischen Applikation von 50 mM Saccharose ausschließlich negative Ströme gemessen werden (Abbildung 32A; Rohspuren nicht gezeigt). Diese nahmen unter Anwesenheit von 50 mM Saccharose in der Pipettenlösung in der Stromantwort zu. Deshalb wird davon ausgegangen, dass in der vakuolären Membran von *Atsuc4.1* kein Symport von Saccharose mit  $H^+$  durch das AtSUC4-Transportprotein möglich ist (Abbildung 32B). Die dominanten negativen Ströme der *Atsuc4.1*-Mutante deuten auf einen im Tonoplasten lokalisierten Saccharose/ $H^+$ -Antiporter hin.

Unter physiologischem pH-Gradienten mit 100  $\mu$ M bzw. 50 mM Saccharose in der Pipettenlösung und einer cytosolischen Applikation von 50 mM Saccharose wurden bei

der *Atsuc4.1*-Mutante wurden wie schon zuvor beim WT (Abbildung 30) die negativen Stromantworten des Antiporters gemessen (Abbildung 32A).

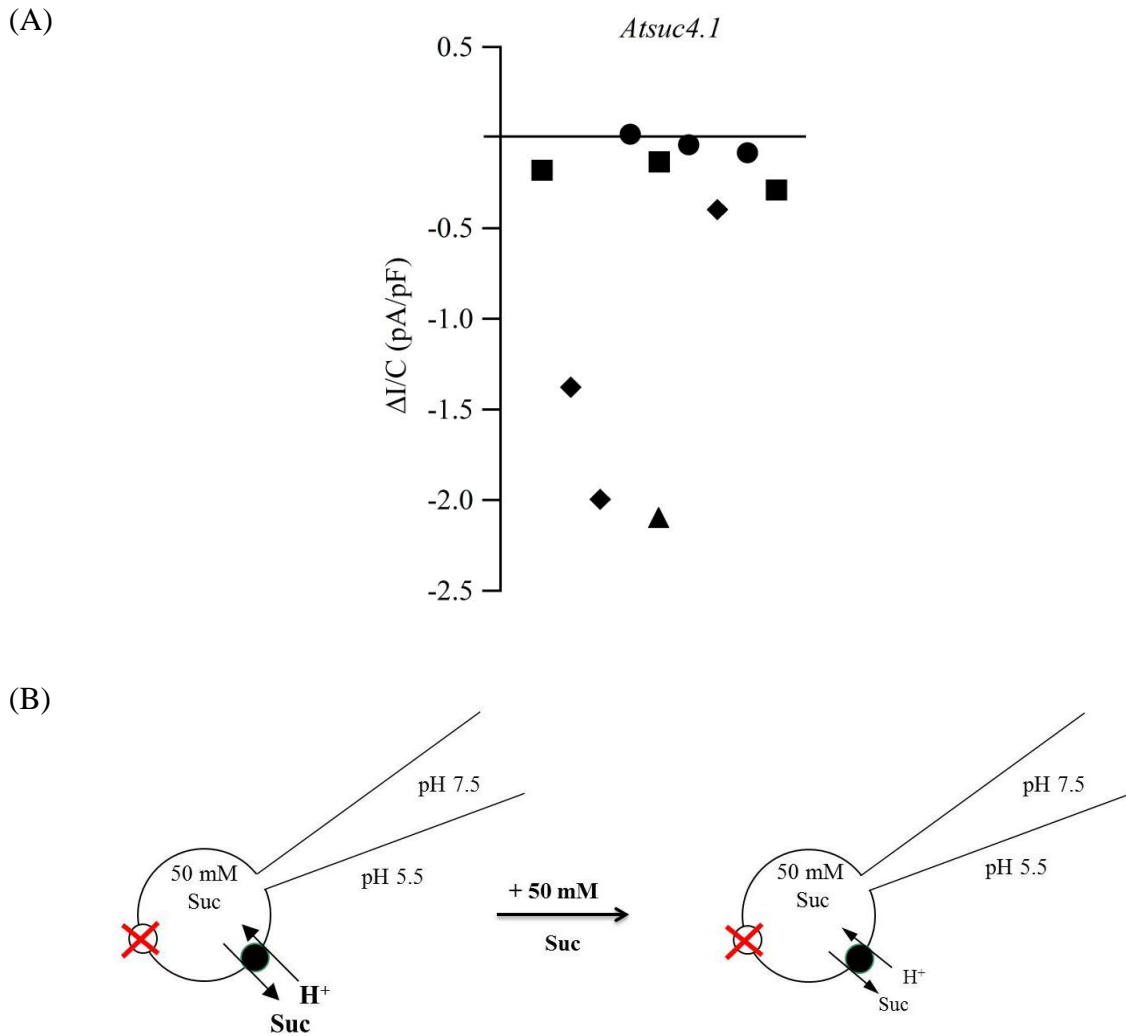


Abbildung 32: Saccharose-induzierte  $H^+$ -Ströme von *Atsuc4.1*-Vakuolen. (A) Stromantworten der *Atsuc4.1*-Verlustmutante auf die cytosolische Applikation von 50 mM Saccharose unter verschiedenen pH- und Saccharosegradienten. Die Symbole bezeichnen die Lösungsbedingungen (Kap. 2.1.10.5), unter denen die Messungen an den *Atsuc4.1* Mutanten durchgeführt wurden:  
 ■ = pH 5,5<sub>Vak</sub>/pH 7,5<sub>Cyt</sub>, 50 mM Saccharose<sub>Vak</sub>, ± 50 mM Saccharose<sub>Cyt</sub>;  
 ● = pH 5,5<sub>Vak</sub>/pH 7,5<sub>Cyt</sub>, 100  $\mu$ M Saccharose<sub>Vak</sub>, ± 50 mM Saccharose<sub>Cyt</sub>;  
 ◆ = pH 7,5<sub>Vak</sub>/pH 5,5<sub>Cyt</sub>, 50 mM Saccharose<sub>Vak</sub>, ± 50 mM Saccharose<sub>Cyt</sub>;  
 ▲ = pH 7,5<sub>Vak</sub>/pH 5,5<sub>Cyt</sub>, 0 mM Saccharose<sub>Vak</sub>, ± 50 mM Saccharose<sub>Cyt</sub>;  
 (B) Die Abbildung beschreibt die Lösungsbedingungen, unter denen die Messungen in (A) mit dem Symbol ◆ stattgefunden haben. Eine Zugabe von 50 mM cytosolischer Saccharose bewirkte den gemessenen negativen Strom (Abnahme des durch den Antiporter (schwarzer Kreis) verursachten positiven Stroms). Der rot durchkreuzte weiße Kreis markiert den Verlust des funktionsfähigen *AtSUC4*-Transportproteins.

### 3.4 Charakterisierung des SV-Kanals in Mesophyllvakuolen

Im Anschluss an die Untersuchungen der vakuolären Protonenpumpen und Zuckertransporter von *A. thaliana* sollte die Regulation und Funktion des vakuolären SV-Kanals elektrophysiologisch ebenfalls mit der *Patch-Clamp*-Technik untersucht werden. Der spannungsabhängige Kationenkanal zeigt eine hohe Leitfähigkeit für  $K^+$ -Ionen und wurde erstmals mittels *Patch-Clamp*-Messungen an *Beta vulgaris*-Vakuolen und Mesophyllvakuolen der Gerste charakterisiert (Hedrich et al. 1986; Hedrich und Neher 1987). In vorangegangenen Publikationen wurde häufig über ein spannungsabhängiges Öffnungsverhalten sowie eine starke Abhängigkeit der Kanalaktivität gegenüber der cytosolischen Calciumkonzentration berichtet (Hedrich und Neher, 1987; Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995; Pei et al., 1999; Van den Wijngaard et al., 2001; Peiter et al., 2005). Um eine hohe SV-Kanal-Aktivität zu erreichen, wurde deshalb eine cytosolische Messlösung (Bad) mit 1 mM Calcium eingesetzt. Darüber hinaus beinhalteten alle Messlösungen (Bad und Pipette) 2 mM DTT. Durch die Zugabe des reduzierenden Stoffes wurde die Offenwahrscheinlichkeit der SV-Kanäle stark erhöht (Carpaneto et al., 1999; Scholz-Starke et al., 2004).

Zur Charakterisierung des Arabidopsis-SV-Kanals wurde zunächst in der *Whole-vacuolar*-Konfiguration gearbeitet. Nach Übergang der *Vacuole-attached*- in die *Whole-vacuolar*-Konfiguration wies der SV-Kanal von *A. thaliana* Mesophyllvakuolen eine verzögerte Aktivierungsreaktion auf. Wie in Abbildung 33 exemplarisch gezeigt, nahmen die SV-Gleichgewichtsstromantworten auf einen konstanten Spannungspuls von +70 mV (Abbildung 33A) während der Äquilibration der Pipettenlösung mit dem Vakuoleninneren nur langsam zu. Erst nach vollständiger Äquilibration wurde aufgrund der maximal erreichten Kanalaktivität keine weitere Zunahme in der SV-Gleichgewichtsstromamplitude verzeichnet (Abbildung 33B).

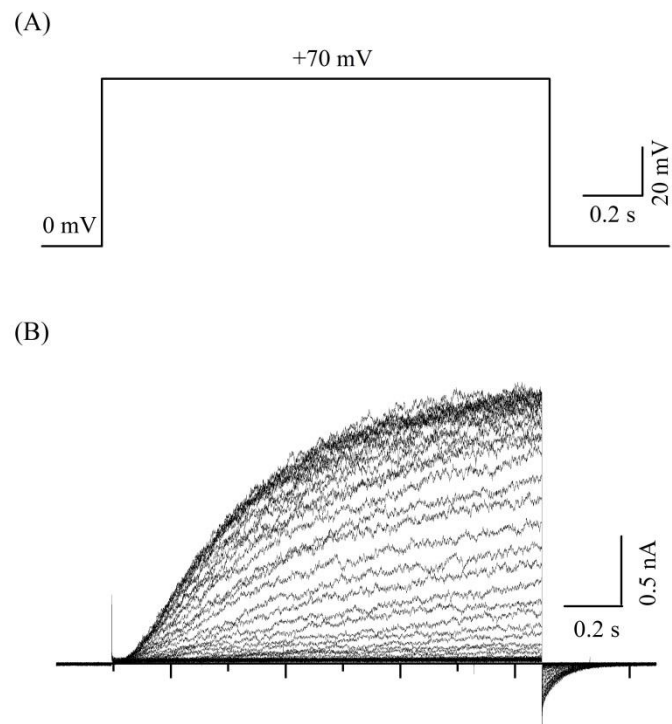


Abbildung 33: Spannungspulsprotokoll und Stromantwort des vakuolären SV-Kanals von *A. thaliana* WT während Äquilibration der Pipettenlösung mit dem Vakuolenlumen. (A) Beim gezeigten Spannungspulsprotokoll wurde ausgehend von einer Haltespannung von 0 mV für 0,2 s eine depolarisierende Spannung von +70 mV für 1,5 s an die vakuoläre Membran angelegt. Anschließend wurde erneut zur Haltespannung von 0 mV für 0,4 s zurückgesprungen. (B) Stromantwort des SV-Kanals auf das in A gezeigte und wiederholt angewendete Spannungspulsprotokoll. Eine konstante Stromantwort wurde erst 14 min nach Durchbruch der vakuolären Membran erreicht. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.2E.

Nach Überführung der SV-Kanäle in einen maximal aktivierbaren Kanalzustand wurden Ganzzellströme auf Einfachspannungspulse von -80 mV bis +100 mV mit einer jeweiligen Spannungszunahme von +10 mV aufgezeichnet. Die Haltespannung betrug -60 mV (Kap. 2.1.7.1). Ab einer positiven Spannung von +20 mV konnten langsam aktivierende Ströme des auswärtsgerichteten SV-Kanals beobachtet werden (Abbildung 34A). Nach Erreichen des Gleichgewichtsstroms (*steady-state*) wurde erneut auf die Haltespannung zurückgesprungen, wodurch das langsame Deaktivieren der SV-Kanäle in Form eines Tailstroms und damit ein Ausstrom von  $K^+$ -Ionen aus der Vakuole in das Cytosol sichtbar wurde. Um die entstehenden Ströme mit anderen Messungen vergleichen zu können, wurden die Ströme durch die Membrankapazität ( $C_m$ ) dividiert und so auf die Größe der Vakuole normiert (Kap. 2.1.4.6). Die zugehörige *steady-state*-Strom-Spannungskennlinie, bei welcher der Gleichgewichtsstrom gegen die Spannung aufgetragen wird, verdeutlicht das Schaltverhalten des auswärtsgerichteten WT-SV-Kanals (Abbildung 34B). Bei negativen Spannungen wurde kein einwärtsgerichteter Strom hervorgerufen. Ab Spannungen positiver +20 mV konnte ein größer werdender  $K^+$ -Einstrom aus der

Vakuole in das Cytosol verzeichnet werden, was bei einer Spannung von +100 mV in einem Gleichgewichtsstrom von 300 pA/pF resultierte.

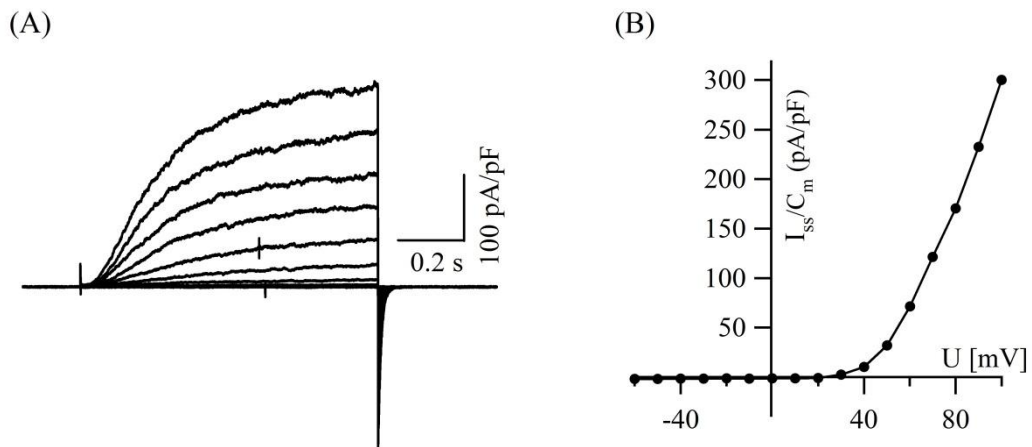


Abbildung 34: Spannungsabhängige Aktivierung des SV-Kanals in Mesophyllvakuolen von *A. thaliana*. (A) Ausgehend von einer Haltespannung von -60 mV wurden makroskopische Ströme des SV-Kanals bei Messspannungen von -60 bis +100 aufgezeichnet. (B) Die Gleichgewichtsströme wurden gegen die angelegten Spannungen aufgetragen. Sowohl Bad- als auch Pipettenlösung enthielten 150 mM KCl bei einem pH-Wert von 7,5. Die Badlösung wurde zusätzlich mit 1 mM freies  $\text{Ca}^{2+}$  versetzt. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.2E.

### 3.4.1 fou2-Mutante mit einer Mutation im TPC1-Gen

Der SV-Kanal wird in *A. thaliana* vom *TPC1*-Gen kodiert (Peiter et al., 2005). Durch die Zuordnung des Gens war es möglich, TPC1-Mutanten zu identifizieren und durch den Vergleich mit WT-Pflanzen regulatorische Seiten des Kanalproteins aufzudecken.

Die TPC1-Mutante *fou2* (*fatty acid oxygenation upregulated 2*) wurde in einem Screen nach veränderter Jasmonatproduktion auf Verwundung entdeckt und in Bonaventure et al. (2007a) erstmalig beschrieben. Die Mutante weist eine veränderte Syntheserate des Stresshormons Jasmonsäure (JA, engl.: *jasmonic acid*) auf. Infolgedessen liegt der Jasmonatgehalt von ungestressten *fou2* Pflanzen um den Faktor zwei höher als beim WT. Der erhöhte Jasmonatgehalt spiegelt sich auch im Phänotyp der Mutante wieder. Pflanzen im Alter von 6 Wochen weisen neben epinastischen Blättern kürzere Petiolen und eine erhöhte Akkumulation von Anthocyanen in den Blättern auf (Bonaventure et al., 2007a; Bonaventure et al., 2007b, Abbildung 35). Hierbei handelt es sich um Effekte, die allgemein bei Mutanten mit erhöhter Jasmonat-Akkumulation beobachtet wurden (Turner et al., 2002).





Abbildung 35: Wachstumsphänotyp der *fou2*-Mutante im Vergleich zum WT. Abgebildet sind 6 Wochen alte und unter Kurztagbedingungen aufgezogene *A. thaliana* Pflanzen (Kap. 2.1.1). Im Vergleich zur WT-Pflanzen (links) zeigt die *fou2*-Mutante (rechts) mit den verkürzten Petiolen und den leicht epinastischen Blättern einen abweichenden Wachstumsphänotyp, der für Mutanten mit erhöhtem Jasmongehalt typisch ist.

Die TPC1-Mutante *fou2* trägt eine Punktmutation (D454N), welche auf der Seite des vakuolären Lumens zwischen der Transmembrandomäne 7 und 8 des TPC1-Kanalproteins lokalisiert ist (Kap. 1.3.1, Abbildung 3). In allen bisher bekannten pflanzlichen Aminosäuresequenzen des TPC1-Proteins ist die in der *fou2*-Mutante ausgetauschte Aminosäure Aspartat stark konserviert (Bonaventure et al., 2007a). Deshalb wird davon ausgegangen, dass diese Aminosäure für die Funktion und/oder Regulation des TPC1-kodierten Kanals wichtig ist. *Patch-Clamp*-Messungen zeigten, dass die Spannungsabhängigkeit der *fou2* SV-Kanäle hin zu negativeren Membranspannungen verschoben ist, was in einer schnelleren Aktivierungskinetik im Vergleich zu WT-SV-Kanälen resultiert (Bonaventure et al., 2007a). Ungeklärt war jedoch die Frage, wie ein einzelner Aminosäureaustausch auf der vakuolären Seite des Kanalproteins den Spannungssensor beeinflusst. Diese Frage sollte neben einer genaueren Charakterisierung des SV-Kanals der *fou2* Mutante im Vergleich zu WT-Pflanzen durch weiterführende *Patch-Clamp*-Experimente geklärt werden.

#### 3.4.1.1 Aktivierung des *fou2* SV-Kanals aus Arabidopsis Mesophyllvakuolen

SV-Kanäle zeigen erst nach vollständiger Äquilibration der Pipettenlösung mit dem Vakuoleninneren eine maximale Aktivität (vgl. Kap. 3.4). Deshalb wurde nach Erreichen der *Whole-vacuolar*-Konfiguration die Aktivierung des SV-Kanals durch einen positiven Spannungspuls von WT- als auch *fou2*-Pflanzen zeitlich dokumentiert. Hierzu wurden Vakuolen mit einer Membrankapazität von 20-30 pF ausgewählt. Ausgehend von einer Haltespannung von 0 mV wurden depolarisierende Spannungspulse von +70 mV bzw. +50 mV wiederholt an die Membran angelegt. Bei WT-Vakuolen konnten 5-6 Minuten nach Etablierung der *Whole-vacuolar*-Konfiguration erste SV-Kanalöffnungen durch einen Anstieg der Stromantwort auf den depolarisierenden Spannungspuls verzeichnet werden. Etwa 12 Minuten nach dem Übergang in die *Whole-vacuolar*-



Konfiguration wurde keine weitere Zunahme der Stromantwort registriert. Demzufolge war zu diesem Zeitpunkt eine maximale Anzahl von SV-Kanälen bei +70 mV aktiv. Im Vergleich dazu öffneten die SV-Kanäle der *fou2*-Mutante bereits 0,5-2 Minuten nach dem Übertritt in die *Whole-vacuolar*-Konfiguration und erreichten nach nur 5-7 Minuten bei einem Spannungspuls von +50 mV bzw. +70 mV ihre volle Aktivität (Abbildung 36).

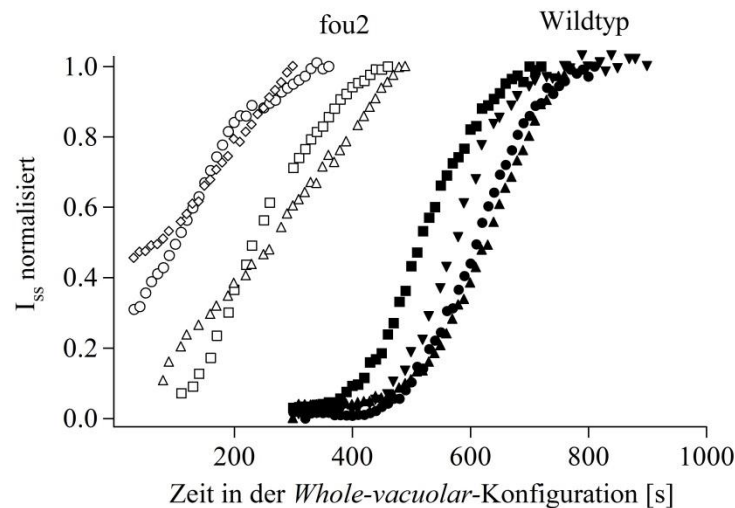


Abbildung 36: Zeitabhängige Aktivierung des SV-Kanals von *fou2*- und WT-Vakuolen nach Durchbruch in die *Whole-vacuolar*-Konfiguration. Die Aktivierung der SV-Kanäle wurde bei einer gleichbleibenden Pulsspannung von +70 mV (○, △, alle geschlossenen Symbole) bzw. +50 mV (□, △) gemessen. Die Haltespannung betrug -60 mV. Die Gleichgewichtsströme des SV-Kanals wurden auf den maximalen Wert normalisiert und gegen die Zeit in der *Whole-vacuolar*-Konfiguration aufgetragen. Die Bad und Pipettenlösungen enthielten 1 mM bzw. 0,1 mM freies  $\text{Ca}^{2+}$ . Genaue Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.2A.

Die zeitverzögerte Aktivierung der SV-Kanäle nach Einstellung der *Whole-vacuolar*-Konfiguration deutet auf die Anwesenheit eines Inhibitor im vakuolären Lumen hin, welcher durch Äquilibration des Zellsafts mit der *Patch*-Pipetten-Lösung ausgewaschen wird (Maathuis und Prins, 1991). Die frühere Aktivierung des *fou2*-SV-Kanals könnte durch eine geringere Inhibitor-Konzentration in den *fou2*-Vakuolen erklärt werden. Darüber hinaus wäre auch ein insensitiveres Verhalten des *fou2*-SV-Kanals gegenüber dem Inhibitor denkbar.

### 3.4.1.2 Semi-quantitative Bestimmung der Elemente in WT- und *fou2*-Vakuolen

Um Hinweise auf den potentiellen Inhibitor zu erhalten, wurde die elementare Zusammensetzung des vakuolären Lumens von WT- und *fou2*-Mesophyllvakuolen mittels einer semiquantitativen EDX-Analyse im Labor von Prof. Jörg Fromm (Universität Hamburg) bestimmt (Kap. 2.3). Dabei konnten in Bezug auf Mg, P, S und Cl keine Unterschiede in den atomaren Konzentrationen bei WT- und *fou2*-Vakuolen festgestellt

werden (Abbildung 37). Erstaunlicherweise war jedoch das K/Ca-Verhältnis in WT- und *fou2*-Vakuolen verschoben. *fou2*-Mesophyllvakuolen beinhalteten signifikant weniger K, aber mehr Ca als WT-Mesophyllvakuolen.

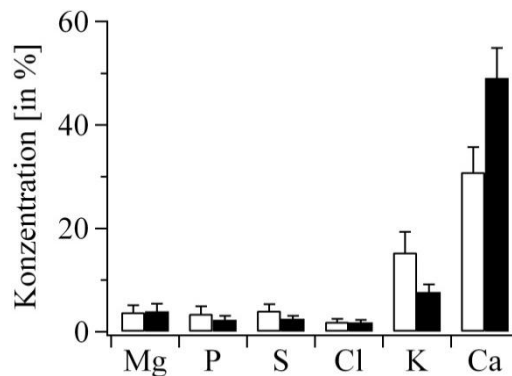


Abbildung 37: Semiquantitative EDX-Analyse der elementaren Zusammensetzung von Mesophyllvakuolen. Es wurden Blätter von jeweils vier Pflanzen untersucht. Die Balken (weiß = WT, schwarz = *fou2*) stehen für die Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung von mindestens 15 Spektren. Die linke Skala zeigt die atomaren % der erfassten radioaktiven Signale.

K und Ca stellten unter den untersuchten Elementen die Hauptelemente in der Vakuole dar, welche beide durch den kationenunspezifischen SV-Kanal transportiert werden können. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass sowohl die cytosolische als auch die vakuoläre Konzentration dieser beiden Ionen einen großen Einfluss auf das Aktivierungspotential des SV-Kanals hat. Eine zunehmende luminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wirkt sich dabei negativ auf die Transportkapazität des WT-SV-Kanals und auf die Richtung des Kationenflusses aus (Pottosin et al., 1997; Pottosin und Schönknecht, 2007). Deshalb handelt es sich bei dem gesuchten SV-Kanal-Inhibitor höchstwahrscheinlich um luminales  $\text{Ca}^{2+}$ , der die Aktivierung des SV-Kanals am Anfang der *Patch-Clamp*-Experimente im *Whole-vacuolar* Modus unterbindet.

### 3.4.1.3 Einfluss von luminalem $\text{Ca}^{2+}$ und pH-Wert auf die SV-Einzelkanalaktivität

Aufgrund des unterschiedlichen K/Ca-Verhältnisses im vakuolären Lumen wurde mittels Einzelkanalexperimente überprüft, ob das SV-Kanalprotein des Wildtyps und der *fou2*-Mutante eine veränderte Sensitivität gegenüber vakuolärem  $\text{Ca}^{2+}$  aufweist. Ausgehend von der *Whole-vacuole*-Konfiguration wurden durch Zurückziehen der *Patch*-Pipette Membranfragmente aus der vakuolären Membran gerissen. Nach Fusion dieser Fragmente lag die Membran (*Patch*) erneut in der ursprünglichen Orientierung vor (Cytosol = Badlösung zugewandte Membranseite, vakuoläres Lumen = Pipettenlösung zugewandte Membranseite) (Kap. 2.1.4.5). Durch die wesentlich geringere Anzahl der SV-Kanäle im *Patch* konnten nun in der *Outside-out*-Konfiguration Einzelkanalfluktua-

tionen aufgezeichnet und somit die absolute Offenwahrscheinlichkeit als auch die Leitfähigkeit des SV-Kanals bestimmt werden. Unter symmetrischen  $K^+$ - und  $H^+$ -Konzentrationen (100 mM  $K^+$ , pH 7,5) und verschiedenen vakuolären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen (0, 100, 1000  $\mu M Ca^{2+}$ ) wurden die Einzelkanalereignisse nahe dem physiologischen Spannungsbereich von -30 mV aufgezeichnet (Abbildung 38A). Aufgrund der hohen Kanalaktivität der *fou2*-Mutante war eine Auflösung von Einzelkanälen bei positiveren Spannungen nicht möglich. Von den Einzelkanalaufzeichnungen wurde ein *All-point*-Amplitudenhistogramm erstellt und darüber die absolute Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  des SV-Kanals ermittelt (Kap. 2.1.8.2). Sowohl die SV-Kanäle des Wildtyps als auch der *fou2*-Mutante zeigten eine hohe Kanalaktivität in Abwesenheit von luminalem  $Ca^{2+}$  auf (Abbildung 38). Mit Zunahme der vakuolären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen nahm die Offenwahrscheinlichkeit des WT-SV-Kanals stark ab (Abbildung 38B). Im Gegensatz zum WT wiesen die Kanäle der *fou2*-Mutante selbst bei einer  $Ca^{2+}$ -Konzentration von 1000  $\mu M$  eine relativ hohe Kanalaktivität auf. Dies ist offenbar mit einer erhöhten Toleranz hinsichtlich vakuolärem  $Ca^{2+}$  zu begründen. Luminales  $Ca^{2+}$  scheint eine geringere Affinität zum *fou2*-Kanal zu besitzen, worüber ein geringerer inhibitorischer Effekt auf die SV-Kanäle zu erklären ist.

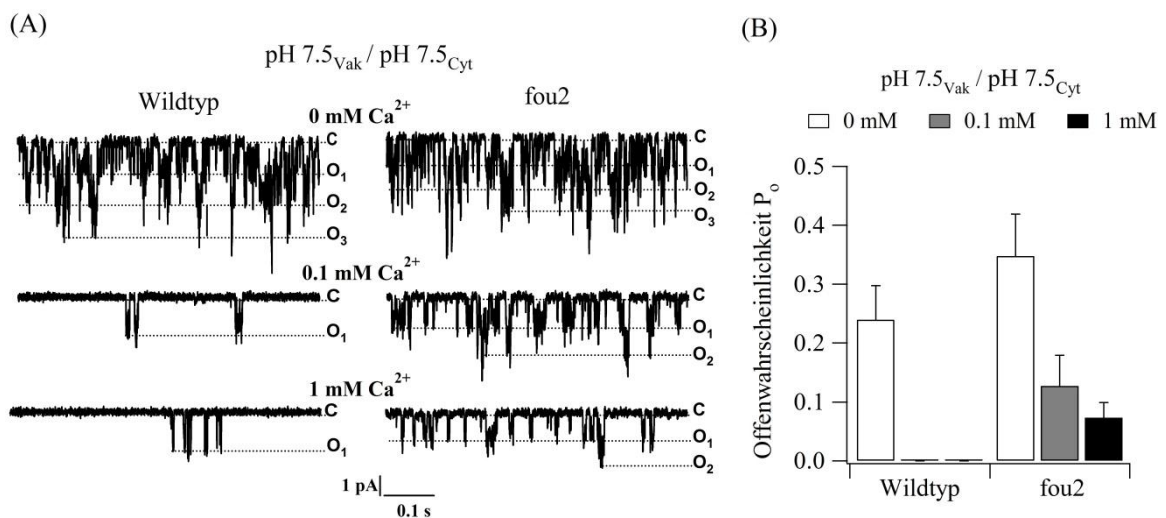


Abbildung 38: Auswirkung der luminalen  $Ca^{2+}$ -Konzentration auf die Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  der WT- und *fou2*-SV-Kanäle. (A) Die *Outside-out*-Einzelkanalexperimente von Mesophyllvakuolen des Wildtyps und der *fou2*-Mutante wurden bei einer Membranspannung von -30 mV unter verschiedenen vakuolären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen (0, 100  $\mu M$ , 1000  $\mu M$ ) aufgezeichnet. C zeigt dabei das Grundstromlevel an, bei dem alle Kanäle geschlossen sind. O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> gibt das Stromniveau an, bei dem 1, 2 oder 3 Kanäle gleichzeitig geöffnet sind. In Bezug auf den pH-Wert (7,5) und die KCl-Konzentration (100 mM) wurden symmetrische Bedingungen vorgegeben. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.2A. (B) Die absolute Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  wurde von Einzelkanalaufzeichnungen, wie in Abbildung A dargestellt, berechnet. Die Werte für 0,1 mM und 1 mM vakuolärem  $Ca^{2+}$  wurden beim WT auf 0 gesetzt, da die Einzelkanalaktivität für die Berechnung zu gering war. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung mit n=3 Experimenten.

Schulz-Lessdorf und Hedrich konnten 1995 zeigen, dass ähnlich einer erhöhten luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ein Ansäuern des luminalen pH-Wertes zur Änderung des SV-Kanal-Aktivierungspotentials führt. Zur Überprüfung, inwieweit die vakuoläre  $\text{H}^+$ -Konzentration einen Einfluss auf die vakuoläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität hat, wurde erneut durch Einzelkanalmessungen in der *Outside-out*-Konfiguration überprüft. Die Abhängigkeit der absoluten Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  des WT- und *fou2*-SV-Kanals von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (0, 100  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) wurde nun unter einem physiologischen pH-Gradienten (pH 7,5<sub>Cyt</sub>/5,5<sub>Vak</sub>) ermittelt. Die Einzelkanalaktivität des WT-SV-Kanals war in Abwesenheit von luminalem  $\text{Ca}^{2+}$  unter einem 100-fachen  $\text{H}^+$ -Gradienten gegenüber symmetrischen pH-Bedingungen stark erniedrigt (Abbildung 39A). Eine Erhöhung der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0 auf 100  $\mu\text{M}$  beeinflusste die Kanalaktivität des Wildtyps dagegen nicht so stark wie unter neutralem luminalen pH-Wert. Eine weitere Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) bewirkte bei einer Membranspannung von -30 mV jedoch erneut einen kompletten Block des SV-Kanals. Die *fou2*-Mutante hingegen zeigte in Abwesenheit von luminalem  $\text{Ca}^{2+}$  nur eine leichte Abnahme in der Einzelkanalaktivität (Abbildung 39A) bei einem luminalen pH-Wert von 5,5 im Vergleich zu einem vakuolärem pH-Wert von pH 7,5 (Abbildung 38A). Eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bis auf 1000  $\mu\text{M}$  bewirkte eine geringe Reduktion der absoluten Offenwahrscheinlichkeit (Abbildung 39B). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die mutierte Aminosäure Teil einer wichtigen regulatorischen Seite des TPC1-Kanalproteins ist, welche durch das Ansäuern des vakuolären Lumens eine Änderung des pK-Werts erfährt.

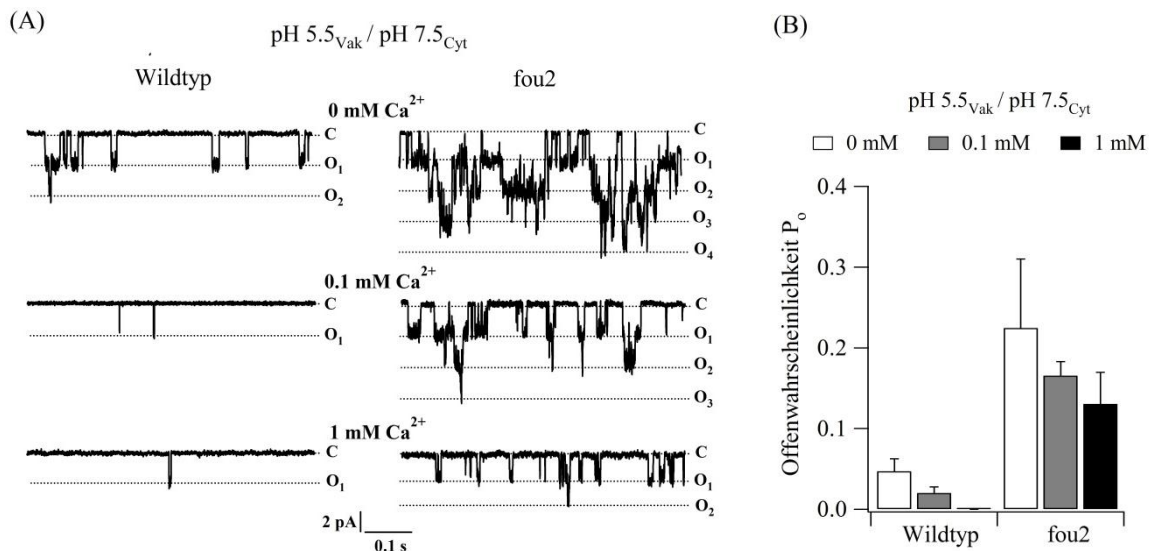
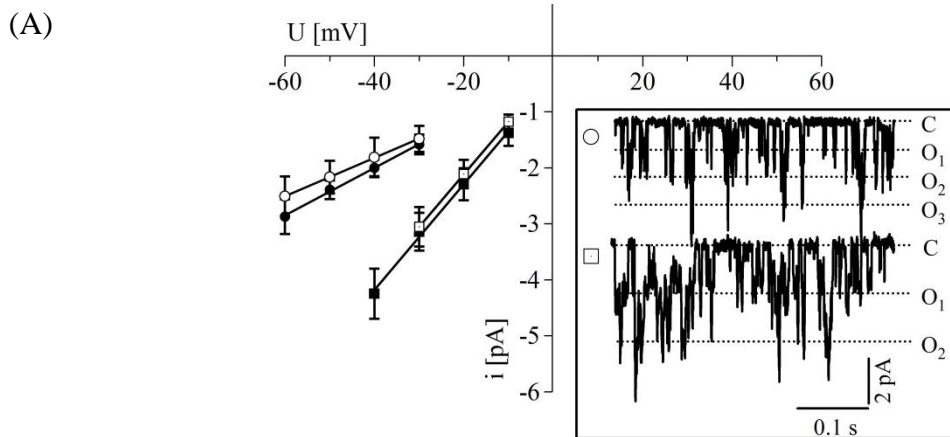


Abbildung 39: Auswirkung des luminalen pH-Werts auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des WT- und *fou2*-SV-Kanals. (A) Die Einzelkanalmessungen wurden in der *Outside-out*-Konfiguration unter physiologischem pH-Gradienten (pH 7,5<sub>Cyt</sub>/ pH 5,5<sub>Vak</sub>) und verschiedenen luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (0, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) bei einer Membranspannung von -30 mV durchgeführt. C markiert die Grundlinie, bei der alle Kanäle geschlossen sind. O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, O<sub>4</sub> gibt das Stromniveau an, bei der 1, 2, 3 oder 4

Kanäle gleichzeitig geöffnet sind. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.2B. (B) Die absolute Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  der SV-Kanäle wurde aus Einzelkanalmessungen entsprechend der Abbildung 39A bestimmt.  $P_o$  wurde beim WT mit einer vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $1000 \mu\text{M}$  auf 0 gesetzt, da die Einzelkanalaktivität zu gering war. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte von  $n = 3-4$  Experimenten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

#### 3.4.1.4 Einfluss des luminalen pH-Wertes auf die SV-Einzelkanalleitfähigkeit

Um die pH-Wert-abhängige Regulationsseite des TPC1-Proteins genauer zu untersuchen, wurden *Outside-out*-Einzelkanalmessungen unter Ausschluss von luminalem  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt. Dabei wurde der vakuoläre pH-Wert schrittweise von pH 7,5 auf pH 4,5 erniedrigt und die Einzelkanalleitfähigkeit des SV-Kanals unter symmetrischen  $\text{K}^+$ -Bedingungen (Bad und Pipette =  $100 \text{ mM KCl}$ ) bestimmt. Die Badlösung enthielt  $1 \text{ mM}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$  bei pH 7,5. Nach Analyse des Offenkanalstroms aus Einzelkanalmessungen im Spannungsbereich von  $-30 \text{ mV}$  bis  $-60 \text{ mV}$  (*fou2*) bzw.  $-10 \text{ mV}$  bis  $-40 \text{ mV}$  (WT) wurde ein Strom-Spannungs-Diagramm erstellt und daraus die SV-Einzelkanalleitfähigkeit  $\gamma$  bestimmt (Abbildung 40A; Kap. 2.1.8.1). Die Einzelkanalleitfähigkeit vom WT- als auch dem *fou2*-SV-Kanal lag bei einem vakuolären pH-Wert von 7,5 im Bereich von  $35-45 \text{ pS}$ . Mit ansteigender luminaler  $\text{H}^+$ -Konzentration nahm auch die Leitfähigkeit des WT- und *fou2*-SV-Kanals zu. Bei einem vakuolären pH-Wert von 4,5 lag die Leitfähigkeit mit  $80-90 \text{ pS}$  doppelt so hoch wie unter neutralem pH-Wert von 7,5 (Abbildung 40B).



(B)

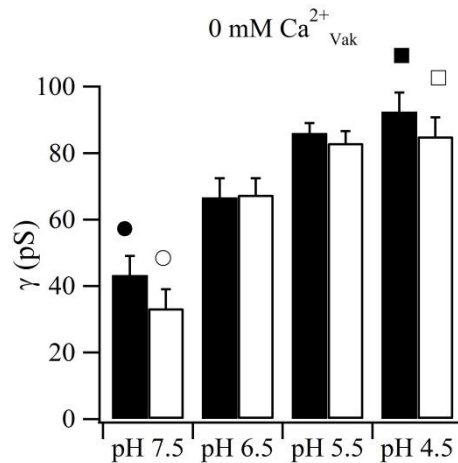


Abbildung 40: Beeinflussung der SV-Einzelkanalleitfähigkeit  $\gamma$  vom WT und von *fou2* durch den luminalen pH-Wert. (A) Einzelkanalereignisse wurden in der *Outside-out*-Konfiguration mit einem luminalen pH-Wert aufgezeichnet und gegen die jeweils angelegte Spannung aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgerade gibt die Einzelkanalleitfähigkeit an. Die offenen Symbole repräsentieren Experimente mit der *fou2*-Mutante, geschlossene mit dem WT. Im rechten Kasten wurden repräsentative Einzelkanalmessungen der *fou2*-Mutante bei einer Membranspannung von  $-30$  mV und einem vakuolären pH-Wert von 7,5 ( $\circ$ ) bzw. 4,5 ( $\square$ ) aufgezeigt. C markiert das Grundstromniveau, bei der alle Kanäle geschlossen sind. O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> gibt das Stromniveau an, bei der 1, 2 oder 3 Kanäle gleichzeitig geöffnet sind. Die Bad- und Pipettenlösungen enthielten jeweils 100 mM KCl. Genaue Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.2C. (B) Die Einzelkanalleitfähigkeit  $\gamma$  wurde unter verschiedenen vakuolären pH-Werten (7,5 bis 4,5) bestimmt. Die schwarzen Balken stehen für den WT, weiße für die *fou2*-Mutante. Die Balken zeigen Mittelwerte aus je 3-4 Experimenten mit der jeweiligen berechneten Standardabweichung.

Anhand der Einzelkanalexperimente konnte gezeigt werden, dass der WT-SV-Kanal sowohl in der Offenwahrscheinlichkeit als auch in der Einzelkanalleitfähigkeit über den vakuolären pH-Wert reguliert ist. Bei saurem pH-Wert wurden eine geringe Offenwahrscheinlichkeit und eine hohe Leitfähigkeit verzeichnet. Im Vergleich dazu lag unter neutralem pH-Wert eine hohe Offenwahrscheinlichkeit vor, die Leitfähigkeit dagegen war stark verringert. Demgegenüber reagierte die *fou2*-Mutante auf einen erhöhten vakuolären pH-Wert vor allem mit einer erhöhten Einzelkanalleitfähigkeit (Abbildung 40), während sich die Offenwahrscheinlichkeit nur wenig änderte (vgl. Abbildung 38 mit Abbildung 39).

#### 3.4.1.5 Aktivierung des WT- und *fou2*-SV-Kanals durch cytosolisches $\text{Ca}^{2+}$

In den vorangegangenen Kapiteln wurde demonstriert, dass nicht nur das Ansäuern des luminalen pH-Werts, sondern auch eine Erhöhung der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine Abnahme in der absoluten Offenwahrscheinlichkeit des SV-Kanals bedingt. Im Gegensatz dazu konnte Schulz-Lessdorf und Hedrich (1995) sowie Pottosin et al. (1997) zeigen, dass eine Anhebung der cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration stimulier-

rend auf die SV-Kanalaktivität wirkt. Um zu überprüfen, ob die *fou2*-Mutation auch die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der SV-Kanäle beeinflusst, wurden *Whole vacuolar*-Messungen an WT- und *fou2*-Vakuolen unter verschiedenen cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (200, 300, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt (Kap. 2.1.10.2D). Dabei wurden auf Einfachspannungspulse von +70 mV größere Ganzzellstromantworten bei einer cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1 mM als bei 300  $\mu\text{M}$  registriert (Abbildung 41A). Um festzustellen, ob diese Beobachtung auf eine veränderte Spannungsabhängigkeit des SV-Kanals zurückzuführen ist, wurde die relative Offenwahrscheinlichkeit über Tailstromexperimente ermittelt (Abbildung 41A; Kap. 2.1.8.3). Die relative Leitfähigkeit (G) des SV-Kanals bei einer Haltespannung von -60 mV wurde gegen die Spannung aufgetragen, bei der die Kanäle voraktiviert wurden. Anschließend wurde an die verschiedenen Kurven eine einfache Boltzmanverteilung angeglichen (Abbildung 41B; Kap. 2.1.8.3, Gleichung 5). Die Anzahl der apparenten Elementarladungsäquivalente wurde mit  $z = 1,6$  als fester Parameter vorgegeben. Die Werte wurden auf die maximale Leitfähigkeit  $G/G_{\text{max}}$  normiert. Die aus der Boltzmanverteilung ermittelte halbmaximale aktivierende Spannung ( $U_{1/2}$ ) gibt die Spannung an, bei der die Aktivierung von 50% aller SV-Kanäle erreicht wird. Mit zunehmender cytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verschob sich die halb-maximale Aktivierungsspannung  $U_{1/2}$  von WT- und *fou2*-Kanälen zu negativeren Membranspannungen hin (Abbildung 41B, C). Es konnte kein Unterschied in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität bezüglich WT und *fou2* aufgezeigt werden, da die durch die ermittelten  $U_{1/2}$ -Werte gelegten Regressionsgeraden die gleiche Steigung aufwiesen (Abbildung 41C).



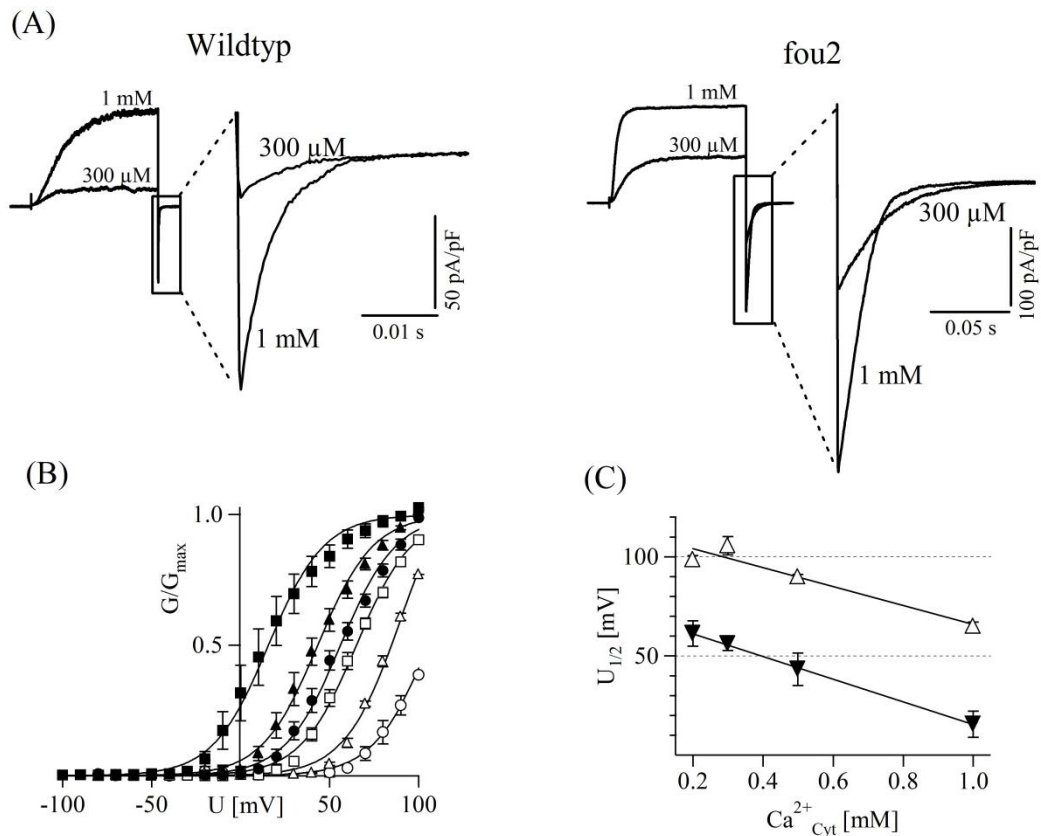


Abbildung 41: Cytosolisches  $Ca^{2+}$  beeinflusst die spannungsabhängige Aktivierung des SV-Kanals. (A) Repräsentative Ganzzellströme von WT- und *fou2*-SV-Kanälen mit den jeweils vergrößert dargestellten Tailströmen (rechts). Ausgehend von einer Haltespannung von -60 mV wurde zur Voraktivierung der Kanäle auf +70 mV gesprungen. Die Tailströme wurden bei einer Haltespannung von -60 mV bestimmt. Die Stromspuren wurden in Gegenwart von 1 mM und 300  $\mu$ M cytosolischem  $Ca^{2+}$  aufgezeichnet. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.2D. (B) Die aus den Tailströmen ermittelten relativen Offenwahrscheinlichkeiten sind als Funktion der Membranspannung in Form von  $G(U)$  Kurven gezeigt. Offene Symbole repräsentieren den WT, geschlossene die *fou2*-Mutante bei folgenden  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen:  $\blacksquare$ =1000  $\mu$ M,  $\blacktriangle$ =500  $\mu$ M,  $\bullet$ =300  $\mu$ M. (C) Die ermittelten halbmaximalen aktivierenden Spannungen ( $U_{1/2}$ ) wurden gegen die cytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration aufgetragen und deren Verlauf mit einer Regressionsgerade beschrieben. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der gebildeten Mittelwerte an. Für (B) und (C) wurde folgende Anzahl von Experimenten durchgeführt:  $n_{WT} = 7$  und  $n_{fou2} = 6$  für 1000  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ ,  $n_{WT, fou2} = 4$  für 500  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ ,  $n_{WT, fou2} = 3$  für 300  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ ,  $n_{WT, fou2} = 4$  für 200  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ .

### 3.4.1.6 Spannungsabhängige Aktivierung des WT- und *fou2*-SV-Kanals unter $K^+$ - und $Ca^{2+}$ -Gradienten

Der Einfluss des  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Gradienten auf die spannungsabhängige Aktivierung des *fou2*-SV-Kanals wurde in der *Whole-vacuolar*-Konfiguration mittels der durch Einfachspannungspulsprotokolle (Kap. 2.1.7.1) induzierten Ganzzellströme näher untersucht (Abbildung 42). Das Aktivierungspotential des *fou2*-SV-Kanals war unter symmetrischen  $K^+$ -Konzentrationen (150 mM) gegenüber dem WT-SV-Kanal um etwa 30 mV hin zu negativeren Spannungen verschoben (Abbildung 42A, links; vgl. Bonaventure et



al., 2007a). Aufgrund dessen wurden sehr viel höhere auswärts- als auch einwärtsgerichtete Ganzzellströme bei *fou2*-Vakuolen im Vergleich zum WT gemessen. Bei WT-Vakuolen konnten nur unter einem  $K^+$ -Gradient (30 mM  $K^+$ <sub>Cyt</sub>/150 mM  $K^+$ <sub>Vak</sub>) nennenswerte einwärtsgerichtete  $K^+$ -Ströme beobachtet werden (Abbildung 42B, Mitte; vgl. Ivashikina und Hedrich, 2005). Der *fou2*-SV-Kanal aktivierte bei gleichem  $K^+$ -Gradienten etwa 40 mV negativer, wodurch im Vergleich zum WT bei -5 mV ein etwa fünffach höherer einwärtsgerichteter Strom generiert wurde. Bei vollständigem Austausch des cytosolischen  $K^+$  durch  $Ca^{2+}$  (15 mM  $Ca^{2+}$ <sub>Cyt</sub>/0  $Ca^{2+}$ <sub>Vak</sub>), wurden beim WT als auch der *fou2*-Mutante weder einwärtsgerichtete  $K^+$ -Ströme noch auswärtsgerichtete  $Ca^{2+}$ -Ströme registriert (Abbildung 42C).

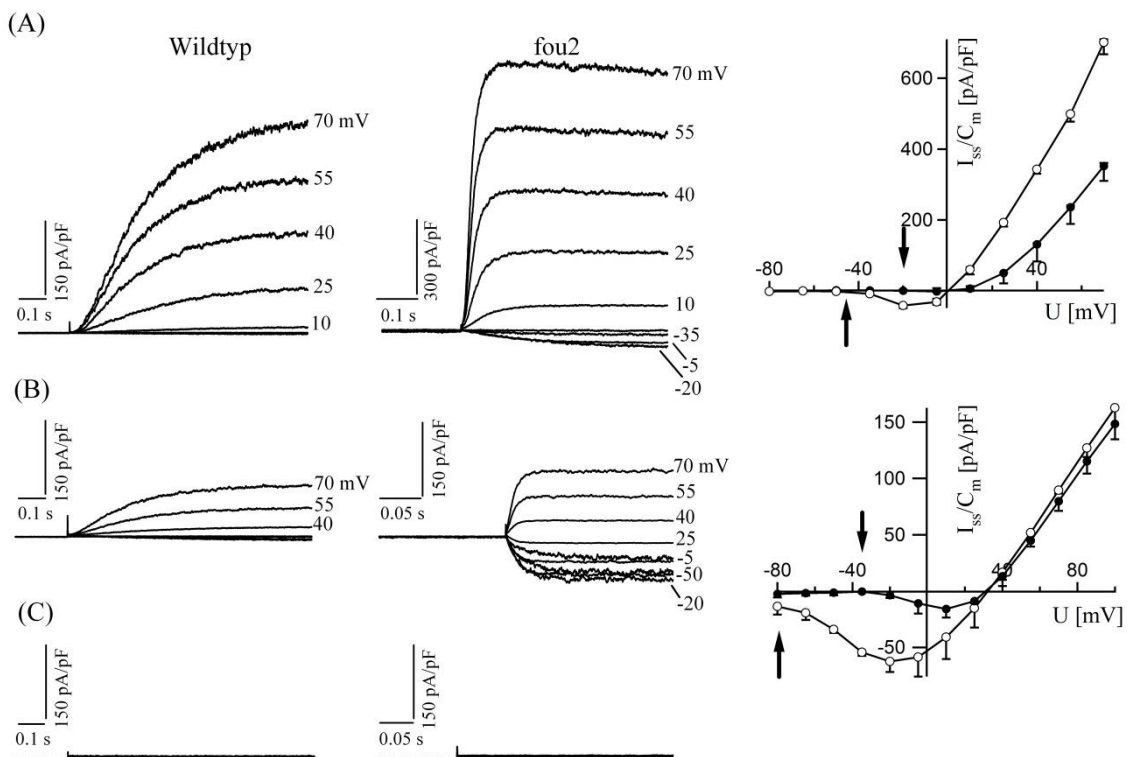


Abbildung 42: Spannungsabhängige Aktivierung der WT- und *fou2*-SV-Kanäle in Abhängigkeit des  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Gradienten. Die Whole-vacuolar-Messungen wurden unter unterschiedlichen cytosolischen Lösungsbedingungen durchgeführt: (A) 150 mM KCl und 1 mM  $Ca^{2+}$ , (B) 30 mM KCl und 1 mM  $Ca^{2+}$ , (C) 15 mM  $Ca^{2+}$  in der Badlösung. Die Pipettenlösung enthielt stets 150 mM KCl. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.2E. Die Ganzzellstromspuren (links und Mitte) wurden ausgehend von einer Haltespannung von -60 mV (WT) bzw. -80 mV (*fou2*) auf depolarisierende Spannungspulse von -50 bis +70 mV aufgezeichnet. Die Messspannung wurde in 15 mV Schritten erhöht. Die *steady-state*-Ströme wurden in einem Strom-Spannungs-Diagramm gegen die jeweiligen Messspannungen aufgetragen (rechts). Die Pfeile zeigen das Aktivierungspotential an. ● WT n=3 (A-C), ○ *fou2* n=9 (A), n=7 (B), n=3 (C). Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der durchgeführten Experimente mit den Standardfehlern.

Die Experimente zeigten eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des WT- und *fou2*-SV-Kanals in Abhängigkeit vom  $K^+$ -Gradienten auf. Eine geringe cytosolische  $K^+$ -

Konzentration führte im physiologischen Spannungsbereich zum  $K^+$ -Einstrom aus der Vakuole in das Cytosol. Das Aktivierungspotential des *fou2*-SV-Kanal lag bei weit negativeren Membranspannungen, wodurch ein größerer  $K^+$ -Einstrom im Vergleich zum WT generiert wurde. Mit  $Ca^{2+}$  als alleiniges cytosolischem Kation konnte unter obigem Spannungsbereich kein SV-Kanalstrom beobachtet werden.

### 3.4.2 Regulation der SV-Kanäle durch 14-3-3-Proteine

Die Aktivität von Ionenkanälen kann nicht nur durch die Membranspannung und Interaktionen mit Ionen verändert werden. Häufig werden membranständige Proteine über Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsreaktionen sowie Interaktionen mit regulatorischen Proteinen beeinflusst. De Boer (2002) und Bunney et al. (2002) konnten zeigen, dass 14-3-3-Proteine die Aktivität von Transportproteinen kontrollieren können. Im Genom von *A. thaliana* gibt es 13 Mitglieder der 14-3-3-Proteinfamilie (GRF1-GRF13; engl.: *general regulating factors*). Diese sind etwa 30 kDa groß und im Zellkern und dem Cytoplasma lokalisiert (Paul et al., 2005). 14-3-3-Proteine interagieren mit spezifischen Konsensussequenzen des Zielproteins, welche ein Phosphoserin oder Phosphothreonin enthalten. Die Aminosäureabfolge dieser spezifischen Konsensussequenzen wurde bestimmt und in Mode 1 (RSxp(S/T)X; Muslin et al. 1996), Mode 2 (RX(Y/F)Xp(S/T)XP; Yaffe et al., 2001) und Mode 3 (p(S/T)X1,2CO2H; Ganguly et al., 2005) eingeteilt.

Die cytosolischen 14-3-3-Proteine GRF6 und GRF1 erhöhen spezifisch die Aktivität des im Tonoplasten lokalisierten  $K^+$ -Kanals TPK1 von *A. thaliana* (Latz et al. 2007). Um zu überprüfen, ob diese 14-3-3-Proteine ebenfalls an der Regulation des SV-Kanals in WT-Mesophyllvakuolen von *A. thaliana* beteiligt sind, wurden *Patch-Clamp*-Experimente durchgeführt und Ganzzellströme sowie Einzelkanalereignisse aufgezeichnet. Die 14-3-3-Proteine wurden von Andreas Latz in *E. coli* Zellen heterolog exprimiert und aufgereinigt (Latz, 2007). Auf depolarisierende Spannungspulse von +70 mV wurden die typisch langsam aktivierenden SV-Kanal-Ströme in der *Whole-vacuolar*-Konfiguration gemessen. Während der cytosolischen Applikation einer GRF6 (200 nM)-haltigen Badlösung mittels des Badperfusionssystems nahmen die SV-Kanalströme bis zum vollständigen Verschwinden stetig ab (Abbildung 43A). Nach Auswaschen des GRF6 kehrte der SV-Kanalstrom vollständig auf das Ausgangsniveau zurück. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt tatsächlich auf die 14-3-3-Proteine zurückzuführen ist, wurden analoge Experimente mit GRF1 und denaturiertem GRF6 durchgeführt. Nach Zugabe von denaturiertem GRF6 und intaktem GRF1 über die Badperfusion wurde in beiden Fällen nur ein leichter Rückgang des Kanalstroms verzeichnet (Abbildung 43B). Diese Ergebnisse belegen, dass das 14-3-3-Protein GRF6 spezifisch die SV-Kanal-Aktivität reguliert.

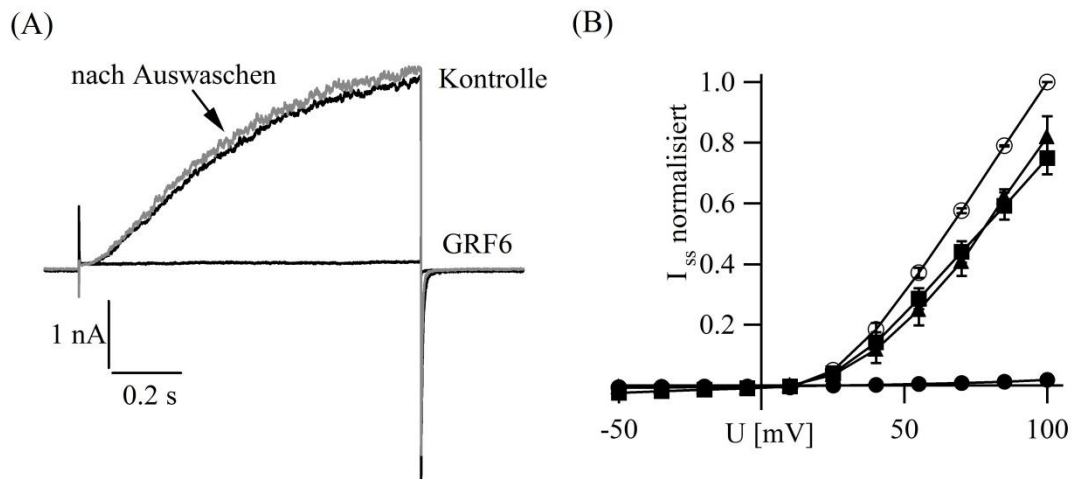


Abbildung 43: Regulation des *A. thaliana* SV-Kanalstroms von Mesophyllvakuolen durch 14-3-3 Proteine. (A) Ausgehend von einer Haltespannung von  $-60$  mV wurden depolarisierende Spannungen von  $+70$  mV angelegt und Ganzzellströme vor (Kontrolle, schwarze Rohspur), sowie während cytosolischer Perfusion mit  $200$  nM GRF6 (GRF6), als auch nach dem Auswaschen von GRF6 (graue Rohspur) aufgezeichnet. (B) Strom-Spannungs-Kennlinie von Gleichgewichts-Strömen des SV-Kanals in Abwesenheit von 14-3-3-Proteinen ( $\circ$ ,  $n=8$ ), mit  $200$  nM GRF6 ( $\bullet$ ,  $n=3$ ),  $200$  nM GRF1 ( $\blacktriangle$ ,  $n=3$ ) und  $200$  nM denaturiertem GRF6 ( $\blacksquare$ ,  $n=3$ ). Es wurde ein Spannungspulsprotokoll von  $-50$  mV bis  $+100$  mV in  $15$  mV Schritten angelegt. Die Ströme wurden auf die Stromamplitude bei  $+100$  mV in Abwesenheit von 14-3-3 Proteinen normiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.1.

Im *Patch-Clamp*-Experimenten an Hefevakuolen konnte gezeigt werden, dass GRF6 eine starke Zunahme der TPK1-Kanalaktivität vermittelt (Latz et al., 2007). Auf makroskopischer Ebene wurde solch ein TPK1-vermittelter Stromanstieg bei *A. thaliana* Mesophyllvakuolen allerdings nicht beobachtet. Dies könnte durch eine geringe Expressionsrate des TPK1-Kanalproteins und aufgrund dessen, einer niedrigen Kanalaktivität begründet sein. Um den GRF6-fördernden Effekt auf TPK1 sichtbar zu machen wurden Einzelkanalmessungen an *A. thaliana* Mesophyllvakuolen in der *Outside-out*-Konfiguration (vgl. Kap. 3.4.1.3; 2.1.4.5) durchgeführt. Nach cytosolischer Applikation von  $100$  nM GRF6 über die Badperfusion nahm die Einzelkanalaktivität des SV-Kanals in Analogie zu den *Whole-vacuolar*-Messungen stark ab (Abbildung 44A). Eine Zunahme der TPK1-Kanalaktivität konnte nicht beobachtet werden, was möglicherweise durch das Abhandenkommen regulatorischer Faktoren bei der Vakuolenisolierung zu erklären ist. Nach Auswaschen von GRF6 nahm die Einzelkanalaktivität des SV-Kanals erneut zu (Abbildung 44B).

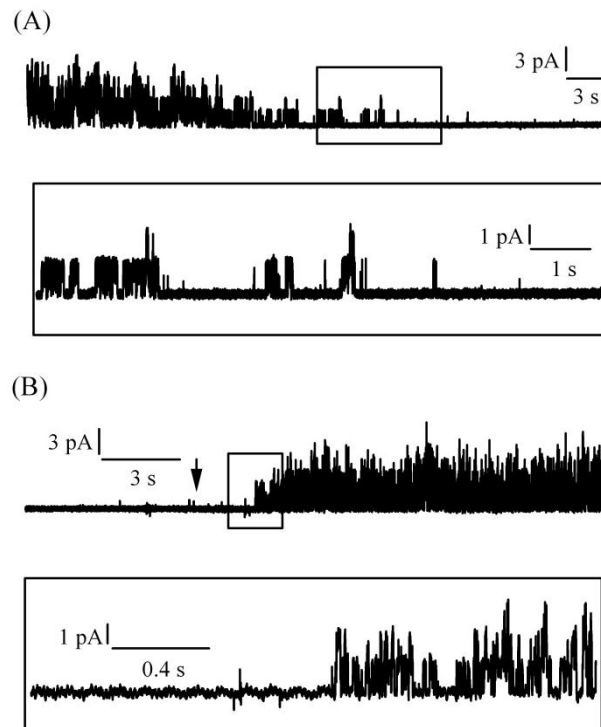


Abbildung 44: GRF6-abhängige Hemmung der SV-Kanalfluktuationen von *A. thaliana* Mesophyllvakuolen. Die Einzelkanalereignisse wurden in der *Outside-out*-Konfiguration bei einer Membranspannung von +70 mV aufgezeichnet. Die Einzelkanalaktivität nahm während der Perfusion mit GRF6 ab (A) und stieg nach Auswaschen (Pfeil) der GRF6-haltigen Badlösung erneut an (B). Die umrahmten Messbereiche in der oberen Einzelkanalaufzeichnung von Abbildung (A) und (B) wurden darunter liegend vergrößert dargestellt. Die in (A) und (B) gezeigten Stromspuren wurden an verschiedenen Vakuolen aufgezeichnet. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.1.

Eine Analyse der TPC1-Proteinsequenz zeigte keine Konsensussequenz zum Binden von 14-3-3-Proteinen auf. Allerdings konnten zwei Sequenzabschnitte im C-Terminus (RS(XX)pSX) und zwischen den beiden EF-Händen (TX(Y)Xp(T)XP) des Proteins identifiziert werden, welche auffallende Ähnlichkeiten zu den von Muslin et al. (1996; RSxp(S/T)X) und Yaffe et al. (2001; RX(Y/F)Xp(S/T)XP) bestimmten spezifischen Konsensussequenzen zeigten.

### 3.5 Charakterisierung des Schließzell-SV-Kanals

Der SV-Kanal wird ubiquitär in Pflanzen exprimiert (Pottosin und Schönknecht, 2007). In *A. thaliana* liegt das *TPC1*-Gen als „*single copy gene*“ vor und wird nicht nur in Blüten, Schoten, Blättern, Wurzeln und der Sprossachse (Furuchi et al., 2001), sondern auch speziell in Schließzellen (Leonhardt et al., 2004) stark exprimiert. Ivashikina und Hedrich, 2005; Peiter et al., 2005; Latz et al 2007; Ranf et al., 2008; Beyhl et al, 2009; etc. haben die Funktion des SV-Kanals in *A. thaliana* Zellkultur- und Mesophyllvakuo-

len studiert (siehe auch Kap. 3.4). Bisher wurden jedoch keine SV-Kanal-typischen Eigenschaften von *A. thaliana* Schließzellvakuolen aufgezeigt. In weiterführenden Arbeiten wurde deshalb die Funktion des Schließzell-SV-Kanals experimentell untersucht und zelltypspezifische Unterschiede in der Aktivierungskinetik,  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit im Vergleich mit Mesophyll-SV-Kanälen herausgearbeitet.

### 3.5.1 SV-Kanalstromdichte bei Schließzellvakuolen

Zu Beginn wurden *Patch-Clamp*-Experimente an isolierten Schließzell- und Mesophyllvakuolen (Kap. 2.1.1) von WT-Pflanzen durchgeführt. Während der SV-Kanal von Mesophyllvakuolen erst nach vollständiger Äquilibrierung der Pipettenlösung mit dem Vakuoleninneren aktiviert, wurde bei Schließzellvakuolen unmittelbar nach dem Durchbruch in die *Whole-vacuole*-Konfiguration vollständig aktivierte SV-Kanalströme gemessen (siehe auch Rienmüller et al., 2010). Dies ist auf ein etwa 80 mal kleineres Lumen der Schließzellvakuolen zurückzuführen, wodurch die Pipettenlösung schneller äquilibriert. Unter symmetrischen Lösungsbedingungen (Bad: 150 mM KCl, 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.5; Pipette 150 mM KCl, pH 7.5) wurden Einfachspannungspulse von -80 mV bis +100 mV in 15 mV Schritten ausgehend von einer Haltespannung von -60 mV appliziert (Kap. 2.1.7.1) und korrespondierende Ganzzellströme aufgezeichnet. Bei Vakuolen beider Zelltypen wurden langsam aktivierende SV-Kanal-Ströme auf depolarisierende Spannungen gemessen (Abbildung 45A). Jedoch zeigten Schließzellvakuolen ( $5644 \pm 1225$  pA/pF) bei +100 mV etwa neun-mal höhere auswärtsgerichtete Gleichgewichtsströme im Vergleich zu Mesophyllvakuolen ( $630 \pm 89$  pA/pF; Abbildung 45A, B) auf. Bei Schließzellvakuolen der *tpc1-2*-knockout-Mutante wurden keine vergleichenden spannungsinduzierten Ströme detektiert (Abbildung 45A, Mitte). Das Aktivierungspotential der Schließzell- u. Mesophyll-SV-Kanäle vom WT lag bei etwa +10 mV (Abbildung 45B). Ein Ansäuern des vakuolären Lumens (pH 7,5 auf pH 5,5) bewirkte eine Abnahme des SV-Kanalstroms bei beiden Zelltypen (Abbildung 45B). Der Effekt war jedoch bei Schließzellvakuolen mit einer 50%igen Reduktion des Kanalstroms deutlicher ausgeprägt als bei Mesophyllvakuolen, bei denen lediglich eine 30%ige Stromabnahme verzeichnet wurde. Infolgedessen kann von einer höheren Sensitivität des Schließzell-SV-Kanals gegenüber einem Ansäuern des vakuolären Lumens ausgegangen werden.

Unter einem einwärtsgerichteten Kaliumgradienten ( $30 \text{ mM K}^+_{\text{Cyt}}/150 \text{ mM K}^+_{\text{vak}}$ ) konnten bei Schließzell- und Mesophyllvakuolen sowohl auswärts- als auch einwärtsgerichtete Ströme beobachtet werden (Abbildung 45C; Ivashikina und Hedrich, 2005). Das Aktivierungspotential der Schließzell-SV-Kanäle lag um etwa 30 mV negativer als das von Mesophyll-SV-Kanälen (vgl. Abbildung 42). Aufgrund dessen generierte der Schließzell-SV-Kanal einen ausgeprägteren einwärtsgerichteten  $\text{K}^+$ -Strom aus der Vakuole in das Cytosol.

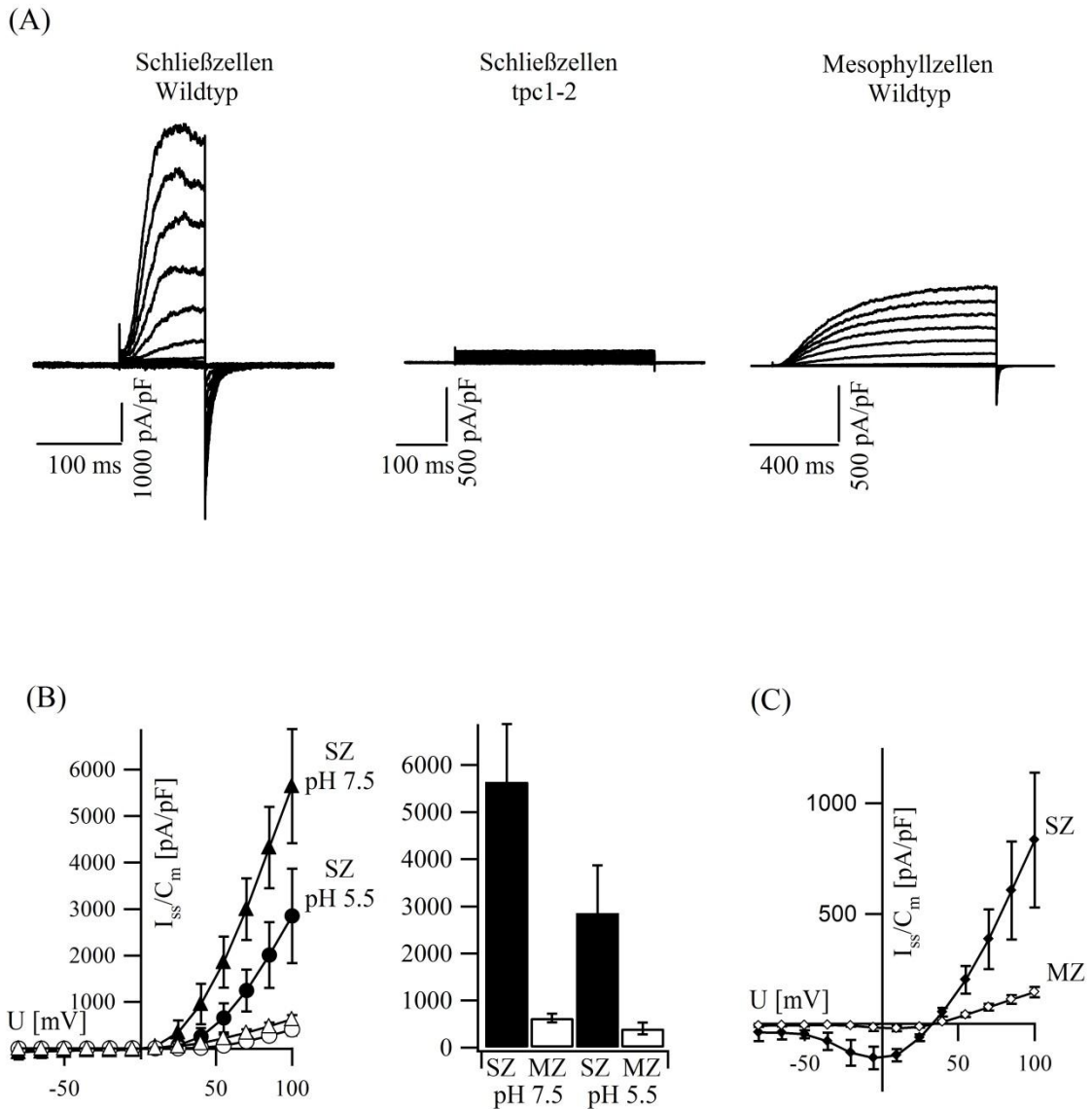


Abbildung 45: SV-Kanalströme von Schließzell- und Mesophyllvakuolen. (A) Typische Ganzzellstromdichten ( $I/C_m$ ) von WT- bzw. *tpc1-2*-Schließzellvakuolen (links bzw. Mitte) und WT-Mesophyllvakuolen (rechts) wurden unter symmetrischen  $K^+$ -Konzentrationen (150 mM) und pH-Werten (pH 7,5) aufgezeichnet. Ausgehend von einer Haltespannung von -60 mV wurde von -80 mV in 15-mV-Schritten zu +100 mV gesprungen. (B) Gleichgewichtsstromdichten von Schließzell- (SZ) und Mesophyllzellvakuolen (MZ) wurden bei unterschiedlichen luminalen pH-Werten (pH 7,5 oder pH 5,5) bestimmt und gegen die jeweils angelegte Spannung aufgetragen. Die mittleren SV-Kanalstromdichten von Mesophyll- und Schließzellvakuolen bei +100 mV wurden in einem Balkendiagramm dargestellt (rechts). SZ pH 7,5  $n=15$ ; SZ pH 5,5  $n=9$ ; MZ pH 7,5  $n=3$ ; MZ pH 5,5  $n=8$ . (C) Die Gleichgewichtsströme des SV-Kanals von Schließzell- und Mesophyllvakuolen wurden unter einwärtsgerichtetem  $K^+$ -Gradienten (30 mM  $KCl_{Cyt}/150$  mM  $KCl_{Vak}$ ) und symmetrischem pH-Wert (pH 7,5) ermittelt und gegen die angelegte Spannung aufgetragen. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.3A. (B, C) Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.5.2 Einzelkanalleitfähigkeit und absolute Offenwahrscheinlichkeit des Schließzell-SV-Kanals

Bei Schließzellvakuolen wurde im Vergleich zu Mesophyllvakuolen eine stets höhere SV-Kanalstromdichte detektiert. Dafür könnte neben dem negativeren Aktivierungspotential (vgl. Kap. 3.5.1) eine erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit, eine höhere absolute Offenwahrscheinlichkeit sowie eine höhere Expressionsdichte der SV-Kanäle verantwortlich sein. Deshalb wurde zunächst die Einzelkanalleitfähigkeit  $\gamma$  des SV-Kanals über Einzelkanalfluktuationen in der *Outside-out*-Konfiguration unter symmetrischen Lösungsbedingungen (100 mM KCl, pH 7.5) bestimmt. Die cytoplasmatische Seite der vakuolären Membran war dabei dem Badmedium zugewandt. Der Schließzell-SV-Kanal zeigte bei einer Membranspannung von +30 mV eine mit dem Mesophyll-SV-Kanal vergleichbar große Einzelkanalstromamplitude auf (Abbildung 46).

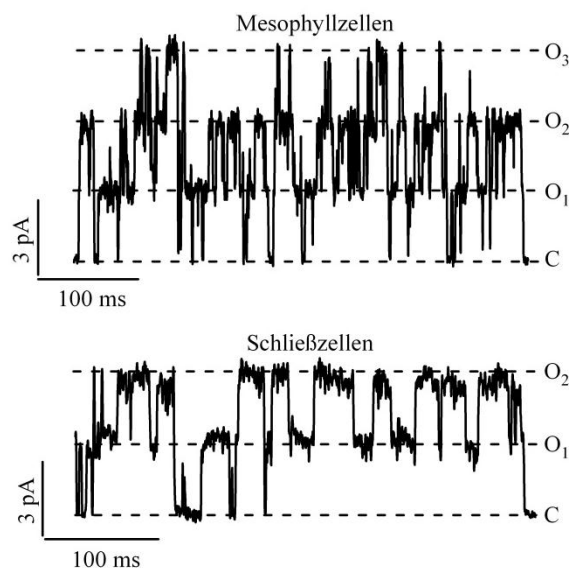


Abbildung 46: Einzelkanalaufzeichnungen des SV-Kanals von Schließzell- und Mesophyllvakuolen. Die *Outside-out*-Messungen wurden unter symmetrischen Lösungsbedingungen (100 mM KCl, pH 7,5) bei einer Membranspannung von +30 mV aufgezeichnet. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.3B. C gibt das Grundstromlevel an, bei dem alle Kanäle geschlossen vorliegen. O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> stellen die Stromniveaus dar, bei denen 1, 2 oder 3 Kanäle gleichzeitig geöffnet sind.

Dies wurde durch Berechnung der SV-Einzelkanalleitfähigkeit (Kap. 2.1.8.1) bestätigt, welche sich bei beiden Zelltypen unter neutralem pH-Wert (pH 7,5<sub>Cyt</sub>/pH 7,5<sub>Vak</sub>) zwischen 70-76 pS bewegte (Tabelle 6). Ein Ansäuern des vakuolären Lumens (pH 7,5<sub>Cyt</sub>/pH 5,5<sub>Vak</sub>) führte sowohl bei Schließzell- als auch bei Mesophyll-SV-Kanälen zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit (109-116 pS; Tabelle 6; vgl. Kap. 3.4.1.4).

Tabelle 6: SV-Einzelkanalleitfähigkeit  $\gamma$  von Schließzell- und Mesophyllvakuolen.

	Schließzellen	Mesophyllzellen
pH 7,5 sym.	$76 \pm 10$ pS n=7	$70 \pm 10$ pS n=3
pH 7,5 <sub>Cyt</sub> / pH 5,5 <sub>Vak</sub>	$116 \pm 5$ pS n=3	$109 \pm 8$ pS n=4

Die Einzelkanalleitfähigkeiten wurden im Bereich von -20 mV bis -60 mV berechnet und die Mittelwerte daraus mit den jeweiligen Standardabweichungen angegeben.

Von vergleichbaren Einzelkanalaufzeichnungen, wie in Abbildung 46 dargestellt, wurde ein *All-point*-Amplitudenhistogramm erstellt und anhand dessen die absolute Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  des SV-Kanals bestimmt (Kap. 2.1.8.2). Dabei zeigten die SV-Kanäle von Schließzellvakuolen in Abwesenheit von luminalem  $Ca^{2+}$  eine geringere Kanalaktivität im Vergleich zu Mesophyllvakuolen auf (Abbildung 47).

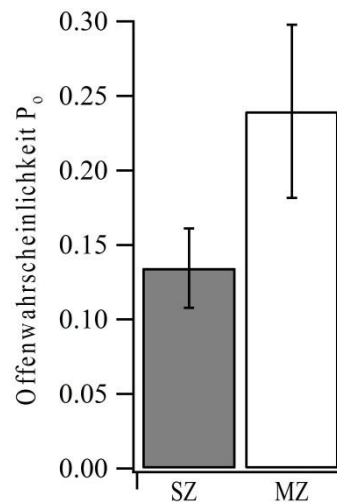


Abbildung 47: Absolute Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  von Schließzell- und Mesophyllzell-SV-Kanälen. Die Offenwahrscheinlichkeit wurde von Einzelkanalaufzeichnungen bei einer Membranspannung von -30 mV bestimmt. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.3B. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus  $n_{SZ}=5$  und  $n_{MZ}=3$  Experimenten.

Anhand der Einzelkanalexperimente konnte gezeigt werden, dass die hohen SV-Kanal-Ganzzellströme bei Schließzellvakuolen weder auf eine erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit noch auf einer gesteigerten absoluten Offenwahrscheinlichkeit zurückzuführen ist.

### 3.5.3 Expressionsniveau des SV-Kanals von Schließzellen und Mesophyllzellen

Um abzuklären, ob eine erhöhte Expressionsrate des TPC1-Proteins bei Schließzellen vorliegt, wurde weiterführend die Menge der *TPC1*-Transkripte mittels quantitativer



Echtzeit-PCR bestimmt (Kap. 2.2.2.5). Aus Mesophyllblättern wurden intakte Schließzellen und Mesophyllzellen gewonnen (Kap. 2.1.2). Die mRNA wurde isoliert (Kap. 2.2.1.1), mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.2.1.2) und die *TPCI* Transkripte quantitativ ermittelt (Kap. 2.2.2.5). Dabei konnte eine vierfach höhere *TPCI* Transkriptmenge in Schließzellvakuolen ( $2729 \pm 389$ ) im Vergleich zu Mesophyllzellvakuolen ( $691 \pm 117$ ) gemessen werden (Abbildung 48). Dies deutet daraufhin, dass die bis zu siebenfach höhere SV-Kanalstromdichte bei Schließzellvakuolen (siehe Kap. 3.5.1) im Vergleich zu Mesophyllvakuolen wahrscheinlich auf eine höhere Expressionsrate des SV-Kanals zurückzuführen ist.

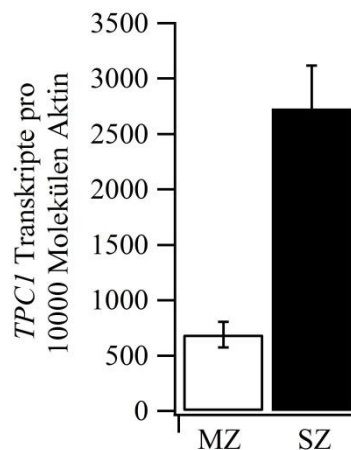


Abbildung 48: *TPCI*-Transkriptmenge in Mesophyll- und Schließzellvakuolen. Die Transkriptmenge von Mesophyll- und Schließzellvakuolen wurde über Echtzeit-PCR ermittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts von  $n=4$  Messungen.

### 3.5.4 Aktivierungskinetik des Schließzell-SV-Kanals

Die makroskopischen Ströme des Schließzell-SV-Kanals wiesen neben einer höheren Stromdichte eine schnellere Aktivierungskinetik auf als SV-Kanäle von Mesophyllvakuolen (Abbildung 45A, B). Zur genaueren Darstellung dieser Charakteristik wurde daher die halbmaximale Aktivierungszeit ( $t_{1/2}$ ) der SV-Kanäle bestimmt. Unter symmetrischen Lösungsbedingungen (150 mM KCl, pH 7,5) erreichten die Schließzell-SV-Kanalströme - bei einer Aktivierungsspannung von +70 mV - 50% des Gleichgewichtstromniveaus nach  $t_{1/2} = 38,2 \pm 5,9$  ms (Abbildung 49A und B). Ein Ansäuern des vakuolären Lumens (pH 5,5) verlängerte die halbmaximale Aktivierungszeit des Schließzell-SV-Kanals deutlich auf  $t_{1/2} = 269,7 \pm 33,9$  ms.

Mesophyll-SV-Kanäle hingegen aktivierten bei neutralem pH-Wert (pH 7,5) und einer Spannung von +70 mV um den Faktor fünf langsamer ( $t_{1/2} = 174,5 \pm 49,0$  ms) als die Schließzell-SV-Kanäle. Nach einer Absenkung des vakuolären pH-Wertes (pH 5,5) wurden halbmaximale Aktivierungszeiten von  $t_{1/2} = 308,4 \pm 53,9$  ms für die Mesophyll-

SV-Kanäle ermittelt (Abbildung 49B). Vergleicht man die beiden Zelltypen untereinander, so bewirkte ein Ansäuern des vakuolären Lumens bei Schließzellvakuolen eine siebenfache Verlängerung der halbmaximalen Aktivierungszeit, wohingegen bei Mesophyllvakuolen lediglich eine zweifache Zunahme von  $t_{1/2}$  beobachtet wurde. Dies deutet auf eine höhere Sensitivität des Schließzell-SV-Kanals bezüglich eines Ansäuerns des vakuolären Lumens hin. Bei Spannungen positiver von +70 mV wurde des Weiteren bei beiden Zelltypen eine Abnahme der halbmaximalen Aktivierungszeit beobachtet. Dies ist bei einem spannungsabhängigem Kanal mit einer höheren Aktivierungsrate bei positiveren Spannungen zu erklären (Pottosin et al., 2004).

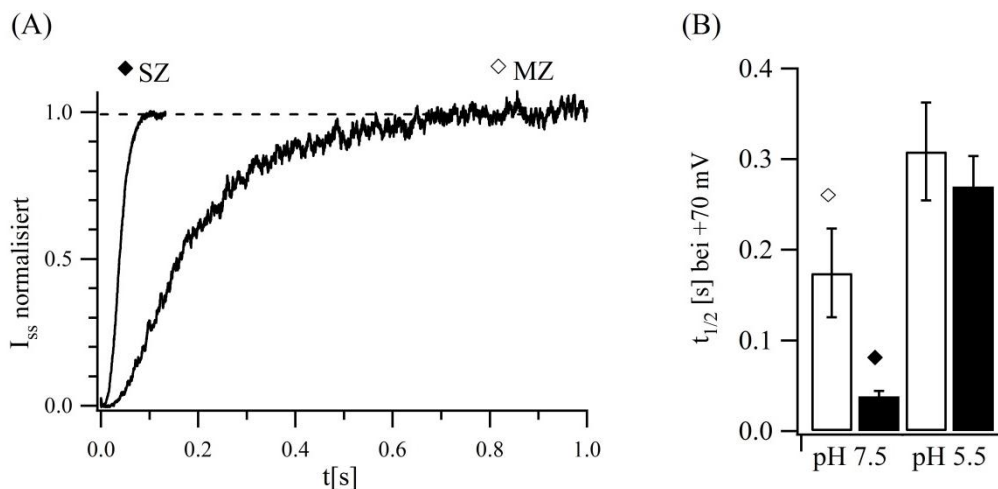


Abbildung 49: Aktivierungskinetik und halbmaximale Aktivierungszeiten der Schließzell- und Mesophyll-SV-Kanäle. (A) Die SV-Kanalströme auf einen Spannungspuls von +70 mV wurden auf den Maximalstrom normiert (gestrichelte Linie). Die Haltespannung betrug -60 mV. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.3C. (B) Die halbmaximale Aktivierungszeit  $t_{1/2}$  wurde bei +70 mV der SV-Kanäle anhand vergleichbarer Stromspuren wie von (A) bestimmt. Die Daten wurden unter einem vakuolären pH-Wert von 7,5 bzw. 5,5 und einem cytosolischem pH-Wert von 7,5 erhoben. Weiße Balken geben  $t_{1/2}$  von Mesophyllvakuolen ( $n_{\text{pH } 7,5}=5$ ;  $n_{\text{pH } 5,5}=7$ ), schwarze von Schließzellvakuolen ( $n_{\text{pH } 7,5}=9$ ;  $n_{\text{pH } 5,5}=5$ ) wieder. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus den jeweiligen Mittelwerten.

### 3.5.5 Cytosolische $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Schließzell- und Mesophyllzell-SV-Kanals

Cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation der Stomaweite. So bewirken ABA oder extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  eine Erhöhung des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels, was wiederum zu einer veränderten Membranleitfähigkeit und zu einem Turgor-induzierten Schließen der Stomata führt (Schroeder et al., 2001; McAinsh et al., 1995). Der SV-Kanal als dominanter Kationenkanal im Tonoplasten wird durch eine Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration stimuliert (Kap. 3.4.1.5). Um zu überprüfen, ob Schließzell-SV-Kanäle im Vergleich zu Mesophyll-SV-Kanälen eine andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität aufweisen, wurde die SV-Kanalstromdichte beider Zelltypen

unter ausgewählten cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen quantifiziert (Mesophyllvakuolen: 0, 100, 200, 300, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ; Schließzellvakuolen: 0, 50, 200, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ). Aufgrund des stark positiven Aktivierungspotentials bei geringen cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wurden die Stromdichten bei einer Membranspannung von +100 mV gemessen. Die mittleren Stromdichten wurden gegen die jeweiligen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen aufgetragen und die Datenpunkte zur qualitativen Beschreibung mit einer Michaelis-Menten-Gleichung interpoliert (Abbildung 50). Im Rahmen dessen wurde ein  $K_M$ -Wert von 130  $\mu\text{M}$  und 1170  $\mu\text{M}$  für den Schließzell- und Mesophyllzell-SV-Kanal ermittelt. Damit zeigte der Schließzell-SV-Kanal eine wesentlich höhere Sensitivität gegenüber der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als der von Mesophyllvakuolen.

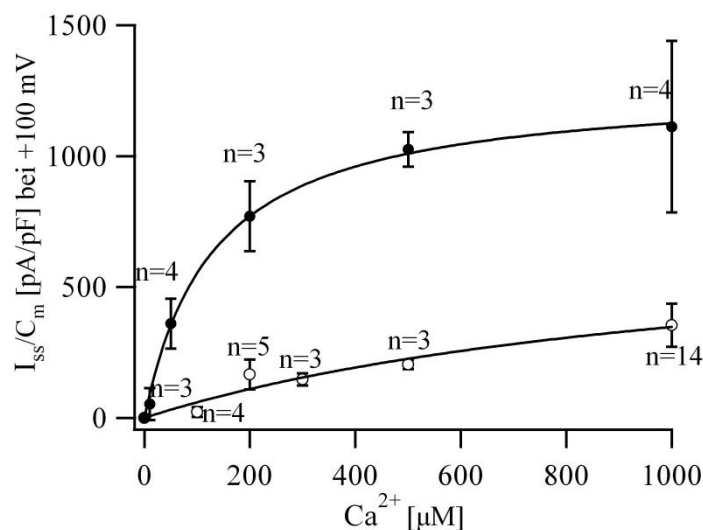


Abbildung 50: Dosis-Effekt-Kurve von cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Schließzell- und Mesophyll-SV-Kanäle. Die Gleichgewichtsströme bei einer Membranspannung von +100 mV wurden gegen die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgetragen. Die Punkte wurden durch eine Michaelis-Menten-Gleichung interpoliert und daraus die  $K_M$ -Werte bestimmt. Gefüllte ( $\bullet$ ) und offene ( $\circ$ ) Kreise zeigen die Mittelwerte von Schließzell- und Mesophyllvakuolen. Die Experimente wurden in der *Whole-vacuole*-Konfiguration unter symmetrischen KCl und pH-Wertbedingungen (100 mM KCl, pH 7,5) sowie mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  in der Pipette und unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in der Badlösung durchgeführt. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.3D. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung.

### 3.5.6 Vakuoläre $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Schließzell-SV-Kanäle

Die Aktivität der SV-Kanäle ist abhängig von der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Schließzell-SV-Kanäle wiesen eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität im Vergleich zu denen von Mesophyllvakuolen auf (Kap. 3.5.5). Vakuoläres  $\text{Ca}^{2+}$  dagegen wirkt sich bei Mesophyllvakuolen negativ auf die SV-Kanalaktivität aus (Kap. 3.4.1.3). So nahm die absolute Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ab. Um zu überprüfen, ob die luminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration den Schließzell-SV-Kanal gleichermaßen

beeinflusst, wurden Einzelkanalereignisse in der *Outside-out*-Konfiguration (Kap. 2.1.4.5) mit 0 mM bzw. 1 mM luminalen  $\text{Ca}^{2+}$  aufgezeichnet und daraus die absolute Offenwahrscheinlichkeit bestimmt (Kap. 2.1.8.2). Die Experimente wurden unter symmetrischen KCl (100 mM) und pH-Wert-Bedingungen (pH 7,5) durchgeführt. Bei einer Membranspannung von -30 mV lag in Abwesenheit von luminalem  $\text{Ca}^{2+}$  die absolute Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  bei 0,13. Entsprechend der SV-Kanalaktivität von Mesophyllvakuolen ging die Offenwahrscheinlichkeit auch bei Schließzellvakuolen nach Erhöhung der luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 1 mM stark zurück (Abbildung 51). In der Nähe des physiologischen Membranpotentials wurden keine Einzelkanalereignisse gemessen. Demzufolge scheinen die SV-Kanäle von Schließzell- und Mesophyllvakuolen eine ähnliche Sensitivität gegenüber vakuolärem  $\text{Ca}^{2+}$  aufzuweisen.

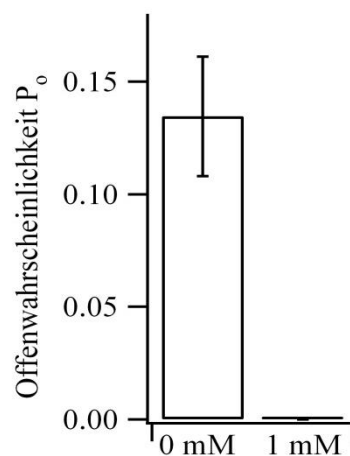


Abbildung 51: Luminales  $\text{Ca}^{2+}$  verringert die absolute Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  des SV-Kanals von Schließzellvakuolen. Die Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  wurde über Einzelkanalexperimente bei einer Membranspannung von -30 mV bestimmt. Die cytoplasmatische Seite der vakuolären Membran war in Richtung des Badmediums orientiert. Es wurden symmetrische Lösungsbedingungen (100 mM KCl und pH 7,5) mit 0 bzw. 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in der Pipette gewählt. Die Badlösung enthielt 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Weitere Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.3E. Die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen wurden aus  $n=5$  Experimenten für 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und  $n=3$  für 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  berechnet.

### 3.5.7 Ionenleitfähigkeit des Schließzell-SV-Kanals

Der  $\text{K}^+$ -Gradient über die vakuoläre Membran beeinflusste das Aktivierungspotential und damit die  $\text{K}^+$ -Ionenleitfähigkeit des Schließzell- und Mesophyll-SV-Kanals gleichermaßen (Kap. 3.4.1.6, 3.5.1). Um zu überprüfen wie sich die Ionenleitfähigkeit des nicht selektiven Kationen-SV-Kanals bei einem  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ - bzw.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Gradienten verhält, wurden erneut *Patch-Clamp*-Messungen durchgeführt und SV-Ströme auf makroskopischer Ebene aufgezeichnet.

In Gegenwart eines  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^+$ -Gradienten (15 mM  $\text{Ca}^{2+}_{\text{Cyt}}/150 \text{K}^+_{\text{Vak}}$ ) konnte bei Mesophyllvakuolen unter symmetrischem pH-Wert (pH 7,5) kein auswärtsgerichteter

$\text{Ca}^{2+}$ -Strom auf depolarisierende Spannungen beobachtet werden (Abbildung 42C, Kap. 3.4.1.6). Schließzellvakuolen dagegen zeigten unter den gleichen Lösungsbedingungen auf einen Spannungspuls von +70 mV auswärtsgerichtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme von 60 pA/pF (Abbildung 52A). Bei Schließzellvakuolen wurde nach Ansäuern des vakuolären Lumens (pH 5,5) eine Zunahme von SV-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen um das 2,5fache hervorgerufen (Abbildung 52). Unter einem physiologischen pH-Gradienten (pH 7,5<sub>Cyt</sub>/pH 5,5<sub>Vak</sub>) konnte auch beim SV-Kanal von Mesophyllvakuolen ein signifikanter  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom von 50 pA/pF bei +70 mV beobachtet werden. Die Membranleitfähigkeit des SV-Kanals für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurde somit in beiden Zelltypen vom luminalen pH-Wert beeinflusst. Dabei scheint der pK-Wert eine wichtige regulatorische Seite des Kanalproteins zu modifizieren und so die  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit des SV-Kanals von *A. thaliana* vorzugeben (vgl. Kap. 3.4.1.3). Der SV-Kanal von Schließzellvakuolen wies unter saurem vakuolären pH-Wert eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Membranleitfähigkeit auf als der von Mesophyllzellen, was wahrscheinlich auf die höhere TPC1-Transkriptrate zurückzuführen ist.

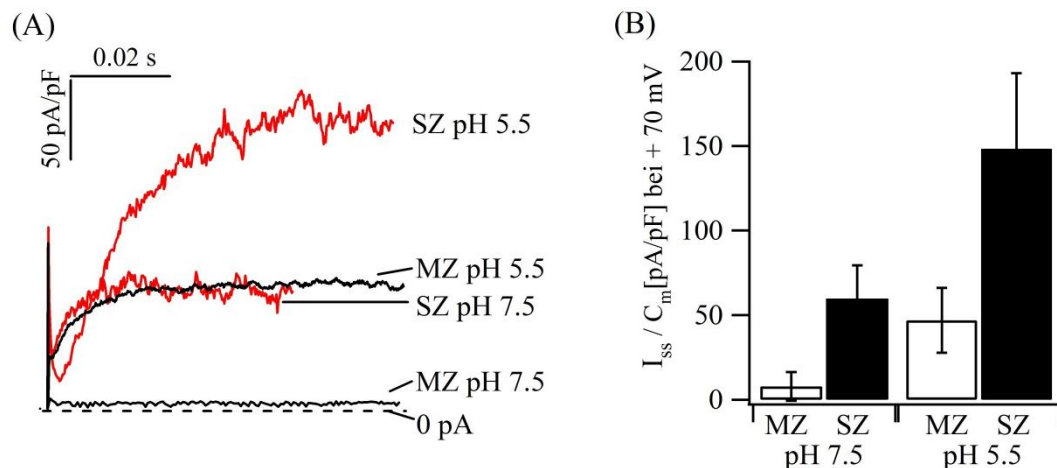


Abbildung 52: SV-Kanal-vermittelte auswärtsgerichtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme von Schließzell- und Mesophyllzellvakuolen. (A) Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme wurden in der *Whole-vacuole*-Konfiguration aufgezeichnet. Ausgehend von einer Haltespannung von -60 mV wurde zu +70 mV gesprungen und die Gleichgewichtsstromdichte ermittelt. (B) Das Balkendiagramm gibt die mittleren Stromdichten bei +70 mV wieder, welche aus Rohspuren wie in Abbildung A dargestellt, bestimmt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von pH 7,5 aus  $n_{\text{MZ}}=3$ ,  $n_{\text{SZ}}=5$  Experimenten und von pH 5,5 aus  $n_{\text{MZ}}=7$ ,  $n_{\text{SZ}}=5$  Experimenten. Die Messungen wurden in Gegenwart eines  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^{+}$ -Gradienten (15 mM  $\text{Ca}^{2+}_{\text{Cyt}}$ /150 mM  $\text{K}^{+}_{\text{Vak}}$ ) und unterschiedlichen vakuolären pH-Werten (pH 5,5, pH 7,5) durchgeführt. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.3F.

Ivashikina und Hedrich (2005) konnten zeigen, dass der SV-Kanal von *A. thaliana* Zellkulturvakuolen neben  $\text{K}^{+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  auch permeabel für  $\text{Na}^{+}$  ist. Unter einem  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -Gradienten (30 mM  $\text{Na}^{+}_{\text{Cyt}}$ /150 mM  $\text{K}^{+}_{\text{Vak}}$ ) wurden auswärtsgerichtete  $\text{Na}^{+}$ -Ströme detektiert. Waren jedoch  $\text{Na}^{+}$ -Ionen (50 mM bzw. 150 mM) in der Vakuole präsent, wurden weder einwärtsgerichtete  $\text{Na}^{+}$  noch  $\text{K}^{+}$  Ströme hervorgerufen. Zur Ermittlung der  $\text{Na}^{+}$ -Ionenleitfähigkeit des Schließzell-SV-Kanals wurden in der *Whole-vacuolar*-

Konfiguration Einfachspannungspulsprotokolle (siehe Kap. 2.1.7.1) von  $-80$  bis  $+100$  mV, ausgehend von einer Haltespannung von  $-60$  mV an die Membran angelegt und die makroskopische Stromantwort aufgezeichnet (Abbildung 42). Zunächst wurden SV-Kanal-Experimente unter reiner Anwesenheit von  $K^+$ -Ionen ( $30 \text{ mM } K^+_{\text{Cyt}}/150 \text{ mM } K^+_{\text{Vak}}$ ) durchgeführt. Unter einem einwärtsgerichteten  $K^+$ -Gradienten lag das Aktivierungspotential des SV-Kanals bei  $-50$  mV und das Umkehrpotential (siehe Kap. 2.1.8.5) bei  $U_{\text{rev}} = +34,0 \pm 0,6$  mV.

Beim Austausch der  $K^+$ -Ionen durch  $Na^+$ -Ionen auf der cytosolischen bzw. vakuolären Seite wurden im Gegensatz zu Messungen an Zellkulturvakuolen (Ivashikina und Hedrich, 2005) sowohl auswärts- als auch einwärtsgerichtete  $Na^+$ -Ströme vermittelt (Abbildung 53). Dabei stieg der einwärtsgerichtete  $Na^+$ -Strom bei einer Membranspannung von  $-30$  mV ( $30 \text{ mM } KCl_{\text{Cyt}}/150 \text{ mM } NaCl_{\text{Vak}}$ ) bzw.  $-5$  mV ( $30 \text{ mM } NaCl_{\text{Cyt}}/150 \text{ mM } KCl_{\text{Vak}}$ ) um das 2,5fache an. Mit  $150 \text{ mM } Na^+$  auf der vakuolären Seite entsprach das Aktivierungspotential dem unter reinen  $K^+$ -Bedingungen, während ein  $Na^+$ -Austausch auf der cytosolischen Seite das Aktivierungspotential des SV-Kanals um  $-15$  mV verschob. Unter einem auswärtsgerichteten  $Na^+$ -Gradienten ( $30 \text{ mM } NaCl_{\text{Cyt}}/150 \text{ mM } KCl_{\text{Vak}}$ ) lag das Umkehrpotential des Schließzell-SV-Kanals ( $U_{\text{rev}} = +31,0 \pm 1,5$  mV) um  $3$  mV negativer als unter einem reinen  $K^+$ -Gradienten ( $30 \text{ mM } K^+_{\text{Cyt}}/150 \text{ mM } K^+_{\text{Vak}}$ ), was darauf hindeutet, dass  $Na^+$ -Ionen leichter durch den SV-Kanal permeieren als  $K^+$ -Ionen. Im Gegensatz dazu war bei inversen Lösungsbedingungen ( $30 \text{ mM } KCl_{\text{Cyt}}/150 \text{ mM } NaCl_{\text{Vak}}$ ) das Umkehrpotential zu positiveren Spannungen hin verschoben ( $U_{\text{rev}} = +47,0 \pm 1,4$  mV).

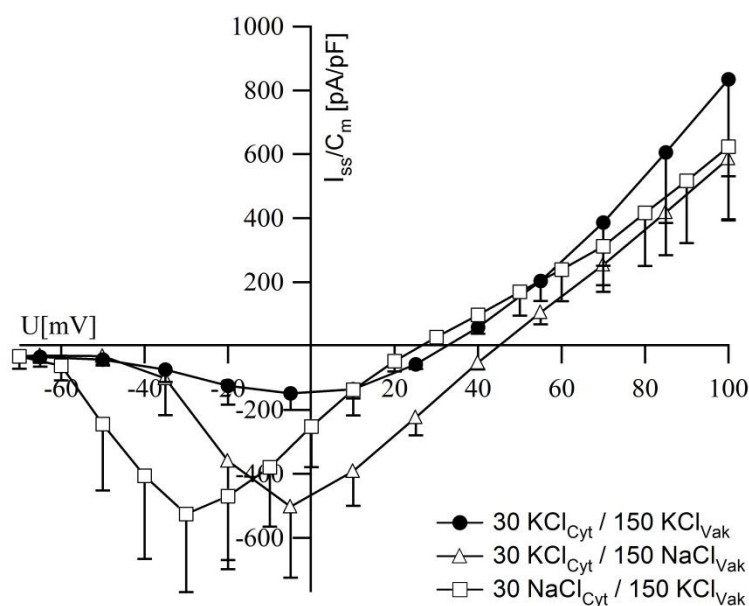


Abbildung 53:  $Na^+$ - und  $K^+$ -Ströme durch den SV-Kanal von Schließzellvakuolen. Die Gleichgewichtsstromdichten des Schließzell-SV-Kanals wurden unter asymmetrischen  $Na^+$ - und  $K^+$ -Konzentrationen in der *Whole-vacuole*-Konfiguration aufgezeichnet und gegen die jeweils angelegte Spannung aufgetragen. Dabei wurde

von -80 mV in 15 bzw. 10 mV Schritten bis zu +100 mV gesprungen. Die Haltespannung betrug dabei -60 mV bzw. -80 mV. In der Abbildung sind die errechneten Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern aufgezeigt. ● = 30 mM  $\text{KCl}_{\text{Cyt}}/150$  mM  $\text{KCl}_{\text{Vak}}$  (n=5);  $\Delta$  = 30 mM  $\text{KCl}_{\text{Cyt}}/150$  mM  $\text{NaCl}_{\text{Vak}}$  (n=7). □ = 30 mM  $\text{NaCl}_{\text{Cyt}}/150$  mM  $\text{KCl}_{\text{Vak}}$  (n=4). Die Badlösung enthielt 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  während die Pipettenlösung  $\text{Ca}^{2+}$ -frei war. Lösungsbedingungen siehe Kapitel 2.1.10.3G.

Unter der Annahme, dass die einzigen permeierenden Kationen durch den SV-Kanal  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Ionen darstellen, wurde mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Spannungsgleichung (Kap. 2.1.9; Goldman, 1943; Hodgkin und Katz, 1949) die relative Permeabilität des Schließzell-SV-Kanals für  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Ionen ( $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$ ) mit 1,3:1 grob bestimmt. Da jedoch zusätzlich  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den Lösungen präsent waren, wurden die Messungen erneut von Florian Rienmüller unter symmetrischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedingungen (1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) und unter Ausschluss von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen durchgeführt. Dabei wurde die hier errechnete relative Permeabilität des Schließzell-SV-Kanals für  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Ionen ( $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$ ) mit 1,3:1 bestätigt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass  $\text{Na}^+$ -Ionen etwas besser als  $\text{K}^+$ -Ionen durch den Schließzell-SV-Kanal permeieren können.

### 3.5.8 Zelltypspezifische SV-Kanal-Eigenschaften hervorgerufen durch unterschiedliches RNA-Splicing?

SV-Kanäle von Schließzell- und Mesophyllvakuolen zeigten zelltypspezifische Unterschiede in der Aktivierungskinetik, der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenleitfähigkeit auf (Kap. 3.5.4, 3.5.5 und 3.5.7). Da das für den SV-Kanal kodierende *TPC1*-Gen im Genom von *A. thaliana* als *single copy gene* vorliegt, wurde überprüft, ob durch posttranskriptionale Modifizierung (z. B. *splicing*, *editing*) die *TPC1*-RNA-Sequenz von Schließzellvakuolen im Vergleich zur RNA-Sequenz von Mesophyllvakuolen verändert wurde. Dazu wurde mRNA von Mesophyll- und Schließzellprotoplasten aus 6 Wochen alten *A. thaliana* Blättern isoliert (Kap. 2.2.1.1) und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.2.1.2). Sieben Primerpaare wurden ausgewählt, um definierte *TPC1*-Fragmente mit einer Länge von 444 bis 591 Basenpaaren mittels PCR (Kap. 2.2.2.1) zu vervielfältigen (Abbildung 54A). Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2.2) in einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt. Anhand des Bandenmusters wurde überprüft, ob die *TPC1*-Fragmente beider Zelltypen unterschiedliche Längen aufzeigten. Hierbei konnten keine Größenunterschiede der *TPC1*-PCR-Fragmente nachgewiesen werden (Abbildung 54B). Die PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel oder direkt aus dem PCR-Ansatz isoliert und aufgereinigt (Kap. 2.2.2.3). Anschließend wurde die genaue Basenabfolge der *TPC1*-cDNA mittels Sequenzierung überprüft (Kap. 2.2.2.4). Jedoch konnten auch dabei weder Splicevarianten noch eine Änderung in der Nukleotid-Abfolge der *TPC1*-cDNA-



Sequenzen beider Zelltypen festgestellt werden. Die zelltypspezifischen Eigenschaften des SV-Kanals von Schließzell- und Mesophyllvakuolen wurden demzufolge nicht durch eine posttranskriptionale Modifikation hervorgerufen.

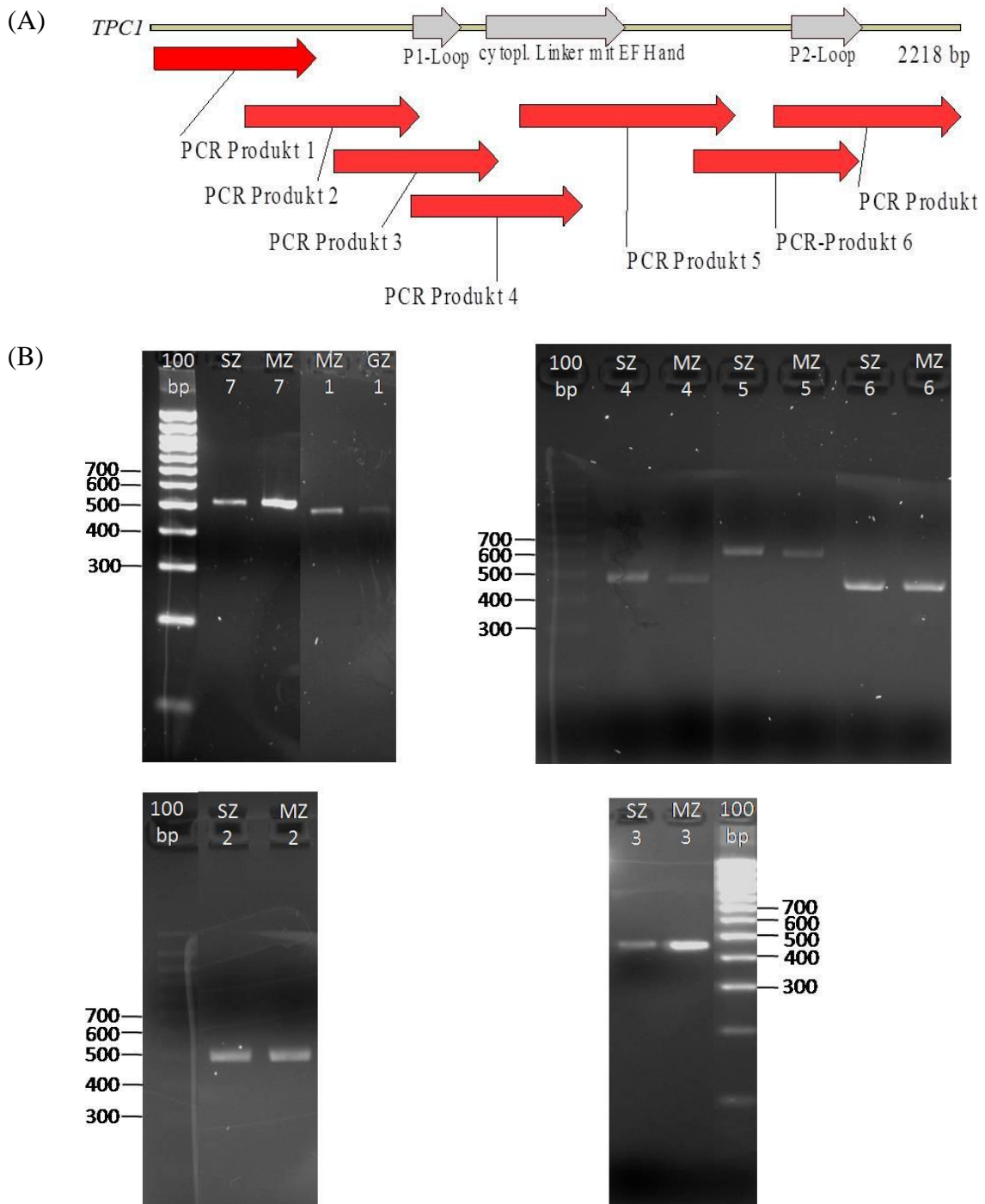


Abbildung 54: Überprüfung der *TPC1*-cDNA von Schließzell- und Mesophyllvakuolen auf putative Splicevarianten. (A) Die Primer (rote Pfeile) wurden für die Synthese von *TPC1*-PCR-Produkten mit einer Größe von 444 bis 591 Basenpaaren gewählt. Die grauen Pfeile markieren jeweils die erste und zweite Porendomäne sowie die cytoplasmatische Schleife mit den beiden EF Händen. (B) Die *TPC1*-PCR-Fragmente 1-7 von Schließzell- und Mesophyll-cDNA wurden in einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 5  $\mu$ l der PCR und 8  $\mu$ l 100 Bp Marker eingesetzt. Die Größen der Banden und somit die Anzahl der Basenpaare sind in der jeweiligen Abbildung angegeben.



## 4 Diskussion

### 4.1 Protonenpumpen in Mesophyll- und Schließzellvakuolen

Die pflanzliche Vakuole ist ein multifunktionales Organ und einzigartig unter eukaryotischen Organellen, da sie neben der vakuolären V-ATPase eine weitere Protonenpumpe, die vakuoläre Pyrophosphatase aufweist (Bethke und Jones, 2000). Diese pumpen unter Verbrauch von ATP bzw. Pyrophosphat  $H^+$  in das vakuoläre Lumen. Während für die Pyrophosphatase organisches Pyrophosphat als einziges Substrat zur Verfügung steht, zeigt die V-ATPase auch geringe Aktivität bezüglich organischem Pyrophosphat, GTP, UTP und CTP (Rea und Poole, 1986). Durch die Protonenpumpen wird die cytosolische pH-Homöostase reguliert und zugleich ein Membranpotential über die vakuoläre Membran generiert (Bethmann et al., 1995; Krebs et al., 2010). Durch den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten kann die Aktivität von spannungsgesteuerten Ionenkanälen beeinflusst und sekundäre Transportprozesse an der vakuolären Membran energetisiert werden. Darüber hinaus kann eine Änderung der  $H^+$ -Konzentration im Cytosol oder vakuolären Lumen eine Funktionsänderung von pH-sensitiven Transportsystemen herbeiführen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Pumpaktivität der  $H^+$ -Pyrophosphatase und der V-ATPase an Mesophyllvakuolen von *A. thaliana* WT-Pflanzen durch *Patch-Clamp*-Messungen belegt und quantifiziert werden. Die cytosolische Applikation von 150  $\mu M$   $PP_i$  bewirkte durch die Pyrophosphatase vermittelte Pumpströme von 0,19 pA/pF. Eine zusätzliche Gabe von 5 mM ATP verursachte eine weitere Zunahme von 2,3 pA/pF (Abbildung 18, Abbildung 19). Sowohl der  $PP_i$ - als auch ATP-induzierte Effekt war durch Auswaschen des jeweiligen Substrats vollständig reversibel. Bereits 1989 konnte Hedrich et al. vergleichbare Pumpströme messen, die durch ATP und  $PP_i$  induziert wurden. Mit Hilfe des spezifischen V-ATPase-Inhibitors Concanamycin A (Huss et al., 2002; Dröse und Altendorf, 1996) wurde gezeigt, dass es sich bei den ATP-vermittelten positiven Strömen tatsächlich um einen durch die V-ATPase vermittelten  $H^+$ -Transport handelte. In den *Patch-Clamp*-Experimenten wurde nach cytosolischer Applikation von 20  $\mu M$  Concanamycin A ein vollständiger Rückgang des ATP-induzierten Pumpstroms beobachtet (Abbildung 20). Da die Versuchsbedingungen so eingestellt wurden, dass keine passiven Ströme auch bei ATP-abhängiger Aktivierung fließen, ist dies ein weiterer Beleg dafür, dass die positiven Ströme durch die V-ATPase hervorgerufen werden,

indem sie unter ATP-Hydrolyse  $H^+$  aus dem Cytosol in das vakuoläre Lumen pumpt (Abbildung 20).

## 4.2 V-ATPase- und Pyrophosphatase-Aktivität der *vha-a2-vha-a3*-Doppelmutante

Die vakuoläre V-ATPase kann in einen integralen Membrankomplex  $V_0$  und einen peripheren  $V_1$ -Komplex unterteilt werden. Beide Komplexe sind aus einer Vielzahl von Untereinheiten aufgebaut (Beyenbach und Wiczorek, 2006). Während der peripher liegende  $V_1$ -Komplex für die ATP-Hydrolyse verantwortlich ist, verlagert der  $V_0$ -Komplex die Protonen aus dem Cytosol in das vakuoläre Lumen (Kap. 1.3.4; Cipriano et al., 2008). Schumacher et al. (1999) identifizierte *det3* (*de-etiolated 3*) als V-ATPase-Mutante mit eingeschränkter Funktionalität. *DET3* codiert für die C-Untereinheit der V-ATPase. Die *det3*-Mutante weist einen um die Hälfte reduzierten mRNA- und dadurch auch Proteingehalt der V-ATPase C-Untereinheit auf. Dies führt zu einem zwergenähnlichen Wuchs, vergleichbar mit dem Wachstumsphänotyp der *vha-a2-vha-a3*-Mutante, was wahrscheinlich mit einer Reduktion der Zellexpansion zu begründen ist (Schumacher et al., 1999). Das geringe Wachstum der *det3*-Mutanten wurde aber auch mit einem gestörten Vesikeltransport in Verbindung gebracht (Dettmer et al., 2006). Mittels eines kolorimetrischen Versuchsaufbaus konnte eine 60%ige Reduktion der V-ATPase-Aktivität an fünf Tage alten *det3*-Keimlingen aufgezeigt werden (Schumacher et al., 1999). Diese wurde durch elektrophysiologische Messungen an *det3-1*-Mutanten im Vergleich zum WT bestätigt (Rienmüller et al., 2012).

Die V-ATPase-Doppelmutante *vha-a2-vha-a3* weist neben der *det3*-Mutante ebenfalls einen stark reduzierten Pumpstrom auf. Sie besitzt ein am N-Terminus um 41 Aminosäuren verkürztes Protein der VHA-a Untereinheit (Krebs et al., 2010). Die VHA-a-Untereinheit bildet einen Halbkanal aus, durch den die Protonen aus dem cytosolischen Raum in das vakuoläre Lumen geschleust werden (Beyenbach und Wiczorek, 2006). Arabidopsispflanzen weisen drei Isoformen für die VHA-a-Untereinheit des V-ATPase- $V_0$ -Komplexes auf, wobei VHA-a1 in den frühen vesikulären Endosomen des *trans*-Golgi-Netzwerks vorliegt (Dettmer et al., 2006; Hanitzsch, 2007; Krebs et al., 2010). Die beiden Isoformen VHA-a2 und VHA-a3 wurden dagegen ausschließlich in der vakuolären Membran gefunden (Kluge et al., 2004; Krebs et al., 2010).

Die *vha-a2-vha-a3*-Doppelmutante besitzt ein am N-Terminus um 41 Aminosäuren verkürztes Protein der VHA-a Untereinheit (Krebs et al., 2010) und zeigt einen ausgeprägten Phänotyp mit einem verringerten Rosettendurchmesser auf (Abbildung 21). Das Wachstum der Pflanze ist stark abhängig von der Tageslänge. Darüber hinaus weist die

*vha-a2-vha-a3*-Mutante eine 80% geringere Nitratkonzentration auf im Vergleich zu WT-Pflanzen (Krebs et al., 2010). Ein kleiner Teil des Nitrats verbleibt im Cytoplasma, während der größte Anteil durch den  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  Antiporter AtCLCa pH-Wert abhängig in die pflanzliche Vakuole transportiert und dort gespeichert wird (De Angeli et al., 2006). Die Auswirkungen der Mutation auf den Metabolismus und die Entwicklung der Pflanze korrelieren mit einem Funktionsverlust der V-ATPase wie die elektrophysiologische Charakterisierung der *vha-a2-vha-a3*-Mutante und die damit verbundene Quantifizierung der Pumpstromaktivität belegen. So wurden im Vergleich zum WT bei der *vha-a2-vha-a3*-Mutante nur noch 7% der ATP-induzierten Pumpströme generiert (Abbildung 22). Überraschenderweise konnten diese Rest-Pumpströme der *vha-a2-vha-a3*-Mutante nicht durch den spezifischen V-ATPase-Inhibitor Concanamycin A inhibiert werden (Abbildung 23). Darüber hinaus konnten bei der *vha-a2-vha-a3*-Mutante keine ATP-induzierten Pumpströmen gemessen werden, wenn diese zunächst mit  $\text{PP}_i$  und anschließend mit  $\text{PP}_i$  und ATP perfundiert wurde (Abbildung 24), im Gegensatz zur alleinigen Gabe von ATP (Abbildung 22). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es sich bei den Rest-Pumpströmen nicht um Pumpströme der V-ATPase handelt. In Einklang mit diesen Daten konnten Florian Rienmüller (AG Hedrich, Universität Würzburg) im Rahmen seiner Diplomarbeit zeigen, dass *vha-a2-vha-a3*-Mutanten lediglich ein Membranpotential von -1,7 mV generieren konnten, was in etwa 3% der Membranpolarisierung (-57 mV) von WT-Vakuolen entsprach. Diese Studien belegen, dass die VHA-a-Untereinheit ein essentieller funktioneller Bestandteil des  $V_0$ -Komplexes der V-ATPase ist. Der Verlust der V-ATPase-Aktivität in der *vha-a2-vha-a3*-Mutante führt ferner zu einer Alkalisierung des vakuolären pH-Werts um 0,5 pH-Wert-Einheiten auf pH 6,4 (Krebs et al., 2010). Das heißt, trotz funktionsunfähiger V-ATPase besteht bei der Doppelmutante ein Protonengradient über der vakuolären Membran, der - bei Annahme eines cytosolischen pH-Werts von pH 7,4 - durch eine 10-fach höhere Protonenkonzentration im vakuolären Lumen charakterisiert ist. Interessanterweise konnte keine signifikant erhöhte Pumpaktivität der Pyrophosphatase in der V-ATPase-Doppelmutante ermittelt werden. (Abbildung 24). Demzufolge scheint die Pyrophosphatase die fehlende V-ATPase und die damit verbundene eingeschränkte Membranpolarisierung nicht zu kompensieren. Es stellt sich somit die Frage, ob der in der Doppelmutante beobachtete Protonengradient alleinig durch die  $\text{H}^+$ -Pyrophosphatase generiert wird. Möglicherweise könnten Vesikel des trans-Golgi-Netzwerks mit intakter VHA-a1-Untereinheit zum vakuolären Ansäuern beitragen (Krebs et al., 2010).

### 4.3 Rolle der vakuolären Protonenpumpen bei Schließzellbewegungen

Während der Anreicherung von Kalium, Calcium, Chlorid, Nitrat, Zucker, etc. in der Schließzellvakuole bei Stomaöffnung ist eine hohe Aktivität der vakuolären Protonenpumpen entscheidend. Durch den Aufbau eines Protonengradienten an der vakuolären Membran wird eine protonenmotorische Kraft für den Transport dieser Stoffe generiert. Expressionsstudien an *A. thaliana* zeigten, dass in Schließzellen die Transkriptanzahl des vakuolenspezifischen VHA-a2-Allels um das 20-fache erhöht war im Vergleich zu Mesophyllzellen (Abbildung 25A). Das VHA-a2-Allel, was für die Untereinheit a des  $V_0$ -Komplex codiert, wurde stellvertretend für alle Untereinheiten des vakuolären V-ATPase-Proteins herangezogen, da die Untereinheit a nur einmal in der vakuolären V-ATPase vorliegt (Kap. 1.3.4). Die Pumpstromdichte der Schließzell-V-ATPase lag bei einer Gabe von 5 mM ATP 1,5-fach höher im Vergleich zu Mesophyllzellen (Abbildung 25A). Willmer et al. (1995) haben mit Hilfe eines Enzymtests ebenfalls eine höhere V-ATPase-Aktivität in Schließzellvakuolen von *Commelina communis* im Vergleich zu Mesophyllvakuolen gefunden. Die V-ATPase von Schließzellvakuolen zeigte jedoch ähnliche Sättigungswerte, pH- und Temperatur-Optima wie in anderen Zelltypen auf (Willmer et al., 1995). Durch die hohe Pumpleistung der V-ATPase an der vakuolären Membran der hoch spezialisierten Schließzellen wird eine starke protonenmotorische Kraft generiert. Dies könnte zu der von Irving et al. (1992) beobachteten Alkalisierung des Cytosols von bis zu 0,3 pH-Wert Einheiten nach ABA-Applikation beitragen. Des Weiteren wurde eine verstärkte Bindung von  $H^+$  in der Zelle als möglicher Grund für die Alkalisierung angeführt (Blatt und Grabov, 1997).

Über die Regulation der vakuolären Schließzell-V-ATPase ist bis heute wenig bekannt. Während blaues Licht die Aktivität der Plasmamembran-gebundenen ATPase in Schließzellen stimuliert (Kinoshita und Hayashi, 2011), zeigte die vakuoläre V-ATPase von *Commelina communis* Schließzellen nach Belichtung mit fluoreszierendem Licht ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) bzw. Kunstlicht ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) keine Änderung der Aktivität auf (Willmer et al., 1995). Trotzdem scheint die vakuoläre V-ATPase eine essentielle Rolle in Schließzellen bei der Weiterleitung von Umweltsignalen zu spielen. So wird bei WT-Pflanzen ein Stomaschluss durch ABA, oxidativen Stress, Kälte und externem  $Ca^{2+}$  induziert (McAinsh et al., 1996; McAinsh und Pittman, 2009; Roelfsema et al., 2012). Dem Stomaschluss geht ein oszillierender  $Ca^{2+}$ -Strom voraus (Gilroy et al., 1990; Allen et al., 2001). Bei Schließzellen der *det3*-Mutante (Kap. 1.3.4) konnte durch eine Erhöhung der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und einer Applikation von  $H_2O_2$  keine  $Ca^{2+}$ -Oszillation, sondern nur eine stetige  $Ca^{2+}$ -Erhöhung hervorgerufen werden, was nicht mehr zum Schließen der Stomata führte (Allen et al., 2000). Daraus kann geschlossen werden, dass die V-ATPase an der Kontrolle von  $Ca^{2+}$ -Strömen -

wahrscheinlich indirekt durch Einwirkung über das Membranpotential auf beteiligte Transportproteine - beteiligt ist.

Die Rolle der vakuolären Pyrophosphatase in Schließzellen wird dagegen kontrovers diskutiert. In jungen Pflanzengeweben wurde eine hohe Aktivität der Pyrophosphatase nachgewiesen (Maeshima, 2000). Dies ist durch die hohe Konzentration von Pyrophosphat bedingt, welches bei verschiedenen metabolischen Prozessen in der Zelle anfällt. In sich entwickelnden Schließzellen wird jedoch eher eine geringe Syntheserate dieses Makromoleküls vermutet (Roelfsema und Hedrich, 2005) und deshalb der Pyrophosphatase nur eine unbedeutende Rolle bei der Energetisierung der Schließzellvakuole zugeordnet. Im Gegensatz dazu postulierte Darley et al. (1995; 1998), dass die Pyrophosphatase als *backup*-System für die Energetisierung des Tonoplasten zur Verfügung stehen könnte, wenn bei schwierigen Umweltbedingungen wie z. B. niedrigen Temperaturen oder Sauerstoffmangel kein ATP für die Funktion der V-ATPase zur Verfügung steht.

## 4.4 Vakuoläre Zuckertransporter

Die funktionelle Charakterisierung verschiedenster Zuckertransportproteine ist seit Jahren ein wichtiger Bestandteil der Forschungsarbeit. Einige wurden auf molekularbiologischer Ebene erfasst und genauer charakterisiert. Die elektrophysiologische Charakterisierung von vakuolären Zuckertransportern im nativen System gestaltete sich jedoch aufgrund der geringen Umsatzrate als schwierig.

### 4.4.1 AtINT1 – ein vakuolärer H<sup>+</sup>/myo-Inositol-Symporter

Das Transportprotein AtINT1 wurde durch subzelluläre GFP-Lokalisationsstudien im Tonoplasten von *A. thaliana* lokalisiert (Schneider et al., 2008). Die ebenfalls zur INT-Familie gehörenden, nah verwandten Transportproteine INT2 (Schneider et al., 2007) und INT4 (Schneider et al., 2006) werden dagegen in der Plasmamembran exprimiert. Die subzelluläre Lokalisation der pflanzlichen Inositoltransportproteine wird durch eine Domäne am C-Terminus vorgegeben (Wolfenstetter et al., 2012). Durch heterologe Expression in *Xenopus* Oozyten wurden INT2 und INT4 als H<sup>+</sup>/Inositol-Symporter elektrophysiologisch charakterisiert. Aufgrund des engen Verwandtschaftsgrades von AtINT1 zu AtINT2 und AtINT4 (Abbildung 5; Schneider et al., 2008) lag es nahe, bei AtINT1 ähnliche Transporteigenschaften anzunehmen. Eine Bestätigung der Symporter-Funktion von AtINT1 konnte nun im Rahmen dieser Arbeit mittels *Patch-Clamp*-Studien an Mesophyllvakuolen von WT-Pflanzen sowie der *int1.1*- und *int1.2*-Mutanten erlangt werden. Es wurde unter inversen pH-Wert-Bedingungen (pH 5.5<sub>Cyt</sub>/pH 7.5<sub>Vak</sub>) gearbeitet, damit trotz konstanter pH-Bedingungen ein H<sup>+</sup>/myo-Inositol-Symport über

die Änderung der *myo*-Inositol-Konzentration induziert werden konnte. Da WT-Vakuolen eine positive Stromantwort (Abbildung 27) auf die cytosolische Applikation von 50 mM *myo*-Inositol zeigten, kann auf einen H<sup>+</sup>-gekoppelten Transport von *myo*-Inositol aus dem Cytosol in das vakuoläre Lumen geschlossen worden. Wie bereits Carpaneto et al. (2005) am ZmSUT1-Protein zeigte, ist der H<sup>+</sup>-gekoppelte Transport von Zuckern umkehrbar, in Abhängigkeit des Zucker- und pH-Gradienten sowie dem anliegenden Membranpotentials. Unter physiologischen Bedingungen (saurer vakuolärer pH-Wert, neutraler cytosolischer pH-Wert, negatives cytosolisches Membranpotential) wäre demzufolge ein H<sup>+</sup>/*myo*-Inositol Symport ausschließlich aus dem vakuolären Lumen in das Cytosol zu erwarten. Die molekulare Identifizierung des zugrundeliegenden Transporters ermöglichten schließlich die Studien an den *int1.1/1.2*-Vakuolen (Abbildung 26). Im Gegensatz zu WT-Vakuolen wurde bei *int1.1*-Vakuolen auf die cytosolische Gabe von *myo*-Inositol keine wesentliche Veränderung der Stromamplitude registriert (Abbildung 27, Abbildung 28B), was *int1.1* als Verlustmutante identifiziert. Bei *int1.2*-Vakuolen wurden jedoch niedrige *myo*-Inositol-induzierte H<sup>+</sup>-Ströme gemessen, welche etwa 30% der mittleren Stromamplitude des Wildtyps betragen (Abbildung 27, Abbildung 28B). Die stark reduzierten Ströme der *int1.2*-Mutante sowie die Quantifizierung der mRNA (Schneider et al., 2008) charakterisieren diese nicht als Knockout-, sondern eher als Knockdown-Pflanze. Die *Patch-Clamp*-Messungen an den *int1.1*- und *int1.2*-Mutanten bestätigen ferner, dass (i) INT1 im Tonoplasten lokalisiert ist und (ii) die *myo*-Inositol-induzierte positive Stromantwort über dieses Transportprotein hervorgerufen wird.

Weitere *Patch-Clamp*-Untersuchungen zur Substratspezifität legen nahe, dass INT1 maßgeblich einen H<sup>+</sup>-gekoppelten Transport von *myo*-Inositol an der vakuolären Membran vermittelt. So wiesen WT-Vakuolen als auch *Atint1.1*-Vakuolen eine positive Stromantwort auf, wenn unter inversen Lösungsbedingungen auf der cytosolischen Seite 50 mM Glucose statt *myo*-Inositol appliziert wurde (Abbildung 28A). Im Vergleich zum WT fielen bei *Atint1.1*-Vakuolen diese Ströme jedoch um 50% geringer aus (Abbildung 28A, B). Ob dies durch die Abwesenheit des INT1-Transportproteins begründet ist, welches eine geringe Transportaktivität für Glukose aufweist, oder dies auf einen indirekten Effekt beruht, konnte nicht hinreichend erörtert werden. Die Glucose-induzierten Ströme der *Atint1.1*-Vakuolen müssen somit von einem anderen Symporter generiert werden. Mittels der *Patch-Clamp*-Analysen an Mesophyllvakuolen wurde jedoch schlussendlich gezeigt, dass AtINT1 *myo*-Inositol H<sup>+</sup>-gekoppelt aus der Vakuole in das Cytosol transportiert.

Eine Aufnahme von cytoplasmatischem *myo*-Inositol in die pflanzliche Vakuole oder eine Ansammlung von hohen Konzentrationen in der Vakuole wurde bis heute nicht beschrieben (Schneider et al., 2008). Die pflanzliche Vakuole beinhaltet jedoch eine große Anzahl von Enzymen, welche an der Aufbereitung nicht mehr benötigter Zellbe-

standteile beteiligt sind. In Mesophyllvakuolen von *Hordeum vulgare* wurden vakuoläre Phosphatasen identifiziert, welche Inositol-1,4,5-triphosphat hydrolysieren und *myo*-Inositol produzieren (Martinoia et al., 1993). Phosphatidylinositol-3-phosphat, welches am Vesikeltransport beteiligt ist, wird im trans-Golgi Netzwerk synthetisiert und zum Abbau in die Zentralvakuole von *A. thaliana* transportiert (Kim et al., 2001). Durch den Abbau der verschiedenen zellulären Bestandteile wird *myo*-Inositol im vakuolären Lumen gebildet. Im Anschluss daran scheint der  $H^+$ /*myo*-Inositol Symporter das recycelte *myo*-Inositol aus der Vakuole in das Cytoplasma zu transportieren, wo es erneut für biosynthetische Prozesse zur Verfügung steht.

*myo*-Inositol ist an unterschiedlichsten metabolischen Reaktionen der Zelle beteiligt und spielt als Vorläufermolekül bei der Synthese von Uridin-diphosphat-glucuronsäure (UDPGA) eine bedeutende Rolle, welches anschließend für die Synthese von Galacturonsäure, Xylose, Apiose und Arabinose zur Verfügung steht (Schneider et al., 2008). Diese Verbindungen sind wichtige Bestandteile von pflanzlichen Zellwandpolymeren (Loewus und Murthy, 2000; Kanter et al., 2005). *myo*-Inositol stellt die strukturelle Basis für Membranen und in der Membran verankerte Proteine bereit, da es ein Bestandteil von Phospholipiden (Lehle, 1990) und Glycosylphosphatidylinositol (Schultz et al., 1998) ist. Durch die Umwandlung des Phospholipids Phosphatidylinositol (PI) entsteht Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ), welches hydrolysiert durch die Phospholipase C in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $IP_3$ ), einen wichtigen *second messenger* der Zelle umgewandelt wird. In Schließzellen wurden z. B. Kanäle identifiziert, welche durch Inositol-1,4,5-Triphosphat aktiviert vakuoläres  $Ca^{2+}$  mobilisieren (Allen et al., 1995; Allen und Sanders 1994a; Gilroy et al., 1990). Neben dem Zuckeralkohol *myo*-Inositol kommen eine Vielzahl anderer Zucker und Zuckerderivate wie z.B. Glukose, Mannitol, Sorbitol, Stachyose und auch Saccharose in der pflanzlichen Zelle vor.

#### 4.4.2 ATSUC4 – ein vakuolärer $H^+$ /Saccharose-Symporter

Saccharose wird im Cytosol aus Triosephosphat, dem Produkt der Photosynthese synthetisiert. Das Disaccharid stellt das ideale Transportmolekül in der Pflanze dar und wird über den Phloemsaft von photosynthetisch aktiven *source*-Gewebe, zu *sink*-Gewebe transportiert. Dort wird es in der Vakuole gespeichert oder in Stärke umgewandelt. Saccharose ist ein nicht reduzierender Zucker und chemisch inert. Für die Akkumulation von Saccharose in Vakuolen, sowie deren Entlassung werden Saccharosetransporter benötigt, die aktiv den Saccharosetransport über die Membran koordinieren. In *Patch-Clamp*-Experimenten zeigten WT- und *Atsuc4.1*-Vakuolen von *A. thaliana* unter physiologischen pH-Wert Bedingungen ( $pH\ 7.5_{Cyt}/pH\ 5.5_{Vak}$ ) nach cytosolischer Applikation von 50 mM Saccharose stets eine negative Stromantwort (Abbildung 30, Abbildung 32). Nach Bertl et al. (1992) deutet dieser negative Strom auf eine

H<sup>+</sup>/Saccharose-Antiport hin, wobei sowohl der saure pH-Wert in der Vakuole als auch die hohe Saccharosekonzentration auf der cytoplasmatischen Seite treibende Kräfte darstellen. Schulz et al. (2011) konnten zeigen, dass TMT1 an der vakuolären Membran exprimiert wird und sowohl Saccharose als auch Glukose im Antiport mit H<sup>+</sup>, aus dem Cytosol in das vakuoläre Lumen transportiert. TMT1 scheint Saccharose mit hoher Kapazität in die Vakuole zu verlagern (Schulz et al., 2011) und ist wahrscheinlich stärker an der vakuolären Membran vertreten als das schwach exprimierte AtSUC4-Protein (Schneider et al., 2011). Die Expression dieses potentiellen Saccharosetransporters (AtSUT4) in der vakuolären Membran konnte von Endler et al. (2006) über Lokalisationsstudien nachgewiesen werden. Weiterführende Studien an ATsUC4-transformierten Hefen wiesen auf einen H<sup>+</sup>-gekoppelten Saccharose-Symportmechanismus hin (Weise et al., 2000). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden durch *Patch-Clamp*-Messungen an *AtSUC4*-Überexprimierern (*AtSUC4-ÜE*) und *Atsuc4.1*-Verlustmutanten unter inversen pH-Wert Bedingungen (pH 5.5<sub>Cyt</sub>/pH 7.5<sub>Vak</sub>) bestätigt werden. Während *Atsuc4.1*-Vakuolen ausschließlich negative Ströme auf Applikation von 50 mM Saccharose zeigte (Abbildung 32), wurden bei über 60% der Messungen an *AtSUC4-ÜE* positive Ströme hervorgerufen, was mit einem H<sup>+</sup>/Saccharose-Symport aus dem Cytosol in das vakuoläre Lumen zu erklären ist (Abbildung 31). Unter physiologischen pH-Wert-Bedingungen (pH 7.5<sub>Cyt</sub>/pH 5.5<sub>Vak</sub>) und einem negativen Membranpotential würde dies bedeuten, dass AtSUC4 Saccharose im Symport mit H<sup>+</sup> aus der Vakuole in das Cytosol schleust. Eine Beteiligung des AtSUC4-Proteins am Saccharoseexport steht auch im Einklang mit Beobachtungen von Schneider et al. (2011), nach denen Extrakte von *AtSUC4-ÜE* im Gegensatz zu WT- und *Atsuc4.1*-Pflanzen rund 30% weniger Saccharose enthielten. Die Gehalte von Glukose, Fruktose oder *myo*-Inositol zeigten sich dagegen unverändert.

AtSUC4 kann für die Remobilisierung der in der Vakuole gespeicherten Saccharose bereit stehen. Dabei wird Saccharose entlang dem Zucker- und H<sup>+</sup>-Gradienten transportiert, was eine effiziente und schnelle Versorgung von *sink*-Gewebe oder eine schnelle Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen ermöglicht. Des Weiteren ist es denkbar, dass AtSUC4 auch eine Rolle beim Stomaschluss spielt, indem Saccharose aus der Vakuole transportiert wird, um das osmotische Potential der Vakuole zu verringern.

#### **4.4.3 Rolle von Saccharose und deren Transporter bei Schließzellbewegungen**

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Regulierung der Stomaweite alleinig durch die Stärke-Zucker-Hypothese erklärt, welche bei Stomaöffnung eine Umwandlung von osmotisch inaktiver Stärke in osmotisch aktive Zucker postulierte (Lloyd, 1908). Die unlösliche und dadurch osmotisch inaktive Stärke kann in das osmotisch aktive Disaccha-



rid Saccharose und weiter in die Einfachzucker Glukose und Fruktose aufgespalten werden. Bei *A. thaliana* konnte die Stärke-Zucker-Hypothese jedoch nicht bestätigt werden. Dort wird - entgegen der aufgestellten Theorie - Stärke während der Stomaöffnung synthetisiert und bei Stomaschluss im Dunkeln abgebaut (Stadler et al., 2003).

Jedoch ist eine Aufnahme von osmotisch aktiven Zuckern über sekundär aktive Transporter in das Cytosol und weiter in das vakuoläre Lumen wahrscheinlich. Ritte et al. (1999) beobachtete eine verstärkte Aufnahme von Glukose, sowie von Fruktose und Saccharose in Schließzellprotoplasten von *Pisum sativum*. Auch in Schließzellen von *Vicia faba* und *Commelina benghalensis* wurde eine Akkumulation von Saccharose nachgewiesen (Tallman und Zeiger, 1988; Talbott und Zeiger, 1993; Poffenroth et al., 1992; Reddy und Rama Das, 1986), die mit der Weite der Pore korreliert (Outlaw und Manchester, 1979). Das Öffnen der Stomata am Morgen steht jedoch eher mit der Aufnahme von  $K^+$ -Ionen in Verbindung und wird nur zu einem geringeren Teil durch Akkumulation von Saccharose beeinflusst. Am Nachmittag nimmt jedoch die  $K^+$ -Konzentration ab und Saccharose wird zum dominanten Osmotikum (Talbott und Zeiger, 1996). Während das Öffnen der Stomata relativ langsam vonstattengeht, zeigten Roelfsema et al. (2004), dass der ABA-induzierte Stomaschluss innerhalb weniger Minuten vollzogen werden kann. Jedoch können die dafür nötigen osmotischen Änderungen nicht alleine über Stärkesynthese oder durch aktiven Zuckertransport bewirkt werden (Roelfsema und Hedrich, 2005). Die maßgebliche osmotische Kraft bei der Stomabewegung muss deshalb durch die Akkumulation und Abgabe von organischen und anorganischen Ionen erzielt werden.

Über die Regulation der Saccharosetransporter in Schließzellen ist bisher wenig bekannt. Während die Expression von *LeSUT1* und *StSUT1* scheinbar durch Licht angeregt wird, bewirkt Dunkelheit dagegen eine verringerte Expressionsrate der putativen Saccharosetransporter (Kühn et al., 1997). Weiterhin konnten Saftner und Wyse (1984) einen stimulierenden Effekt von ABA und anderen Phytohormonen auf die Aktivität von Saccharosetransportern nachweisen.

## 4.5 Regulation und Funktion des SV-Kanals

Der *slow vacuolar* (SV) Kanal ist der bekannteste Kationenkanal in der pflanzlichen Vakuole. Die langsam aktivierenden Ströme des SV-Kanals auf depolarisierende Spannungspulse wurden 1986 erstmalig von Hedrich et al. bei *Patch-Clamp*-Messungen an Mesophyllvakuolen der Gerste aufgezeigt. In der darauffolgenden Zeit erschienen zahlreiche Publikationen über den SV-Kanal (Hedrich und Marten 2011). Jedoch gelang es erst 2005 das *TPCI*-Gen zu identifizieren, welches für den SV-Kanal kodiert (Peiter et al., 2005). Bei elektrophysiologischen Studien zeigten TPC1-überexprimierende Pflan-

zen deutlich höhere SV-Kanal-Ströme auf im Vergleich zum WT. In der T-DNA Verlustmutanten-Linie *tpc1-2* wurden jedoch keine vergleichbaren zeitabhängigen Ströme festgestellt (Peiter et al., 2005; Rienmüller et al. 2010). Die Zuordnung des *TPC1*-Gens ermöglichte somit die Funktion des SV-Kanals durch Veränderung der genetischen Information näher zu untersuchen (Dadacz-Narloch et al. 2011).

Die vorliegende Arbeit befasste sich ebenfalls mit elektrophysiologischen Studien zum SV-Kanal an Mesophyll- und Schließzellvakuolen von *A. thaliana*. Dabei wurden bei beiden Zelltypen vergleichbare langsam aktivierende Ströme bei Membrandepolarisierung gemessen (Abbildung 34; Abbildung 45A). Die typischen SV-Kanalströme blieben jedoch bei Messungen an Schließzellvakuolen der *tpc1-2*-Verlustmutante aus (Abbildung 45A; Rienmüller et al. 2010). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Peiter et al. (2005) und identifizierten auch in Schließzellvakuolen *TPC1* als SV-Kanal- kodierendes Gen.

#### 4.5.1 Regulatorische Proteine des SV-Kanals

Um elektrophysiologische Studien am SV-Kanal mittels *Patch-Clamp-Technik* durchzuführen, müssen zuvor einzelne Vakuolen aus pflanzlichen Zellen isoliert werden. Dabei gehen lösliche cytoplasmatische Bestandteile verloren, welche regulatorische Funktionen übernehmen können. Da das Aktivierungspotential des spannungsabhängigen SV-Kanals meist positiver in Bezug auf den physiologisch relevanten Membranpotentialbereich (0 bis -30 mV; Bethmann et al. 1995; Walker et al., 1996) liegt, wurde neben der Funktion des dominierenden vakuolären Kationenkanals viel über dessen Regulation gemutmaßt. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass cytosolische Faktoren einen Einfluss auf das Kanalprotein ausüben und dadurch der SV-Kanal spezifisch in seiner Aktivität beeinflusst wird (Hedrich und Neher, 1987; Allen und Sanders, 1996; Allen und Sanders, 1995; Carpaneto et al., 2001; Dobrovinskaya et al., 1999; Pei et al., 1999; Bethke und Jones, 1997). Zu diesen Faktoren zählen auch 14-3-3 Proteine, die neben der Regulation von pflanzlichen K<sup>+</sup>-Kanälen und humanen Cl<sup>-</sup>-Kanälen der Plasmamembran auch an der Regulation von *Drosophila* Transportproteinen beteiligt sind (Booij et al., 1999; Zhou et al., 1999; Chan et al., 2000). Durch *Patch-Clamp*-Studien wurde gezeigt, dass die im Tonoplasten lokalisierten Kationenkanäle TPK1 und TPC1 spezifisch vom 14-3-3 Protein GRF6 reguliert werden (Abbildung 43; Abbildung 44; Latz et al., 2007). Während GRF6 die Aktivität des SV-Kanals vermindert, wird TPK1 durch das gleiche 14-3-3 Protein aktiviert. Dies steht im Einklang mit Messungen an *Hordeum vulgare*, wobei das 14-3-3B-Protein die Aktivität des SV-Kanals stark vermindert (van den Wijngaard et al., 2001).

Anhand der Aminosäuresequenz des TPC1-Proteins konnten zwei putative Bindestellen für 14-3-3-Proteine identifiziert werden, wobei eine davon im cytosolischen Loop, die

andere zwischen den EF-Händen lokalisiert war (Kap. 1.3.1, Abbildung 3). Der Regulationsmechanismus kann zum einen auf eine direkte Interaktion des 14-3-3 Proteins mit dem Kanalprotein zurückzuführen sein. Andererseits zeigten Korthout und Boer (1998), dass 14-3-3 Proteine auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden können. Dies macht eine Verdrängung der aktivierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von den beiden SV-Kanal-EF-Händen wahrscheinlich. Inwieweit jedoch diese Sequenzabschnitte bei der Regulation durch 14-3-3-Proteine eine Rolle spielen, ist ungewiss und könnte durch Einbringen von Punktmutationen oder Entfernen des Sequenzabschnittes am C-Terminus mit anschließenden *Patch-Clamp*-Experimenten weiter abgeklärt werden.

Da 14-3-3-Proteine an den HvKCO1 Kanal von Gerste binden (Sinnige et al., 2005) und auch eine regulatorische Funktion bei der vakuolären V-ATPase übernehmen (Bunney et al., 2002), wurde darüber diskutiert, ob 14-3-3-Proteine als „molekulare Schalter“ beim vakuolären Transport fungieren (Latz et al. 2007). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Kationenkanäle TPK1 und TPC1 nicht nur durch das gleiche 14-3-3-Protein GRF6 reguliert, sondern auch beide Kanäle durch eine Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert werden (Abbildung 50; Latz et al., 2007).  $\text{Ca}^{2+}$  ist ein ubiquitäres Signalmolekül, und ein Anstieg der cytosolischen freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird durch diverse Faktoren verursacht (Kudla et al., 2010). Gao et al. (2004) fand beispielsweise, dass eine Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration infolge einer schnellen Änderung des zellulären osmotischen Potentials und Salzstress verursacht wird. Calmodulin (CaM), ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes regulatorisches Protein, wurde als *second messenger* Molekül identifiziert, welches den SV-Kanal gegenüber cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  sensitiviert. Calmodulin Antagonisten wie W-7 (N-(6-Aminoheptyl)-5-Chloro-1-naphthalenesulfonamid Hydrochlorid), TFP (Trifluoperazin) und R24571 (Calmidazolium Hydrochlorid) blocken den SV-Kanal dagegen antagonistenspezifisch (Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995; Bethke und Jones, 1994).

Das 14-3-3 Protein GRF6 reguliert die beiden vakuolären Kationenkanäle invers. Während der  $\text{K}^+$ -Kanal TPK1 eine Erhöhung der Kanalaktivität aufweist (Latz et al., 2007), nimmt die Aktivität des nicht-selektiven Kationenkanals TPC1 stark ab (Kap. 3.4.2). Damit sind 14-3-3-Proteine in der Lage, die  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit der vakuolären Membran hin zu einer vorrangigen  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit zu verschieben. Somit kann unter Salzstress die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit der Membran aufrechterhalten und das bei hohen Konzentrationen toxisch wirkende  $\text{Na}^+$  (Pilon-Smits et al., 2009) in der Vakuole akkumuliert werden.

14-3-3-Proteine binden an bestimmte Proteinabschnitte, welche zuvor von spezifischen Kinasen an einem Serin oder Threonin des TPC1-Proteins phosphoryliert wurden. Doch ist Phosphorylierung nicht nur ein wichtiger Prozess zur Ausführung von Protein-Protein-Interaktionen. Eine Regulierung der Aktivität von Transportproteinen kann auch

über den Phosphorylierungszustand spezifischer Phosphorylierungssequenzen bestimmt werden, wofür neben einer Kinase zur Gegenregulation eine Phosphatase benötigt wird. Das TPC1-Kanalprotein weist mehrere putative Phosphorylierungsstellen auf. Daraufhin schlugen Bethke und Jones (1997) ein Model zur Regulation der SV-Kanalaktivität in *Hordeum vulgare* vor, wobei die Aktivität des SV-Kanals über die Phosphorylierung zweier Stellen des Kanal-Proteins reguliert ist. Allen und Sanders (1995) zeigten, dass die Aktivität des SV-Kanals von *Vicia faba* durch die Proteinphosphatase Calcineurin moduliert werden kann.

#### 4.5.2 *fou2*-SV-Kanäle aktivieren bei physiologischen Membranspannungen

Der SV-Kanal wurde als spannungsabhängiger Kationenkanal beschrieben, welcher bei positiven Membranspannungen und erhöhten cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen aktiviert (Hedrich und Neher, 1987). Dabei scheint cytosolisches Calcium das Aktivierungspotential des SV-Kanals hin zu physiologisch relevanten Membranspannungen zu verschieben und eine spannungsabhängige Aktivierung des Kanalproteins erst zu ermöglichen. In Abwesenheit von cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  konnten selbst bei einer Membranspannung von +100 mV keine SV-Kanalöffnungen beobachtet werden (Abbildung 50), da die Aktivierungsschwelle der SV-Kanäle vermutlich bei noch positiveren Membranspannungen liegt. Beim *fou2*-(D454N)-SV-Kanal ist die spannungsabhängige Aktivierung in Abhängigkeit von cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  unverändert. Eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  auf 1 mM bewirkt bei *fou2* eine mit dem WT vergleichbare Verschiebung in der Spannungsabhängigkeit (Abbildung 41). Dies deutet auf eine unveränderte Sensitivität des *fou2*-SV-Kanals gegenüber der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hin.

Neben der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird der Spannungssensor des SV-Kanals vom  $\text{K}^+$ -Gradienten (Ivashikina und Hedrich, 2005) über die vakuoläre Membran beeinflusst. Ein ins Cytosol gerichteter  $\text{K}^+$ -Gradient (30 mM  $\text{K}^+_{\text{Cyt}}$ /150 mM  $\text{K}^+_{\text{vak}}$ ) bewirkt eine Verschiebung des Aktivierungspotentials zu negativeren Membranspannungen (Abbildung 42B; Ivashikina und Hedrich, 2005), so dass die SV-Kanäle öffnen und  $\text{K}^+$  ans  $\text{K}^+$ -verarmte Cytosol entlassen können.

Das Aktivierungspotential des *fou2*-SV-Kanals liegt im Gegensatz zum WT-SV-Kanal schon unter symmetrischen  $\text{K}^+$ -Bedingungen bei negativen Membranspannungen (Bonaventure et al., 2007a; Abbildung 42A), so dass der *fou2*-Kanal als hyperaktiver Kanal bezeichnet werden kann (Hedrich et al., 2012). Aufgrund dessen wies die *fou2*-Mutante größere einwärtsgerichtete  $\text{K}^+$ -Ströme im Vergleich zum WT auf, wodurch unter physiologischen Membranspannungen mehr  $\text{K}^+$  ins Cytosol verlagert wird (Abbildung 42A). Dies resultiert in einer geringeren vakuolären  $\text{K}^+$ -Konzentration

(Abbildung 37), was hauptsächlich den veränderten Wachstumsphänotyp der *fou2*-Mutante hervorzurufen scheint. Das Genexpressionsprofil der *fou2*-Mutante weist starke Ähnlichkeiten mit Pflanzen auf, die unter  $K^+$ -Mangel kultiviert wurden (Armengaud et al., 2004; Bonaventure et al., 2007 b). Während die Expression der  $K^+$ -Transportproteine unter  $K^+$ -Mangel unverändert stark ist, wurde eine erhöhte Expression von CAX3 festgestellt (Armengaud et al., 2004). CAX3 ist ein  $Ca^{2+}/H^+$ -Antiporter und vermittelt  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in die Vakuole (Shigaki und Hirschi, 2000; Cheng et al., 2005). Nach Quantifizierung des CAX3-Expressionslevels durch Echtzeit-PCR (Daten wurden nicht gezeigt) konnte jedoch die Vermutung nicht bestätigt werden, dass die erhöhte vakuoläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration der *fou2*-Mutante (Abbildung 37) durch CAX3 vermittelt wurde. Der erhöhte  $Ca^{2+}$ -Gehalt in *fou2*-Mesophyllvakuolen konnte auch nicht auf eine veränderte  $Ca^{2+}$ -Permeabilität des *fou2*-SV-Kanals zurückgeführt werden. Weder bei Mesophyllvakuolen des *A. thaliana* Wildtyps noch der *fou2*-Mutante wurde mit  $Ca^{2+}$  als alleiniges cytosolisches Kation und unter neutralem vakuolären pH-Wert (pH 7.5) ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Cytosol in die Vakuole beobachtet (Abbildung 42C). Die erhöhte luminale  $Ca^{2+}$ -Konzentration der *fou2*-Mutante könnte jedoch durch den hyperaktiven SV-Kanal getriggert werden, der verstärkt  $K^+$  in das Cytosol entlässt und somit einen entgegengesetzten Transport von Gegenionen durch die  $H^+$ -transportierende V-ATPase und den  $Ca^{2+}/H^+$ -vermittelten CAX-Transporter ermöglicht.

#### 4.5.3 Höhere Toleranz der *fou2*-SV-Kanäle gegenüber vakuolärem $Ca^{2+}$

Während cytosolisches  $Ca^{2+}$  zu einer starken Aktivierung des SV-Kanals führt, zeigt luminales  $Ca^{2+}$  beim WT eher eine konträre Wirkung auf den SV-Kanal. Mit ansteigender luminaler  $Ca^{2+}$ -Konzentration nimmt die absolute Offenwahrscheinlichkeit des SV-Kanals stark ab (Abbildung 38). Die SV-Kanäle der *fou2*-Mutante bleiben hingegen selbst unter hohen vakuolären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen aktiv. Die veränderte *fou2*- $K^+$ -Homöostase scheint deshalb neben der veränderten Spannungsabhängigkeit auf die geringere Sensitivität des *fou2*-SV-Kanals bezüglich erhöhten vakuolären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen zurückzuführen zu sein (Abbildung 38, Abbildung 39). Demzufolge kann *fou2* mehr  $Ca^{2+}$  in der Vakuole akkumulieren bis der SV-Kanal vollständig geblockt ist.

Die *fou2*-Mutante zeichnet sich durch eine veränderte Jasmonatsynthese aus, weswegen auch von einer *Gain-of-Function*-Mutation des TPC1-Gens gesprochen wird (Bonaventure et al., 2007a; Bonaventure et al., 2007b). Bei Verwundung einer Pflanze steigt jedoch nicht nur der Jasmonsäurespiegel, sondern auch die cytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration stark an (Chico et al., 2002; Fisahn et al., 2004; Dombrowski und Bergey, 2007; Creelman und Mullet, 1997). Da die Vakuole neben dem Apoplasten ein

wichtiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher ist (Johannes et al., 1992) und der  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte SV-Kanal der dominierende Kationenkanal im Tonoplasten darstellt (Hedrich und Neher, 1987), könnte der SV-Kanal eine wichtige Rolle bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Signaltransduktion bei Verwundung spielen. Das cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal führt zu einer Aktivierung von spezifischen Genen, welche bei Verwundung induziert werden (Dombrowski und Borgey, 2007). Möglicherweise kann die *fou2*-Mutante bei Verwundung aufgrund der erhöhten vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ein stärkeres cytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal generieren im Vergleich zum WT und somit eine veränderte Genexpression bewirken. Bei vier Wochen alten *fou2*-Pflanzen wurde eine 25-fach höhere Genexpression der Lipoxygenase 2 festgestellt, was eine 4fach angestiegene 18:3 Oxygenierungsrate zur Folge hatte (Bonaventure et al. 2007a). Die Lipoxygenase 2 spielt in *A. thaliana* eine Rolle bei der Produktion von Jasmonsäure (Bell et al., 1995).

Die Einzelkanalleitfähigkeit bei *A. thaliana* Mesophyllvakuolen des Wildtyps als auch der *fou2*-Mutante stieg unter Abwesenheit von luminalem  $\text{Ca}^{2+}$  mit Erhöhung der luminalen Protonenkonzentration an (Abbildung 40). Im Gegensatz dazu wurde nach Ansäuern des vakuolären Lumens beim WT eine Abnahme der absoluten Offenwahrscheinlichkeit beobachtet (vgl. Abbildung 38 mit Abbildung 39). Die Abnahme der absoluten Offenwahrscheinlichkeit vom *A. thaliana* SV-Kanal bei luminalem Ansäuern könnte deshalb eher auf eine pH-abhängige Änderung in der Spannungssensitivität als in der Spannungsabhängigkeit zurückzuführen sein. Unter vakuolärem  $\text{Ca}^{2+}$  wird bei der *fou2*-Mutante im Gegensatz zum WT die absolute Offenwahrscheinlichkeit durch Ansäuern des vakuolären Lumens kaum beeinträchtigt (vgl. Abbildung 38 mit Abbildung 39). Möglicherweise wurde durch die Punktmutation auf der luminalen Seite der pK-Wert der Regulierungsstelle verändert. Im TPC1-Kanalprotein scheint demzufolge die Aminosäure Aspartat an der Stelle 454 die Spannungssensitivität in Abhängigkeit des vakuolären pH-Wertes zu regulieren und somit die Offenwahrscheinlichkeit zu bestimmen.

Eine Erhöhung der luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0 mM auf 100  $\mu\text{M}$  nach Ansäuern des vakuolären Lumens (pH 5,5), bewirkte proportional gesehen eine geringere Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit als unter neutralem pH-Wert (vgl. Abbildung 38 mit Abbildung 39). Die *fou2*-Mutante zeigte nach Erhöhung der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dagegen weiterhin eine erstaunlich hohe absolute Offenwahrscheinlichkeit (Abbildung 39). Unter luminalem pH 5,5 war die Abnahme der absoluten Offenwahrscheinlichkeit des SV-Kanals nach Anstieg der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration geringer als unter pH 7,5. Da die Offenwahrscheinlichkeit der *fou2*-Mutante sowohl auf Ansäuern des vakuolären Lumens als auch auf eine Erhöhung der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration weniger sensitiv reagiert als der WT, kann angenommen werden, dass die luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle sich nahe am vakuolären Spannungssensor befindet.

## 4.6 Schließzell- und Mesophyllzell-spezifische SV-Kanal-Eigenschaften

### 4.6.1 Zelltyp-spezifische SV-Kanal-Eigenschaften werden nicht durch posttranskriptionale Modifikation hervorgerufen

Das SV-Kanal kodierende Gen, *TPC1*, liegt im Genom von *A. thaliana* als „single copy Gen“ vor und stellt somit das einzige Mitglied der TPC-Genfamilie dar (Peiter et al., 2005). Zelltypspezifische Unterschiede können bei „single copy“ Genprodukten durch Splicevarianten oder „RNA-editing“ hervorgerufen werden. In *Caenorhabditis elegans* wurden beispielsweise zwei Splicevarianten des Anionenkanalproteins ICln identifiziert, welche unterschiedliches Verhalten in der Inaktivierung aufweisen (Fürst et al., 2002). Deshalb wurden in dieser Arbeit ausführliche Fragmentanalysen bezüglich der *TPC1* mRNA von *A. thaliana* durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Größe und die Basenabfolge des *TPC1* Transkripts von Schließzellen und Mesophyllzellen nicht voneinander abweichen (Abbildung 54). Dies deutet darauf hin, dass Unterschiede in den *TPC1*-Kanaleigenschaften der beiden Gewebetypen wahrscheinlich nicht durch unterschiedliches „Splicing“ und „RNA editing“ hervorgerufen werden, sondern wohl eher durch eine zelltypspezifische posttranslationale Modifikation. Darüber hinaus wäre eine Regelung der zelltypabhängigen Kanaleigenschaften durch Interaktion mit zelltypspezifischen regulatorischen Proteinen denkbar.

### 4.6.2 Hohe SV-Kanal-Stromdichte bei Schließzellvakuolen

*TPC1* wird in Schließzellvakuolen von *A. thaliana* exprimiert (Leonhardt et al., 2004) und übernimmt auch dort die dominante Rolle bezüglich der Ionenleitfähigkeit an der vakuolären Membran. Bei Ganzzellmessungen an Arabidopsis Schließzellvakuolen wurde eine SV-Kanal-Stromdichte von 5644 pA/pF bestimmt (Abbildung 45). Diese war um das Neunfache höher im Vergleich zu Arabidopsis Mesophyllvakuolen (630 pA/pF). Unter neutralen pH-Wert-Bedingungen wurden jedoch bei *A. thaliana* Mesophyll- und Schließzellvakuolen vergleichbare Einzelkanalleitfähigkeiten von 70-76 pS bestimmt (Tabelle 6). Unter einem physiologischen pH-Gradienten (100 mM  $K^+_{sym}$ ) stieg die Einzelkanalleitfähigkeit auf 109-116 pS an. In vorangegangenen Studien wurden SV-Kanal-Einzelkanalleitfähigkeiten von 60-80 pS bei *Hordeum vulgare* Mesophyllvakuolen (50 mM  $K^+_{sym}$ ; Hedrich et al., 1987), aber auch weitaus höhere von 210 pS bei *Allium cepa* (200 mM  $K^+_{sym}$ ; Amodeo und Zeiger, 1994) bzw. 280 pS bei *Vicia faba* Schließzellen (200 mM  $K^+_{sym}$ ; Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995) ermittelt. Unter 200 mM  $K^+$  wurde aber auch schon bei Wurzelzellen von *Beta vulgaris* eine SV-Kanal-Einzelkanalleitfähigkeit von 60-80 pS gemessen (Hedrich und Neher, 1987). Aufgrund der Messungen bei *A. thaliana* ist daher zu vermuten, dass die Einzelkanalleitfähigkeit

des unspezifischen Kationen-SV-Kanals eher mit der Pflanzenspezies und weniger mit dem Zelltyp differiert.

Während die Einzelkanalleitfähigkeit von Schließzellen und Mesophyllzellen nicht voneinander abwich, wurde jedoch eine vierfach höhere Anzahl der TPC1-Transkripte in Schließzellen detektiert (Abbildung 48). Aufgrund dessen wurde zusätzlich die Transkriptmenge der V-ATPase Untereinheit VHA-a2 bestimmt, welche in Schließzellen 20-fach höher exprimiert ist als in Mesophyllzellen (Abbildung 25A; Kap. 4.3). In diesem Zusammenhang wird darauf hingewiesen, dass auch *Vicia faba* Schließzellen eine zweifach höhere Proteinkonzentration der plasmamembrangebundenen V-ATPase im Vergleich zu Mesophyllzellen beinhalten (Becker et al., 1993). Die erhöhten Transkriptmengen von *TPC1* und *VHA-a2* in Schließzellvakuolen deuten darauf hin, dass Transportproteine mit einer wichtigen Rolle für schnelle zelluläre Volumenänderungen stärker exprimiert werden. Somit wird eine zügige Anpassung der Schließzellen auf veränderte Umweltbedingungen gewährleistet.

Neben einer höheren TPC1-Transkriptrate zeigten Schließzell- im Vergleich mit Mesophyllzellvakuolen eine schnellere Aktivierungskinetik (Abbildung 49) des SV-Kanals auf. Eine veränderte Aktivierungszeit wurde bei KAT1-Kanälen, exprimiert in Oocyten, mit einem veränderten Expressionsniveau des Kanalproteins in Verbindung gebracht (Véry et al., 1994). Bei hoher KAT1-Expression wurde ebenfalls eine schnellere Aktivierungskinetik beobachtet.

Des Weiteren wiesen die SV-Kanäle von Schließzellvakuolen gegenüber Mesophyllvakuolen eine höhere pH-Sensitivität auf (Abbildung 45). Die Sensitivität gegenüber vakuolärem  $\text{Ca}^{2+}$  war jedoch gleich. Die absolute Offenwahrscheinlichkeit der Schließzell-SV-Kanäle nahm mit Anstieg der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration stark ab (Abbildung 51). Dagegen war die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der Schließzell-SV-Kanäle größer, als bei Mesophyll-SV-Kanälen, wodurch erstere eine höhere Sensitivität gegenüber cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  aufweisen (Schließzellen:  $K_m = 130 \mu\text{M}$ ; Mesophyllzellen:  $K_m = 1167 \mu\text{M}$ ; Abbildung 50). Da sich die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität im  $\mu\text{M}$ -Bereich bewegt, wird die Affinität des SV-Kanalproteins als sehr gering bewertet. Jedoch wurde gezeigt, dass cytosolische Komponenten wie z. B. Calmodulin oder  $\text{Mg}^{2+}$  in der Lage sind, die Sensitivität der SV-Kanäle bezüglich  $\text{Ca}^{2+}$  zu erhöhen (Pei et al., 1999; Bethke und Jones, 1994; Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995; Carpaneto et al., 2001). Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität unter Abwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen bestimmt wurde, ist eine Verschiebung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität hin zu physiologisch relevanteren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wahrscheinlich.

#### 4.6.3 $\text{Na}^+$ -Ionenleitfähigkeit des Schließzell-SV-Kanals

Der nichtselektive SV-Kanal weist gegenüber alkalischen Kationen wie  $\text{Na}^+$  eine hohe Permeabilität auf (Amodeo et al., 1994; Paganetto et al., 2001). In Schließzellvakuolen



von *Allium cepa* konnte eine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Permeabilität des SV-Kanals von 1,6:1 aufgezeigt werden. Unter einem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Gradienten ( $30 \text{ mM Na}^+$  oder  $\text{K}^+_{\text{Cyt}}/150 \text{ mM K}^+_{\text{Vak}}$ ) wurde mittels Tailstromanalyse eine ähnliche  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Permeabilität (1,3:1) des SV-Kanals von *Arabidopsis* Schließzellvakuolen ermittelt (Abbildung 53). Demgegenüber wiesen SV-Kanäle von *Vigna unguiculata*, *Plantago maritima*, *Plantago media* und *Beta vulgaris* eine leicht niedrigere  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Permeabilität von 1:1 auf (Coyaud et al., 1987; Hedrich und Neher, 1987; Maathuis und Prins, 1990). Unter hohen cytosolischen  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{K}^+$ -Konzentrationen (150 mM) mit 150 mM vakuolärem  $\text{K}^+$  wurden entsprechend der recht ähnlichen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Permeabilität bei *Arabidopsis* Schließzellvakuolen vergleichbare auswärtsgerichtete SV-Kanalstromamplituden gemessen (Rienmüller et al., 2010). In Schließzellvakuolen steigt die vakuoläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration unter Salzstress an (Rienmüller et al., 2010), was durch semi-quantitative EDX-Analysen festgestellt wurde. Da der SV-Kanal  $\text{Na}^+$  in beiden Richtungen über die vakuoläre Membran transportiert (Abbildung 53), könnte unter Salzstress  $\text{Na}^+$  als Osmotikum für Schließzellbewegungen zur Verfügung stehen, wobei  $\text{Na}^+$  durch den SV-Kanal geschleust wird. Darüber hinaus wurde AtNHX1 als  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter identifiziert (Apse et al., 2003), welcher potentiell  $\text{Na}^+$ -Ionen über die vakuoläre Membran von Schließzellen in die Vakuole verlagern könnte.

Unter asymmetrischen, einwärtsgerichteten monovalenten Kationenkonzentrationen liegt das Aktivierungspotential des Schließzell-SV-Kanals bei physiologischen Membranspannungen, so dass sowohl auswärts- als auch einwärtsgerichtete Ströme gemessen werden (Abbildung 53). Durch einen Austausch von  $\text{K}^+$  mit  $\text{Na}^+$  im vakuolären Lumen konnte bei gleichbleibendem Aktivierungspotential ein zweifacher Anstieg der einwärtsgerichteten Stromantwort beobachtet werden (Abbildung 53). Bei Zellkulturvakuolen hingegen ist das Aktivierungspotential des SV-Kanals hin zu positiveren Membranspannungen verschoben, so dass kein SV-Kanal vermittelter  $\text{Na}^+$ -Einstrom ins Cytosol möglich ist (Ivashikina und Hedrich, 2005). Demzufolge reagiert der SV-Kanal zellspezifisch auf die Anwesenheit von  $\text{Na}^+$ -Ionen und vermittelt daraufhin einen zellspezifischen Ionenfluss. Der *Arabidopsis* SV-Kanal ist somit in der Lage, sowohl  $\text{K}^+$  als auch  $\text{Na}^+$  Ionen beim Stomaschluss in das Cytosol zu entlassen. Aufgrund der hohen  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit des SV-Kanals wäre ein ausgeprägter Phänotyp der *tpc1-2*-Mutante unter Salzstressbedingungen zu erwarten. Jedoch konnten bei WT und *tpc1-2*-Pflanzen, unter Salzstressbedingungen (200 mM) kein unterschiedliches Verhalten in der Stomaaktivität detektiert werden (Hedrich und Marten, 2011). Dieses Verhalten wird mit einem Anstieg der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ -Antiporter- (Apse und Blumwald, 2002; Queirós et al., 2009; Jiang et al., 2010) und  $\text{K}^+$ -Kanalaktivität in Verbindung gebracht (Hedrich und Marten, 2011).

#### 4.6.4 Rolle des SV-Kanals am vakuolären $\text{Ca}^{2+}$ -Transport

Aufgrund der Ähnlichkeit des SV-Kanals mit tierischen  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^+$ -Kanälen (Ishibashi et al., 2000) wird dem SV-Kanal eine Rolle beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport an der vakuolären Membran zugeschrieben (Pottosin et al., 2009). Bei heterotrophen Zellkulturvakuolen von *A. thaliana* wurden SV-Kanal-vermittelte auswärtsgerichtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme unter einem  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Gradienten (15 mM  $\text{Ca}^{2+}_{\text{Cyt}}/150$  mM  $\text{K}^+_{\text{Vak}}$ ) registriert (Ivashikina und Hedrich, 2005). Auch Arabidopsis Schließzellvakuolen zeigten unter gleichem Ionengradienten einen SV-Kanal vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom auf, welcher durch Ansäuern des vakuolären Lumens signifikant erhöht wurde (Abbildung 52). Mesophyllvakuolen des Wildtyps wiesen lediglich unter physiologischen pH-Wert-Bedingungen einen auswärtsgerichteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport durch den SV-Kanal auf. Unter neutralen pH-Werten (pH 7,5<sub>Cyt/Vak</sub>) konnten keine relevanten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in das vakuoläre Lumen abgebildet werden (Abbildung 42C; Abbildung 52). Ein kanalvermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom in die Vakuole ist unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich wenig relevant, da dieser entgegen dem elektrochemischen Gradienten verlaufen würde (Felle 1988; Pérez et al., 2008). Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport aus dem Cytosol in die Vakuole ist durch sekundär aktive P-type  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen (Geisler et al., 2000; Sze et al., 2000) und  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiportern (Shigaki und Hirschi et al., 2006) viel eher wahrscheinlich.

Durch die Tatsache, dass der SV-Kanal zum Öffnen cytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  benötigt und gleichzeitig permeable für dieses Kation ist, wurde ein  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom (CICR: calcium induced calcium release) aus der Vakuole in das Cytosol von Ward und Schroeder (1994) postuliert. Diese Vorstellung des CICR wird bis heute jedoch sehr kontrovers diskutiert (Allen und Sanders, 1996; Pottosin et al., 1999; Carpaneto et al., 2001; Ivashikina und Hedrich, 2005; Ranf et al., 2008). Ward und Schroeder (1994) konnten an Messungen von *Vicia faba* Schließzellvakuolen zeigen, dass der SV-Kanal unter 5 mM cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  und 50 mM luminalem  $\text{Ca}^{2+}$  Kationenströme in das vakuoläre Lumen vermittelt. Anhand der  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten und den durch Tailströme ermittelten Umkehrpotentialen wurde eine  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$  Permeabilität des SV-Kanals von *Vicia faba* Schließzellen von 3:1 berechnet (Ward und Schroeder, 1994). Deshalb vermuteten Ward und Schroeder (1994), dass der SV-Kanal eine Rolle bei der ABA-Signaltransduktion spielen könnte, indem das cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch CICR des SV-Kanals erhöht bzw. verstärkt wird. Unter physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ - (10-1000 nM Cytosol/200-2000  $\mu\text{M}$  Vakuole; Felle, 1988; Bethke und Jones, 1994; Pérez et al., 2008) und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen (symmetrisch 100 mM; Pérez et al., 2008) konnte bisher jedoch kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom - generiert durch den SV-Kanal - beobachtet werden. Sowohl Mesophyll- als auch Schließzell-SV-Kanäle weisen bei erhöhten vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine sehr geringe Offenwahrscheinlichkeit auf (Abbildung 38, Abbildung 51). Ein möglicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom in das Cytosol würde sehr gering ausfallen und ein ausgeprägtes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal vermittelt durch den SV-Kanal somit unmöglich machen.

Um zu klären, inwieweit der SV-Kanal an der Vermittlung von cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen beteiligt ist, wurden Experimente an Aequorin-exprimierenden WT, *tpc1-2-knockout* und *TPCI-Überexprimierer* Pflanzen durchgeführt (Ranf et al., 2008). Diese wurden verschiedenen biotischen und abiotischen Stimuli (Kälte, Salzstress, oxidativer Stress, Mannitol) ausgesetzt, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale induzieren. Dabei werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entweder über die Plasmamembran transportiert oder aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern wie z. B. der Vakuole entlassen. Bei keinem dieser Stimuli konnte jedoch ein Unterschied in der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der verschiedenen Pflanzen hervorgerufen werden (Ranf et al., 2008). Dies deutet darauf hin, dass der SV-Kanal nicht an der Ausbildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen bzgl. dieser verschiedenen Stimuli involviert ist und keinen Einfluss auf die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase hat (Ranf et al., 2008). Die physiologische Rolle des SV-Kanals scheint daher eher in der Aufrechterhaltung der zellulären  $\text{K}^+$ -Homöostase zu liegen.

## 4.7 Rolle des SV-Kanals bei der Stomabewegung

Auch im Hinblick auf die Stomabewegung wurde viel über den CICR des SV-Kanals und damit verbunden die Ausbildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen diskutiert (Ward und Schroeder, 1994; Ward et al., 1995; Dietrich et al., 2001; Peiter et al., 2005; Ranf et al., 2008; Hedrich und Marten, 2011). Deshalb wurde von Peiter et al. (2005) erstmalig geprüft, inwieweit der SV-Kanal bei der Übermittlung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen eine Aufgabe übernimmt. Eine Erhöhung der ABA-, MeJA-,  $\text{CO}_2$ - bzw. extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkt einen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und anschließend ein oszillierendes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, was zum Schließen der Stomata führt (Schroeder et al., 2001; Allen et al., 2000; Islam et al., 2010). Vergleichende Messungen an WT und *tpc1-2* Pflanzen zeigten, dass der  $\text{CO}_2$ - und ABA-induzierte Stomaschluss gleich verlief und das erneute Öffnen der Stomata in derselben Weise inhibiert wurde (Peiter et al., 2005; Ranf et al., 2008). Auch bei einer Applikation von MeJA konnte kein Unterschied zwischen WT und der *tpc1-2* Mutante in der basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation beobachtet werden (Islam et al., 2010). Jedoch war die *tpc1-2* Mutante, im Gegensatz zum WT und dem *TPCI*-Überexprimierer nicht in der Lage, einen wirksamen Stomaschluss auf eine Erhöhung der externen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu induzieren (Peiter et al., 2005; Islam et al., 2010). Auch eine Aktivierung des in der Plasmamembran lokalisierten S-Typ Anionenkanals SLAC1 blieb bei der *tpc1-2* Mutante aus (Islam et al., 2010) Dies könnte bedeuten, dass der SV-Kanals bei extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimuli als  $\text{K}^+$ -Kanal zur Aktivierung der S-Typ Anionenkanälen beiträgt (Islam et al., 2010). Demgegenüber kann ein Einfluss des SV-Kanals auf die

cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation ausgeschlossen werden. Eine Rolle des SV-Kanals *downstream* der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation hingegen ist wahrscheinlich.

Aufgrund der oben erwähnten Experimente ist die Rolle des Schließzell-SV-Kanals wahrscheinlich eher beim  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Transport (bei Salzstress) und damit verbunden der Regulation der zellulären Kalium-Homöostase zu suchen. Durch die hohe Leitfähigkeit des SV-Kanals (Abbildung 45) können beim Stomaschluss effektiv  $\text{K}^+$ -Ionen über die vakuoläre Membran ins Cytosol verlagert werden (White, 2000). Der einwärtsgerichtete  $\text{K}^+$ -Transport kann an der vakuolären Schließzellmembran durch den VK-Kanal, einem weiteren  $\text{K}^+$ -selektiven-Kanal unterstützt werden (Ward und Schroeder, 1994). Während der VK-Kanal in Abwesenheit von cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  nicht aktiv ist (Gobert et al., 2007), wurde unter physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $1 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ) jedoch eine starke und schnelle Aktivierung beobachtet (Ward et al., 1995). Ein VK-vermittelter  $\text{K}^+$ -Einstrom könnte eine Depolarisierung der vakuolären Membran und somit einer Aktivierung der SV-Kanäle bewirken, was zu einem anhaltenden  $\text{K}^+$ -Einstrom in das Cytosol führt. Das im Vergleich zu Mesophyll-SV-Kanälen sensitivere Verhalten des Schließzell-SV-Kanals bzgl. cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Abbildung 50) ermöglicht darüber hinaus eine frühe Aktivierung bei negativeren Membranpotentialen, wodurch bei einem auswärtsgerichteten  $\text{K}^+$ -Gradienten sogar ein  $\text{K}^+$ -Efflux in die Schließzellvakuole möglich wäre.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue Einblicke bezüglich des Transportprozesses vakuolärer Protonenpumpen, Zuckertransporter und des SV-Kanals von *Arabidopsis thaliana* gewonnen:

1. Mittels *Patch-clamp*-Technik wurden ATP- und Pyrophosphat-induzierte Pumpströme an Mesophyllvakuolen des Wildtyps gemessen. Die durch ATP hervorgerufenen Pumpströme konnten durch den spezifischen V-ATPase-Inhibitor Concanamycin A vollständig inhibiert werden. Messungen an der V-ATPase-Doppelmutante *vha-a2-vha-a3* hingegen zeigten eine kaum vorhandene ATPase-Aktivität auf. Die vakuoläre Pyrophosphatase-Aktivität der *vha-a2-vha-a3*-Mutante war mit dem WT vergleichbar und konnte die verminderten Pumpströme der V-ATPase nicht kompensieren.  
Zudem wurde an *A. thaliana* WT-Pflanzen die Expressionsrate und Pumpstromdichte der V-ATPase von Schließzellen und Mesophyllzellen untersucht. Dabei konnte bei Schließzellen eine höhere Expressionsrate sowie Pumpleistung im Vergleich zu Mesophyllzellen detektiert werden, wodurch an der vakuolären Membran von Schließzellen eine starke protonenmotorische Kraft generiert werden kann.
2. Des Weiteren wurden die Transporteigenschaften des im Tonoplasten lokalisierten Transportproteins AtINT1 an Arabidopsis Mesophyllzellen des Wildtyps näher untersucht. Unter inversen pH-Wert-Bedingungen konnte AtINT1 als Symporter identifiziert werden, welcher *myo*-Inositol  $H^+$ -gekoppelt aus der Vakuole in das Cytosol transportiert. Diese Daten wurden durch weitere Messungen an den Mutantenlinien *Atint1.1* und *Atint1.2* gestützt, da bei diesen keine bzw. nur stark reduzierte Stromantworten durch Applikation von *myo*-Inositol hervorgerufen werden konnten.
3. Überdies wurde eine elektrophysiologische Charakterisierung des AtSUC4-Transporters durchgeführt. Unter einem physiologischen Protonengradienten konnte bei WT- und *Atsuc4.1*-Vakuolen ausschließlich ein Saccharose/ $H^+$ -getriebener Antiportmechanismus detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten 60 % der *AtSUC4-ÜE* unter inversen pH-Gradienten während Saccharose-Applikation Ströme, die auf einen Saccharose/ $H^+$ -Symportmechanismus hinweisen. Bei der *Atsuc4.1*-Verlustmutante hingegen konnten unter gleichen Lösungsbedingungen ausschließlich Ströme detektiert werden, die mit einem Saccharose/ $H^+$ -gekoppelten Antiportmechanismus in Einklang zu bringen sind. Durch die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe unter Norbert Sauer, Universität Erlangen, wird die Vermutung untermauert, dass AtSUC4 Saccharose im Symport mit  $H^+$  aus der Vakuole in das Cytosol transportiert und somit eine Rolle bei der Remobilisierung der in der Vakuole gespeicherten Saccharose übernimmt.
4. Darüber hinaus konnten Studien am nichtselektiven spannungsabhängigen „slow-vacuolar-channel“ (SV-Kanal) von Arabidopsis Mesophyllvakuolen

durchgeführt werden. Dabei wurde das 14-3-3-Protein GRF6 als regulatorisches Protein identifiziert, welches die SV-Kanalaktivität stark verringert.

Die gain-of-function Mutante *fou2* mit der Punktmutation D454N im TPC1-Kanalprotein zeigt abweichende Kanaleigenschaften zum WT auf. Das Aktivierungspotential des *fou2*-SV-Kanals liegt bei 30 mV negativeren Membranspannungen, was die Offenwahrscheinlichkeit des SV-Kanals unter physiologischen Membranspannungen erhöht. Die *fou2*-Mutation beeinflusst außerdem die luminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle des SV-Kanals, wodurch die Affinität bzgl. luminalem  $\text{Ca}^{2+}$  geringer ist und die *fou2*-SV-Kanalaktivität bei hohen luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bestehen bleibt. Die absolute Offenwahrscheinlichkeit des WT-SV-Kanals nimmt mit Ansäuern des vakuolären Lumens im Gegensatz zum *fou2*-SV-Kanal stark ab, die Einzelkanalleitfähigkeit des WT- als auch des *fou2*-SV-Kanals dagegen zu.

Anhand der durchgeführten Messungen konnte eine regulatorische, vakuolär gelegene  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle des TPC1-kodierten Kanals lokalisiert und charakterisiert werden, welche sich vermutlich nahe am Spannungssensor befindet und unter physiologischen Membranspannungen einen einwärtsgerichteten Kationenstrom ermöglicht.

5. Ferner wurden SV-Kanäle von Schließzellen untersucht und deren spezifische Eigenschaften mit Mesophyll-SV-Kanälen verglichen. In Schließzellen liegt neben einer erhöhten Transkriptmenge des *single-copy* Gens TPC1 eine höhere Stromdichte des SV-Kanals vor. Unter einwärtsgerichtetem  $\text{K}^+$ -Gradienten liegt das Aktivierungspotential von Schließzell-SV-Kanäle um 30 mV negativer als bei Mesophyllvakuolen, was unter physiologischen Membranspannungen zu einem ausgeprägtem  $\text{K}^+$ -Einstrom führt. Darüber hinaus zeigte der Schließzell-SV-Kanal eine höhere Permeabilität von  $\text{Na}^+$ - gegenüber  $\text{K}^+$ -Ionen (1,3:1) auf. Während Schließzell- und Mesophyll-SV-Kanäle eine vergleichbare luminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität aufweisen, zeigen Schließzell-SV-Kanäle eine höhere cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ - und vakuoläre pH-Sensitivität auf. Sequenzanalysen der *TPC1*-cDNA zeigten, dass die Zelltypspezifischen Unterschiede des SV-Kanals nicht durch posttranskriptionale Modifikation hervorgerufen werden.

## 6 Summary

As an output of this dissertation, the following new insights into vacuolar transport processes of proton pumps, sugar transporters and slow vacuolar channels (SV-channels) via the patch clamp technique were gained:

1. The vacuolar V-ATPase of *A. thaliana* mesophyll cells of the WT as well as of the double mutant *vha-a2-vha-a3* were analyzed. The specific V-ATPase-inhibitor concanamycin A inhibits the WT V-ATPase activity completely. In *vha-a2-vha-a3* mutant the V-ATPase activity was completely absent and shows no ATP induced  $H^+$  currents. However, the vacuolar *vha-a2-vha-a3* pyrophosphatase current density was indistinguishable from the WT and could not compensate the missing V-ATPase pump currents. Additionally, the V-ATPase expression rate and  $H^+$  currents of *A. thaliana* guard cells and mesophyll cells were examined. In guard cells the expression rate as well as the pump currents were higher compared to mesophyll cells which resulted in a stronger proton motive force.
2. Furthermore, the transport mechanism of the vacuolar membrane protein AtINT1 was studied on Arabidopsis WT mesophyll cells. At high vacuolar and low cytoplasmic pH values AtINT1 could be identified as an  $H^+$ /inositol symporter. These data was confirmed by further measurements of the mutant lines *Atint1.1* and *Atint1.2*. After application of *myo*-inositol the currents were completely absent in *Atint1.1* and strongly reduced in the *Atint1.2* mutant.
3. Besides transport characteristics of the tonoplast localized AtSUC4 protein was analyzed. After application of cytosolic sucrose, WT as well as *Atsuc4.1* vacuoles showed an  $H^+$ /sucrose driven Antiport mechanism in presence of physiological  $H^+$ -gradient. However, in the presence of an inverse pH gradient, 60 % of the AtSUC4-overexpressing mutant showed sucrose induced currents indicating an  $H^+$ /sucrose Symport mechanism of the AtSUC4 transport protein. Corresponding currents could not be detected in AtSUC4 less vacuoles (*Atsuc4.1*). In the inverse system sucrose induced currents of the *Atsuc4.1* mutant were in accordance with an  $H^+$ /sucrose coupled antiport mechanism. These patch clamp measurements confirm the findings of the working group of Norbert Sauer, University of Erlangen. AtSUC4 acts as a symporter by transporting sucrose coupled with  $H^+$  out of the vacuole into the cytosol and therefore plays a role in the remobilization of stored vacuolar sucrose.
4. Additionally the non-selective voltage dependent slow vacuolar channel (SV channel) of Arabidopsis mesophyll vacuoles was electrophysiologically characterized. Thereby the 14-3-3 protein GRF6 could be identified as a regulatory protein of the SV channel, which down-regulates the SV channel activity. The gain-of-function mutant *fou2* containing the point mutation D454N on the vacuolar lumen side of the SV channel protein, shows different channel properties compared to WT. The *fou2* channel activation was shifted to 30 mV more

negative membrane potentials which resulted in higher open probability than WT SV channels. The *fou2* mutation also affected the luminal  $\text{Ca}^{2+}$  binding site of the SV channel and lowered the affinity to vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$ . *fou2* channel activity remained high even at inhibitory vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. The WT SV channel open probability decreased strongly with luminal acidification in contrast to *fou2*. However, the single channel conductance of WT and *fou2* SV channels increased.

The regulatory vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$  binding site of the TPC1 channel seems to be located nearby the voltage sensor and enables a pronounced *fou2* inward current under physiological membrane voltages.

5. The *A. thaliana* guard cell SV channel features were compared with mesophyll cells. In guard cells the transcript number of the single copy gene TPC1 was elevated which resulted in a higher SV current density than in mesophyll cells. When the  $\text{K}^+$  gradient was directed out of the vacuolar lumen the guard cell SV channel activated at about 30 mV less negative voltages compared to mesophyll cells and mediated distinct inward currents. The guard cell SV channel showed permeability for  $\text{Na}^+$  over  $\text{K}^+$  (1,3:1). SV channels from guard cells and mesophyll cells exhibited comparable luminal  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivities. However, the guard cell SV channel is more sensitive to cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and vacuolar pH. Sequence analyses of the TPC1 cDNA showed that the varying features of the guard cell and mesophyll cell SV channels are not related to post-transcriptional modifications.



## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aufbau einer Biomembran.....	1
Abbildung 2:	Stomatypen .....	4
Abbildung 3:	Topologiemodell des <i>Arabidopsis</i> TPC1-Proteins .....	9
Abbildung 4:	Model einer eukaryotischen V-Typ-H <sup>+</sup> -ATPase .....	13
Abbildung 5:	Phylogenetischer Baum der INT-Familie von <i>A. thaliana</i> Inositol- Transportern.....	15
Abbildung 6:	Phylogenetischer Baum der neun putativen Saccharose- Transporter von <i>A. thaliana</i> .....	16
Abbildung 7:	Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Vorverstärkers.....	21
Abbildung 8:	Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik .....	24
Abbildung 9:	Schaltbild der makroskopischen Stromableitung .....	25
Abbildung 10:	Einfachspannungspulsprotokoll.....	27
Abbildung 11:	Doppelspannungspulsprotokoll .....	28
Abbildung 12:	Einzelkanalereignisse in Mesophyllvakuolen.....	28
Abbildung 13:	Ermittlung der Einzelkanalleitfähigkeit.....	29
Abbildung 14:	Bestimmung der absoluten Offenwahrscheinlichkeit über Amplitudenhistogramme .....	29
Abbildung 15:	Tail-Ströme des SV Kanals.....	30
Abbildung 16:	Gleichgewichtsströme des SV-Kanals.....	31
Abbildung 17:	Bestimmung des Umkehrpotentials .....	32
Abbildung 18:	PP <sub>i</sub> - und ATP-induzierte makroskopische Ströme bei <i>A. thaliana</i> WT-Vakuolen .....	46
Abbildung 19:	Vergleich der durch 5 mM ATP- und 150 μM PP <sub>i</sub> -induzierten Stromdichte bei <i>A. thaliana</i> WT-Vakuolen .....	46
Abbildung 20:	Concanamycin A-abhängige Hemmung der V-ATPase-Aktivität von WT-Vakuolen .....	47
Abbildung 21:	Phänotyp der <i>vha-a2-vha-a3</i> -Mutante .....	48
Abbildung 22:	ATP-induzierte H <sup>+</sup> -Ströme von WT- und <i>vha-a2-vha-a3</i> - Mesophyllvakuolen.....	49

Abbildung 23: ATP-induzierte vakuoläre Ströme von der V-ATPase-Mutante <i>vha-a2-vha-a3</i> werden nicht durch eine zweifache Applikation von 10 $\mu$ M Concanamycin A (ConA) in das Badlumen inhibiert .....	49
Abbildung 24: PP <sub>i</sub> - und ATP-induzierte H <sup>+</sup> -Ströme der Pyrophosphatase und V-ATPase von WT und der <i>vha-a2-vha-a3</i> -Mutante .....	50
Abbildung 25: VHA-a2-Expression und Pumpstromdichte von Schließzell- und Mesophyllzellvakuolen .....	52
Abbildung 26: Schematische Darstellung des INT1-Gens .....	53
Abbildung 27: <i>myo</i> -Inositol-induzierte H <sup>+</sup> -Ströme von WT-, <i>Atint.1.1</i> - und <i>Atint1.2</i> -Mesophyllvakuolen.....	55
Abbildung 28: Zucker-induzierte Ströme in Mesophyllvakuolen von WT, <i>Atint1.1</i> - und <i>Atint1.2</i> -Mutanten .....	56
Abbildung 29: Schematische Darstellung des AtSUC4-Gens .....	57
Abbildung 30: Saccharose-induzierte H <sup>+</sup> -Ströme von Mesophyllvakuolen des Wildtyps .....	58
Abbildung 31: Saccharose-induzierte H <sup>+</sup> -Ströme in <i>AtSUC4-ÜE</i> Mesophyllvakuolen.....	59
Abbildung 32: Saccharose-induzierte H <sup>+</sup> -Ströme von <i>Atsuc4.1</i> -Vakuolen .....	60
Abbildung 33: Spannungspulsprotokoll und Stromantwort des vakuolären SV-Kanals von <i>A. thaliana</i> WT während Äquilibrierung der Pipettenlösung mit dem Vakuolenlumen .....	62
Abbildung 34: Spannungsabhängige Aktivierung des SV-Kanals in Mesophyllvakuolen von <i>A. thaliana</i> .....	63
Abbildung 35: Wachstumsphänotyp der <i>fou2</i> -Mutante im Vergleich zum WT .....	64
Abbildung 36: Zeitabhängige Aktivierung des SV-Kanals von <i>fou2</i> - und WT-Vakuolen nach Durchbruch in die <i>Whole-vacuolar</i> -Konfiguration .....	65
Abbildung 37: Semiquantitative EDX-Analyse der elementaren Zusammensetzung von Mesophyllvakuolen.....	66
Abbildung 38: Auswirkung der luminalen Ca <sup>2+</sup> -Konzentration auf die Offenwahrscheinlichkeit Po der WT- und <i>fou2</i> -SV-Kanäle.....	67
Abbildung 39: Auswirkung des luminalen pH-Werts auf die Ca <sup>2+</sup> -Sensitivität des WT- und <i>fou2</i> -SV-Kanals .....	68
Abbildung 40: Beeinflussung der SV-Einzelkanalleitfähigkeit $\gamma$ vom WT und von <i>fou2</i> durch den luminalen pH-Wert .....	70

---

Abbildung 41: Cytosolisches $\text{Ca}^{2+}$ beeinflusst die spannungsabhängige Aktivierung des SV-Kanals .....	72
Abbildung 42: Spannungsabhängige Aktivierung der WT- und <i>fou2</i> -SV-Kanäle in Abhängigkeit des $\text{K}^+$ - und $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten .....	73
Abbildung 43: Regulation des <i>A. thaliana</i> SV-Kanalstroms von Mesophyllvakuolen durch 14-3-3 Proteine.....	75
Abbildung 44: GRF6-abhängige Hemmung der SV-Kanalfluktuationen von <i>A. thaliana</i> Mesophyllvakuolen .....	76
Abbildung 45: SV-Kanalströme von Schließzell- und Mesophyllvakuolen.....	78
Abbildung 46: Einzelkanalaufzeichnungen des SV-Kanals von Schließzell- und Mesophyllvakuolen.....	79
Abbildung 47: Absolute Offenwahrscheinlichkeit $P_o$ von Schließzell- und Mesophyllzell-SV-Kanälen .....	80
Abbildung 48: <i>TPCI</i> -Transkriptmenge in Mesophyll- und Schließzellvakuolen .....	81
Abbildung 49: Aktivierungskinetik und halbmaximale Aktivierungszeiten der Schließzell- und Mesophyll-SV-Kanäle .....	82
Abbildung 50: Dosis-Effekt-Kurve von cytosolischem $\text{Ca}^{2+}$ auf die Schließzell- und Mesophyll-SV-Kanäle .....	83
Abbildung 51: Luminales $\text{Ca}^{2+}$ verringert die absolute Offenwahrscheinlichkeit $P_o$ des SV-Kanals von Schließzellvakuolen.....	84
Abbildung 52: SV-Kanal-vermittelte auswärtsgerichtete $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme von Schließzell- und Mesophyllzellvakuolen.....	85
Abbildung 53: $\text{Na}^+$ - und $\text{K}^+$ -Ströme durch den SV-Kanal von Schließzellvakuolen .....	86
Abbildung 54: Überprüfung der <i>TPCI</i> -cDNA von Schließzell- und Mesophyllvakuolen auf putative Splicevarianten.....	88

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	CaCl <sub>2</sub> - und EGTA-Konzentrationen zum Einstellen der freien Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen in den Messlösungen bei pH 7,5.....	34
Tabelle 2:	CaCl <sub>2</sub> - und EGTA-Konzentrationen zum Einstellen der freien Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen in den Messlösungen bei pH 5,5.....	34
Tabelle 3:	PCR-Programm des Thermocyclers .....	41
Tabelle 4:	Sequenzierprimer .....	43
Tabelle 5:	RT-PCR Primer.....	44
Tabelle 6:	SV-Einzelkanalleitfähigkeit $\gamma$ von Schließzell- und Mesophyllvakuolen.....	80

## 9 Anhang

### 9.1 Literaturverzeichnis

**Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R.** 2000. GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. FEBS 486: 93-98.

**Allaway WG.** 1973. Accumulation of malate in guard cells of *Vicia faba* during stomatal opening. Planta 110: 63-70.

**Allen GJ and Sanders D.** 1994. Osmotic stress enhances the competence of *Beta vulgaris* vacuoles to respond to inositol 1,4,5-trisphosphate. The Plant Journal 6: 687-695.

**Allen GJ and Sanders D.** 1995. Calcineurin, a type 2B protein phosphatase, modulates the Ca<sup>2+</sup>-permeable slow vacuolar ion channel of stomatal guard cells. The Plant Cell 7: 1473-1483.

**Allen GJ and Sanders D.** 1995. Calcineurin, a type 2B protein phosphatase, modulates the Ca<sup>2+</sup>-permeable slow vacuolar ion channel of stomatal guard cells. The Plant Cell 7: 1473-1483.

**Allen GJ and Sanders D.** 1996. Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. The Plant Journal 10: 1055-1069.

**Allen GJ, Amtmann A, Sanders D.** 1998. Calcium-dependent and calcium-independent K<sup>+</sup> mobilization channels in *Vicia faba* guard cell vacuoles. Journal of Experimental Botany 49: 305–318.

**Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI.** 2001. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. Nature. 411:1053-7.

**Allen GJ, Chu SP, Schumacher K, Shimazaki CT, Vafeados D, Kemper A, Hawke SD, Tallman G, Tsien RY, Harper JF, Chory J, Schroeder JI.** 2000. Alteration of Stimulus-Specific Guard Cell Calcium Oscillations and Stomatal Closing in *Arabidopsis det3* Mutant. Science 289: 2338-2342.

**Allen GJ, Sanders D.** 1994. Two voltage gated, calcium release channels coreside in the vacuolar membrane of broad bean guard cells. Plant Cell 6: 685-694.

- Aluri S, Büttner M.** 2007. Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 2537-2542.
- Amodeo G, Escobar A, Zeiger E.** 1994. A cationic channel in the guard cell Tonoplast of *Allium cepa*. Plant Physiol. 105: 999-1006.
- Ap Rees T.** 1994. Plant physiology. Virtue on both sides. Curr. Biol. 4: 557-559.
- Apse MP and Blumwald E.** 2002. Engineering salt tolerance in plants. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 146-150.
- Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E.** 2003. Vacuolar cation/H<sup>+</sup> exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. Plant J. 36: 229-39.
- Armengaud P, Breitling R, Amtmann A.** 2004. The potassium-dependent transcriptome of Arabidopsis reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. Plant Physiol. 136: 2556–2576.
- Baud S, Wuillème S, Lemoine R, Kronenberger J, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C.** 2005. The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. Plant J. 43: 824-36.
- Becker B.** 2007. Function and evolution of the vacuolar compartment in green algae and land plants (Viridiplantae). 2007. International Review of Cytology. 264: 1-24.
- Becker D, Geiger D, Dunkel M, Roller A, Bertl A, Latz A, Carpaneto A, Dietrich P, Roelfsema MR, Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B, Czempinski K, Hedrich R.** 2004. AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K<sup>+</sup> channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. Proc Natl Acad Sci USA. 101: 15621-6.
- Becker D, Zeilinger C, Lohse G, Depta H, Hedrich R.** 1993. Identification and biochemical characterization of the plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. Planta 190: 44-50.
- Bell, E, Creelman, RA, Mullet, JE.** 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8675-8679.
- Bertl A, Blumwald E, Coronado R.** 1992. Electrical measurements on endomembranes. Science 258: 873-874.
- Bertl A, Slayman CL.** 1990. Cation-selective channels in the vacuolar membrane of *Saccharomyces*: Dependence on calcium, redox state, and voltage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7824-7828.

- Bethke PC, Jones RL.** 1994.  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin modulates ion channel activity in storage protein vacuoles of barley aleurone cells. *The Plant Cell* 6: 277-285.
- Bethke PC, Jones RL.** 1997. Reversible protein phosphorylation regulates the activity of the slow-vacuolar ion channel. *The Plant Journal* 11: 1227-1235.
- Bethke PC, Jones RL.** 2000. Vacuoles and prevacuolar compartments. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 469-475.
- Bethmann B, Thaler M, Simonis W, Schönknecht G.** 1995. Electrochemical potential gradients of  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Cl}^-$  across the tonoplast of the green alga *Eremosphaera Viridis*. *Plant Physiol.* 109: 1317–1326.
- Beyenbach KW and Wiczorek H.** 2006. The V-type  $\text{H}^+$  ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of Experimental Biology* 209: 577-589.
- Beyhl D, Hörtensteiner S, Martinoia E, Farmer EE, Fromm J, Marten I, Hedrich R.** 2009. The *fou2* mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium. *Plant J.* 58: 715-23.
- Blatt MR and Grabow A.** 1997. Signalling gates in abscisic acid-mediated control of guard cell ion channels. *Physiologia Plantarum* 100: 481-490.
- Bonaventure G, Gfeller A, Proebsting WM, Hörtensteiner S, Chételat A, Martinoia E, Farmer EE.** 2007a. A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in Arabidopsis. *The Plant Journal* 49: 889-898.
- Bonaventure G, Gfeller A, Rodriguez VM, Armand F, Farmer EE.** 2007b. The *fou2* gain-of-function allele and the wildtype allele of *Two Pore Channel 1* contribute to different extents or by different mechanisms to defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 48: 1775-1789.
- Booij PP, Roberts MR, Vogelzang SA, Draayenhof R, de Boer AH.** 1999. 14-3-3 proteins double the number of outward-rectifying  $\text{K}^+$  channels available for activation in tomato cells. *Plant Journal* 20: 673-683.
- Bowman EJ, Sieber A, Altendorf K.** 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7972-7976.
- Brüx A, Liu TZ, Krebs M, Stierhof YD, Lohmann JU, Otto Miersch O, Waster-nack C, Schumacher K.** 2008. Reduced V-ATPase Activity in the trans-Golgi Network Causes Oxylipin-Dependent Hypocotyl Growth Inhibition in Arabidopsis. *Plant Cell.* 20: 1088–1100.

- Bunney TD, van den Wijngaard PWJ, de Boer AH.** 2002. 14-3-3 protein regulation of proton pumps and ion channels. *Plant Mol. Biol.* 50: 1041-1051.
- Büttner M.** 2007. The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 581: 2318-24.
- Carpaneto A, Cantu AM, Gambale F.** 1999. Redox agents regulate ion channel activity in vacuoles from higher plant cells. *FEBS Letters* 442: 129-132.
- Carpaneto A, Cantu AM, Gambale F.** 2001. Effects of cytoplasmic  $Mg^{2+}$  on slowly activating channels in isolated vacuoles of *Beta vulgaris*. *Planta* 213: 457-468.
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R.** 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under control of sucrose gradient and proton motive force. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 21437-43.
- Caspari T, Will A, Opekarova M, Sauer N, Tanner W.** 1994. Hexose/ $H^+$  symporters in lower and higher plants. *J. exp. Biol.* 196: 483-491.
- Cellier F, Conejero G, Ricaud L, Doan TL, Lepetit M, Gosti F, Casse F.** 2004. Characterization of AtCHX17, a member of the cation/ $H^+$  exchangers, CHX family from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in  $K^+$  homeostasis. *Plant Journal* 39: 834-846.
- Chan HC, Wu WL, So SC, Chung YW, Tsang LL, Wang XF, Yan YC, Luk SCW, Siu SS, Tsui SKW, Fung KP, Lee CY, Waye MMY.** 2000. Modulation of the  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  channel by 14-3-3 $\epsilon$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270: 581-587.
- Cheng NH, Pittman JK, Shigaki T, Lachmansingh J, LeClere S, Lahner B, Salt DE, Hirschi KD.** 2005. Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol* 138: 2048-2060.
- Chico JM, Raíces M, Téllez-Iñón MT and Ulloa RM.** 2002. A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiol.* 128: 256-270.
- Cipriano DJ, Wang Y, Bond S, Hinton A, Jefferies KC, Qi J, Forgac M.** 2008. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochim Biophys Acta.* 1777: 599-604.
- Cookson SJ, Williams LE, Miller AJ.** 2005. Light-dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Physiol.* 138: 1097-1105.



- Coyaud L, Kurkdjian A, Kado R, Hedrich R.** 1987. Ion channels and ATP-driven pumps involved in ion transport across the Tonoplast of sugarbeet vacuoles. *Biochimica et Biophysica Acta* 902: 263-268.
- Creelman RA, Mullet JE.** 1997. Oligosaccharins, Brassinolides, and Jasmonates: Non-traditional Regulators of Plant Growth, Development, and Gene Expression. *The Plant Cell* 9: 1211-1223.
- D'Auzac J.** 1975. Caractérisation d'une ATPase membranaire en presence d'une phosphatase acide dans les lutoïdes du latex d'Hevea brasiliens. *Phytochem.* 14: 671-675.
- Dadacz-Narloch B, Beyhl D, Larisch C, López-Sanjurjo EJ, Reski R, Kuchitsu K, Müller TD, Becker D, Schönknecht G, Hedrich R.** 2011. A Novel Calcium Binding Site in the Slow Vacuolar Cation Channel TPC1 Senses Luminal Calcium Levels. *Plant Cell.* 23: 2696-707.
- Darley CP, Davies JM, Sanders D.** 1995. Chill-induced changes in the activity and abundance of the vacuolar proton-pumping pyrophosphatase from mung bean hypocotyls. *Plant Physiol* 109: 659-665.
- Darley CP, Skiera LA, Northrop FD, Sanders D, Davies JM.** 1998. Tonoplast inorganic Pyrophosphatase in *Vicia faba* guard cells. *Planta* 206: 272-277.
- Davies JM, Hunt I, Sanders D.** 1994. Vacuolar H<sup>+</sup>-pumping ATPase variable transport coupling ratio controlled by pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8547-8551.
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H.** 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 24: 939-42.
- De Boer AH.** 2002. Plant 14-3-3 proteins assist ion channels and pumps. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 416-421.
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K.** 2006. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18: 715-730.
- Diekmann W, Hedrich R, Raschke K, Robinson DG.** 1993. Osmocytosis and vacuolar fragmentation in guard cell protoplasts: their relevance to osmotically-induced volume changes in guard cells. *J Exp Bot* 44: 1569-1577.
- Dobrovinskaya OR, Muniz J, Pottosin II.** 1999a. Asymmetric block of the plant vacuolar Ca<sup>2+</sup>-permeable channel by organic cations. *Eur Biophys J.* 28: 552-563.
- Dombrowski JE, Daniel R, Bergey DR.** 2007. Calcium ions enhance systemin activity and play an integral role in the wound response. *Plant Science.* 172: 335-344.

- Dröse S and Altendorf K.** 1996. Bafilomycins and Concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *The Journal of Experimental Biology* 200: 1-8.
- Dröse S, Bindseil KU, Bowman EJ, Siebers A, Zeeck A, Altendorf K.** 1993. Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry N.Y.* 32: 3902-3906.
- Emmerlich V, Linka N, Reinhold T, Hurth MA, Traub M, Martinoia E, Neuhaus HE.** 2003. The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 11122-6.
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmitdt UG.** 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* 141: 196-207.
- Fairley-Grenot KA and Assmann SM.** 1992. Permeation of  $\text{Ca}^{2+}$  through  $\text{K}^+$  channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *J. Membrane Biol.* 128: 103-113.
- Fan LM, Zhao Z, Assman SM.** 2004. Guard cells: a dynamic signaling model. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 537-546.
- Felle H.** 1988. Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: Interaction of  $\text{Ca}^{2+}$  and pH? *Planta* 176, 248-255.
- Fisahn J, Herde O, Willmitzer L, Peña-Cortés H.** 2004. Analysis of the transient increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  during the action potential of higher plants with high temporal resolution: Requirement of  $\text{Ca}^{2+}$  transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. *Plant Cell Physiol.* 45: 456-459.
- Fürst J, Ritter M, Rudzki J, Danzl J, Gschwentner M, Scandella E, Jakab M, König M, Oehl B, Lang F, Deetjen P, Paulmichl M.** 2002. ICl<sub>in</sub> ion channel splice variants in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 277: 4435-4445.
- Furuchi T, Cunningham KW, Muto S.** 2001. A putative two pore channel AtTPC1 mediates  $\text{Ca}^{2+}$  flux in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Cell Physiol.* 42: 900-905.
- Ganguly S, Weller JL, Ho A, Chemineau P, Malpoux B and Klein DC.** 2005. Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102: 1222-1227.
- Gao D, Knight MR, Trewavas AJ, Sattelmacher B, Plieth C.** 2004. Self-reporting *Arabidopsis* expressing pH and  $[\text{Ca}^{2+}]$  indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiol.* 134: 898-908.

- Gao XQ, Wang XL, Ren F, Chen J, Wang XC.** 2009. Dynamics of vacuoles and actin filaments in guard cells and their roles in stomatal movement. *Plant, Cell and Environment* 32: 1108-1116.
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR.** 1999. The *Arabidopsis thaliana* proton transporter, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 1480-1485.
- Geisler M, Axelsen KB, Harper JF, Palmgren MG.** 2000. Molecular aspects of higher plant P-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. *Biochim Biophys Acta.* 1465: 52-78.
- Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ.** 1990. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 346: 769-771
- Gobert A, Isayenkov S, Voelker C, Czempinski K, Maathuis FJM.** 2007. The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar  $\text{K}^{+}$  conductance and plays a role in  $\text{K}^{+}$  homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 10726-10731.
- Goldmann DE.** 1943. Potential, impedance and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27: 37-60.
- Hanitzsch M, Schnitzer D, Seidel T, Gollmack D, Dietz KJ.** 2007. Transcript level regulation of the vacuolar  $\text{H}^{+}$ -ATPase subunit isoforms VHA-a, VHA-E and VHA-G in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Membrane Biology* 24: 507-518.
- Hedrich R and Neher E.** 1987. Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature* 329: 833-835.
- Hedrich R and Schroeder JI.** 1989. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 40: 539-569.
- Hedrich R, Flügge UI, Fernandez JM.** 1986. Patch-clamp studies of ion transport in isolated plant vacuoles. *FEBS Lett.* 3910: 228-232.
- Hedrich R, Kurkdijan A, Guern J, Flügge UI.** 1989. Comparative studies on the electrical properties of the  $\text{H}^{+}$  translocating ATPase and pyrophosphatase of the vacuolar-lysosomal compartment. *EMBO* 8: 2835-2841.
- Hedrich R, Marten I.** 2011. TPC1-SV channels gain shape. *Mol Plant.* 4: 428-41.
- Hedrich R.** 2012. Ion channels in plants. *Physiological Reviews.* In press.
- Heldt HW.** 2005. *Plant Biochemistry.* Elsevier Academic Press. Burlington, MA.
- Hetherington AM and Woodward FI.** 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424: 901-908.
- Hille B.** 1984. *Ionic Channels of Excitable Membranes.* 1. Ausgabe. Sinauer. Sunderland, MA

- Hille B.** 1992. Ionic channel of excitable membranes. Sinauer. Sunderland, MA
- Hirata T, Nakamura N, Omote H, Wada Y, Futai M.** 2000. Regulation and reversibility of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275: 368-389.
- Hirschi KD, Zhen RG, Cunningham KW, Rea PA, Fink GR.** 1996. CAX1, an H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8782-8786.
- Hodgkin AL and Katz B.** 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108: 37-77.
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Véry AA, Somonneau T, Thibaud JB, Sentenac H.** 2003. The Arabidopsis outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5549-5554.
- Hoth S, Niedermeier M, Feuerstein A, Hornig J, Sauer N.** 2010. An ABA-responsive element in the AtSUC1 promoter is involved in the regulation of AtSUC1 expression. *Planta.* 232: 911-23.
- Humble GD, Raschke K.** 1971. Stomatal Opening Quantitatively Related to Potassium Transport: Evidence from Electron Probe Analysis. *Plant Physiology* 48: 447-453.
- Hurth MA, Suh SJ, Kretschmar T, Geis T, Bregante M, Gambale F, Martinoia E, Neuhaus HE.** 2005. Impaired pH homeostasis in Arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiol.* 137: 901-10.
- Huss M, Ingenhorst G, König S, Gaßel M, Dröse S, Zeeck A, Altendorf K, Wiczorek H.** 2002. Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V<sub>o</sub> Subunit c. *The Journal of Biological Chemistry.* 43: 40544-40548.
- Irving HR, Gehring CA, Parish RW. 1992. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 1790-1794.
- Ishibashi K, Suzuki M, Imai M.** 2000. Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270: 370-376.
- Islam MM, Munemasa S, Hossain MA, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y.** 2010. Roles of AtTPC1, vacuolar two pore channel 1, in Arabidopsis stomatal closure. *Plant Cell Physiol.* 51, 302–311.
- Ivashikina N and Hedrich R.** 2005. K<sup>+</sup> currents through SV-type vacuolar channels are sensitive to elevated luminal sodium levels. *Plant J.* 41: 606-614.
- Jiang X, Leidi EO and Pardo JM.** 2010. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signal Behav.* 5.

- Johannes E, Brosnan JM and Sanders D.** 1992. Parallel pathways for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release from the vacuole of higher plants. *The Plant Journal* 2: 97-102
- Kadota Y, Furuichi T, Ogasawara Y, Goh T, Higashi K, Muto S, Kuchitsu K.** 2004. Identification of putative voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels involved in cryptogein-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317: 823-830.
- Kane PM.** 2000. Regulation of V-ATPases by reversible disassembly. *FEBS Lett.* 469: 137-141.
- Kanter U, Usadel B, Gueerineau F, Li Y, Pauly M, Tenhaken R.** 2005. The inositol oxygenase gene family of Arabidopsis is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cellwall matrix polysaccharides. *Planta* 221: 243-254.
- Karlsson J.** 1975. Membrane-bound potassium and magnesium ion-stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*BETA VULGARIS L.*). *Biochim. Biophys. Acta* 399: 356-63.
- Kim DH, Eu Y-J, Yoo CM, Kim Y-W, Pih KT, Jin JB, Kim SJ, Stenmark H, In-hwan Hwang I.** 2001. Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the *trans*-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *Plant Cell* 13: 287-301.
- Kinoshita T, Hayashi Y.** 2011. New insights into the regulation of stomatal opening by blue light and plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. *Int Rev Cell Mol Biol.* 289: 89-115.
- Kirshner N.** 1962. Uptake of catecholamines by particulate fraction of the adrenal medulla. *J. Biol. Chem.* 237: 2311-2317.
- Kluge C, Seidel T, Bolte S, Sharma SS, Hanitzsch M, Satiat-Jeunemaitre B, Ross J, Sauer M, Gollack D, Dietz KJ.** 2004. Subcellular distribution of the V-ATPase complex in plant cells, and in vivo localisation of the 100 kDa subunit VHA-a within the complex. *BMC Cell Biol.* 5:29.
- Korthout HAAJ and De Boer AH.** 1998. Plant plasma membrane 14-3-3 proteins differ in solubility and form fusicoccin-dependent complexes. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 357-365.
- Kovermann P, Meyer S, Hörtensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, Lee Y, Martinoia E.** 2007. The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant J.* 52: 1169-80
- Krebs M, Beyhl D, Görlich E, Al-Rasheid KAS, Marten I, Stierhof YD, Hedrich R, Schumacher K.** 2010. Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 3251-6.

- Kudla J, Batistic O, Hashimoto K.** 2010. Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. *The Plant Cell* 22: 541–563.
- Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R, Frommer WB.** 1997. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science*. 275: 1298-300.
- Kurusu T, Sakurai Y, Miyao A, Hirochika H, Kuchitsu K.** 2004. Identification of a putative voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel (*OsTPC1*) involved in  $\text{Ca}^{2+}$  influx and regulation of growth and development in rice. *Plant Cell Physiol*. 45: 693-702.
- Latz A, Becker D, Hekman M, Müller T, Beyhl D, Marten I, Eing C, Fischer A, Dunkel M, Bertl A, Rapp UR, Hedrich R.** 2007. TPK1 a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated Arabidopsis vacuole two-pore  $\text{K}^+$  channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J*. 52:449-59.
- Latz, A.** 2007. Lokalisation, Funktion und Regulation pflanzlicher Tandem-Poren-Kaliumkanäle in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Leckie CP, McAinsh MR, Allen GJ, Sanders D, Hetherington AM.** 1998. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15837-15842.
- Lehle L.** 1990. Phosphatidyl inositol metabolism and its role in signal transduction in growing plants. *Plant Mol Biol*. 15: 647-58.
- Leidi EO, Barragán V, Rubio L, El-Hamdaoui A, Ruiz MT, Cubero B, Fernández JA, Bressan RA, Hasegawa PM, Quintero FJ, Pardo JM.** 2010. The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J*. 61: 495-506.
- Leigh RA and Pope AJ.** 1987. Understanding tonoplast function: some emerging problems. In B Marin, ed. *Plant Vacuoles: Their Importance in Solute Compartmentation in Cells and Their Applications in Plant Biotechnology*. Plenum Press, New York, pp 101-110.
- Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie EAC, Webb AAR, Manison NF, Brownlee C, Skepper JN, Chen J, Prestwich GD, Brearley CA.** 2003. Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10091-10095.
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI.** 2004. Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* 16: 596-615.
- Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwankun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL, Krizek B, Murphy AS,**

- Gilroy S, Gaxiola R.** 2005. *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase AVP1 Regulates Auxin-Mediated Organ Development. *Science* 310: 121-5.
- Lloyd FE.** 1908. The physiology of stomata. *Carnegie Inst Washington Year Book* 82: 1-142.
- Loewus FA, Murthy PPN.** 2000. myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* 150: 1-19.
- Lohse G and Hedrich R.** 1992. Characterization of the plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Vicia faba* guard cells. *Planta* 188: 206-214.
- Maathuis FJ and Prins HB.** 1991. Inhibition of inward rectifying Tonoplast channels by a vacuolar factor: physiological and kinetic implications. *J. Membr. Biol.* 122: 251-258.
- Maathuis FJ and Prins HBA.** 1990. Patch clamp studies on the root cell vacuoles of a salt tolerant and a salt sensitive *Plantago* species. *Plant Physiol.* 92: 23-28.
- MacRobbie EAC.** 1980. Osmotic measurements on stomatal cells of *Commelina communis* L. *Journal of Membrane Biology* 53: 189-198
- MacRobbie EAC.** 1990. Calcium-dependent and calcium-independent events in the initiation of stomatal closure by abscisic acid. *Proc. RoY. Soc. Lond. B* 241: 214-219.
- Maeshima M.** 2000. Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta.* 1465: 37-51.
- Marger MD and Saier MH Jr.** 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18: 13-20.
- Martinoia E, Locher R, Vogt E.** 1993. Inositol triphosphate metabolism in subcellular fractions of barley (*Hordeum vulgare* L.) mesophyll cells. *Plant Physiol.* 102: 101-105.
- Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus EH.** 2007. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J. Exp Bot.* 58: 83-102.
- Marty F.** 1999. Plant vacuoles. *Plant Cell* 11: 587-599.
- McAinsh MR and Pittman JK.** 2009. Shaping the calcium signature. *New Phytologist* 181: 275-294.
- McAinsh MR, Clayton H, Mansfield TA, Hetherington AM.** 1996. Changes in Stomatal Behavior and Guard Cell Cytosolic Free Calcium in Response to Oxidative Stress. *Plant Physiol.* 111: 1031-1042.
- McAinsh MR, Webb AAR, Taylor JE, Hetherington AM.** 1995. Stimulus-induced oscillations in guard cell cytoplasmic free calcium. *Plant Cell* 7: 1207-1219.

- McClintock M, Higinbotham N, Uribe EG, Cleland RE.** 1982. Active, Irreversible Accumulation of Extreme Levels of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in the Brown Alga, *Desmarestia*. *Plant Physiol.* 70: 171-174.
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N.** 2000. AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J.* 24: 869-82.
- Mitsuda N, Enami K, Nakata M, Takeyasu K, Sato MH.** 2001. Novel type *Arabidopsis thaliana* H<sup>+</sup>-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* 488: 29-33.
- Mueller S, Hilbert B, Dueckershoff K, Roitsch T, Krischke M, Mueller MJ, Berger S.** 2008. General Detoxification and Stress Responses Are Mediated by Oxidized Lipids through TGA Transcription Factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 768-785.
- Müller ML, Taiz L.** 2002. Regulation of the lemon-fruit V-ATPase by variable stoichiometry and organic acids. *Journal of Membrane Biology* 185: 209-220.
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS.** 1996. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84: 889-97.
- Neher E, Sakmann B.** 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 260: 799-801.
- Neuhaus HE.** 2007. Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Lett.* 581: 2223-6.
- Niklas KJ and Spatz HC.** 2012. *Plant Physics*. The University of Chicago Press.
- Nishi T and Forgac M.** 2002. The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases: Nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3 94-103.
- Numberger M, Draguhn A.** 1996. *Patch-Clamp Technik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford.
- Outlaw WH Jr, Manchester J.** 1979. Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. *Plant Physiol* 64: 79-82.
- Paganetto A, Carpaneto A, Gambale F.** 2001. Ion transport and metal sensitivity of vacuolar channels from the roots of the aquatic plant *Eichhornia crassipes*. *Plant, Cell and Environment* 24: 1329–1336.
- Pandey S, Wang XQ, Coursol SA, Assmann SM.** 2002. Preparation and applications of *Arabidopsis thaliana* guard cell protoplasts. *New Phytologist* 153: 517-526.
- Paul AL, Sehnke PC, Ferl RJ.** 2005. Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in Arabidopsis seems to be driven by client interactions. *Mol Biol Cell* 16: 1735-43.



- Pei ZM, Ward JM, Harper JE, Schroeder JI.** 1996. A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. The EMBO Journal 15: 6564-6574.
- Pei ZM, Ward JM, Schroeder JI.** 1999. Magnesium sensitizes slow vacuolar channels to physiological cytosolic calcium and inhibits fast vacuolar channels in fava bean guard cell vacuoles. Plant Physiology 121: 977-986.
- Peiter E, Maathuis FJ, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D.** 2005. The vacuolar Ca<sup>2+</sup>-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. Nature 434: 404-8.
- Penny MG, Kelday LS, Bowling DJF.** 1976. Active chloride transport in leaf epidermis of *Commelina communis* in relation to stomatal activity. Planta 130: 291-294
- Pilon-Smits EAH, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M.** 2009. Physiological functions of beneficial elements. Curr. Opin. Plant Biol. 12: 267-74.
- Pittman JK and Hirschi KD.** 2003. Don't shoot the (second) messenger: endomembrane transporters and binding proteins modulate cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels. Current Opinion in Plant Biology 6: 257-262.
- Poffenroth M, Green DB, Tallman G.** 1992. Sugar concentrations in guard cells of *Vicia faba* illuminated with red or blue light: analysis by high performance liquid chromatography. Plant Physiol 98: 1460-1471.
- Pottosin II and Schönknecht G.** 2007. Vacuolar calcium channels. J. Exp. Bot. 58: 1559-1569.
- Pottosin II, Dobrovinskaya OR, Muniz J.** 1999. Cooperative block of the plant endomembrane ion channel by ruthenium red. Biophysical Journal 77: 1973-1979.
- Pottosin II, Dobrovinskaya OR, Muniz J.** 2001. Conduction of monovalent and divalent cations in the slow vacuolar channel. Journal of Membrane Biology 181: 55-65.
- Pottosin II, Martinez-Estevez M, Dobrovinskaya OR, Miniz J, Schönknecht G.** 2004. Mechanism of luminal Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> action on the vacuolar slowly activating channels. Planta 219: 1057-1070.
- Pottosin II, Tikhonova LI, Hedrich R, Schönknecht G.** 1997. Slowly activating vacuolar channels cannot mediate Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release. The Plant Journal 12: 1387-1398.
- Pottosin II, Wherrett T, Shabala S.** 2009. SV channels dominate the vacuolar Ca<sup>2+</sup> release during intracellular signaling. FEBS Lett. 583: 921-926.

- Queirós F, Fontes N, Silva P, Almeida D, Maeshima M, Gerós H and Fidalgo F.** 2009. Activity of tonoplast proton pumps and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in potato cell cultures is modulated by salt. *J. Exp. Bot.* 60: 1363-1374.
- Ranf S, Wünnenberg P, Lee J, Becker D, Dunkel M, Hedrich R, Scheel D, Dietrich P.** 2008. Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca<sup>2+</sup> signals induced by abiotic and biotic stresses. *The Plant Journal* 53: 287-299.
- Raschke K, Hedrich R, Reckmann U, Schroeder JI.** 1988. Exploring biophysical and biochemical components of the osmotic motor that drives stomatal movement. *Botanica Acta* 101: 283-294.
- Raschke K.** 1979. Movements of stomata. In Haupt, W. and Feinleib, E. (eds), *Encyclopedia of Plant Physiology* 7: 384-441.
- Rasmussen RP, Morrison T, Herrmann M, Wittwer CT.** 1998. Quantitative PCR by Continuous Fluorescence Monitoring of a Double Strand DNA Specific Binding Dye. *Biochemica* 2: 8-11.
- Rea PA, Kim Y, Sarafian V, Poole RJ, Davies JM, Sanders D.** 1992. Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends Biochem Sci.* 17: 348-53.
- Rea PA, Poole RJ.** 1986. Chromatographic resolution of h-translocating pyrophosphatase from h-translocating ATPase of higher plant tonoplast. *Plant Physiol.* 81: 126-9.
- Rea PA, Sanders D.** 1987. Tonoplast energisation: two H<sup>+</sup> pumps, one membrane. *Physiol Plant* 71: 131-141.
- Reddy AR, Rama Das VS.** 1986. Stomatal movement and sucrose uptake by guard cell protoplasts of *Commelina benghalensis* L. *Plant Cell Physiol* 27: 1565–1570.
- Rienmüller F, Beyhl D, Lautner S, Fromm J, Al-Rasheid KA, Ache P, Farmer EE, Marten I, Hedrich R.** 2010. Guard cell-specific calcium sensitivity of high density and activity SV/TPC1 channels. *Plant Cell Physiol.* 51: 1548-54.
- Rienmüller F, Dreyer I, Schönknecht G, Schulz A, Schumacher K, Nagy R, Martinoia E, Marten I, Hedrich R.** 2012. Luminal and Cytosolic pH Feedback on Proton Pump Activity and ATP Affinity of V-type ATPase from *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 8986-8993.
- Ritte G, Rosenfeld J, Rohrig K, Raschke K.** 1999. Rates of sugar uptake by guard cell protoplasts of *Pisum sativum* L. related to the solute requirement for stomatal opening. *Plant Physiology* 121: 647-6555.
- Roelfsema MRG and Hedrich R.** 2005. In the light of stomatal opening: new insights into 'the watergate'. *New Phytologist* 167: 665-691.

- Roelfsema MRG, Levchenko V, Hedrich R.** 2004. ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *The Plant Journal* 37: 578-588.
- Roelfsema MRG, Steinmeyer R, Staal M, Hedrich R.** 2001. Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *The Plant Journal* 26: 1-13.
- Roelfsema MRG; Hedrich R, Geiger D.** 2012. Anion channels: master switches of stress responses. *Trends Plant Sci.* 17: 221-9.
- Rungie JM, Wiskich JT.** 1973. Salt-stimulated Adenosine Triphosphatase from Smooth Microsomes of Turnip. *Plant Physiol.* 51: 1064-8.
- Sachs G and Shin JM.** 1995. The Pharmacology of the Gastric Acid Pump: The H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 277-305.
- Saftner RA and Wyse RE.** 1984. Effect of plant hormones on sucrose uptake by sugar beet root tissue discs. *Plant Physiol.* 74: 951-955.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-567.
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA.** 1992. Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1775-1779.
- Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrtz M, Klebl F.** 2004. AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different *Arabidopsis* ecotypes. *The Plant Journal* 40: 120–130.
- Schachtman D, Schroeder JI, Lucas WJ, Anderson JA, Gaber RF.** 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science* 258: 1654-1658
- Schnabl H, Kottmeier C.** 1984. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in de-salted extracts from isolated guard-cell protoplasts *Planta* 162: 220-225.
- Schneider S, Beyhl D, Hedrich R, Sauer N.** 2008. Functional and physiological characterization of *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER1, a novel Tonoplast-localized transporter for *myo*-inositol. *The Plant Cell* 20: 1073-87.
- Schneider S, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Höll J, Imlau A, Schmitt B, Batz S, Wolf S, Hedrich R, Sauer N.** 2011. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology.* 14: 325-36.

- Schneider S, Schneidereit A, Konrad KR, Hajirezaei MR, Gramann M, Hedrich R, Sauer N.** 2006. *Arabidopsis thaliana* INOSITOL TRANSPORTER4 mediates high affinity H<sup>+</sup>-transport of *myo*-inositol across the plasma membrane. *Plant Physiol.* 141: 565-577.
- Schneider S, Schneidereit A, Udvardi P, Hammes U, Gramann M, Dietrich P, Sauer N.** 2007. *Arabidopsis thaliana* INOSITOL TRANSPORTER2 mediates high affinity H<sup>+</sup>-symport of different inositols across the plasma membrane. *Plant Physiol.* 145: 1395-1407.
- Schneidereit A, Imlau A, Sauer N.** 2008. Conserved cis-regulatory elements for DNA-binding-with-one-finger and homeo-domain-leucine-zipper transcription factors regulate companion cell-specific expression of the *Arabidopsis thaliana* SUCROSE TRANSPORTER 2 gene. *Planta.* 228: 651-62.
- Scholz-Starke J, Angeli AD, Ferraretto C, Paluzzi S, Gambale F, Carpaneto A.** 2004. Redox-dependent modulation of the carrot SV channel by cytosolic pH. *FEBS Letters* 576: 449-454.
- Schroeder JI and Fang HH.** 1991. Inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in guard cells provide a mechanism for low-affinity K<sup>+</sup> uptake. *Plant Biol.* 88: 11583-11587.
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D.** 2001. Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 627-658.
- Schroeder JI, Hagiwara S.** 1989. Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 338: 427-430.
- Schroeder JI, Raschke K, Neher E.** 1987. Voltage dependence of K<sup>+</sup> channels in guard-cell protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4108-4112.
- Schultz C, Gilson P, Oxley D, Youl J, Bacic A.** 1998. GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: Implications for signaling in plants. *Trends Plant Sci.* 3: 426-431.
- Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Büttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R.** 2011. Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant Journal* 68: 129-136.
- Schulz-Lessdorf B and Hedrich R.** 1995. Protons and calcium modulate SV-type channels in the vacuolar-lysosomal compartment: channel interaction with calmodulin inhibitors. *Planta* 197: 655-671.
- Schulz-Lessdorf B, Dietrich P, Marten I, Lohse G, Busch H, Hedrich R.** 1994. Coordination of plasma membrane and vacuolar membrane ion channels during stomatal movement. *Symp Soc Exp Biol.* 48: 99-112.

- Schumacher K, Vafeados D, McCarthy M, Sze H, Wilkins T, Chory J.** 1999. The *Arabidopsis det3* mutant reveals a central role for the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in plant growth and development. *Genes and Development* 13: 3259-3270.
- Shigaki T, Hirschi KD.** 2006. Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H<sup>+</sup> exchangers in plants. *Plant Biol* 8: 419-29.
- Shope JC, DeWald DB, Mott KA.** 2003. Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization. *Plant Physiology* 133: 1314-1321.
- Singer SJ and Nicolson GL.** 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-31.
- Sinnige MP, ten Hoopen P, van den Wijngaard PWJ, Roobeek I, Schoonheim PJ, Mol JNM, De Boer AH.** 2005. The barley two-pore K<sup>+</sup>-channel HvKCO1 interacts with 14-3-3 proteins in an isoform specific manner. *Plant Sci.* 169: 612-619.
- Stadler R, Büttner M, Ache P, Hedrich R, Ivashikina N, Melzer M, Shearson SM, Smith SM, Sauer N.** 2003. Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 528-537.
- Stadler R, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N.** 1999. The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant J* 19: 269–278.
- Surpin M and Raikhel N.** 2004. Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 100-109.
- Sze H, Liang F, Hwang I.** 2000. Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup> pumps: insights from expression in yeast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 433-62.
- Sze H, Schumacher K, Muller ML, Padmanaban S, Tail L.** 2002. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Trends Plant Sci.* 7: 157-161.
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich, R.** 2001. KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2917-2921.
- Taiz L.** 1992. The Plant Vacuole. *J. exp. Biol.* 172: 113-122.
- Talbott LD and Zeiger E.** 1996. Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. *Plant Physiol.* 111: 1051-1057.
- Talbott LD, Zeiger E.** 1993. Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. *Plant Physiol* 102: 1163–1169.
- Tallman G, Zeiger E.** 1988. Light quality and osmoregulation in *Vicia* guard cells: evidence for involvement of three metabolic pathways. *Plant Physiol* 88: 887–895.

- Thiel G, MacRobbie EAC, Blatt MR.** 1992. Membrane transport in stomatal guard cells: The importance of voltage control. *Journal of Membrane Biology* 126: 1-18.
- Tikhonova LI.** 1998. Ionic channels of the vacuolar membrane of higher plants. *Membr Cell Biol.* 12: 301-18.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A.** 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14, 153-164.
- Van den Wijngaard PWJ, Bunney TD, Roobeek I, Schönknecht G, de Boer AH.** 2001. Slow vacuolar channels from barley mesophyll cells are regulated by 14-3-3 proteins. *FEBS Letters* 488: 100-104.
- Van Kirk CA, Raschke K.** 1978. Presence of chloride reduces malate production in epidermis during stomatal opening. *Plant Physiology* 61: 361-364
- Venema K, Belver A, Marin-Manzano MC, Rodriguez-Rosales MP, Donaire JP.** 2003. A novel intracellular  $K^+/H^+$  antiporter related to  $Na^+/H^+$  antiporters is important for  $K^+$  ion homeostasis in plants. *Journal of Biological Chemistry* 278: 22453-22459.
- Véry AA, Bosseux C, Gaymard F, Sentenac H, Thibaud JB.** 1994. Level of expression in *Xenopus* oocytes affects some characteristics of a plant inward-rectifying voltage-gated  $K^+$  channel. *Pflügers Arch.* 428, 422–424.
- von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Dynowski M, Ludewig U.** 2010. CLC-b-Mediated  $NO_3^-/H^+$  Exchange Across the Tonoplast of Arabidopsis Vacuoles. *Plant Cell Physiol.* 51: 960-968.
- Walker DJ, Leigh RA, Miller AJ.** 1996. Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 93: 10510-10514.
- Walker RR and Leigh RA.** 1981. Characterization of a salt-stimulated ATPase activity associated with vacuoles isolated from storage roots of the red beet (*Beta vulgaris L.*). *Planta* 153: 140-149.
- Ward JM, Pei ZM, Schroeder JI.** 1995. Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *Plant Cell* 7: 833-844.
- Ward JM, Schroeder JI.** 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. *The Plant Cell* 6: 669-683.
- Weiner H, Stitt M, Heldt HW.** 1987. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics.* 893: 13-21.

- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM.** 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *The Plant Cell* 12: 1345-1355.
- White PJ, Bowen HC, Demidchik V, Nichols C, Davies JM.** 2002. Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1564: 299-309.
- Wille A and Lucas WJ.** 1984. Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. *Planta* 160: 129-142.
- Willmer CM, Grammatikopoulos G, Lasceve G, Vavasseur A.** 1995. Characterization of the vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase from guard cell protoplasts of *Commelina*. *Journal of Experimental Botany* 46: 383-389.
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW.** 1994. Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* 193: 530-535.
- Wolfenstetter S, Wirsching P, Dotzauer D, Schneider S, Sauer N.** 2012. Routes to the Tonoplast: The Sorting of Tonoplast Transporters in *Arabidopsis* Mesophyll Protoplasts. *Plant Cell* 24:215-32.
- Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE.** 2006. Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell*. 18: 3476-90.
- Yaffe MB and Elia AEH.** 2001. Phosphoserine/threonine-binding domains. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 131-138.
- Zhou Y, Schopperle W, Murrey H, Jaramillo A, Dagan D, Griffith L, Levitan I.** 1999. A dynamically regulated 14–3–3, slob, and slowpoke potassium channel complex in *Drosophila* presynaptic nerve terminals. *Neuron* 22: 809-818.
- Zifarelli G and Pusch M.** 2010. CLC transport proteins in plants. *FEBS Letters* 584: 2122-2127.

## 9.2 Publikationen

- Latz A, Becker D, Hekman M, Müller T, **Beyhl D**, Marten I, Eing C, Fischer A, Dunkel M, Bertl A, Rapp UR, Hedrich R. **2007**. TPK1, a Ca<sup>2+</sup>-regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore K<sup>+</sup> channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J*. 52: 449-59.

Schneider S, **Beyhl D**, Hedrich R, Sauer N. **2008**. Functional and physiological characterization of *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER1, a novel Tonoplast-localized transporter for *myo*-inositol. *The Plant Cell* 20: 1073-87.

**Beyhl D**, Hörtensteiner S, Martinoia E, Farmer EE, Fromm J, Marten I, Hedrich R. **2009**. The *fou2* mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium. *Plant J.* 58: 715-23.

Krebs M, **Beyhl D**, Görlich E, Al-Rasheid KAS, Marten I, Stierhof YD, Hedrich R, Schumacher K. **2010**. *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 3251-6.

Rienmüller F, **Beyhl D**, Lautner S, Fromm J, Al-Rasheid KA, Ache P, Farmer EE, Marten I, Hedrich R. **2010**. Guard cell-specific calcium sensitivity of high density and activity SV/TPC1 channels. *Plant Cell Physiol.* 51: 1548-54.

Schulz A, **Beyhl D**, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Büttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R. **2011**. Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant Journal* 68: 129-136.

Dadacz-Narloch B, **Beyhl D**, Larisch C, López-Sanjurjo EJ, Reski R, Kuchitsu K, Müller TD, Becker D, Schönknecht G, Hedrich R. **2011**. A Novel Calcium Binding Site in the Slow Vacuolar Cation Channel TPC1 Senses Luminal Calcium Levels. *Plant Cell.* 23: 2696-707.

### 9.3 Abkürzungsverzeichnis

% .....	Prozent
Ø.....	Durchmesser
Ω .....	Ohm
π .....	Psi
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>Cyt</sub> .....	cytosolische Calciumkonzentration
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>Vak</sub> .....	vakuoläre Calciumkonzentration
°C .....	Grad Celsius
μ .....	Mikro-
A.....	Ampere / Fläche
<i>A. thaliana</i> .....	<i>Arabidopsis thaliana</i>



ABA.....	Abscisinsäure (engl.:abscisic acid)
Abb.....	Abbildung
ADP .....	Adenosindiphosphat
Ag.....	Silber
ATP.....	Adenosintriphosphat
Ba <sup>2+</sup> .....	Bariumion
Bp.....	Basenpaar(e)
bzw.....	beziehungsweise
ca.....	circa
Ca <sup>2+</sup> .....	Calciumion
CaCl <sub>2</sub> .....	Calciumchlorid
CaM .....	Calmodulin
cDNA.....	engl.: complementary deoxyribonucleic acid
Cl <sup>-</sup> .....	Chloridionen
C <sub>m</sub> .....	Membrankapazität
CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
ConA.....	Concanamycin A
Cs <sup>+</sup> .....	Cäsiumion
Da.....	Dalton
DAG.....	Diacylglycerol
DEPC .....	Diethylpyrocarbonat
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTPs .....	desoxy Nukleosidtriphosphate
DTT.....	Dithiothreitol
e <sup>-</sup> .....	Elektron
EDTA.....	engl.: ethylenediaminetetraacetic acid
EDX .....	engl.: energy dispersive X-ray)
EGTA.....	engl.: ethyleneglycoltetraacetic acid
E <sub>Kalium</sub> .....	Nernstpotential für Kalium
engl.....	Englisch

F .....	Faradaykonstante / Farad
<i>fou2</i> .....	engl.: fatty acid oxygenation upregulated 2
fwd .....	engl.: forward (vorwärts, für 5'-3'-Primer)
γ .....	Einzelkanalleitfähigkeit
g .....	Erdbeschleunigung / Gramm
G .....	Giga- / Leitfähigkeit
GRF .....	engl.: general regulating factors
h .....	Stunde
H <sup>+</sup> .....	Protonen
H <sub>2</sub> O .....	Wasser
HCl .....	Salzsäure
Hepes .....	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
Hz .....	Herz
I .....	Strom
i .....	Stromamplitude
IP <sub>3</sub> .....	Inositol-1,4,5-Triphosphat
I <sub>tail</sub> .....	Tailstrom
JA .....	Jasmonsäure (engl.: jasmonic acid)
k .....	Kilo-
K <sup>+</sup> .....	Kaliumionen
Kap .....	Kapitel
KCL .....	Kaliumchlorid
kg .....	Kilogramm
kHz .....	Kiloherz
K <sub>m</sub> .....	Michaeliskonstante
l .....	Liter
Li <sup>+</sup> .....	Lithiumion
LJP .....	Diffusionspotential (engl.: liquid junction potential)
lx .....	Lux
m .....	Milli- / Meter / Geradensteigung

M.....	Molar / Mega-
MES .....	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mg <sup>2+</sup> .....	Magnesiumionen
MgCl <sub>2</sub> .....	Magnesiumchlorid
min .....	Minute
ml .....	Milliliter
mm .....	Millimeter
mM.....	Millimolar
mosmol.....	Milliosmol
mRNA .....	Boten Ribonukleinsäure (engl.: messenger ribonucleic acid)
mV .....	Millivolt
MZ .....	Mesophyllzelle
n .....	Nano-
nA.....	Nanoampere
Na <sup>+</sup> .....	Natriumion
NaCl .....	Natriumchlorid
NH <sup>4+</sup> .....	Ammoniumion
nm .....	Nanometer
NO <sup>3-</sup> .....	Nitrat
Oligo-dT.....	Oligo Deoxythymidin
p .....	Piko-
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pF .....	Pikofarad
PI.....	Phosphatidylinositol
PIP <sub>2</sub> .....	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
P <sub>o</sub> .....	Offenwahrscheinlichkeit
PP <sub>i</sub> .....	Pyrophosphat
pS .....	Pikosiemens
R.....	Gaskonstante / Widerstand
Rb <sup>+</sup> .....	Rubidiumion

---

rev .....	engl.: reverse (rückwärts, für 3'-5'-Primer)
RNA .....	engl.: Ribonucleic acid
RT .....	Reverse Transkription / Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
RT-PCR .....	(engl.: real-time-polymerase chain reaction)
s .....	Sekunde
S .....	Siemens
Suc .....	Saccharose
SV .....	engl.: slow vacuolar
SZ .....	Schließzelle
T .....	Temperatur
TBE .....	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tbl .....	Tabelle
TPC .....	engl.: Two-Pore-Channel
Tris .....	Trishydroxymethylaminomethan
U .....	Umdrehungen / Spannung
$U_{rev}$ .....	Umkehrpotential
UV .....	ultraviolett
V .....	Volt
vgl. ....	vergleiche
WT .....	Wildtyp
z. B. ....	zum Beispiel

## 9.4 Lebenslauf



## 9.5 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen die mich unterstützt haben und zum Gelingen und erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen danke ich:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl der Botanik I anzufertigen, für die fortwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht und die vielen Ideen, die gute Arbeitsatmosphäre am Institut und das entgegengebrachte Vertrauen.

Prof. Dr. Irene Marten für die Einweisung in die *Patch-Clamp*-Technik, die aufgebrachte Geduld und Bereitschaft bei jeglichen Fragen und Problemen weiterzuhelfen, für die Unterstützung bei Präsentationen und die gute Betreuung. Vielen Dank fürs unermüdliche Korrekturlesen.

Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für die sofortige Bereitschaft, sich als Zweitgutachter dieser Dissertation zur Verfügung zu stellen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

Dr. Dirk Becker für viele Anregungen und seine Hilfsbereitschaft.

Allen anderen fleißigen Korrekturlesern dieser Arbeit.

Der Werkstatt für die stetigen Bemühungen den Messplatz bei Problemen zu optimieren und am Laufen zu halten, Joachim und allen Gärtnern den Überblick bei allen Mutanten zu bewahren und unzählige von Pflanzen anzuziehen, allen TA's für die Beratung bei molekularbiologischen Fragen und den vielen Bestellungen von Arbeitsmaterialien, Caroline für die unermüdliche Suche nach Literatur und für viele nette Kaffeestunden, Matze und Karin aus dem Sekretariat für das Erledigen der Bürokratie, Christian für das sofortige Einspringen bei jeglichen Computerproblemen, der Putzmannschaft.

Meinen ehemaligen Kollegen am Institut für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen schöne Stunden.

Hubert, für seine Freundschaft und Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern, die mich immer unterstützt, mich in meinen Vorhaben bekräftigt haben und mich meinen eigenen Weg gehen ließen.

Meinem Mann Axel für seine Unterstützung, seine Geduld, sein Vertrauen und seine Liebe.

Meiner Miezi und meinem Kater für endlose Kuschelstunden.

Dem besten Schwiegervater der Welt.

Meinem Bruder, Karin, Martha und Marlene.

Herrn Dr. Rüffer, Micha und dem kompletten Enterosan<sup>®</sup>-Team für das super Arbeitsklima.

## 9.6 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. Ich habe bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden weder weitere akademische Grade erworben, noch zu erwerben versucht.

Nüdlingen,

.....

Diana Krause