

Funktionale Charakterisierung pflanzlicher Kaliumkanäle in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe
genehmigte

Dissertation

von

Diplom-Biologe

Christian Eing

aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Holger Puchta
Referent: PD Dr. Adam Bertl
Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Thiel
Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2006

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die gemäß Wortlaut oder Inhalt aus anderen Arbeiten entnommen sind, wurden durch Angabe der Quelle als Entlehnungen kenntlich gemacht.

Karlsruhe, im Januar 2006

Christian Eing

Diese Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität Karlsruhe, Lehrstuhl 1, unter der Leitung von PD Dr. Adam Bertl im Zeitraum von Juni 2003 bis Januar 2006 angefertigt.

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn PD Dr. Adam Bertl für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Herrn Dr. Hermann Bihler danke ich für die zahlreichen Tipps zur Elektrophysiologie und zur Auswertung der Daten.

Bei Frau Dr. Anja Roller möchte ich mich für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und zahlreiche Anregungen zu meiner Arbeit bedanken.

Meiner Frau Bianka danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis, besonders während der Schlussphase dieser Arbeit.

Mein Dank für die finanzielle Unterstützung geht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Publikationen

Bihler H.*, Eing C.*, Hebeisen S., Roller A., Czempinski K., Bertl A. TPK1 is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar cation channel. *Plant Physiol.* 2005 139(1):417-24.

Roller, A., Bihler, H., Slayman, C., Eing, C., Bertl, A., Natura, G. 2005. In the Yeast Potassium Channel, Tok1p, the external Ring of Aspartate Residues Modulates both Gating and Conductance. *Pflügers Arch.* 2005 451(2):362-70

*joint first author

Kongressmitteilungen

Eing, C., Roller, A., Bihler, H., Bertl, A. Functional expression and characterization of Arabidopsis tandem-pore K⁺ channels in yeast. *Handbuch zur Jahrestagung der deutschen botanischen Gesellschaft 2004*, S.99

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Biomembranen	1
1.2 Membrantransport	2
1.2.1 Transportproteine / Translokatoren	2
1.2.1.1 Aktiver Transport.....	2
1.2.1.2 Passiver Transport	3
1.3 Ionenkanäle.....	4
1.3.1 Typische Charakteristika von Ionenkanälen.....	4
1.3.2 Makroskopische Strom-Spannungs-Beziehung.....	7
1.3.3 Zeitabhängiges Verhalten von Ionenkanälen (Kinetik)	9
1.3.4 Struktur spannungsabhängiger Ionenkanäle.....	11
1.3.5 Kaliumkanäle.....	12
1.4 Kaliumhaushalt und beteiligte Systeme.....	14
1.4.1 Kaliumtransport in der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
1.4.2 Kaliumkanäle in <i>Arabidopsis</i>	17
1.4.2.1 TPK-Kanäle (Two-Pore-K ⁺ -Channel)	18
1.5 Die pflanzliche Vakuole	20
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Verwendete Organismen, Plasmide und Oligonukleotide.....	23
2.1.1 Verwendete Ausgangsstämme von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.1.2 Verwendete <i>Escherichia coli</i>	23
2.1.3 Verwendete Linien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.1.4 Verwendete Plasmide	24
2.1.5 Synthetische Oligonukleotide	24
2.1.6 Nomenklatur von Genen und Proteinen	25
2.2 Medien.....	25
2.2.1 Kulturmedien	25
2.2.2 Lösungen zur Plasmidisolierung aus Hefezellen.....	27
2.2.3 Lösungen zur Präparation kompetenter Hefezellen und zur Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA	27
2.2.4 Lösungen zur Protoplastierung von Hefe	28

2.2.5	Lösungen zur Elektrophysiologie an Hefeprotoplasten.....	28
2.2.6	Lösungen zur Elektrophysiologie an Hefevakuolen.....	28
2.2.7	Lösungen zur Elektrophysiologie an Arabidopsisvakuolen.....	29
2.2.8	Lösungen zur Bestimmung der Öffnungsweite der Stomata	29
2.2.9	Lösungen zur Bestimmung der Keimungsrate.....	29
2.2.10	Sonstige Lösungen.....	30
2.3	Molekularbiologische Methoden	31
2.3.1	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> (DH5 α) mit CaCl ₂	31
2.3.2	Präparation kompetenter Hefezellen nach der LiAc – Methode.....	31
2.3.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	32
2.3.4	Transformation von Hefezellen nach der LiAc - Methode.....	33
2.3.5	Plasmidisolierung aus Hefe	34
2.3.6	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	34
2.3.7	Agarosegele	34
2.3.8	Klonierung der Gene <i>TPK1</i> , <i>KCO3</i> und <i>TPK4</i> in pFI61	35
2.4	Zellbiologische Methoden.....	38
2.4.1	Wachstumstests: Tropftest	38
2.4.2	Wachstumstests: Messung der optischen Dichte (OD ₆₀₀)	38
2.4.3	Hemmhoftest (Haloassay)	39
2.4.4	Bestimmung der Öffnungsweite der Stomata von <i>A. thaliana</i>	39
2.4.5	Bestimmung der Keimungsrate von <i>A. thaliana</i>	39
2.5	Überprüfung der Deletionsmutation in der Arabidopsislinie <i>tpk1</i> Δ (<i>KCO1-2</i>)..	40
2.6	Elektrophysiologie / Patch–Clamp–Technik.....	41
2.6.1	Elektrophysiologie an Hefeprotoplasten	41
2.6.1.1	Präparation von Hefeprotoplasten.....	42
2.6.1.2	Herstellung von Glasmikropipetten.....	42
2.6.1.3	Aufbau des Messplatzes	42
2.6.1.4	Sealformation und Ganzzelleableitung.....	43
2.6.2	Elektrophysiologie an Hefevakuolen.....	44
2.6.3	Elektrophysiologie an Arabidopsisvakuolen	44
2.6.3.1	Präparation von Protoplasten aus Arabidopsis-Mesophyllzellen.....	44
2.6.3.2	Freisetzung der Vakuolen aus Arabidopsisprotoplasten	45
2.6.4	Simulation elektrophysiologischer Experimente	45
2.6.5	Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit eines Ionenkanals.....	46

3.	Ergebnisse.....	49
3.1	Das Expressionssystem Hefe.....	49
3.2	Funktionale Expression von Kanälen der TPK-Familie in Hefe	50
3.2.1	Lokalisation von Tpk1p im Tonoplasten von Hefe	55
3.3	Funktionale Charakterisierung der TPK-Kanäle	56
3.3.1	Elektrophysiologische Identifizierung von Kco3p im Plasmalemma	56
3.3.2	Funktionale Charakterisierung von Kco3p durch Wachstumsexperimente ..	57
3.3.3	Elektrophysiologische Identifizierung von Tpk4p im Plasmalemma	63
3.3.4	Funktionale Charakterisierung von Tpk4p durch Wachstumsexperimente...	65
3.3.5	Funktionale Charakterisierung von Tpk1p im Tonoplast von Hefe	70
3.3.5.1	Elektrische Eigenschaften des Hefetonoplasten	70
3.3.5.2	<i>TPK1</i> exprimiert funktional im Tonoplast von Hefe	71
3.3.5.3	Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit von Tpk1p.....	73
3.3.5.4	Calciumabhängigkeit von Tpk1p	74
3.3.5.5	Selektivität von Tpk1p	75
3.3.5.6	Modulation von Tpk1p durch 14-3-3 Proteine	77
3.4	Kanalaktivität im Tonoplast von <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
3.4.1	Calciumabhängigkeit des SV-Kanals	82
3.4.2	Selektivität des SV-Kanals	83
3.5	Kanalaktivität im Tonoplast von <i>tpc1</i> -Deletionsmutanten	84
3.6	Kanalaktivität im Tonoplast von <i>tpk1</i> -Deletionsmutanten	87
3.7	Stomatäre Öffnungsweite verschiedener <i>Arabidopsis</i> -Linien	88
3.8	Bestimmung der Keimungsrate verschiedener <i>Arabidopsis</i> -Linien	89
4.	Diskussion	91
4.1	Funktionale Expression und Charakterisierung von <i>KCO3</i> in Hefe	91
4.2	Funktionale Expression und Charakterisierung von <i>TPK4</i> in Hefe	92
4.3	Ist Tpk1p eine Komponente des SV-Kanals?	94
4.4	Kodiert <i>TPC1</i> für den SV-Kanal?.....	96
4.5	Aktivität von Tpk1p in <i>Arabidopsis</i>	98
5.	Zusammenfassung.....	101
6.	Literatur	103
7.	Anhang	107

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromol / Liter
μs	Mikrosekunden (10^{-6} Sekunden)
A	Ampere
ADP	Adenosin 5'-Diphosphat
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
bidest	zweifach destilliert
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
dpi	Dots per inch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether) N,N,N',N'-Tetraessigsäure
g_x	Leitfähigkeit (S), $g_x = 1/R_x$, Subskript o = Offenkanal
$G\Omega$	Gigaohm (10^9 Ohm)
Hz	Hertz
i_x	Einzelkanalstrom (A), Subskript: o = Offenkanal; mean = gemittelt
I_x	Strom (A), Subskript: wc = „whole cell“ (ganze Zelle); mean = gemittelt
kB	Kilobasen
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LiAc	Lithiumacetat
$M\Omega$	Mega Ohm ($10^6\Omega$)
MAT	Mating-Type
β -ME	β -Mercapto-Ethanol
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
PEG	Polyethylenglycol
P_x	Zustandswahrscheinlichkeit, Subskript: o = offen, c = geschlossen (closed)
Ψ_x	elektrisches Potential, Subskript: o = außen (out), i = innen
R_x	elektrischer Widerstand (Ω), Subskript: o = offener Kanal
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
V_m	Membranspannung

1. Einleitung

1.1 Biomembranen

Alle lebenden Zellen sind von einer biologischen Membran umgeben. Zusätzlich besitzen eukaryotische Zellen zahlreiche interne Membranen. Die Aufgabe dieser Membranen ist nicht nur die Abgrenzung des Zellinneren vom extrazellulären Milieu bzw. die Aufteilung der Zelle in unterschiedliche Kompartimente. Wichtige Zellfunktionen wie Signalaufnahme und Signalweiterleitung, Kontakt zwischen den Zellen, Energiekonservierung, Transport oder Motilität sind zu wesentlichen Teilen an das Vorhandensein von Membranen gebunden (Kleinig und Sitte, 1999).

Die vielfältigen Aufgaben einer biologischen Membran erfordern eine ganz besondere molekulare Organisation. Membranen bestehen aus Proteinen und Lipiden, wobei der Anteil dieser beiden Komponenten sehr stark zwischen den unterschiedlichen Membranen variiert. Zum Beispiel besitzt die Membran der Schwannschen Zellen ein Gewichtsverhältnis Protein/Lipid von 0,25, die innere Membran der Mitochondrien ein Verhältnis von 5,0. Die aktuelle Vorstellung von einer Biomembran beruht auf dem Fluid-Mosaic-Modell (Singer und Nicholson, 1972). Es besagt, dass das strukturelle Gerüst einer Membran aus einer flüssig-kristallinen Lipiddoppelschicht besteht, in der die eingebetteten Membranproteine lateral frei beweglich sind.

Die Lipide einer biologischen Membran treten in einer großen Vielfalt auf, besitzen jedoch eine grundlegende gemeinsame Eigenschaft: Sie bestehen aus einem lipophilen und einem hydrophilen Bereich, haben also amphipathische Eigenschaften. Der lipophile Bereich besteht aus Fettsäureresten, die über Esterbindungen mit Glycerin oder über Amidbindungen mit Sphingosin verbunden sind. Seltener sind, z.B. bei den Archaea, langkettige Alkohole an den hydrophilen Bereich gekoppelt.

Die Art und die Anzahl der Membranproteine hängt von der Funktion der jeweiligen Membran ab. Die Proteine sind die eigentlichen Träger der biologischen Funktionen der Membran. Es werden zwei Gruppen von Membranproteinen unterschieden: Periphere und integrale Membranproteine.

Die peripheren Proteine, die etwa 20% der Membranproteine ausmachen, sind nicht über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem lipophilen Bereich der Membran verbunden. Sie liegen der Membran nur auf und lassen sich recht leicht von der Membran ablösen. Ein bekanntes Beispiel ist das Cytochrom C an der inneren Mitochondrienmembran.

Integrale Membranproteine bilden starke hydrophobe Bindungen zu den Lipiden der Membran aus. Sie sind nur durch Detergenzien aus der Membran lösbar. Die integralen Teile dieser Proteine bilden eine α -Helix, die zumeist aus unpolaren Aminosäuren wie z.B. Leucin, Phenylalanin oder Valin besteht. Für eine α -Helix, die die Membran vollständig durchspannt, sind 20 – 25 Aminosäuren notwendig.

1.2 Membrantransport

Die Lipiddoppelschicht der Biomembran stellt eine etwa fünf nm starke, hydrophobe Schranke zwischen zwei wässrigen Phasen dar. Der Durchtritt wasserlöslicher und geladener Moleküle durch diese Barriere ist zumeist auf Translokatoren angewiesen. Nur sehr kleine polare Moleküle wie z.B. Wasser können frei durch die Membran diffundieren. Hydrophobe (lipophile) Moleküle (z.B. Steroidhormone) können dagegen relativ ungehindert durch die Lipidschicht gelangen.

Die Tatsache, dass nicht alle Substanzen eine Membran in gleichem Maß passieren können, bezeichnet man als selektive Permeabilität.

1.2.1 Transportproteine / Translokatoren

Biomembranen enthalten zahlreiche Transportproteine, die ihr Substrat nach sehr unterschiedlichen Mechanismen transportieren. Sind bei einem Transportvorgang solche Translokatoren beteiligt, spricht man von spezifischem Transport. Er kann von der freien Diffusion anhand verschiedener Kriterien abgegrenzt werden:

1. er ist substratspezifisch
2. er ist saturierbar
3. er ist häufig hemmbar.

Ein Transportvorgang kann also mit einer enzymatischen Reaktion verglichen werden. Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Formen des spezifischen Transports: Den passiven Transport, bei dem keine Energie aufgewendet werden muss, und den aktiven Transport, der Energie benötigt.

1.2.1.1 Aktiver Transport

Der aktive Transport ist immer direkt an einen Energie liefernden Prozess gekoppelt. Ein solches System kann daher auch den Transport eines Substrates gegen einen bestehenden Konzentrationsgradienten leisten und so zur Anreicherung des Substrates beitragen.

Primär aktive Ionentransporter werden als Ionenpumpen bezeichnet. Diese können verschiedene Energiequellen nutzen. Beispiele hierfür sind die Hydrolyse von ATP (z.B. bei der H^+ -ATPase), Redox-Reaktionen (z.B. bei der Cytochromoxidase) oder Licht (z.B. beim Bacteriorhodopsin).

1.2.1.2 Passiver Transport

Carrier

Carrier sind Membranproteine, die mit ihrem Substrat einen Komplex bilden und den Transport durch die Membran ermöglichen. Die Bindung des Substrates ist je nach Zustand des Carrier-Proteins immer nur auf der einen oder auf der anderen Membranseite möglich. Der Substrattransport kann mit einer Konformationsänderung des Carriermoleküls einhergehen oder durch Translokation des Carrier-Substratkomplexes innerhalb der Membran erfolgen (Adam et al., 1995). Es werden zwei Formen des Transports durch Carrier unterschieden: Cotransport und Uniport.

Cotransport (Sekundär aktiver Transport)

Cotransporter sind Membranproteine, die den Transport eines Substrates an den Transport eines anderen Substrates koppeln. Der Transportvorgang ist nur indirekt an den Energieverbrauch gekoppelt. Hier wird die Energie aus einem bestehenden elektrochemischen Gradienten (z.B. von Na^+ - oder H^+ -Ionen), der durch primär aktiven Transport aufgebaut worden ist, genutzt, um ein anderes Substrat gegen seinen Konzentrationsgradienten zu transportieren.

Werden die beiden Substrate in dieselbe Richtung transportiert, spricht man von einem Symport, erfolgt der Transport der beiden Substrate in entgegengesetzte Richtung, so spricht man von einem Antiport.

Sowohl Symport als auch Antiport können elektrisch neutral (es wird netto keine Ladung transportiert) oder elektrogen (es wird netto Ladung transportiert) erfolgen.

Uniport

Uniporter sind Transportsysteme, die den Transport des Substrats nur entlang des elektrochemischen Gradienten ermöglichen. Diesen Transportprozess bezeichnet man auch als erleichterte Diffusion.

Eine weitere Klasse passiver Transportproteine sind die Ionenkanäle. Auf sie soll im Weiteren näher eingegangen werden.

1.3 Ionenkanäle

1.3.1 Typische Charakteristika von Ionenkanälen

Ionenkanäle sind wassergefüllte Poren, die die Membran durchspannen und im leitenden Zustand nach beiden Seiten hin offen sind. Der Zugang des Substrats an die Bindestelle ist daher im Gegensatz zum Carrier von beiden Seiten der Membran möglich. Ionenkanäle zeichnen sich durch eine sehr hohe Transportrate von 10^6 - 10^7 Ladungen pro Sekunde und eine recht geringe Dichte in der Membran von etwa 1-10 Molekülen pro μm^2 aus. Carrier oder Ionenpumpen weisen dagegen eine geringe Transportrate (10^2 - 10^4 Substratmoleküle/s) bei einer sehr hohen Dichte (10^3 - 10^5 Moleküle/ μm^2) auf.

Ein Ionenkanal kann grundsätzlich in zwei verschiedenen Konformationen, entweder offen und elektrisch leitend oder geschlossen und nicht leitend vorliegen. Abwechselndes Öffnen und Schließen, also das Schaltverhalten eines Ionenkanals, wird als Gating bezeichnet. Der reversible Übergang zwischen leitendem und nicht leitendem Zustand eines Ionenkanals offenbart sich experimentell als spontane Änderungen des gemessenen elektrischen Stroms, wie in Abbildung 1.1 am Beispiel des pflanzlichen Ionenkanals *Tpk1p* zu sehen ist. Dabei wird deutlich, dass die Zeit, die ein Ionenkanal im offenen oder geschlossenen Zustand verweilt, sehr variabel ist, während der Strom, der durch den offenen Kanal fließt, konstant ist. Dieser Strom durch den offenen Kanal wird unter symmetrischen Bedingungen durch die Leitfähigkeit ($g_o=1/R_o$) des Kanals und der anliegenden Spannung (V) bestimmt.

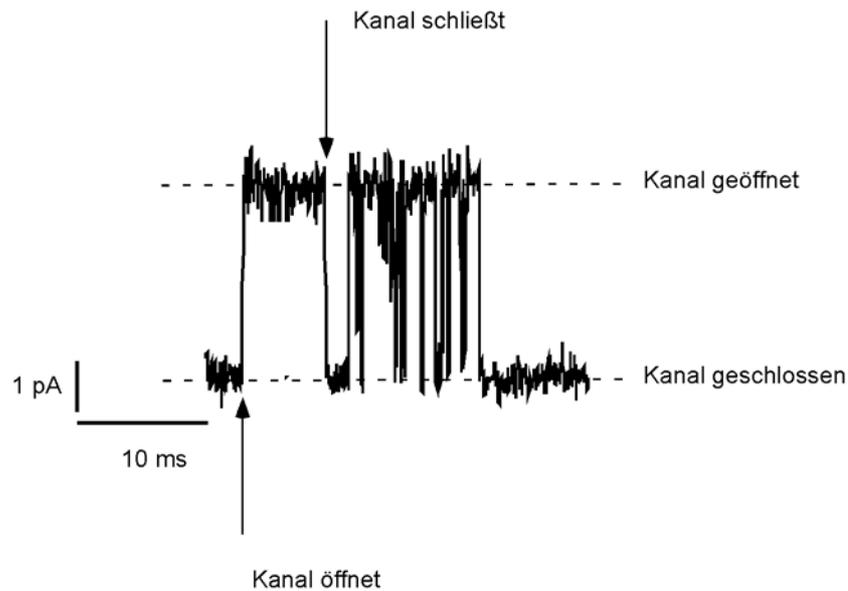


Abbildung 1.1 Einzelkanalereignisse im Tonoplast von CEN.SR36-3c-TPK1

Typische Einzelkanalereignisse verursacht durch die Aktivität von Tpk1p in Hefevakuolen. Die Membranspannung betrug 60 mV. Gemessen wurde in symmetrisch 100 mM KCl, die Badlösung enthielt zusätzlich 1 mM CaCl₂.

Das Schaltverhalten wird bestimmt durch die mittlere Lebensdauer im leitenden und nicht leitenden Zustand. Spezielle Strukturen in den Proteinen sind für den Übergang zwischen dem offenen, elektrisch leitenden, und dem geschlossenen, nicht leitenden Zustand verantwortlich. Die Lebensdauer der beiden Zustände ist abhängig von chemischen und physikalischen Faktoren. Beispiele dafür sind zyklische Nukleotide, Calcium oder Acetylcholin aber auch mechanische Reize, Licht, Temperatur oder Änderungen der Membranspannung. Die Verweildauer des Kanals im offenen und geschlossenen Zustand bestimmt die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Eine Offenwahrscheinlichkeit von 0,2 bedeutet, dass der Kanal sich im Durchschnitt während des Experimentes 20% der Zeit im offenen (also leitenden) Zustand befunden hat.

Die Triebkraft für den Transport von Ionen durch einen Kanal ist der elektrochemische Gradient, bestehend aus dem elektrischen Gradienten (elektrische Potentialdifferenz: $E_x = \Delta\Psi = \Psi_i - \Psi_o$) und dem chemischen Gradienten (Konzentrationsgradient: $\Delta C = C_o - C_i$).

Die Membranspannung, bei der sich die aus dem elektrischen Feld stammende Triebkraft und die entgegengesetzte Triebkraft aus dem Konzentrationsgradienten genau aufheben, wird als Gleichgewichtspotential bezeichnet. Es lässt sich für ein beliebiges Ion über die Nernst-Gleichung bestimmen:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

Hierbei steht E_x für das Gleichgewichtspotential in Volt, R ist die Gaskonstante ($8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T ist die absolute Temperatur (in Kelvin), z ist die Wertigkeit des Ions und F die Faraday-Konstante (96500 Cmol^{-1}). C_o ist die Konzentration des Ions auf der Außenseite der Membran, C_i ist die Konzentration auf der Innenseite der Membran.

Der Strom durch einen Kanal im offenen Zustand folgt unter symmetrischen Bedingungen näherungsweise dem Ohmschen Gesetz:

$$i_o = V_m / R_o$$

Dabei ist i_o der Strom durch einen Kanal im offenen Zustand (Offenkanalstrom), V_m ist die Membranspannung und R_o ist der Widerstand des Kanals für ein bestimmtes Ion.

In anderer Schreibweise, wobei die Leitfähigkeit des Kanals an Stelle des Widerstandes verwendet wird ($g = 1/R$), ergibt sich:

$$i_o = g_o V_m$$

Hierbei ist g_o die Leitfähigkeit des Kanals für ein bestimmtes Ion im offenen Zustand.

Nach dem Ohmschen Gesetz besteht demnach ein linearer Zusammenhang zwischen dem Offenkanalstrom i_o und der Membranspannung V_m . Dies ist aus der Simulation in Abbildung 1.2 ersichtlich.

Trägt man die Offenkanalamplituden aus Abbildung 1.2 A in einem Strom-Spannungs-Diagramm gegen die Spannung auf, ergibt sich für einen idealen Kanal unter symmetrischen Bedingungen eine Gerade (Abbildung 1.2 C). Die Steigung dieser Gerade ist die Leitfähigkeit des Kanals, sie beträgt hier ca. 50 pS. Die Spannung, bei der sich das Vorzeichen des gemessenen Stromes umkehrt, bei der also die Strom-Spannungs-Kurve die X-Achse schneidet, ist das Gleichgewichts- oder Umkehrpotential. Bei symmetrischer Ionenverteilung beträgt das Umkehrpotential 0 mV (Abbildung 1.2 A und Dreiecke in 1.2 C). Bei der im zweiten Experiment gewählten unsymmetrischen Ionenverteilung (Abbildung 1.2 B) treten auch bei -20 mV Auswärtsströme auf. Das Ionenverhältnis beträgt hier etwa 5:1, d.h. die Konzentration der beweglichen Kationen (z.B. Kalium) ist in der Zelle fünf mal größer als außerhalb. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewichtspotential auf etwa -40 mV (Abbildung 1.2 B und Dreiecke in 1.2 C).

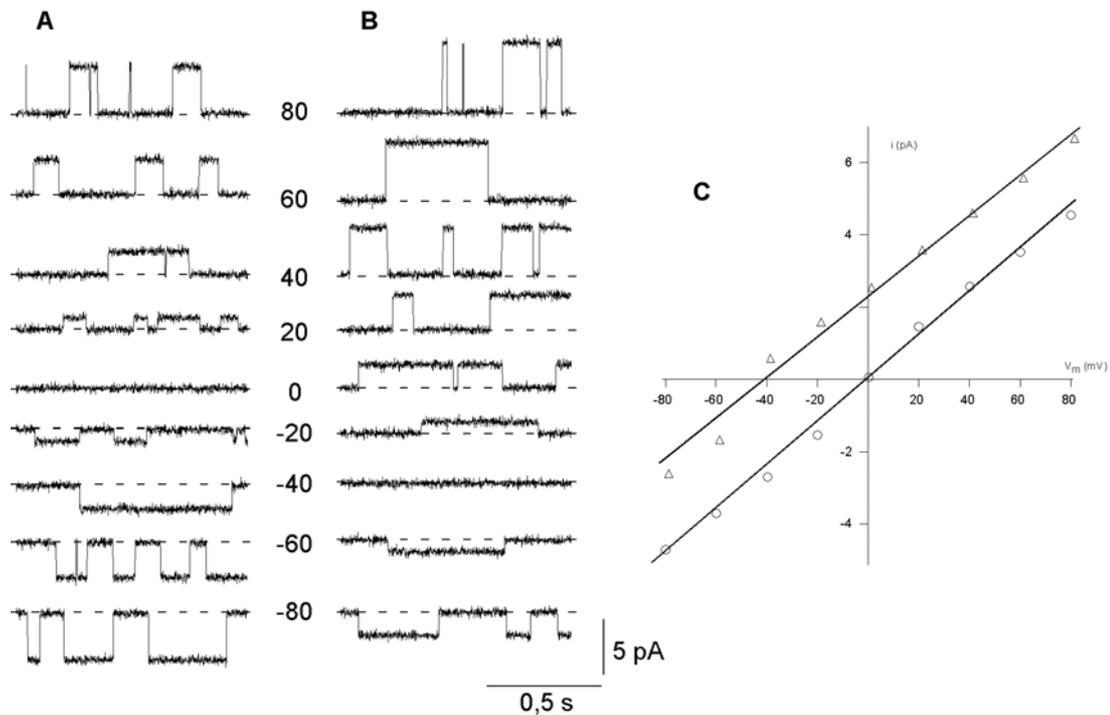


Abbildung 1.2 Herleitung der Strom-Spannungs-Beziehung für einen Einzelkanal

Die Daten wurden mit Hilfe des Simulationsprogramms Pulse-Sim (Heka, Lambrecht) gewonnen. Näheres dazu im Text und unter 2.6.4

- A Einzelkanalereignisse bei verschiedenen Membranspannungen und symmetrischem Ionenverhältnis
 B Einzelkanalereignisse bei verschiedenen Membranspannungen und nicht symmetrischem Ionenverhältnis
 C Die Darstellung der Offenkanaalamplituden aus A (Kreise) und B (Dreiecke) als Funktion der Membranspannung führt zur Strom-Spannungs-Kurve für den Offenkanalstrom .

Wie aus Abbildung 1.2 ersichtlich ist, beträgt die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals sowohl bei positiven als auch bei negativen Membranspannungen etwa 0,3 – 0,6. Die Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals ist also spannungsunabhängig. Zeigt ein Ionenkanal bei unterschiedlichen Membranspannungen jedoch unterschiedliche Offenwahrscheinlichkeiten wie in der Simulation von Abbildung 1.3 A, so spricht man von einem spannungsabhängigen Ionenkanal.

1.3.2 Makroskopische Strom-Spannungs-Beziehung

Der mittlere Strom (i_{mean}) eines einzelnen Kanals ist proportional zur Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bei der angelegten Spannung:

$$i_{\text{mean}} = g_o V_m P_o.$$

Dabei ist P_o die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bei einer bestimmten Membranspannung. Betrachtet man nun nicht nur einen einzelnen Kanal sondern einen Membranfleck mit einer Population aus n Kanälen einer Art, so ergibt sich für den Strom I_{wc} durch die gesamte Membran einer Zelle:

$$I_{\text{wc}} = i_o P_o n = i_{\text{mean}} n$$

Die makroskopische Strom-Spannungs-Kennlinie für einen Kanal ergibt sich aus dem Produkt der Strom-Spannungs-Kurve des Offenkanalstroms, der Offenwahrscheinlichkeit und der Anzahl der betrachteten Kanäle. Die Strom-Spannungs-Kurve für eine ganze Population von Kanälen unterscheidet sich von der mittleren Strom-Spannungs-Kurve eines einzelnen Kanals folglich nur durch die Größe des Stromes.

Abbildung 1.3 zeigt auf der linken Seite simulierte Einzelkanalspuren bei unterschiedlichen Haltespannungen. Rechts sind der Strom durch den offenen Kanal (B), die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (C) und der mittlere Strom durch den Kanal bzw. durch die gesamte Zellmembran (D) gegen die herrschende Membranspannung dargestellt. Bei -140 mV ist der Offenkanalstrom deutlich einwärts gerichtet, trägt also ein negatives Vorzeichen (Abbildung 1.3 A und B). Da die Offenwahrscheinlichkeit bei Spannungen negativer als -100 mV jedoch verschwindend gering ist (Abbildung 1.3 C), kann hier fast kein mittlerer und kein makroskopischer Strom beobachtet werden (Abbildung 1.3 D). Wird die Membran auf Spannungen positiver als -40 mV geklemmt, steigt die Offenwahrscheinlichkeit für die Kanäle deutlich an. Mit steigender Offenwahrscheinlichkeit nimmt auch der mittlere bzw. der makroskopische Strom zu. Da die Membranspannung dann positiver als das Gleichgewichtspotential für die beweglichen Ionen (hier -40 mV) ist, ist der Strom auswärts gerichtet (positives Vorzeichen). Bei einer Spannung von $+100$ mV und positiver nähert sich die Offenwahrscheinlichkeit asymptotisch der maximalen Offenwahrscheinlichkeit von 1,0. Der hier betrachtete Kanal zeigt eine deutliche Gleichrichtung des Stromes. Der mittlere Strom durch den Kanal ist bei negativen Membranspannungen sehr gering. Erst bei Spannungen positiver als -40 mV ist ein deutlicher Auswärtsstrom erkennbar. Kanäle mit dieser Bevorzugung von Auswärtsströmen werden als Auswärtsgleichrichter bezeichnet. Entsprechend bezeichnet man Kanäle, die eine Präferenz für Einwärtsströme zeigen, als Einwärtsgleichrichter.

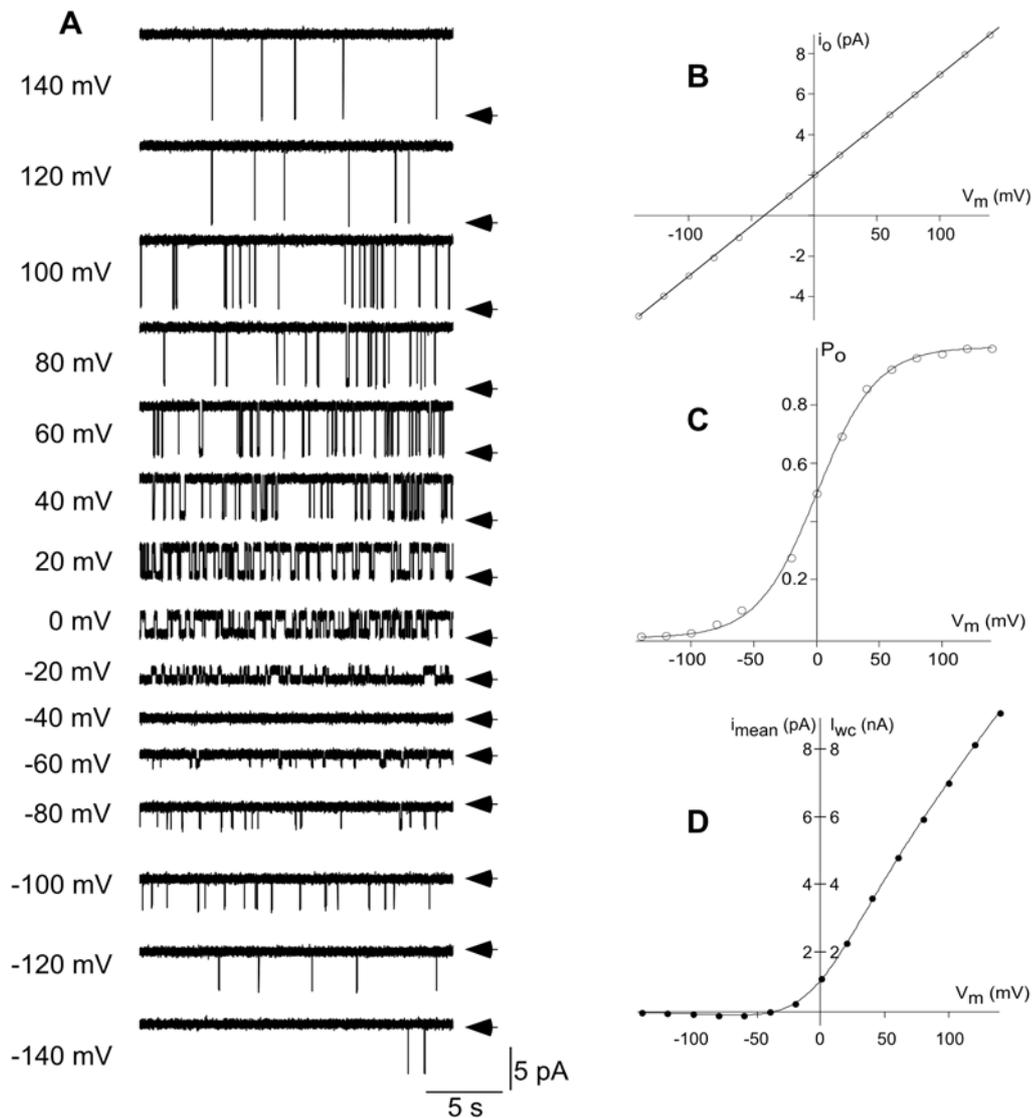


Abbildung 1.3 Herleitung der makroskopischen Strom-Spannungs-Kurve

Die Daten wurden mit Hilfe des Simulationsprogramms Pulse-Sim (Heka, Lambrecht) gewonnen. Erklärung im Text.

A Stromspuren bei unterschiedlichen Haltespannungen. Die Pfeile symbolisieren das Niveau, bei dem alle Kanäle geschlossen sind.

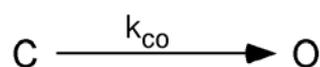
B Strom-Spannungs-Kurve des Offenkanalstroms

C Offenwahrscheinlichkeit

D Strom-Spannungs-Kurve für den mittleren Strom (i_{mean}) und für den Strom durch eine Population von 1000 Kanälen, z.B. in einem Whole-Cell-Experiment (I_{wc}).

1.3.3 Zeitabhängiges Verhalten von Ionenkanälen (Kinetik)

Im einfachsten Fall liegt ein Ionenkanal in zwei diskreten Zuständen vor: geschlossen (c) oder offen (o).



Der Übergang vom geschlossenen in den offenen Zustand wird durch die Geschwindigkeitskonstante k_{co} beschrieben.

Unter der Annahme, dass sich der Kanal zum Zeitpunkt $t = 0$ im geschlossenen Zustand (c) befindet, folgt der Zerfall des Zustands (c) einer Exponentialfunktion. Bei einem spannungsabhängigen Kanal, wie z.B. in der Simulation zu Abbildung 1.4, ist der Reiz, der den Zerfall des Zustands (c) auslöst, eine Änderung der Membranspannung. Betrachtet man einen Kanal zu einem bestimmten Zeitpunkt t nach der Änderung der Membranspannung, so gilt für die Wahrscheinlichkeit, dass der Kanal in diesem Moment geschlossen ist, folgende Beziehung:

$$P_c(t) = e^{-k_{co}t}.$$

Für die Offenwahrscheinlichkeit P_o zum Zeitpunkt t ergibt sich damit

$$P_o(t) = 1 - P_c(t) = 1 - e^{-k_{co}t}.$$

Für einen einzelnen Kanal ist nicht präzise vorhersagbar, wann der Übergang vom geschlossenen in den offenen Zustand erfolgt. Allerdings wird in der Simulation zu Abbildung 1.4 A deutlich, dass bereits unmittelbar nach Änderung der Membranspannung (t_0) die ersten Kanäle öffnen. Nach 200 ms (t_1) befinden sich bereits 4 Kanäle im leitenden Zustand, nach 0,8 s (t_2) sind alle sechs betrachteten Kanäle offen. Dieses zeitabhängige Verhalten wird als Kinetik des Kanals bezeichnet.

Betrachtet man eine Population von 10 Kanälen (Abbildung 1.4 B), so ist der allmähliche Übergang der Kanäle in den offenen Zustand als treppenförmiger Anstieg des Stromes zu erkennen. Vergrößert man die betrachtete Kanalpopulation auf 100 oder 1000 Kanäle, so glättet sich der stufenweise Anstieg des Stroms. Nach ca. 1 s erreicht in Abbildung 1.4 B der Strom nahezu einen konstanten Wert. In Abbildung 1.4 A wird deutlich, dass die Kanäle nach der Änderung der Membranspannung alle nach einer gewissen Zeit vom geschlossenen in den offenen Zustand übergehen. Die Kanäle wechseln aber dennoch immer wieder in den geschlossenen Zustand zurück. Die Änderung der Membranspannung bewirkt also kein fixes „Umschalten“ des Kanals von geschlossen nach offen sondern erhöht nur die Verweildauer im offenen Zustand (die Offenwahrscheinlichkeit). So stellt sich nach einer gewissen Aktivierungszeit ein Gleichgewicht zwischen der Hin- und der Rückreaktion ein, was dadurch deutlich wird, dass der sich einstellende Gleichgewichtstrom konstant bleibt (Abbildung 1.4 B).

Dieser Gleichgewichtszustand wird je nach Kanal unterschiedlich schnell erreicht. Viele Kanäle besitzen eine charakteristische Kinetik, durch die sie im Experiment leicht identifizierbar sind.

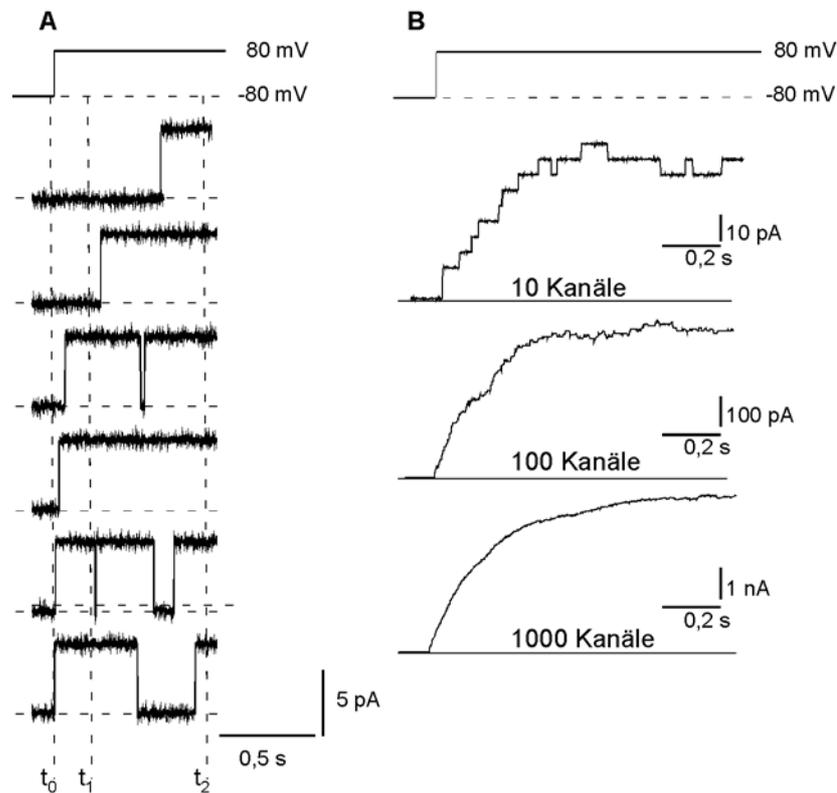
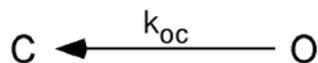


Abbildung 1.4 Simulation zur Kinetik von Ionenkanälen

A Reaktionen eines spannungsabhängigen Kanals auf eine Depolarisierung von -80 mV auf $+80$ mV. t_0 = Zeitpunkt der Änderung der Membranspannung, $t_1 = 0,2$ s nach Spannungsänderung, $t_2 = 0,8$ s nach Spannungsänderung

B Summierung der Reaktionen unterschiedlich vieler Einzelkanäle aus A auf die Depolarisierung. Die Daten wurden mit Hilfe des Simulationsprogramms Pulse-Sim (Heka, Lambrecht) gewonnen.

Wird auch die Rückreaktion (siehe spontane Schließungen in Abbildung 1.4 A, Spur 3, 5 und 6)



berücksichtigt, dann ergibt sich für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kanal zum Zeitpunkt t nach Änderung der Membranspannung geschlossen ist:

$$P_c(t) = e^{-(k_{co} + k_{oc})t}.$$

Die Offenwahrscheinlichkeit zum Zeitpunkt t lässt sich dann errechnen über:

$$P_o(t) = 1 - e^{-(k_{co} + k_{oc})t}.$$

1.3.4 Struktur spannungsabhängiger Ionenkanäle

Ionenkanäle, deren Offenwahrscheinlichkeit von der Membranspannung abhängt, werden als spannungsabhängige Kanäle bezeichnet. Sie sind unter anderem an der Entstehung des Aktionspotentials in Neuronen beteiligt. Ein typischer Vertreter spannungsabhängiger Ionenkanäle ist der Shakerkanal aus *Drosophila*, der aus vier

1. Einleitung

Untereinheiten mit je sechs Transmembransegmenten (S1-S6) besteht und eine lange Schleife hydrophober Aminosäuren zwischen S5 und S6 aufweist. Das Transmembransegment S4 besitzt eine charakteristische Anhäufung positiv geladener Aminosäuren und scheint die Aufgabe des Spannungssensors zu übernehmen. Von der langen hydrophoben Kette zwischen S5 und S6 wird angenommen, dass diese die zentrale Pore auskleidet und als Selektivitätsfilter fungiert (Fox & Guerinot, 1998). Die Untereinheit des Shaker-Kanals (6TM-1P) kann als grundlegender Baustein für viele Ionenkanäle gelten. Natrium- und Calciumkanäle bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette mit 24 Transmembrandomänen, die aus 4 Wiederholungen einer Shaker-Kanal-Untereinheit aufgebaut ist (Abbildung 1.5).

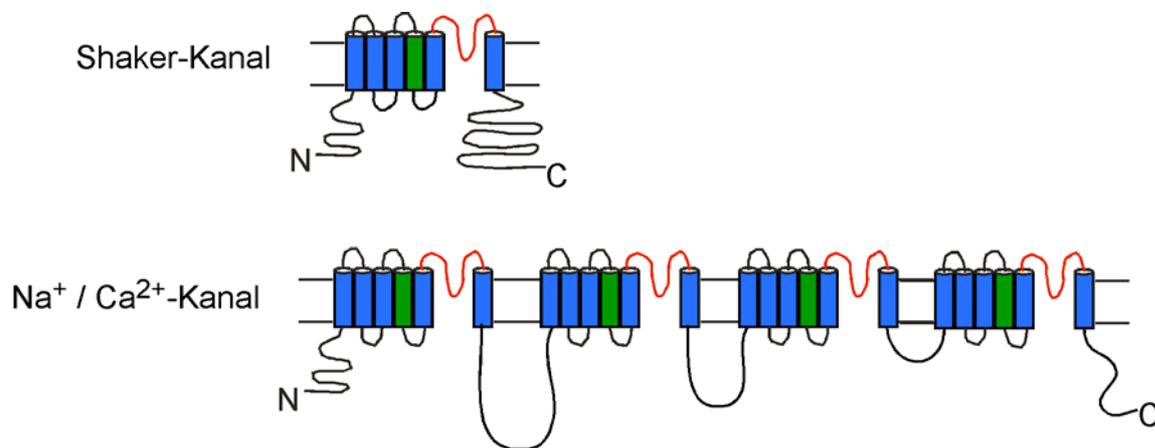


Abbildung 1.5 Der Shaker-Kanal als Grundbaustein von Natrium- und Calciumkanälen

Schematische Darstellung einer Untereinheit des Shaker-Kanals und eines Natrium- oder Calciumkanals. Der Spannungssensor wird als grünes Rechteck, die Porenloops als rote Schleifen dargestellt. N und C symbolisieren das aminotermiale bzw. das carboxyterminale Ende des Proteins. Sie befinden sich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran.

1.3.5 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle zeigen eine hohe Selektivität für Kalium gegenüber anderen Kationen. Die Permeabilität für K^+ ist typischerweise etwa 100 mal größer als für Na^+ . Diese Selektivität wird bestimmt durch den Aufbau der Kanalpore, die von vier sogenannten Porenloops ausgekleidet wird. Ein funktionaler Kanal ist entweder ein Tetramer aus vier α -Untereinheiten mit je einem Porenloop pro Untereinheit oder ein Dimer aus zwei Untereinheiten mit je zwei Porenloops pro Untereinheit (Abbildung 1.6). Die Untereinheiten besitzen im Porenloop die für Kaliumkanäle charakteristische Sequenz aus neun Aminosäuren (TXXTXG(Y/F)GD, Abbildung 1.7). Diese stark konservierte

Sequenz wird für die hohe Selektivität der Kaliumkanäle verantwortlich gemacht (Heginbotham et al., 1994). Sie findet sich sowohl in Kanälen vom Shaker-Typ, beim K_{ir} -Typ (2TM-1P) und auch bei den TPK-Kanälen, die über zwei Porenloops pro Untereinheit verfügen (4TM-2P).

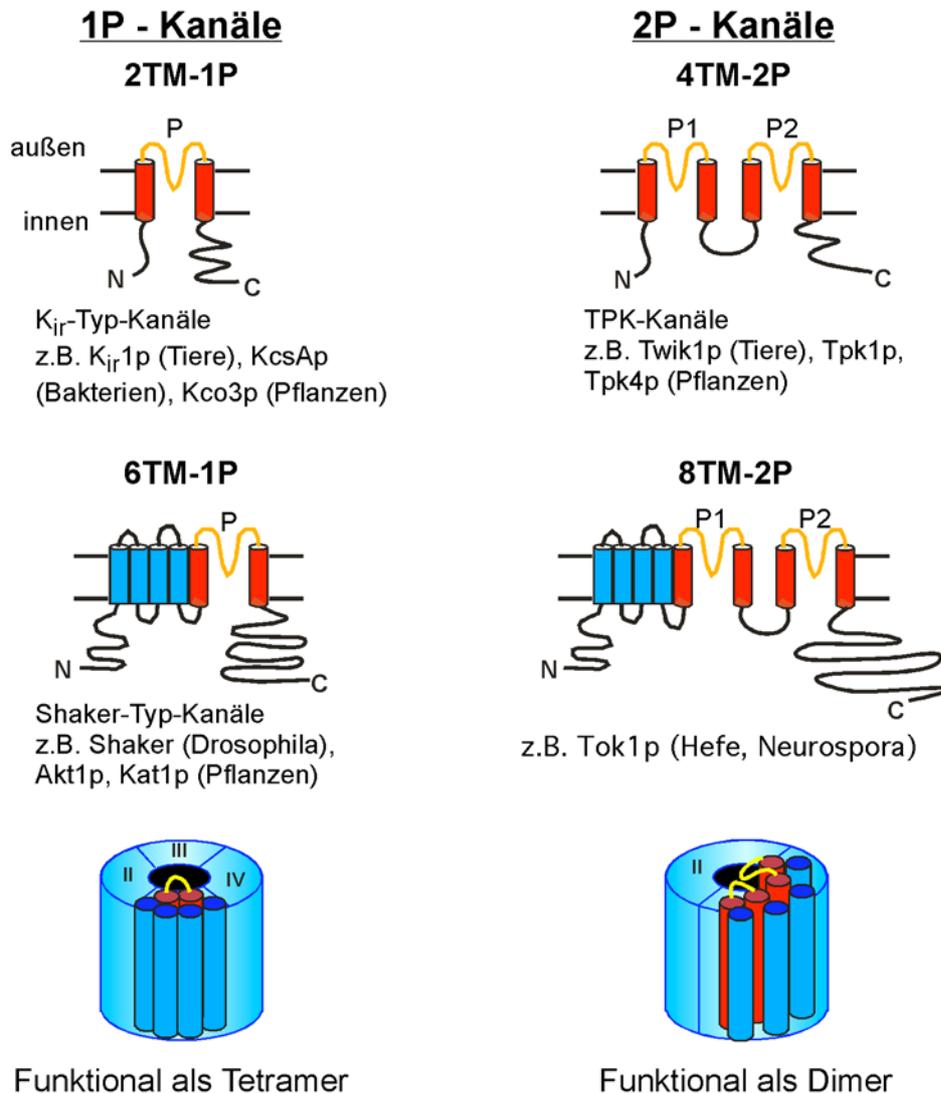


Abbildung 1.6 Strukturmerkmale spannungsabhängiger Kaliumkanäle

Schematisch dargestellt ist jeweils die Topologie einer kanalbildenden Untereinheit von Kaliumkanälen, sowie im unteren Teil der Abbildung der Aufbau als Tetramer (links) bzw. als Dimer (rechts). Die Porenloops (P) sind orange dargestellt.

Der in der Hefe gefundene auswärtsgerichtete Kaliumkanal Tok1p besitzt - wie auch die TPK-Kanäle - zwei Porenloops (8TM-2P). Die aus 8 Transmembrandomänen bestehende Struktur erinnert an einen Kaliumkanal der Shaker-Familie kombiniert mit der Untereinheit eines K_{ir} -Typ-Kanals (Bertl et al., 1998a).

Akt1p	RYVTSMYWSIT TLTTGYGDLHPVNTK
KcsAp	RYVTALYWSIT TLTTGYGDFHAENPR
Shaker	SIPDAFWWAVV TKTTVGYGDMTPVGFW
Tpk1p-P1	GVVDALYFCIV TMTTVGYGDLVPNSSA
Tpk1p-P2	PVISAFYCVCS TVTTLGYGDKSFNSEA
Tpk4p-P1	LFVDAFYFSIV TFSTTVGYGDIVPSTST
Tpk4p-P2	DWLDSVYLSVISV TTVGYGDKTFKTVE
Kco3p	GWLDSFCFSVMMV TTVGFGDRAFNTWL

Abbildung 1.7 Porenregion verschiedener Kaliumkanäle

Sequenz-Alignment der Porenregion verschiedener Kaliumkanäle. Die Kaliumkanal-Signatursequenz (Heginbotham et al., 1994) ist rot hervorgehoben. P1 bezeichnet den N-terminalen Porenloop, P2 steht für den C-terminalen Porenloop.

1.4 Kaliumhaushalt und beteiligte Systeme

Kalium ist das vorherrschende Kation im zellulären Milieu der meisten pro- und eukaryotischen Zellen. Kaliumionen spielen eine wichtige Rolle bei vielen zellulären Prozessen wie Proteinsynthese, Osmoregulation, Enzymfunktion usw. und sind deshalb für das Zellwachstum unentbehrlich. Eine starke Abnahme der intrazellulären K^+ -Konzentration hat schädigende Auswirkungen auf die Zelle. Bei einem sehr geringen Angebot an K^+ -Ionen im externen Medium muss ein gewisser Anteil des normalen K^+ -Gehalts durch andere Kationen ersetzt werden, um zumindest die elektrische Neutralität zu gewährleisten.

Natriumionen können bis zu einem gewissen Grad die Funktion von Kaliumionen in der Zelle übernehmen. Unter starkem Kaliummangel kann in Gegenwart von Natrium eine Wachstumsförderung auftreten, ab einem bestimmten Na^+K^+ -Verhältnis überwiegt jedoch die toxische Wirkung von Natrium (Rodríguez-Navarro, 2000).

Die meisten Zellen erhalten intrazellulär eine deutlich über der Umgebung liegende Kaliumkonzentration aufrecht und müssen demnach in der Lage sein, K^+ entgegen dem chemischen Gradienten in die Zelle zu transportieren.

In tierischen Zellen ist die Kaliumaufnahme im wesentlichen ein primär aktiver Prozess, der durch die Na^+/K^+ -ATPase bewerkstelligt wird. Diese Na^+/K^+ -ATPase nutzt die aus der Hydrolyse von ATP gewonnene Energie, um Na^+ -Ionen aus der Zelle zu exportieren und K^+ -Ionen in die Zelle aufzunehmen.

Im Gegensatz zu tierischen Zellen müssen sich Pflanzen, Pilze und Bakterien an große Schwankungen im extrazellulären Kaliumangebot anpassen können. Die zellulären Mechanismen des K^+ -Transports über die Plasmamembran sind daher komplex. Es sind verschiedene hoch- und niederaffine Transportsysteme beteiligt.

Die Triebkraft für die Aufnahme von K^+ -Ionen (und anderen Substanzen) liefert hier eine H^+ -ATPase im Plasmalemma (z.B. Pma1p bei Hefe). Diese H^+ -ATPase verwendet die Energie aus der Hydrolyse von ATP, um Protonen aus der Zelle zu exportieren. Die Folge dieser Aktivität ist der Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über der Plasmamembran. Der pH-Unterschied zwischen Cytoplasma und dem extrazellulären Raum beträgt etwa 2 pH-Einheiten. Untrennbar mit dem Aufbau des Protonengradienten (Ladungstransport) verbunden ist der Aufbau einer elektrischen Potentialdifferenz über der Plasmamembran. Diese elektrische Potentialdifferenz erreicht bei Pflanzen und Pilzen durchschnittlich Werte um ca. -120 bis -240 mV (innen negativ).

Die Aufnahme von Kalium und anderen Ionen kann dann sowohl passiv (über Ionenkanäle) als auch sekundär aktiv (z.B. gekoppelt an einen H^+ -Import) erfolgen. Sekundär aktiv kann Kalium bis zu 6 Größenordnungen akkumuliert werden. Eine elektrische Potentialdifferenz von -240 mV würde alleine bereits eine Akkumulierung von Kalium um den Faktor 10^4 ermöglichen. Zusätzlich kann beim H^+ -Cotransport jedoch noch der chemische Gradient der Protonen für die Kaliumaufnahme genutzt werden.

1.4.1 Kaliumtransport in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefe *S. cerevisiae* wird nicht erst seit der vollständigen Sequenzierung ihres Genoms (1996) in der Zell- und Molekularbiologie häufig als eukaryotischer Modellorganismus eingesetzt. Die relativ einfache genetische Manipulation macht *Saccharomyces cerevisiae* auch zu einem beliebten Modellsystem zur Expression und Untersuchung verschiedener eukaryotischer Gene.

Die Bäckerhefe, die schon seit dem Altertum zur Bereitung von Lebensmitteln wie Brot und Bier verwendet wird, ist ein einzelliger Pilz aus der Abteilung der Eumycota, Unterabteilung Ascomyceten, Klasse Hemiascomyceten, Ordnung Endomycetales, Familie Saccharomycetaceae (Webster, 1983).

Hefen sind heterotrophe, fakultativ anaerobe Mikroorganismen, die sich durch Sprossung vegetativer Zellen vermehren.

Im Plasmalemma der Bäckerhefe gibt es verschiedene K^+ -Transportsysteme, von denen einige bereits identifiziert sind. Auf die wichtigsten soll hier kurz eingegangen werden (Siehe auch Abbildung 1.8).

Trk1p und Trk2p werden mit hoch- bzw. moderat affiner K^+ -Aufnahme assoziiert. Trk1p besteht aus 1235 Aminosäuren und hat eine Masse von 141 kDa. Das Protein besitzt 12 hydrophobe Segmente, mutmaßliche Transmembrandomänen, sowie eine mögliche Nukleotidbindestelle (Gaber et al., 1988). Trk1p ermöglicht die Aufnahme von K^+ -Ionen in die Zelle mit hoher Affinität, wofür ein Symportmechanismus mit H^+ (Rodríguez-Navarro, 2000) diskutiert wird.

Trk2p ist zu 55% identisch mit Trk1p, allerdings erfolgt die Aufnahme von Kaliumionen in die Zelle mit deutlich geringerer Affinität. Für die Kaliumaufnahme über Trk2p wird ebenfalls ein Protonensymport diskutiert (Bihler et al., 1999). Die Deletion von *TRK1* und *TRK2* führt zu Hefestämmen, die nicht mehr in der Lage sind, bei millimolaren Kaliumkonzentrationen zu wachsen.

Eine weitere Möglichkeit zur Aufnahme von Kalium in die Hefezelle ist ein nichtspezifischer Ionenkanal, der als Nsc1p (Non-selective-cation-channel) bezeichnet wird. Die für diesen Kanal codierenden Gene sind bisher noch nicht identifiziert worden, Nsc1p ist jedoch sicher unabhängig von Trk1p und Trk2p (Bihler et al., 1998, Bihler et al., 2001). Nsc1p wird durch millimolare Konzentrationen zweiwertiger Metallionen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} und durch eine Absenkung des extrazellulären pH-Wertes auf 3,5 blockiert.

S. cerevisiae besitzt zusätzlich einen auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanal, der als Tok1p bezeichnet wird. Dieser spannungsabhängige Kanal ist beim negativen Ruhepotential der Zellmembran normalerweise geschlossen und öffnet bei positiven Spannungen (Bertl et al., 1998a). Die Überexpression von Tok1p kann das Wachstum von *trk*-Doppel-Deletionsmutanten in millimolaren Kaliumkonzentrationen teilweise wiederherstellen.

In der vakuolären Membran der Hefe sind bisher eine Protonen-ATPase (Vma1p) und ein als Yvc1p bezeichneter Ionenkanal elektrophysiologisch charakterisiert worden. Yvc1p ist ein unspezifischer Kationenkanal, der eine deutliche Einwärtsgleichrichtung vom vakuolären Lumen ins Cytoplasma zeigt (Bertl und Slayman, 1990).

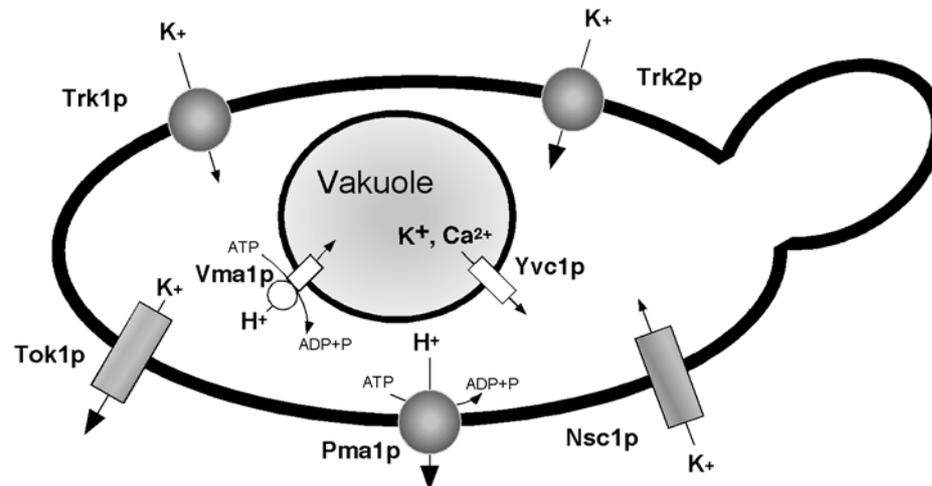


Abbildung 1.8 Kaliumtransport in *S. cerevisiae*

Schematische Darstellung der wichtigsten am Kaliumtransport beteiligten Systeme. Näheres siehe Text.

1.4.2 Kaliumkanäle in *Arabidopsis*

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält 15 Gene, die für Kaliumkanäle codieren. Sie können nach ihrer Topologie in drei Familien eingeteilt werden (Mäser et al., 2001):

Shaker-Typ, 6TM-1P	TPK-Typ, 4TM-2P	K _{ir} -Typ, 2TM-1P
<i>AKT1</i> , At2g26650	<i>TPK1</i> , At5g55630	<i>KCO3</i> , At5g46360
<i>AKT2</i> , At4g22200	<i>TPK2</i> , At5g46370	
<i>AKT5</i> , At4g32500	<i>TPK3</i> , At4g18160	
<i>AKT6</i> , At2g25600	<i>TPK4</i> , At1g02510	
<i>KAT1</i> , At5g46240	<i>TPK5</i> , At4g01840	
<i>KAT2</i> , At4g18290		
<i>KAT3</i> , At4g32650		
<i>GORK</i> , At5g37500		
<i>SKOR</i> , At3g02850		

Tabelle 1.1 Kaliumkanäle in *A. thaliana*

Mitglieder der drei vertretenen Kaliumkanalfamilien mit der gebräuchlichen Bezeichnung und der Bezeichnung des Genlocus. Kanäle vom Shaker-Typ zeichnen sich aus durch sechs Transmembrandomänen und einen Porenloop. Die Kanäle der TPK-Familie besitzen vier Transmembrandomänen und zwei Porenloops, die Kanäle vom K_{ir}-Typ besitzen dagegen nur zwei Transmembrandomänen und einen Porenloop.

In *A. thaliana* finden sich neun Mitglieder der Shaker-Familie (Very, Sentenac, 2003), die K_{ir}-Familie ist durch ein Mitglied vertreten (*KCO3*). Fünf Kanäle lassen sich der Familie der Zwei-Porenloop-Kanäle (TPK) zuordnen, über die bis heute noch wenig bekannt ist.

1.4.2.1 TPK-Kanäle (Two-Pore-K⁺-Channel)

Die ursprüngliche Bezeichnung der Kanäle dieser Familie als KCO-Kanäle beruhte auf anfänglichen Experimenten zur Charakterisierung von *TPK1* (ehemals *KCO1*) in Insektenzellen (Sf9, Sf21; Czempinski et al., 1997). In diesen Experimenten wurde ein calciumabhängiger Auswärtsstrom am Plasmalemma transfiszierter Sf9-Zellen der Aktivität des *TPK1*-Genproduktes zugeschrieben, was zum Namen *KCO1* für K⁺-outward-rectifying führte. Entsprechend wurden die anderen fünf Mitglieder der Familie, die große Sequenzhomologien aufweisen, mit den Namen *KCO2* bis *KCO6* bezeichnet. Da jedoch kurz darauf festgestellt wurde, dass dieselben calciumabhängigen Auswärtsströme auch an Insektenzellen auftraten, die nicht mit *TPK1* (*KCO1*) transfiziert worden waren, kamen Zweifel an der Beschreibung von *KCO1* auf (Czempinski et al., 1997b). Später konnten zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass Tpk1p in Pflanzen in der vakuolären Membran lokalisiert ist (Czempinski et al., 2002; Schönknecht et al., 2002). Da die Bezeichnung KCO für diese Familie von Ionenkanälen nun nicht mehr zutreffend schien, einigte man sich auf den Begriff TPK-Kanäle (Two-Pore-K⁺-Channels).

Die Familie der TPK-Kanäle in *Arabidopsis* besteht eigentlich nur aus fünf Mitgliedern. Obwohl *KCO3* nur über zwei Transmembrandomänen und einen Porenloop verfügt, wird der Kanal wegen seiner hohen Übereinstimmung in der Sequenz jedoch häufig zur Familie der TPK-Kanäle gezählt. Tpk1p, Tpk2p, Tpk3p und Kco3p zeichnen sich durch den Besitz von EF-Händen in der C-terminalen Domäne aus. EF-Hände sind Proteindomänen, die Calciumionen mit hoher Spezifität binden können (Kretsinger et al., 1973). Die mit dem Ion gebildete Struktur erinnert an eine greifende Hand. Das Vorhandensein dieser Strukturen im c-terminalen Bereich eines Kanalproteins deutet auf eine direkte Regulierung der Aktivität des Kanals durch Calcium hin.

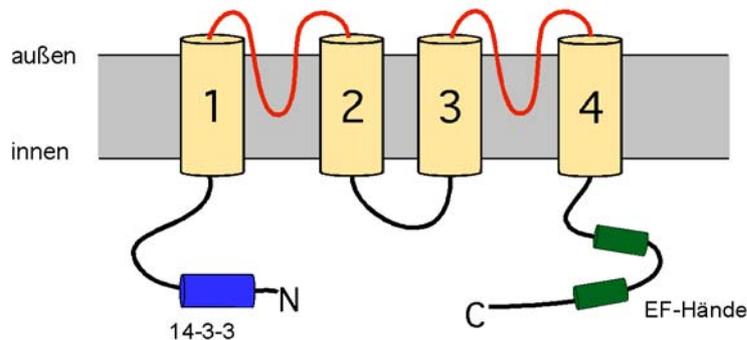


Abbildung 1.9 Strukturmodell von Tpk1p als Beispiel für TPK-Kanäle

Modell von Tpk1p, hergeleitet aus Hydrophobizitätsanalysen und Sequenzmotiven. Gezeigt sind die vier Transmembrandomänen (gelb), die beiden Porenloops (rot), die Bindestelle für 14-3-3 Proteine (blau) und die beiden EF-Hände (grün). Nach Becker et al., 2004

Zusätzlich besitzen Tpk1p, Tpk2p, Tpk3p und Tpk5p eine Bindestelle für 14-3-3-Proteine sowie mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen. 14-3-3-Proteine sind eine Klasse hoch konservierter regulatorischer Proteine, die in allen darauf untersuchten eukaryotischen Zellen vorkommen. Typischerweise besitzt jeder Organismus mehrere dieser sogenannten GRFs (General Regulating Factors). Sie besitzen die Fähigkeit, an andere Proteine zu binden und diese in ihrer Aktivität zu beeinflussen. Auch Transporter im Plasmalemma und im Tonoplast werden durch 14-3-3-Proteine reguliert (Bunney et al., 2002). Während *S. cerevisiae* nur zwei GRFs besitzt, verfügt *A. thaliana* über 13 verschiedene GRFs.

Neben Tpk1p wurden bisher nur an Tpk4p Untersuchungen zur funktionalen Charakterisierung durchgeführt. Tpk4p wurde als spannungsunabhängiger, kaliumselektiver Kanal charakterisiert, der in der Plasmamembran von Pollen lokalisiert ist. Tpk4p besitzt keine EF-Hände und kein Bindungsmotiv für 14-3-3 Proteine (Becker et al., 2004).

Einen Überblick über die TPK(KCO)-Kanäle und einige grundlegende Merkmale gibt Tabelle 7.1 im Anhang. Hier finden sich auch die Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Kanäle *KCO3*, *TPK4* und *TPK1*.

1.5 Die pflanzliche Vakuole

Die Vakuole dient der Pflanzenzelle als zentrales Kompartiment zur Speicherung von organischen und anorganischen Ionen, zum Abbau von Proteinen und zur Entsorgung giftiger Substanzen. Sie ist jedoch auch z.B. durch die Freisetzung von Ca^{2+} an intrazellulären Signalwegen beteiligt.

Ionenkanäle, Ionenpumpen und Carrier in Tonoplasten tragen wesentlich zur Homöostase des Ionenhaushalts der Zelle bei.

Die treibende Kraft für die Akkumulation von Stoffen in der Vakuole ist ein Protonengradient, der durch die Aktivität der V-Typ H^+ -ATPase und der H^+ -PPase, die das vakuoläre Lumen ansäuern, erzeugt wird. Die Vakuole ist mit einem pH von ca. 5 deutlich saurer als das Cytoplasma (pH 7).

In elektrophysiologischen Untersuchungen an pflanzlichen Vakuolen wurden eine Reihe von Ionenkanälen entdeckt, die eine Rolle im Kaliumhaushalt der Pflanzenzelle spielen könnten. Der dominierende Ionenkanal in der Membran pflanzlicher Vakuolen ist ein langsam aktivierender, spannungsabhängiger Kanal, der als SV-Kanal (**S**low-**A**ctivating-**V**acuolar-**C**hannel) bezeichnet wird und in allen bisher daraufhin untersuchten Pflanzen gefunden wurde. SV-Kanäle weisen zwar eine starke Ca^{2+} -Abhängigkeit auf, benötigen zur Aktivierung allerdings unphysiologisch hohe cytoplasmatische Calciumkonzentrationen ($>1\mu\text{M}$). Ein weiteres Charakteristikum der SV-Kanäle ist deren fehlende Selektivität. SV-Kanäle sind für monovalente Kationen wie Na^+ , K^+ , Rb^+ sehr gut permeabel ($P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} = 1$), während die Durchlässigkeit für divalente Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) oder gar Anionen kontrovers diskutiert wird (Pottosin et al., 2001). Obwohl SV-Kanäle funktional bereits seit 20 Jahren beschrieben sind und wie erwähnt auch in allen bislang daraufhin untersuchten Pflanzen gefunden wurden, blieb deren molekulare Identität lange verborgen. Erst kürzlich wurde das Genprodukt von *TPK1*, das fluoreszenzoptisch als Tonoplastenprotein identifiziert wurde (Schönknecht et al., 2002, Czempinski et al., 2002), als Komponente des SV-Kanals beschrieben (Schönknecht et al., 2001). Dagegen diskutierten Peiter et al. (2005) in *A. thaliana* einen Zusammenhang zwischen SV-Kanal-Strom und dem Produkt des Gens *TPC1*.

Im Gegensatz zum spannungsabhängigen SV-Kanal sind die sogenannten FV-Kanäle (**F**ast-**A**ctivating-**V**acuolar-**C**hannel) und die VK-Kanäle (**V**acuolar-**K**⁺-selective-**C**hannel) spannungsunabhängig (Ward et al., 1994). VK-Kanäle sind, ähnlich wie die SV-Kanäle, nur in hohen cytoplasmatischen Calciumkonzentrationen aktiv, zeigen aber eine hohe

Selektivität für Kalium. Sie sind bisher in den Vakuolen von Schließzellen und auch in den Vakuolen der Wurzel von *Beta vulgaris* beobachtet worden (Pottosin et al., 2003). Im Gegensatz dazu werden die wenig selektiven FV-Kanäle durch Calcium blockiert (Hedrich und Neher, 1987).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die funktionale Charakterisierung von Ionenkanälen aus *Arabidopsis thaliana*. Dazu sollten die Kanäle *KCO3*, *TPK4* und *TPK1* in geeigneten Hefestämmen funktional exprimiert werden. Durch elektrophysiologische und zellbiologische Methoden sollten charakteristische Eigenschaften wie Selektivität und Schaltverhalten der Kanäle untersucht werden.

Insbesondere sollte überprüft werden, inwiefern ein kausaler Zusammenhang zwischen der Aktivität des *TPK1*-Genprodukts und den SV-Strömen pflanzlicher Tonoplasten besteht (Schönknecht et al., 2002). Zur Klärung dieser Frage sollten Charakteristika wie Selektivität und Spannungsabhängigkeit von Tpk1p in Hefe mit den elektrischen Eigenschaften der vakuolären Membran der Blattmesophyllzellen von *Arabidopsis* verglichen werden.

Einige der Daten zur funktionalen Charakterisierung von Tpk1p wurden bereits vorab publiziert (siehe Publikationsliste: Bihler et al., 2005). Alle in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurden jedoch von mir selbst durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

2.1.1 Verwendete Ausgangsstämme von *Saccharomyces cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Quelle
PLY232	MATa his3 Δ 200 leu2-3, 112 trp1 Δ 901 ura3-52 suc2 Δ 9	P. Ljungdal, Stockholm
PLY246	MATa his3 Δ 200 leu2-3, 112 trp1 Δ 901 ura3-52 suc2 Δ 9 trk1 Δ 51 trk2 Δ 50::kanMX tok1 Δ 1::HIS3	P. Ljungdal, Stockholm
CEN.SR36-3C	CEN.PK; Mat a; ura3-52; his3 Δ 1; leu2-3_112; trp1-289; YOR087w/088w::HIS3	Euroscarf, Frankfurt

Tabelle 2.1 Herkunft und Genotypen der verwendeten Hefestämme

2.1.2 Verwendete *Escherichia coli*

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α	deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(rk ⁻ mk ⁺), recA1, relA1, supE44, thi1, Δ (lacZYA-argFV169), ϕ 80 δ lacZ Δ M15, F ⁻ , λ ⁻	Clontech, Heidelberg

Tabelle 2.2 Herkunft und Genotypen der verwendeten *E. coli*

2.1.3 Verwendete Linien von *Arabidopsis thaliana*

Name	Beschreibung	Quelle
Columbia-0	Wildtyp-Linie	Botanischer Garten der Universität Karlsruhe
tpk1 Δ (KCO1-2),	Deletionsmutation im Gen <i>TPK1</i> (<i>KCO1</i> , At5g55630), Stammnummer SALK146903	NASC, Nottingham
tpc1-2	Deletionsmutation im Gen <i>TPC1</i> (At4g03560), Stammnummer SALK145413	NASC, Nottingham

Tabelle 2.3 Herkunft und Eigenschaften der verwendeten *Arabidopsis*-Linien

NASC = Nottingham Arabidopsis Seed Collection

In der *Arabidopsis*-Linie tpk1 Δ wurde das Gen *TPK1* (At5g55630) durch eine T-DNA-Insertion im Exon Nr. 2 des Gens deletiert (Alonso et al., 2003). Die Überprüfung der T-DNA-Insertion erfolgte wie unter 2.5 beschrieben.

Die Linie tpc1-2 besitzt eine homozygote Insertionsmutation im Exon Nr. 17 des Gens At4g03560 (Alonso et al., 2003). Mittels RT-PCR wurde nachgewiesen, dass diese Linie über kein vollständiges Transkript von *TPC1* mehr verfügt. Auch die dem Protein entsprechende Bande bei 73 kDa konnte in der Deletionsmutante nicht mehr nachgewiesen werden (Peiter et al., 2005).

2. Material und Methoden

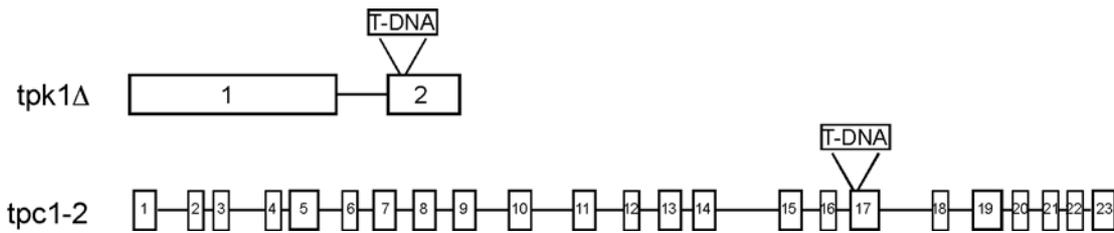


Abbildung 2.1 Lage der T-DNA-Insertion in *tpk1Δ* und *tpc1-2*

Schematische Darstellung der Genloci von *TPK1* (At5g55630) und *TPC1* (At4g03560) mit der Lage der T-DNA-Insertion in den Deletionsmutanten *tpk1Δ* (Exon Nr. 2) bzw. *tpc1-2* (Exon Nr. 17).

2.1.4 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pFL61	episomaler Expressionsvektor für Hefe, mit PGK-Promotor	H. Sentenac, Montpellier
pA112A1XE	episomaler Expressionsvektor für Hefe, mit ADH-Promotor	K. Czempinski, Potsdam
pcDNA3.1D-TOPO	Amplifikationsvektor für <i>E. coli</i>	D. Becker, Würzburg

Tabelle 2.4 Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Das Gen *TPK1* und *TPK1*-GFP wurden mir freundlicherweise als c-DNA auf dem Plasmid pA112A1XE von Katrin Czempinski, Potsdam, zur Verfügung gestellt.

Die Gene *TPK1*, *KCO3* und *TPK4* wurden mir freundlicherweise als c-DNA auf dem Plasmid pcDNA3.1D-TOPO von Dirk Becker, Würzburg, zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5'→3'	Annealing-Temperatur	Hersteller
TPK1-1	GCTATCTTGCGGCCGCATGTCGAG TGATGCAGCTCG	57°C	Roth
TPK1-2	GCTATCTTGCGGCCGCTTAAGCGC TCCTTTGAATCTGAGACG	56°C	Roth
TPK1-GEN1	CTGTGAGAACATCATCAATGAAGAC C	60°C	Roth
TPK1-GEN2	ACGATCAAAGAGTTAGAGTGTGGC	60°C	Roth
KCO3-1	GCTATCTTGCGGCCGCATGCCAAT GACTCCATC	57°C	Roth
KCO3-2	GCTATCTTGCGGCCGCTTAAGCGC TAACAGAAGTTGC	57°C	Roth
TPK4-1	GCTATCTTGCGGCCGCATGGAAGA AGAGAACC	58°C	Roth
TPK4-2	GCTATCTTGCGGCCGCTCATGATC CGCTTGATG	57°C	Roth
PGKTERM	CCGAACATAGAAATATCGAATGG	51°C	Roth
PGKPROM	AACTTGCATAAATTGGTCAATGC	50°C	Roth

Tabelle 2.5 Verwendete Oligonukleotide (Primer) für die PCR und Sequenzierungen

2.1.6 Nomenklatur von Genen und Proteinen

In dieser Arbeit wurden durchgängig die für Hefe üblichen Bezeichnungen für Gene und die entsprechenden Proteine angewandt. So bezeichnet z.B. *TPK1* das funktionale Gen des Wildtyps und *tpk1* das nicht funktionale Gen in der Deletionsmutante. Tpk1p steht für das Genprodukt des Wildtyp-Gens.

2.2 Medien

Die verwendeten Laborchemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Sigma–Aldrich (Deisenhoven) bzw. Roth (Karlsruhe) bezogen. Chemikalien für Kulturmedien stammten außerdem von Clontech und Difco.

Zymolyase 20T zur Protoplastierung wurde von ICN Biochemicals (Eschwege) bezogen, sämtliche Restriktionsendonucleasen von NEB (Heidelberg). Ebenso stammten die DNA-Polymerase, Calf-Intestinal-Phosphatase sowie die DNA-Ligase von NEB. Die Ex-Taq-Polymerase wurde von Cambrex (Verviers, Belgien) bezogen.

2.2.1 Kulturmedien

Zur Herstellung der Medien wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Ließ es die Stabilität der gelösten Substanzen zu, wurden die Medien 15 Minuten bei 121°C autoklaviert, ansonsten wurden sie sterilfiltriert. Zur Verfestigung wurde den Medien 2% Agar zugegeben. Dem SDAP-Medium, das für die Kalium-abhängigen Wachstumstests verwendet wurde, wurde zur Verfestigung 2% aufgereinigter Agar (Sigma) zugegeben.

- LB - Medium

- 1% Bactotrypton
 - 0,5% Hefeextrakt
 - 0,5% NaCl

- LB - Ampicillin – Medium

- 100 µg Ampicillin / ml LB – Medium

- YPD - Medium (Yeastextract-Bactopepton-Dextrose) +50 KCl

- 1% Hefeextrakt
 - 2% Bactopepton
 - 2% Glucose
 - 50 mM KCl
 - 50 mg/l Adeninsulfat

2. Material und Methoden

- SD -Ura-Medium +50 KCl
Uracil-Mangelmedium (Clontech) Die Zubereitung erfolgte nach Herstellerangaben aus Minimal-SD-Base und Zugabe von –Ura Drop-Out-Supplements
50 mM KCl
50 mg/l Adeninsulfat
- SD -Trp-Medium +50 KCl
Tryptophan-Mangelmedium (Clontech) Die Zubereitung erfolgte nach Herstellerangaben aus Minimal-SD-Base und Zugabe von –Trp Drop-Out-Supplements
50 mM KCl
50 mg/l Adeninsulfat
- SDAP: Medium für Wachstumstests (Tropftests, Flüssigkultur und Haloassays)
(**S**ynthetisches **D**extrose-**A**rginin-**P**hosphat-**M**edium)

Glucose	2 %
L-Arginin	10 mM (1,74 g/l)
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0,2 bzw. 5 mM
KCl	siehe Legenden zu den Abbildungen
<i>Spurenelemente</i>	
FeNaEDTA	13 µM
H ₃ BO ₃	8 µM
CuSO ₄	0,25 µM
KI	0,6 µM
MnSO ₄	2,7 µM
Na ₂ MoO ₄	1 µM
ZnSO ₄	2,5 µM
CoCl ₂	0,5 µM
NiCl ₂	0,5 µM
<i>Vitamine</i>	
Biotin	2 µg/l
Calciumpantothenat	400 µg/l
Folsäure	2 µg/l
Inositol	2 mg/l
Niacin	400µg/l
p-Aminobenzoessäure	200 µg/l
Pyridoxinhydrochlorid	400 µg/l
Riboflavin	200 µg/l
Thiaminhydrochlorid	400 µg/l
Histidin	50 mg/l
Leucin	50 mg/l
Tryptophan	50 mg/l

pH 6,5 mit H₃PO₄ (85%)
Für Medien mit pH 3,5 wurde nach dem Autoklavieren weitere 50 µl 85% H₃PO₄ auf 100 ml Medium zugegeben.

2.2.2 Lösungen zur Plasmidisolierung aus Hefezellen

- Sorbitol/EDTA
 - 0,9 M Sorbitol
 - 0,1 M EDTA
 - pH 7,5

- Sorbitol/EDTA/ β -Mercaptoethanol
 - 0,9 M Sorbitol
 - 0,1 M EDTA
 - 14 mM β -Mercaptoethanol
 - pH 7,5

- Zymolyase 20T - Stammlösung
 - Zymolyase aus *Arthrobacter luteus*, 20 000 U/g
 - 2 mg/ml in 1 M Sorbitol

- TE - Puffer
 - 10 mM Tris
 - 1 mM EDTA
 - pH 7,5, eingestellt mit HCl

- EDTA/Tris/SDS
 - 0,5 M EDTA
 - 2 M Tris
 - 10 % (w/v) SDS

- Puffer HB und Waschpuffer aus E.Z.N.A. Plasmid Miniprep-Kit (Peqlab, Erlangen)

2.2.3 Lösungen zur Präparation kompetenter Hefezellen und zur Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA

- Heringssperma - DNA
 - 10 μ g/ μ l, Yeastmakerkit K 1606-1, Firma Clontech

- PEG/LiAc (für 10 ml)
 - 8 ml 50% PEG (Polyethylenglycol) -Lösung
 - 1 ml 10x TE-Puffer, pH7.5
 - 1 ml 1 M LiAc (Lithiumacetat) –Lösung

- LiAc/TE (für 10 ml)
 - 1 ml 1M LiAc-Lösung
 - 1 ml 10x TE-Puffer
 - 8 ml H₂O

- LiAc/TE/Glycerin (für 10 ml)
 - 1 ml 1M LiAc-Lösung
 - 1 ml 10x TE-Puffer
 - 1,5 ml Glycerin
 - 6,5 ml H₂O

2. Material und Methoden

Folgende Lösungen wurden dem Yeastmaker-Kit der Firma Clontech entnommen:

- 50% PEG
- 10x TE-Puffer
- 10x (1 M) Lithiumacetat

2.2.4 Lösungen zur Protoplastierung von Hefe

- Puffer 1 (Inkubationspuffer)
 - 50 mM KH_2PO_4
 - 30 mM 2-Mercaptoethanol
 - mit KOH titriert auf pH 7,2
- Puffer 2 (Protoplastierungspuffer)
 - 50 mM KH_2PO_4
 - 2,4 M Sorbit
 - 30 mM 2-Mercaptoethanol
 - mit KOH titriert auf pH 7,2
- Resuspensionspuffer 1
 - 220 mM KCl
 - 10 mM CaCl_2
 - 5 mM MgCl_2
 - 5 mM MES
 - 0,6% Glucose
 - mit Tris titriert auf pH 7,2

2.2.5 Lösungen zur Elektrophysiologie an Hefeprotoplasten

- Pipettenlösung 1
 - 175 mM KCl
 - 4 mM MgCl_2
 - 4 mM ATP
 - 1 mM EGTA
 - 0,152 mM CaCl_2
 - mit KOH titriert auf pH 7,0
- Badlösung 1
 - 150 mM KCl
 - 10 mM CaCl_2
 - 5 mM MgCl_2
 - mit Tris titriert auf pH 7,5

2.2.6 Lösungen zur Elektrophysiologie an Hefevakuolen

- Pipettenlösung 2
 - 100 mM KCl
 - 5 mM MgCl_2
 - 10 μM CaCl_2
 - pH 7,0 mit Tris/MES

- Badlösung 2
 - 100 mM KCl
 - 5 mM MgCl₂
 - 1 mM CaCl₂
 - pH 7,0 mit Tris/MES
- Puffer zur Freisetzung der Vakuolen (Citratpuffer)
 - 100 mM K₃Citrat
 - 0,2% Glucose
 - pH 6,8 mit MES

2.2.7 Lösungen zur Elektrophysiologie an Arabidopsisvakuolen

- Protoplastierungslösung 3
 - 0,6 M Sorbitol
 - 10 mM KCl
 - pH 5,8 mit Tris/MES
 - 5 mg/ml BSA
 - 5 mg/ml Macerozym R-10 (Serva)
 - 5 mg/ml Cellulase Onozuka R-10 (Serva)
- Resuspensionspuffer 3
 - 0,6 M Sorbitol
 - 10 mM KCl
 - pH 5,8 mit Tris/MES
- Pipettenlösung 3
 - 150 mM KCl
 - 5 mM MgCl₂
 - 10 µM CaCl₂
 - pH 7,0 mit Tris/MES
- Badlösung 3
 - 150 mM KCl
 - 5 mM MgCl₂
 - 1 mM CaCl₂
 - pH 7,0 mit Tris/MES

2.2.8 Lösungen zur Bestimmung der Öffnungsweite der Stomata

- MES-KOH-Puffer (Standardmedium)
 - 10 mM MES
 - 50 mM KCl
 - 100 µM CaCl₂
 - pH 6,15 mit KOH

2.2.9 Lösungen zur Bestimmung der Keimungsrate

- MES-KOH-Puffer
 - 10 mM MES
 - pH 6,0 mit KOH
 - Abscisinsäure 0 / 0,1 / 1 / 10 µM

2.2.10 Sonstige Lösungen

- Kryolösung für kompetente *E. coli*
 - 50 mM CaCl₂
 - 15 % (w/v) Glycerin
- TAE-Puffer zur DNA Gelelektrophorese
 - 40 mM Tris
 - 1 mM EDTA
 - pH 8,3

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation kompetenter *E. coli* (DH5 α) mit CaCl₂

Ein Inoculum *E. coli* (DH5 α) wurde auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Eine Einzelkolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze in 10 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 200 Upm inkubiert.

100 ml LB-Medium wurden mit 0,5 - 1 ml der Übernachtskultur angeimpft, dadurch wurde eine Anfangs-OD₆₀₀ von ca. 0,06 erreicht.

Nachfolgend wurde bei 37°C und 200 Upm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,7 - 1,0 erreicht war. Dies dauerte ca. 3 Stunden. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten auf Eis gekühlt.

Die Zellen wurden in sterilen Zentrifugenröhrchen 10 Minuten mit 3000 Upm und 4°C in einer Hermle Z 383 K Zentrifuge abzentrifugiert, das Pellet in 2 ml vorgekühlter, steriler 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und weitere 18 ml CaCl₂-Lösung zugegeben.

Die Suspension wurde eine Stunde auf Eis gestellt.

Anschließend wurde erneut sedimentiert (siehe oben), der Überstand dekantiert, die Restlösung vollständig mit einer Pipette abgezogen und das Pellet in 1 ml kalter Kryolösung (50 mM CaCl₂, 15% Glycerin) resuspendiert.

500 μ l Aliquots wurden in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80°C tiefgefroren.

2.3.2 Präparation kompetenter Hefezellen nach der LiAc – Methode

10 ml YPD-Medium wurden mit einer Einzelkolonie Hefezellen beimpft und über Nacht bei 30°C und 200 Upm inkubiert.

Zwei sterile Erlenmeyerkolben mit je 50 ml YPD-Medium wurden mit je ca. 1,5 μ l der Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 30°C und 200 Upm inkubiert.

Die Zellsuspension wurde auf 4 sterile 25 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und 5 Minuten mit 3000 Upm in einer Hermle Z 383 K Zentrifuge abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, und die Pellets in je 8 ml steriler LiAc/TE-Lösung resuspendiert.

Diese Suspension wurde wiederum 5 Minuten mit 3000 Upm abzentrifugiert, die Zellpellets in je 0,25 ml LiAc/TE-Lösung resuspendiert, und jeweils 2 Ansätze in

einem 1,5 ml Reagiergefäß zusammengeführt. Anschließend wurde für eine Stunde bei 30°C und 75 Upm inkubiert.

Zur längerfristigen Aufbewahrung (bis zu maximal 2 Monaten) wurden die Zellen bei 3000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge Modell Nr. 5415 C abzentrifugiert und die Pellets in je 0,5 ml LiAc/TE/Glycerin-Lösung resuspendiert.

Aliquots zu je 300 µl wurden in 1,5 ml Eppendorf Reagiergefäßen bei –80°C eingefroren.

2.3.3 Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA

(Hitzeschock-Methode nach Bignell und Evans (1996), modifiziert)

Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten alle auf Eis.

Die kompetenten *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut. Entsprechende Volumina der Plasmid-DNA (für 0,5 und 1 µg) wurden in sterile, vorgekühlte 1,5 ml Reagiergefäße vorgelegt. Es wurden 200 µl kompetenter *E. coli* zu den DNA-Lösungen zugetropft und der Ansatz vorsichtig durch Aufziehen in die Pipettenspitze gemischt. Anschließend wurde 30 Minuten auf Eis gekühlt. Ebenso wurde mit einem Kontrollansatz ohne Plasmid-DNA verfahren.

Alle Ansätze wurden 1 Minute im Thermostat auf 42°C erhitzt (Hitzeschock) und sofort anschließend zwei Minuten auf Eis gekühlt.

Zu jedem Ansatz wurde 1 ml LB-Medium pipettiert und durch Aufziehen in die Pipettenspitze vorsichtig gemischt. Anschließend wurden die Ansätze 60 Minuten bei 37°C und 200 Upm inkubiert.

Die Ansätze wurden 3 Minuten mit 12000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert, vom Überstand 1 ml abpipettiert und das Pellet im Restmedium resuspendiert.

Je 100 µl der Zellsuspension wurden auf eine LB-Ampicillin-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5 - 10 ml LB-Ampicillin-Medium wurden mit einer Einzelkolonie transformierter *E. coli* beimpft und bei 30°C und 200 Upm über Nacht inkubiert.

Zur Aufbewahrung bei –80°C wurden 0,5 ml steriles 40% -iges Glycerin in einem Kryoröhrchen vorgelegt, 0,5 ml der Übernachtskultur dazu pipettiert und gut durchmischt.

2.3.4 Transformation von Hefezellen nach der LiAc - Methode

(Clontech-Yeastmaker-Protokoll K1606-1)

Die kompetenten Hefen wurden auf Eis aufgetaut, die Heringssperma-DNA in einem Thermoblock 10 Minuten bei 100°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Entsprechende Volumina an Heringssperma-DNA wurden in sterile 1,5 ml Reagiergefäße vorgelegt und entsprechende Volumina pDNA dazu gegeben (siehe Tabelle).

pDNA-Konzentration in ng	Heringssperma-DNA in µg	Heringssperma-DNA Stammlsg. [10 µg/µl] in µl
0	0	0
1000	500	50

Jeweils 100 µl kompetenter Hefezellen wurden zugegeben und die Ansätze gemischt. Nach Zugabe von je 0,6 ml steriler PEG/LiAc-Lösung wurde kurz gevortext und bei 30°C, 200 Upm für 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Ansätze 15 Minuten bei 42°C im Thermoblock erhitzt und dann 3 Minuten auf Eis abgekühlt.

Zur Pelletierung der Zellen wurde 5 Sekunden mit 14000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 0,5 ml 1x TE-Puffer resuspendiert. Von jedem Ansatz wurden 100 µl auf Selektivmedium (SD -Ura bzw. SD -Trp) ausplattiert. Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

Zur Anfertigung von Kryokulturen wurden 10 ml Selektivmedium mit einer Einzelkolonie transformierter Hefen beimpft und bei 30°C und 200 Upm über Nacht inkubiert. 0,5 ml steriles 40% -iges Glycerin wurde in Kryoröhrchen vorgelegt, 0,5 ml der Übernachtskultur zugegeben und gut durchmischt. Die Kulturen wurden bei -80°C aufbewahrt. Als Arbeitskultur wurden die transformierten Zellen auf Selektivmedium ausgestrichen und 48 Stunden bei 30°C inkubiert. Alle 2-3 Wochen wurden die tiefgefrorenen Zellen aufgetaut und neue Arbeitskulturen auf Selektiv-Agarplatten (SD -Trp bzw. SD -Ura) angelegt. Von diesen Arbeitskulturen erfolgte die Animpfung der für die Wachstumstests und elektrophysiologischen Messungen benötigten Übernachtskulturen in Flüssigmedium.

2.3.5 Plasmidisolierung aus Hefe

10 ml SD –Ura–Medium (SD –Trp-Medium für p112A1XE) wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 30°C und 200 Upm über Nacht inkubiert. 10 ml dieser Vorkultur wurden in einem sterilen 25 ml Zentrifugenröhrchen mit 3000 Upm für 5 Minuten in einer Hermle Z 383 K Zentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Sorbitol/EDTA-Lösung resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Reagiergefäß überführt. Die Zellsuspension wurde bei 3000 Upm für 10 Sekunden in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0,4 ml Sorbitol/EDTA/β-Mercaptoethanol-Lösung resuspendiert.

0,1 ml Zymolyase-Lösung wurden dazu pipettiert und der Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 30 Sekunden bei 3000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert.

Der Überstand wurde vollständig abgezogen und verworfen, das Pellet in 0,4 ml TE-Puffer resuspendiert, 90 µl EDTA/Tris/SDS-Lösung dazu gegeben, der Ansatz gemischt und für 30 Minuten bei 65°C inkubiert.

Anschließend wurden 80 µl 5 M Kaliumacetat-Lösung zupipettiert, gemischt und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden 10 Minuten mit 14000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert.

Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA aus dem Überstand erfolgte mit Hilfe eines Plasmid-Mini-Präparationskits (Peqlab, Erlangen), nach Herstellerangaben.

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch mit einem Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg).

2.3.6 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgte mit einem Plasmid-Mini-Präparationskit (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben.

2.3.7 Agarosegele

Agarosegele zur DNA-Elektrophorese enthielten 1% Agarose in TAE-Puffer. Die DNA wurde in 1,5 bis 2 Stunden bei einer Spannung von 75 V bei 100 mA aufgetrennt. Als Stromquelle diente Modell Nr. E835 (Consort).

Die Färbung erfolgte durch Baden des Gels für ca. 20 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (0,04 µg/ml).

2.3.8 Klonierung der Gene *TPK1*, *KCO3* und *TPK4* in pFI61

Da die Gene *TPK1*, *KCO3* und *TPK4* auf dem Vektor pcDNA3.1D-TOPO, der zur Expression in Hefe ungeeignet ist, zur Verfügung standen, mussten sie in den Vektor pFI61 umkloniert werden. Dieser Vektor besitzt die nötigen Voraussetzungen für eine Amplifizierung und die Expression der Gene in Hefe. Dazu gehören neben dem Selektionsmarker URA3 und dem für Hefe geeigneten Replikationsstartpunkt auch der Promotor- und der Terminatorbereich der Phosphoglycerinkinase aus Hefe. Die Gene wurden in die NotI-Schnittstelle ligiert und stehen damit unter der Kontrolle des PGK-Promotors. Folgende Schritte wurden durchgeführt:

1. PCR zur Insertion zusätzlicher NotI-Schnittstellen

Die Klonierung in pFI61 sollte über die NotI-Schnittstelle des Vektors erfolgen. Daher erfolgte die PCR mit Primern, die am 5'-Ende ebenfalls eine NotI-Schnittstelle besitzen (*TPK1*-1/-2, *KCO3*-1/-2 bzw. *TPK4*-1/2, siehe oben).

PCR-Ansatz:

- 0,3 - 1,0 µl pDNA (ca. 100 ng)
- 0,60 µl Primer 1 (*TPK1*-1, *KCO3*-1 bzw. *TPK4*-1)
- 0,60 µl Primer 2 (*TPK1*-2, *KCO3*-2 bzw. *TPK4*-2)
- 8,00 µl dNTP-Mix (200 µM je dNTP)
- 10,00 µl Pfu-Polymerase-Puffer (10fach)
- 0,67 µl Pfu-Polymerase
- ad 100 µl H₂O bidest, steril

PCR-Programm

	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	94°C	30 sec.	1
Denaturierung	94°C	30 sec.	30
Primer-Annealing	54°C	1 Minute	
Elongation	72°C	4 Minuten	
Terminale Elongation	72°C	7 Minuten	1

Die PCR wurde in einem Thermocycler Modell PC-960 (Corbett Research, Sydney) durchgeführt.

2. Aufreinigung des PCR-Produktes über Agarose-Gelelektrophorese

Der PCR-Ansatz wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die DNA mittels Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und die dem PCR-Produkt entsprechende Bande ausgeschnitten. So konnte der Ausgangsvektor vom Produkt abgetrennt werden. Die Aufreinigung der DNA aus der Agarose erfolgte mit einem Gelextraktions-Kit (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben.

3. Zweite PCR zur Amplifizierung des aufgereinigten Produktes der ersten PCR

Zur Amplifizierung des PCR-Produktes wurde die PCR nach oben stehendem Schema wiederholt und dabei das aufgereinigte Produkt der ersten PCR (das jeweilige Gen mit einer NotI-Schnittstelle an beiden Enden) als Template eingesetzt. So konnte weitestgehend sichergestellt werden, dass sich keine Teile des Ausgangsvektors mehr in der DNA-Lösung befanden und genug DNA für die spätere Ligation vorhanden war.

Die Aufreinigung des Produktes der zweiten PCR erfolgte über einen Cycle-Pure-Kit der Firma Peqlab (Erlangen) nach Herstellerangaben.

4. Restriktionsspaltung des Vektors pFI61

Zur Restriktionsspaltung des Vektors pFI61 wurde die Vektor-DNA aus *E. coli* isoliert und 10 µg der DNA in einem 100µl-Ansatz mit 30 Units NotI-Enzym im entsprechenden Puffer (NEB-Puffer 1, mit BSA) über Nacht bei 37°C gespalten. Zur Verhinderung von Religationen des Vektors wurde anschließend zum Restriktionsansatz 1 ml CIP (Calf-Intestinal-Phosphatase) zupipettiert und für eine weitere Stunde inkubiert.

5. Restriktionsspaltung des PCR-Produktes mit NotI

Nach den beiden PCR-Schritten verfügten die Gene über eine NotI-Schnittstelle an beiden Enden der DNA. Um diese DNA in den mit NotI gespaltenen Vektor ligieren zu können, mussten sie ebenfalls mit NotI geschnitten werden, da die durch die PCR erzeugten Schnittstellen doppelsträngig vorlagen.

Zur Restriktionsspaltung des PCR-Produktes wurden 16,8 µl des aufgereinigten PCR-Produktes (ca. 600 ng) in einem 20-µl-Ansatz mit 5 Units NotI in Puffer NEB1 mit BSA bei 37°C über Nacht gespalten.

6. *Aufreinigung der Restriktionsansätze über Agarose-Gelelektrophorese*

Die Restriktionsansätze mit dem Vektor und dem PCR-Produkt wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, die DNA durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und die entsprechenden Banden ausgeschnitten.

Die Aufreinigung der DNA aus dem Gel erfolgte über einen Gelextraktions-Kit (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben.

7. *Ligationsansatz*

Zur Ligation des mit NotI geschnittenen PCR-Produktes in die NotI-Schnittstelle des geschnittenen Vektors wurden ca. 100 ng Vektor-DNA und 300 ng PCR-Produkt zusammen pipettiert, mit H₂O bidest auf 17,5 µl aufgefüllt, 2 µl Ligase-Puffer (10fach) und 0,5 ml DNA-Ligase zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

8. *Transformation von E. coli*

Die ligierte DNA wurde mit 100 µl kompetenten *E. coli* versetzt und die Transformation wie oben beschrieben durchgeführt.

9. *Überprüfung der Transformanten*

Zur Überprüfung des korrekten Einbaus des DNA-Inserts in den Vektor wurden einige transformierte Kolonien in je 5 ml LB-Ampicillin-Medium überführt, über Nacht bei 37°C und 200 Upm inkubiert und die DNA mit einem Plasmid-Mini-Präparationskit (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben isoliert.

Die isolierte DNA wurde einem Restriktionsansatz unterzogen. Dabei kamen folgende Enzymkombinationen zum Einsatz:

TPK1: NcoI in NEB-Puffer 4 mit BSA

KCO3: XbaI in NEB-Puffer 2 mit BSA

TPK4: XbaI und HindIII in NEB-Puffer 2 mit BSA

Pro Enzym und Restriktionsansatz wurden 3 Units Enzym pro µg Plasmid-DNA eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurde die DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Folgende Banden wurden bei korrektem Einbau des Inserts in den Vektor erwartet:

TPK1: 4350 und 2202

KCO3: 1096 und 5119 Basenpaare

TPK4: 1599 und 4681 Basenpaare

Zur Überprüfung wurden die positiven Klone mit den Primern PGKProm und PGKTerm von GATC (Konstanz) sequenziert (Sequenzen der Primer siehe oben).

10. Transformation der Hefe mit den Plasmiden

Die korrekten Plasmide wurden wie oben beschrieben zur Transformation des Hefestamms PLY246 verwendet. Anschließend wurden die Plasmide wie oben beschrieben aus der Hefe isoliert und erneut sequenziert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Wachstumstests: Tropftest

1 ml einer Übernachtskultur wurde in einem sterilen 1,5 ml Reagiergefäß mit 4000 Upm für 3 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde die OD_{600} auf $1,0 \pm 0,05$ eingestellt und Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ hergestellt. Je 7 μl jeder Verdünnung wurden auf SDAP-Agarplatten der angegebenen Zusammensetzung pipettiert. Die Platten wurden bei 30°C für 72 Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die Platten mit einer Auflösung von 600 dpi eingescannt und mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop die Helligkeit und der Kontrast der Abbildungen nachreguliert.

2.4.2 Wachstumstests: Messung der optischen Dichte (OD_{600})

15 ml SDAP-Medium der jeweils angegebenen Zusammensetzung wurde mit einer entsprechenden Menge einer Übernachtskultur auf eine Anfangs-OD von 0,1 angeimpft.

Die Kulturen wurden bei 30°C und 200 Upm inkubiert. Die OD_{600} der Proben wurde in einem Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

2.4.3 Hemmhofstest (Haloassay)

1 ml einer Übernachtskultur wurde in einem sterilen 1,5 ml Reagiergefäß mit 4000 Upm für 3 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit 1 ml sterilem H₂O_{bidest} gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde die OD₆₀₀ auf $1,0 \pm 0,05$ eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl zu 5 ml warmen (45°C) SDAP-Agar (0,5% Agar) zupipettiert und damit eine SDAP-Agar-Platte der entsprechenden Kaliumkonzentration überschichtet. Nach dem Erstarren des Agars wurden sterile Filterplättchen aufgelegt und je 10 µl der entsprechenden Hemmstofflösung aufgetropft. Die Konzentration der Hemmstofflösungen betrug 1 mol/l. Die Platten wurden 72 Stunden bei 30°C inkubiert und dann der Durchmesser der Hemmhöfe durch Ausmessen an der Platte bestimmt. Anschließend wurden die Platten mit einer Auflösung von 600 dpi eingescannt und mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop die Helligkeit und der Kontrast der Abbildungen nachreguliert.

2.4.4 Bestimmung der Öffnungsweite der Stomata von *A. thaliana*

Blätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden 3 Stunden im Dunkeln in 10 mM MES-KOH-Puffer (pH 6,15, 50 mM KCl, Abscisinsäure wie in der Abbildung angegeben) inkubiert und anschließend 3 Stunden belichtet. Die Epidermis wurde in Streifen abgezogen, unter dem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung betrachtet und mit einer Digitalkamera abfotografiert. Das Ausmessen der Öffnungsweite erfolgte dann am Computer.

2.4.5 Bestimmung der Keimungsrate von *A. thaliana*

Samen der entsprechenden Linien von *A. thaliana* wurden zur kalten Stratifikation drei Tage bei 4°C im Dunkeln in MES-KOH-Puffer (pH 6,0) mit der entsprechenden Abscisinsäurekonzentration inkubiert. Anschließend wurden die Samen auf Agarplatten mit derselben Abscisinsäurekonzentration verteilt und bei Licht und 22°C inkubiert. Jeden Tag wurde die Anzahl der gekeimten Samen unter dem Stereomikroskop bestimmt.

2.5 Überprüfung der Deletionsmutation in der Arabidopsislinie *tpk1Δ* (KCO1-2)

Die Linie *tpk1Δ* (KCO1-2) wurde von NASC (Nottingham Arabidopsis Seed Collection) bezogen (Stamm-Nummer SALK146903). Sie besitzt eine homozygote Insertionsmutation im Exon Nr. 2 des Gens *TPK1* (At5g55630; Alonso et al., 2003). 300 mg Blätter wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerkleinert. Die Isolierung der DNA aus dem zerriebenen Blattmaterial erfolgte unter Verwendung eines DNeasy-Plant-MiniKit (Qiagen, Hilden).

Das Gen At5g55630 wurde durch eine PCR amplifiziert. Es wurde je ein Ansatz mit DNA aus dem Wildtyp (Columbia-0) und aus *tpk1Δ* bearbeitet.

PCR-Ansatz:

2 µl DNA (ca.100 ng)

2 µl Primer TPK1-GEN1

2 µl Primer TPK1-GEN2

4 µl dNTP-Mix

10,00 µl ExTaq-Polymerase-Puffer, 10fach (Cambrex, Verviers, Belgien)

0,3 µl ExTaq-Polymerase (Cambrex, Verviers, Belgien)

ad 50 µl H₂O bidest, steril

Die Tabelle zeigt das verwendete PCR-Programm:

	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	96°C	60 s	1
Denaturierung	94°C	15 s	30
Primer-Annealing	60°C	30 s	
Elongation	72°C	1 Minute	

Nach erfolgter PCR wurde der Ansatz über ein Agarosegel aufgetrennt, und die PCR-Produkte aus dem Gel isoliert. Das Gel zeigte beim Wildtyp eine Bande bei ca. 1800 BP und bei *tpk1Δ* eine Bande in der Größe von ca. 2300 BP.

Anschließend wurden die PCR-Produkte unter Verwendung eines TOPO TA Cloning-Kits (Invitrogen, Karlsruhe) in den Vektor pCRII-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert, und kompetente *E. coli* mit der Plasmid-DNA transformiert. Nach Amplifizierung der DNA wurden die Plasmide isoliert und einem Restriktionsverdau mit EcoRI unterzogen. Hierbei wurde das zuvor in den Vektor ligierte PCR-Fragment wieder

herausgeschnitten. Durch die Auftrennung der Restriktionsansätze über ein Agarosegel (Abbildung 2.2) wurde erkennbar, dass das aus dem Vektor ausgeschnittene DNA-Stück bei der Deletionsmutante deutlich größer ist als beim Wildtyp. Dies zeigt, dass die T-DNA tatsächlich im Bereich des angegebenen Genlocus lokalisiert ist. Die genaue Lage der T-DNA-Insertion im Exon Nr. 2 des Gens *TPK1* wurde durch Sequenzierung des Plasmids pcRII-TOPO-*tpk1*Δ überprüft.

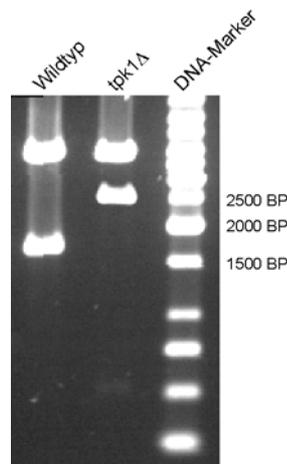


Abbildung 2.2 Überprüfung der T-DNA-Insertion in *tpk1*Δ

Agarosegel-Elektrophorese nach Restriktionsverdau mit *EcoRI*. Verdaut wurde der Vektor pcRII-TOPO mit dem Insert aus der PCR-Reaktion des Wildtyps (links) bzw. der Deletionsmutante *tpk1*Δ (Mitte). Die Vergrößerung des PCR-Inserts in *tpk1*Δ bestätigt die Lage der T-DNA-Insertion im Gen *TPK1*.

2.6 Elektrophysiologie / Patch-Clamp-Technik

Mit der von Neher und Sakmann entwickelten Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981) konnten durch Aufsetzen einer Glaspipette erstmals einzelne Ionenkanäle in biologischen Membranen elektrisch isoliert und untersucht werden. Diese Methode erfordert einen hohen Abdichtwiderstand (Gigaseal) zwischen Glas- und Membranoberfläche, daher ist eine saubere Membranoberfläche eine wichtige Voraussetzung, um einen hohen Abdichtwiderstand zu erhalten. Eine die Membran bedeckende Zellwand oder andere Strukturen müssen möglichst vollständig entfernt werden, ohne jedoch das Plasmalemma zu schädigen.

2.6.1 Elektrophysiologie an Hefeprotoplasten

Die Präparation von Hefeprotoplasten und die Durchführung der Patch-Clamp-Experimente erfolgte weitgehend nach den Protokollen von Bertl et al. (1998b) und wird im Folgenden kurz beschrieben.

2.6.1.1 Präparation von Hefeprotoplasten

Zur Protoplastierung der Hefezellen wurden 10 ml einer Übernachtskultur bei 2000 Upm für 5 Minuten abzentrifugiert, das Pellet in 3 ml Puffer 1 resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur und 200 Upm inkubiert.

Anschließend wurden 4 ml Puffer 2 sowie ca. 60 mg Rinderserumalbumin und ca. 12 mg Zymolyase 20T zugegeben und 45 Minuten bei Raumtemperatur und 200 Upm inkubiert.

Zymolyase ist ein Enzymcocktail aus Glukanasen, Proteasen und Mannasen, die das Polysaccharid-Netzwerk der Zellwand aufbrechen. Das Rinderserumalbumin soll eine Beschädigung der Membranproteine durch die in der Zymolyase enthaltenen Proteasen verhindern.

Danach wurden die Protoplasten abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml Resuspensionspuffer 1 aufgenommen und 150 µl einer 40%igen Glukose-lösung zugegeben.

2.6.1.2 Herstellung von Glasmikropipetten

Für die Herstellung der Messpipetten wurden Kapillaren aus Borsilikatglas verwendet (Kimax-51, Kimble, USA). Die Kapillaren wurden in ein vertikales Pipettenziehgerät (Modell Nr. 750, David Kopf, USA) eingespannt und in zwei Schritten ausgezogen, so dass aus einer Kapillare zwei Pipetten mit einem Spitzendurchmesser von 1 - 2 µm entstanden.

Zur Beseitigung von eventuell durch den Zugvorgang an der Spitze entstandenen Abrisskanten wurden die Pipetten in einer selbstgebauten Hitzepoliereinheit an einem Platindraht glatt geschmolzen.

2.6.1.3 Aufbau des Messplatzes

Der Messplatz bestand im Wesentlichen aus einem schwingungsgedämpften Tisch auf dem ein inverses Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen), eine Messkammer, ein Mikromanipulator mit Grob- und Feintrieb (MP87, Sutter, USA) und ein Vorverstärker mit Pipettenhalter (Firma Heka, Lambrecht) platziert wurden. Der gesamte Aufbau wurde durch einen Faradaykäfig gegen elektrische Störsignale aus der Umgebung abgeschirmt.

Eine am Mikroskop angebrachte CCD-Videokamera ermöglichte auch bei geschlossenem Faradaykäfig die Beobachtung des Messobjektes über einen Monitor. Das gemessene Signal wurde über den Vorverstärker und ein abgeschirmtes Kabel

an den eigentlichen Patch-Clamp-Verstärker (EPC9, Heka, Lambrecht) weitergeleitet, digitalisiert, gefiltert und in einen Apple Macintosh Computer eingespeist. Die weitere Verarbeitung und Auswertung erfolgte mit dem Softwarepaket Pulse/PulseFit 8.0 (Heka, Lambrecht).

2.6.1.4 Sealformation und Ganzzelleleitung

Nach dem Befüllen der Messkammer mit Badlösung 1 wurde ein Tropfen frisch präparierter Protoplasten zugegeben und einige Minuten gewartet, um die Zellen auf den Boden der Messkammer absitzen zu lassen.

Danach wurde eine frische Messpipette mit sterilfiltrierter Pipettenlösung 1 gefüllt und in den Pipettenhalter eingespannt.

Um eine Verschmutzung der Pipettenspitze durch Schmutzpartikel in der Lösung zu verhindern, wurde an die Pipette mittels eines Schlauchsystems ein Überdruck von ca. 10 cm Wassersäule angelegt.

Nach dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurden die Spannungsoffsets, hervorgerufen durch Verstärker und Übergangspotentiale zwischen Pipetten- und Badlösung, abgeglichen.

Anschließend wurden Pipettenspitze und Protoplast mit Hilfe des Mikromanipulators und Mikroskopes in Fokus gebracht und der Überdruck von der Pipettenspitze genommen. Der ausgewählte Protoplast wurde durch Anlegen eines kleinen Unterdrucks angesaugt und vom Boden der Messkammer angehoben. Durch gleichmäßiges, vorsichtiges Saugen ließ sich die Membran etwas in die Pipettenspitze einsaugen und ein hoher Abdichtwiderstand erreichen. Zur Beobachtung der Sealbildung wurde der Abdichtwiderstand durch Anlegen eines Testpulses (5 mV, 5 ms) an die Pipette kontinuierlich gemessen. Die entsprechende Stromantwort wurde in einen Widerstandswert umgerechnet und konnte am Oszilloskopmodul des Rechners als Pipetten- bzw. Abdichtwiderstand abgelesen werden. Werte von 1 G Ω und mehr zeigten das Erreichen des Cell-Attached-Zustandes an (Abbildung 2.3, oben).

Um elektrisch Zugang zur gesamten Zellmembran zu erhalten, musste der Membranfleck, der die Pipettenöffnung abdichtet, durchbrochen werden. Dies geschah durch Anlegen eines relativ hohen Spannungspulses (ca. 1 V) für 100-200 μ s bei gleichzeitigem Anlegen eines leichten Unterdruckes.

Nach dem Durchbrechen der Membran und einer Wartezeit von einigen Minuten, um einen weitgehenden Austausch von Cytoplasma durch die Pipettenlösung zu

gewährleisten, wurde die eigentliche Messung begonnen. Dazu wurde die Membran auf verschiedene Spannungen geklemmt und die entsprechende Stromantwort aufgezeichnet.

Standardmäßig wurden die Daten mit 1 kHz aufgezeichnet und bei 400 Hz gefiltert.

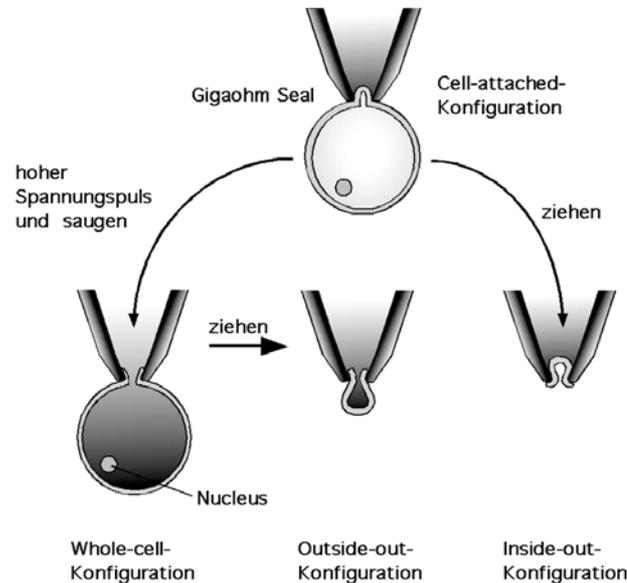


Abbildung 2.3 Messkonfigurationen in Patch-Clamp-Experimenten

Aus Numberger und Draguhn, 1996

2.6.2 Elektrophysiologie an Hefevakuolen

Das Vorgehen bei den elektrophysiologischen Untersuchungen an Hefevakuolen war dem Verfahren an Hefeprotoplasten sehr ähnlich. Zur Freisetzung der Vakuolen aus den Protoplasten wurde die Messkammer nach Absetzen der Protoplasten einige Minuten mit Citratpuffer durchspült, bis die ersten Vakuolen sichtbar wurden. Dann wurde die Lösung in der Messkammer durch die Badlösung 2 für Hefevakuolen ersetzt. Als Pipettenlösung diente Pipettenlösung 2 für Hefevakuolen. Abweichungen hiervon sind in den Abbildungen angegeben. Die Daten wurden im Normalfall mit 1 kHz aufgezeichnet und mit 250 Hz gefiltert.

2.6.3 Elektrophysiologie an Arabidopsisvakuolen

Das Vorgehen bei der Durchführung elektrophysiologischer Experimente an Vakuolen von *A. thaliana* ist dem Verfahren bei Hefevakuolen recht ähnlich. Auf die Unterschiede wird im Folgenden kurz eingegangen.

2.6.3.1 Präparation von Protoplasten aus Arabidopsis-Mesophyllzellen

Einige Blätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden abgeschnitten und die untere Epidermis vorsichtig abgezogen. Die Blätter wurden 1 Stunde bei 30°C und 100 Upm

in Protoplastierungslösung 3 inkubiert und die groben Blattrückstände anschließend entfernt. Die grünliche, die Protoplasten enthaltende Lösung, wurde in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und 3 min bei 500 g abzentrifugiert. Die Protoplasten wurden in Resuspensionspuffer 3 resuspendiert, erneut zentrifugiert und wiederum resuspendiert. Die Aufbewahrung erfolgte bis zu maximal 5 Stunden auf Eis.

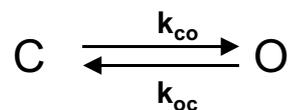
2.6.3.2 Freisetzung der Vakuolen aus Arabidopsisprotoplasten

Zur Freisetzung der pflanzlichen Vakuolen war die Perfusion der Messkammer mit Badlösung 3 ausreichend. Bereits nach wenigen Minuten wurden die ersten Vakuolen sichtbar.

Das weitere Vorgehen war identisch mit dem Ablauf bei den Messungen an Hefevakuolen, es wurden jedoch die Bad- und Pipettenlösung 3 für Vakuolen aus *Arabidopsis* verwendet.

2.6.4 Simulation elektrophysiologischer Experimente

Die Simulationen zu den Abbildungen 1.2, 1.3, 1.4 und 2.4 wurden mit dem Programm Pulse-Sim (Heka) durchgeführt. Dieses Programm ermöglicht die Simulation der Eigenschaften eines einzelnen Ionenkanals oder auch einer ganzen Population von Ionenkanälen basierend auf kinetischen Modellen. Als einfachstes kinetisches Modell zur Beschreibung eines spannungsabhängigen Ionenkanals kann ein Zweizustandsmodell betrachtet werden. In diesem Modell kann der Kanal nur in zwei diskreten Zuständen vorliegen: geschlossen (c) oder offen (o).



Die Übergänge zwischen diesen beiden Zuständen werden durch die Geschwindigkeitskonstanten k_{co} und k_{oc} beschrieben. Im Falle eines spannungsabhängigen Ionenkanals sind diese beiden Geschwindigkeitskonstanten spannungsabhängig in der Form:

$$k_{co} = k_{co}^0 e^{zeV/skT} \quad \text{und} \quad k_{oc} = k_{oc}^0 e^{-zeV/(1-s)kT}$$

Dabei sind k_{co}^0 und k_{oc}^0 die fundamentalen Geschwindigkeitskonstanten bei einer elektrischen Spannung von $V = 0$ Volt, k ist die Boltzmannkonstante, e ist die

2. Material und Methoden

Elementarladung, z ist die Ladungszahl, T ist die absolute Temperatur und s ist ein Maß für die Lage der Energiebarriere. Die beiden Zustände (c) und (o) geben im Falle von Einzelkanälen die Aufenthaltswahrscheinlichkeit im offenen bzw. geschlossenen Zustand an. Bei Betrachtung einer ganzen Population von Ionenkanälen ist dies die Anzahl der Kanäle im jeweiligen Zustand (N_o und N_c).

Die für die Simulationen eingesetzten Parameter sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Parameter/Variable	Abbildung 1.2 A	Abbildung 1.2 B	Abbildung 1.3	Abbildung 1.4
Spannungsabhängigkeit	nein	nein	ja	ja
Anzahl der Kanäle	1	1	1	1 / 10 / 100 / 1000
α = Übergangsrate k_{co} (s^{-1})	5	5	5	1
β = Übergangsrate k_{oc} (s^{-1})	5	5	5	5
q = Anzahl zu verschiebender Ladungen	1	1	1	1
s = Position der Energiebarriere	0,5	0,5	0,5	0,5
g_o = Leitfähigkeit des Offenkanals (pS)	50	50	50	50
Haltespannung (mV)	0	0	0	-80
Umkehrspannung (mV)	0	-40	-40	-40

Tabelle 2.6 Zur Simulation eingesetzte Variablen und Parameter

Die Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit in Abbildung 1.3 C erfolgte nach folgender Gleichung:

$$P_o(V) = \frac{k_{co}}{k_{co} + k_{oc}}$$

2.6.5 Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit eines Ionenkanals

Die Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit erfolgte über Amplitudenhistogramme (Bertl und Slayman, 1990). Das Vorgehen soll anhand einer simulierten Einzelkanalableitung kurz erklärt werden (Abbildung 2.4). Für die Simulation wurde wie unter 2.6.4 das einfachste kinetische Modell angenommen, bei dem der Ionenkanal nur geschlossen (c) oder offen (o) vorliegen kann. Die Übergänge zwischen dem geschlossenen (c) und dem offenen (o) Zustand sind durch die Geschwindigkeitskonstanten k_{co} und k_{oc} charakterisiert, wobei die mittleren Verweildauern im offenen bzw. im geschlossenen Zustand die Reziprokwerte der

entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten ($\tau_o = 1/k_{oc}$ und $\tau_c = 1/k_{co}$) sind. Für die Simulation der Stromspur in Abbildung 2.4 wurden folgende Parameter verwendet:

$n = 4$ (Anzahl der Kanäle)

$k_{co} = 5 \text{ s}^{-1}$ (Geschwindigkeitskonstante für Übergang $c \rightarrow o$)

$k_{oc} = 10 \text{ s}^{-1}$ (Geschwindigkeitskonstante für Übergang $o \rightarrow c$)

$g_o = 50 \text{ pS}$ (Offenkanalleitfähigkeit)

$V_m = 80 \text{ mV}$ (Membranspannung)

$f = 1 \text{ kHz}$ (Abtastrate)

Die theoretisch zu erwartende Offenwahrscheinlichkeit ist durch das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten nach folgender Gleichung bestimmt:

$$P_o = k_{co} / (k_{co} + k_{oc}) = \tau_o / (\tau_o + \tau_c)$$

Unter Berücksichtigung der oben angegebenen Parameter ergäbe dies für dieses Experiment eine theoretische Offenwahrscheinlichkeit von 0,33.

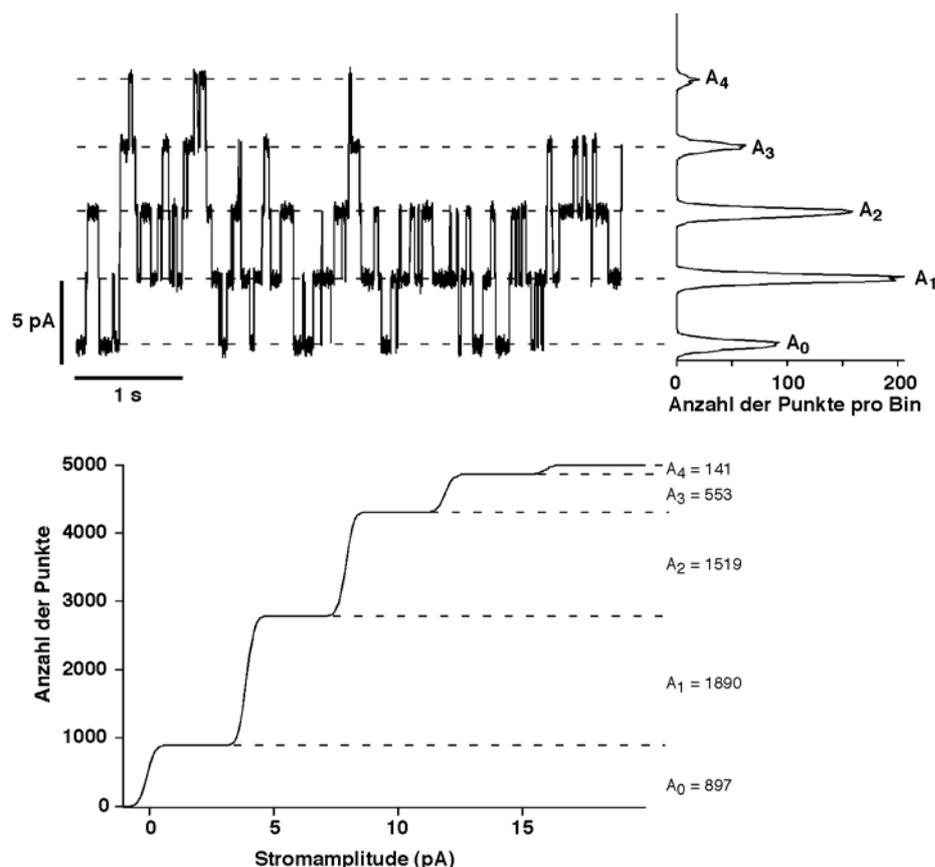


Abbildung 2.4 Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit über Amplitudenhistogramme

Oben: Stromspuren eines mit der Software Pulse-Sim simulierten Experimentes mit dem dazu gehörenden Amplitudenhistogramm (rechts).

Unten: Das Integral des Amplitudenhistogramms liefert die Anzahl der Datenpunkte unter den Peaks.

Nähere Erklärung im Text

Zur experimentellen Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit wurden Amplitudenhistogramme erstellt. In der Praxis wird eine Stromspur in ein Raster mit einer bestimmten Binweite (in diesem Falle 70 fA) aufgeteilt und die Anzahl der Datenpunkte, die in jedem dieser Bins liegen, in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 2.4 A, rechts neben der Stromspur). Wie in dieser Abbildung zu sehen ist, ergeben sich diskrete Peaks, die den diskreten Leitfähigkeitsniveaus in der Originalstromspur zugeordnet werden können. Der Peak um 0 pA (A_0) repräsentiert die Grundlinie mit allen Kanälen im geschlossenen Zustand. Die anderen Peaks entsprechen den Leitfähigkeitsniveaus mit einem (A_1), zwei (A_2), drei (A_3) oder vier (A_4) gleichzeitig offenen Kanälen, wobei die Fläche unter diesen Peaks die Anzahl der Datenpunkte wiedergibt. Da jeder Datenpunkt 1 ms entspricht (Abtastrate 1 kHz = $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) entspricht die Fläche A_0 also der Zeit, in der alle Kanäle geschlossen sind, A_1 entspricht der Zeit, die 1 Kanal offen ist (3 Kanäle sind geschlossen), A_2 entspricht der Zeit, die 2 Kanäle gleichzeitig offen sind etc.

Durch Integration des Amplitudenhistogramms (Abbildung 2.4, unten) konnte die Fläche der Peaks und damit die Anzahl der Datenpunkte (Verweildauern) bei den unterschiedlichen Stromamplituden bestimmt werden. Diese entsprechen den jeweiligen Abständen zwischen den einzelnen Plateaus in Abbildung 2.4 (unten) und sind rechts als solche markiert. Die tatsächliche Offenwahrscheinlichkeit (P_o) kann nun durch folgende Gleichung berechnet werden:

$$P_o = \frac{(A_1 + 2A_2 + \dots + nA_n)}{n(A_0 + A_1 + A_2 + \dots + A_n)}$$

Dabei sind A_0, A_1, A_2, \dots bis A_n die Flächen unter den Peaks für 0, 1, 2, bzw. n offene Kanäle. Die Bestimmung nach dieser Methode ergab für das simulierte Experiment in Abbildung 2.4 (oben links) eine Offenwahrscheinlichkeit von 0,36, was sehr nahe an der theoretischen Offenwahrscheinlichkeit von 0,33 liegt und somit die Gültigkeit dieser Berechnung demonstriert.

3. Ergebnisse

3.1 Das Expressionssystem Hefe

In elektrophysiologischen Ganzzellaufnahmen an Wildtypzellen (PLY232) von *Saccharomyces cerevisiae* treten nach plötzlichen Änderungen der Membranspannung (siehe Spannungsprotokoll in Abbildung 3.1) große, langsam aktivierende Auswärtsströme und kleine, instantane Einwärtsströme auf (Abbildung 3.1). Die Auswärtsströme gehen auf die Aktivität des spannungsabhängigen Kaliumkanals Tok1p zurück, während die kleinen Einwärtsströme aus der Aktivität der beiden Kaliumaufnahme-systeme Trk1p und Trk2p resultieren (Bertl et al., 1995). In Abwesenheit divalenter Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) treten zusätzlich große, langsam aktivierende Einwärtsströme auf (hier nicht gezeigt), die der Aktivität eines bislang molekular nicht identifizierten niederaffinen Kationenaufnahmesystems zugeordnet werden (Bihler et al., 1999).

Im Hefestamm PLY246, in dem die Gene für Trk1p, Trk2p und Tok1p deletiert wurden, sind in Anwesenheit von millimolaren Konzentrationen externen Calciums keine messbaren Ionenströme am Plasmalemma zu entdecken. Dieser Hefestamm schien daher für die Expression sowie für die elektrophysiologische Identifikation und Charakterisierung der zu untersuchenden Kanäle prädestiniert zu sein.

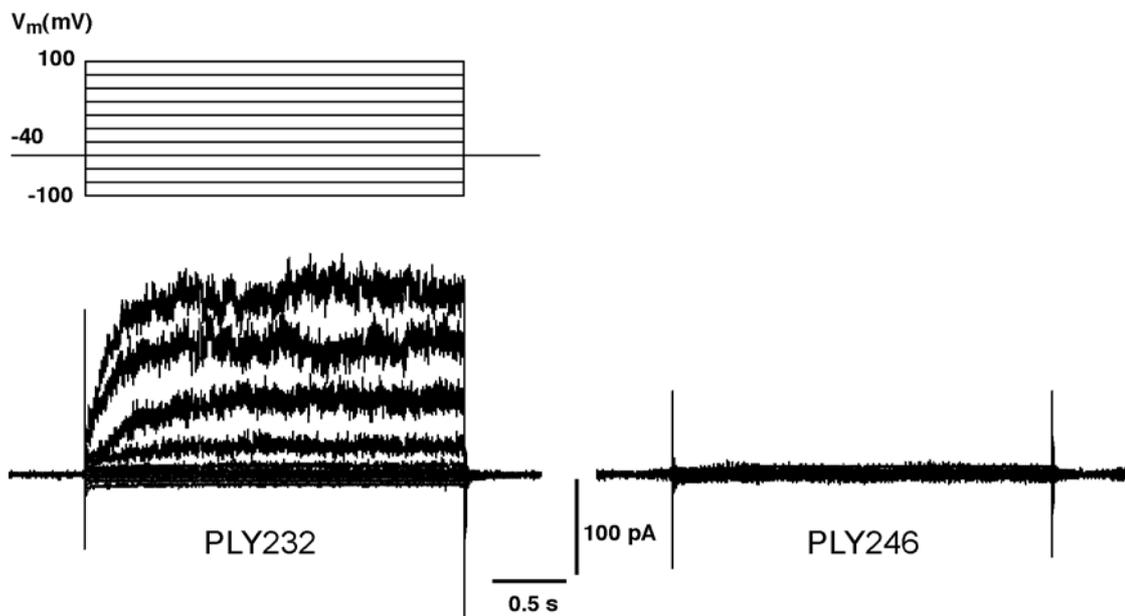


Abbildung 3.1 Kanalaktivität am Plasmalemma von Hefe

Ganzzellaufnahmen an PLY232 bzw. PLY246 mit Bad- und Pipettenlösung 1. Das verwendete Spannungsprotokoll ist links oben dargestellt: Ausgehend von einer Haltespannung von -40 mV wurde die Membran in Schritten von 20 mV auf Spannungen von -100 mV bis 100 mV geklemmt. Nach $2,5$ s wurde die Membran erneut auf die Haltespannung geklemmt. Zwischen den Pulsen lagen Zeitintervalle von $0,5$ s. Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet.

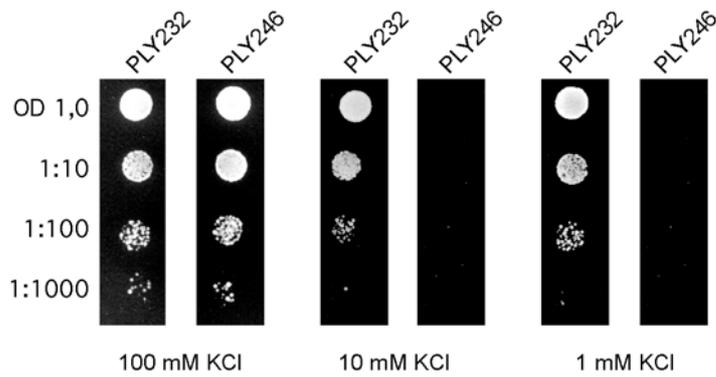


Abbildung 3.2 Erhöhter Kaliumbedarf von PLY246

Tropftests der beiden Hefestämme auf SDAP-Agarplatten mit unterschiedlicher Kaliumkonzentration bei pH 6,5 und 5 mM CaCl₂. Aufgetropft wurden je 7 µl einer Zellsuspension, oben beginnend mit OD₆₀₀ = 1,0 und darunter die jeweiligen Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Das Wachstum der beiden Stämme erfolgte jeweils auf derselben Platte, zur besseren Übersicht werden die Tropfreihen jedoch getrennt dargestellt.

In Wachstumstests auf Medien mit unterschiedlicher Kaliumkonzentration zeigte sich, dass die Abwesenheit von Auswärts- und Einwärtsströmen in der *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante (PLY246) mit einem Wachstumsdefekt auf Kalium-limitierten Medien korreliert. Während der Wildtyp (PLY232) auf Kaliumkonzentrationen von 100 mM bis weniger als 1 mM sehr gutes Wachstum zeigte (Abbildung 3.2), benötigte die *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante (PLY246) für ein gutes Wachstum Kaliumkonzentrationen von deutlich über 10 mM. Somit würde sich der PLY246-Stamm nicht nur für die elektrophysiologische Identifikation und Charakterisierung heterologer Ionenkanäle eignen, sondern auch zur physiologischen Identifikation von Transportproteinen mit Kaliumaufnahme-funktion mittels Wachstumsexperimenten. Membranproteine, die das Wachstum der PLY246-Mutante in limitierenden Kaliumkonzentrationen verbessern, sollten nicht nur Transportfunktion zeigen, sondern diese Funktion auch im Plasmalemma ausüben.

3.2 Funktionale Expression von Kanälen der TPK-Familie in Hefe

Zur Untersuchung der Eigenschaften der TPK-Kanäle wurden die für diese pflanzlichen Kanäle codierenden Gene in den Hefeexpressionsvektor pFI61 kloniert und der Hefestamm PLY246 mit den Konstrukten transformiert. Im pFI61-Vektor, der das URA3-Gen als Selektionsmarker trägt, stehen die Gene unter der Kontrolle des konstitutiven PGK-Promotors. Um mögliche, mit der Transformation durch die pflanzlichen Ionenkanäle assoziierten Wachstumsphänotypen zu entdecken, musste das Wachstum der transformierten Hefestämme mit dem der Kontrollstämme (PLY232 und PLY246) auf der gleichen Agarplatte verglichen werden. Da aber die Kontrollstämme PLY232 und

PLY246 Uracil-auxotroph, die transformierten Stämme durch das Plasmid aber Uracil-autotroph sind, wurden die Kontrollstämme mit dem leeren Vektor pFI61 (mit URA3-Marker) transformiert. Mit den transformierten Stämmen wurde ein Tropftest auf SDAP-Agarplatten mit unterschiedlicher Kaliumkonzentration durchgeführt (Abbildung 3.3). Um eine eventuelle Aufnahme von Kalium durch Nsc1p auszuschließen, wurden die Experimente in 5 mM CaCl₂ durchgeführt, da Nsc1p unter diesen Bedingungen nicht mehr aktiv ist (Bihler et al., 2002).

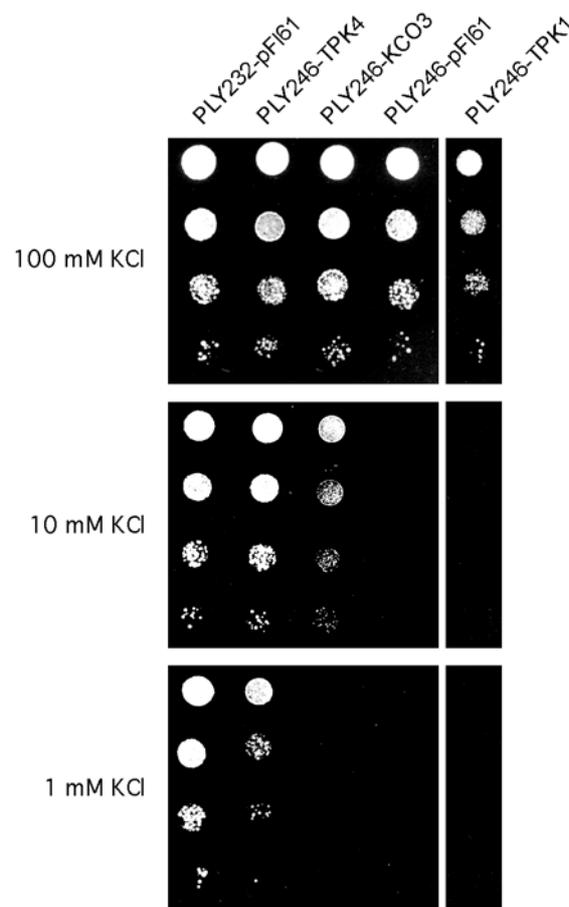


Abbildung 3.3 TPK4 und KCO3 komplementieren die Kaliumaufnahme

Tropftests auf SDAP-Agarplatten mit Kaliumkonzentrationen wie jeweils links angegeben, in 5 mM CaCl₂, pH 6,5. Aufgetropft wurden je 7 µl einer Zellsuspension, oben beginnend mit OD₆₀₀ = 1,0 und darunter die jeweiligen Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000. Das Wachstum erfolgte bei 30°C für 3 Tage. Der Wachstumstest mit PLY246-TPK1 (ganz rechts) wurde auf einer separaten Platte durchgeführt. Die beiden Kontrollstämme mit dem leeren Plasmid zeigten hier ein vergleichbares Wachstum wie im linken Teil der Abbildung und wurden der besseren Übersichtlichkeit wegen nicht nochmals abgebildet.

Beide Kontrollstämme, PLY232-pFI61 und PLY246-pFI61, zeigten dasselbe Wachstumsmuster wie die entsprechenden Ausgangsstämme, die nicht mit dem leeren Vektor transformiert wurden. Der Wildtyp PLY232-pFI61 zeigte in allen

3. Ergebnisse

Kaliumkonzentrationen ein sehr gutes Wachstum, während der *trk1trk2tok1*-Deletionsstamm PLY246-pFI61 nur bei 100 mM KCl wuchs.

Die Expression des *TPK4*-Gens in PLY246 führte zu einer deutlichen Veränderung des kaliumabhängigen Wachstums des Deletionsstammes. Anders als der Wirtsstamm PLY246, aber sehr ähnlich dem Wildtypstamm PLY232, wuchs der *TPK4* exprimierende Stamm bei allen Kaliumkonzentrationen sehr gut. *TPK4* komplementiert also den Wachstumsdefekt der *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante in millimolaren Kaliumkonzentrationen.

Die Expression des Gens für den Kaliumkanal *Kco3p* führte ebenfalls zu einer deutlichen Wachstumsverbesserung von PLY246. Zwar wuchs der transformierte Stamm (PLY246-KCO3) auf Platten mit 100 mM und 10 mM KCl noch sehr gut, bei 1 mM KCl war allerdings kein Wachstum mehr zu beobachten.

Ein ähnliches Bild wie in den Tropftests (Abbildung 3.3) zeigte sich beim Wachstum der Stämme in Flüssigkultur.

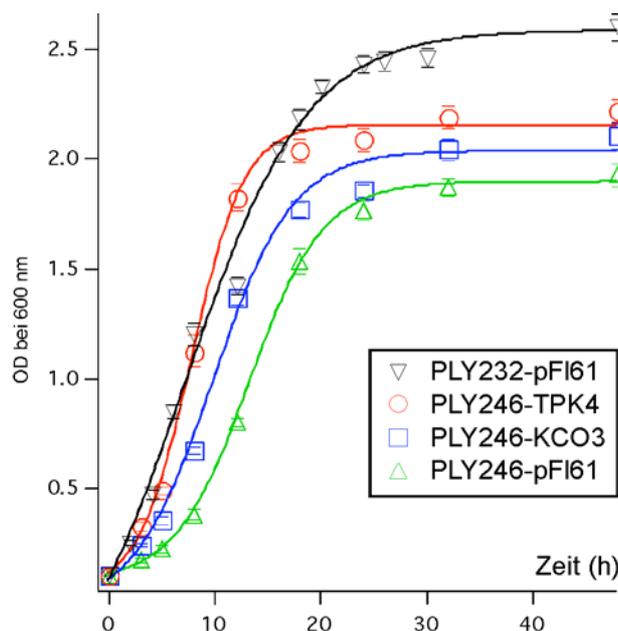


Abbildung 3.4 Wachstum in Flüssigkultur mit 100 mM KCl

Zeitlicher Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm als Maß für das Wachstum der vier untersuchten Hefestämme in SDAP-Medium bei 100 mM KCl, pH 6,5 und 0,2 mM CaCl_2 . Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

Aus Abbildung 3.4 ist erkennbar, dass alle vier Stämme in 100 mM KCl ein sehr gutes Wachstum zeigten. Die Unterschiede sowohl in der Geschwindigkeit der Zunahme der optischen Dichte der Zellkultur als auch in der nach ca. 48 Stunden erreichten Zelldichte waren gering. PLY232-pFI61 erreichte mit einer OD von 2,6 einen höheren Wert als die

drei anderen Stämme, deren OD₆₀₀ nach 48 Stunden zwischen 1,8 (PLY246-pFI61) und 2,2 (PLY246-TPK4) lag. Dieses Ergebnis ist mit dem Wachstum auf Platte (Abbildung 3.3) gut vergleichbar.

Zur übersichtlicheren Darstellung wurde an die Datenpunkte für jeden einzelnen Stamm eine sigmoide Kurve (durchgezogene Linie) angepasst, die durch folgende Gleichung beschrieben wird:

$$Y = K_0 + K_1 / [1 + \exp(-(t-K_2) / K_3)]$$

Dabei ist Y die optische Dichte bei 600 nm und t die Inkubationsdauer in Stunden.

Die Parameter K₀ – K₃ haben folgende Bedeutung:

K₀: Theoretischer Minimalwert der Funktion (OD₆₀₀)

K₁: Theoretischer Maximalwert der Funktion (OD₆₀₀)

K₂: Umkehrpunkt der Funktion (X-Koordinate in h)

K₃: Maß für die Steigung der Funktion im Umkehrpunkt (in h⁻¹)

Die Darstellung und die Kurvenanpassung erfolgte mit dem Softwarepaket IGOR-Pro. Die errechneten Werte für die einzelnen Parameter sind der Vollständigkeit wegen in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Im Medium mit geringer Kaliumkonzentration (5 mM KCl) zeigten sich deutlichere Unterschiede im Wachstum der einzelnen Stämme. PLY232-pFI61 wuchs auch hier sehr gut und erreichte nach 48 Stunden eine optische Dichte von über 2,5 (Abbildung 3.5).

Das Wachstum des Stammes PLY246-TPK4 war etwas schneller als das des Wildtypstammes PLY232-pFL61 und erreichte bereits nach etwa 30 Stunden sein Maximum, das allerdings mit einer OD₆₀₀ von 2,1 etwas geringer war als das des Wildtypstammes.

Der *KCO3* exprimierende Stamm wuchs deutlich langsamer und erreichte nach 48 Stunden auch nur eine optische Dichte von ca. 1,2. Dennoch war dieses Wachstum deutlich stärker als das der *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante mit dem leeren Vektor (PLY246-pFL61). Dieser Stamm wuchs in 5 mM KCl sehr langsam und erreichte auch nach 48 Stunden nur eine OD von etwa 0,3.

3. Ergebnisse

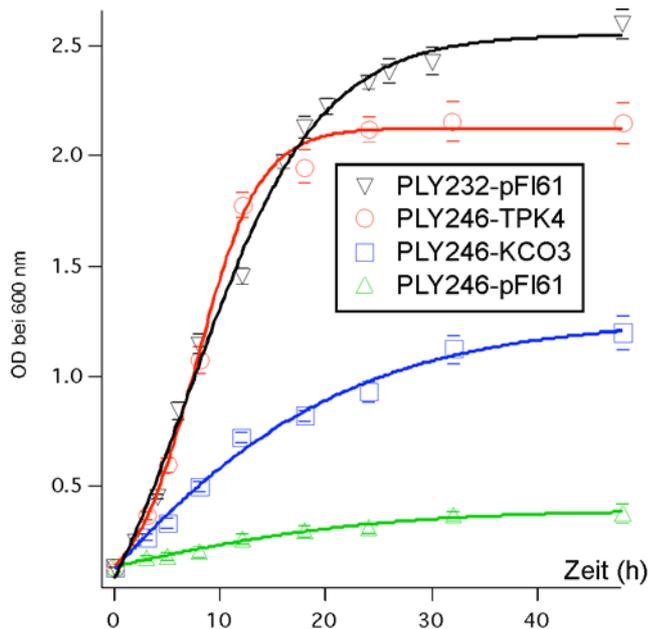


Abbildung 3.5 Wachstum in Flüssigkultur mit 5 mM KCl

Zeitlicher Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm als Maß für das Wachstum der vier untersuchten Hefestämme in SDAP-Medium in 5 mM KCl, pH 6,5 und 0,2 mM CaCl₂. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

100 mM KCl

Stamm	K ₀	K ₁	K ₂ (h)	K ₃ (h ⁻¹)
PLY246-pFI61	0,068	1,823	13,341	3,494
PLY246-KCO3	-0,061	2,093	9,900	3,768
PLY246-TPK4	0,024	2,125	7,887	2,489
PLY232-pFI61	-0,644	3,226	7,217	5,777

5 mM KCl

Stamm	K ₀	K ₁	K ₂ (h)	K ₃ (h ⁻¹)
PLY246-pFI61	-0,159	0,511	-0,514	12,531
PLY246-KCO3	-1,903	3,097	-8,172	13,808
PLY246-TPK4	-0,039	2,076	7,713	2,986
PLY232-pFI61	-0,728	3,181	6,943	6,162

Tabelle 3.1 Parameter zur Beschreibung der Daten der OD-Messung

Die Tabelle zeigt die Werte der Variablen, die das Computerprogramm „IGOR-Pro“ zur Beschreibung der Daten der OD-Messung ermittelt hat. Nähere Erklärung im Text.

Diese Unterschiede im Wachstum entsprechen den Ergebnissen der Tropftests auf Agarplatten (Abbildung 3.3). *TPK4* komplementierte die Kaliumaufnahme so gut, dass nahezu ein dem Wildtyp (PLY232-pFI61) vergleichbares Wachstum erreicht wurde. Auch die Expression von *KCO3* bewirkte eine deutliche Verbesserung der Kaliumaufnahme verglichen mit dem Deletionsstamm mit dem leeren Vektor (PLY246-pFL61). Unterhalb von 5 mM Kalium ermöglichte *KCO3* jedoch, wie schon im Tropftest zu sehen war, kein Wachstum mehr.

Die *TPK4*- und *KCO3*-vermittelte Verbesserung des Wachstums von PLY246 in Medien mit millimolaren Kaliumkonzentrationen lässt vermuten, dass sowohl Tpk4p als auch Kco3p in Hefe funktional sind. Da die beiden Genprodukte in Hefe ganz offensichtlich an der Aufnahme von Kalium aus dem externen Medium in die Zelle beteiligt sind, ist zu erwarten, dass diese beiden Ionenkanäle, wie für Tpk4p in Pflanzenzellen bereits gezeigt (Becker et al., 2004), auch in Hefe ihre Funktion im Plasmalemma ausüben.

Ganz anders als bei *KCO3* und *TPK4* bewirkte die Transformation von PLY246 mit *TPK1* keine Verbesserung des Wachstums der Deletionsmutante. Da, wie in Abbildung 3.3 ersichtlich, das Wachstumsmuster des *TPK1* exprimierenden Stammes (PLY246-*TPK1*, äußerste rechte Verdünnungsreihe) ganz ähnlich dem des Kontrollstammes PLY246-pFL61 (zweite Verdünnungsreihe von rechts) mit dem leeren Plasmid ist, liegt die Vermutung nahe, dass *TPK1* entweder nicht exprimiert wurde, oder aber das Protein Tpk1p nicht funktional war.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte in Blattmesophyllzellen von Tabak und *Arabidopsis* nachgewiesen werden, dass *Tpk1p* in der vakuolären Membran lokalisiert ist (Czempinski et al., 2002; Schönknecht et al., 2002). Die Lokalisation im Tonoplasten von Hefe wäre eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende Verbesserung des Wachstums von PLY246 in niedrigen Kaliumkonzentrationen durch die Expression von *TPK1*.

3.2.1 Lokalisation von Tpk1p im Tonoplasten von Hefe

Da *TPK1* in Pflanzenzellen offensichtlich in der vakuolären Membran exprimiert und die Expression von *TPK1* in PLY246 nicht zu einer Veränderung des kaliumabhängigen Wachstumsmusters führte, wurde versucht, das *TPK1*-Genprodukt in Hefe fluoreszenzoptisch zu lokalisieren. Dazu wurde der Hefestamm PLY246 mit dem Vektor p112A1XE, der als Insert ein Gen für ein Fusionsprotein aus Tpk1p und GFP trug, transformiert. Bei anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich eine deutliche grüne Fluoreszenz in der vakuolären Membran (Abbildung 3.6), was darauf hindeutet, dass der Kanal auch in der Hefe im Tonoplasten exprimiert. Dies erklärt, warum PLY246-*TPK1* auf niedrigen Kaliumkonzentrationen nicht besser wächst als der *trk1trk2tok1*-Deletionsstamm mit dem leeren Plasmid (PLY246-pFI61). Da Tpk1p in der vakuolären Membran lokalisiert ist und keinen Einfluss auf die Kaliumabhängigkeit der Hefestämme aufwies, wurde PLY246-*TPK1* in den folgenden Wachstumsexperimenten nicht mitgeführt.

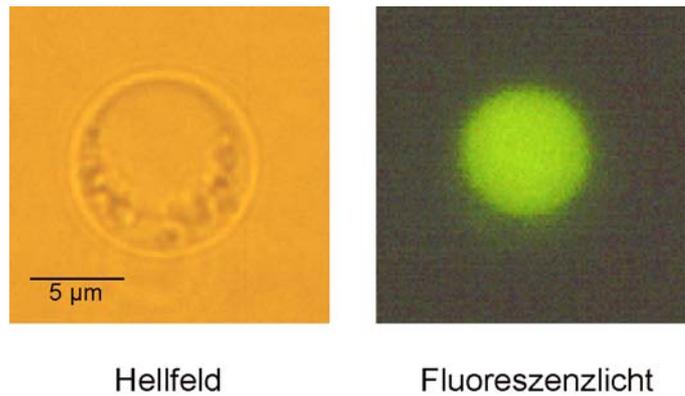


Abbildung 3.6 Lokalisation von Tpk1p im Tonoplasten von Hefe

Mikroskopische Aufnahmen eines Protoplasten des Hefestammes PLY246, transformiert mit dem Gen für ein Fusionsprotein aus Tpk1p und GFP auf dem Vektor p112A1XE, bei 1250facher Vergrößerung. Die Aufnahmen wurden mit einem Mikroskop vom Typ Axioskop (Zeiss) mit einem Ölimmersionsobjektiv (100x Neofluar, Zeiss) gemacht. Es wurde der Filtersatz FT510 (Zeiss) verwendet.

3.3 Funktionale Charakterisierung der TPK-Kanäle

3.3.1 Elektrophysiologische Identifizierung von Kco3p im Plasmalemma von Hefe

Aus den Wachstumsexperimenten (Abbildung 3.3 bis 3.5) ist ersichtlich, dass Kco3p funktional an der Kaliumaufnahme in Hefe beteiligt ist, so dass eine Lokalisation des Kanalproteins im Plasmalemma zu vermuten wäre.

Sollte dies der Fall sein, so müssten am Plasmalemma des transformierten Stamms PLY246-KCO3 Ionenströme messbar sein. Tatsächlich konnte in einigen Experimenten eine Kanalaktivität festgestellt werden, wie das Beispiel in Abbildung 3.7 zeigt. Da der Ausgangsstamm PLY246 keine derartigen Ströme aufweist, ist es sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Einzelkanalereignisse auf die Aktivität des KCO3-Genprodukts zurückzuführen sind. Die Kco3p-assoziierten Einzelkanalströme traten nur bei sehr negativen Membranspannungen (< -100 mV) auf und hatten eine Offenkanalleitfähigkeit von ungefähr 70 pS unter den gegebenen experimentellen Bedingungen. Die Kanalereignisse traten in Bursts auf und zeigten ein sehr schnelles Schalten innerhalb der Bursts. Allerdings war die Häufigkeit und die Dauer der erfolgreichen Kco3p-Messungen zu gering, um eine genauere elektrophysiologische Charakterisierung dieses Kanals durchzuführen.

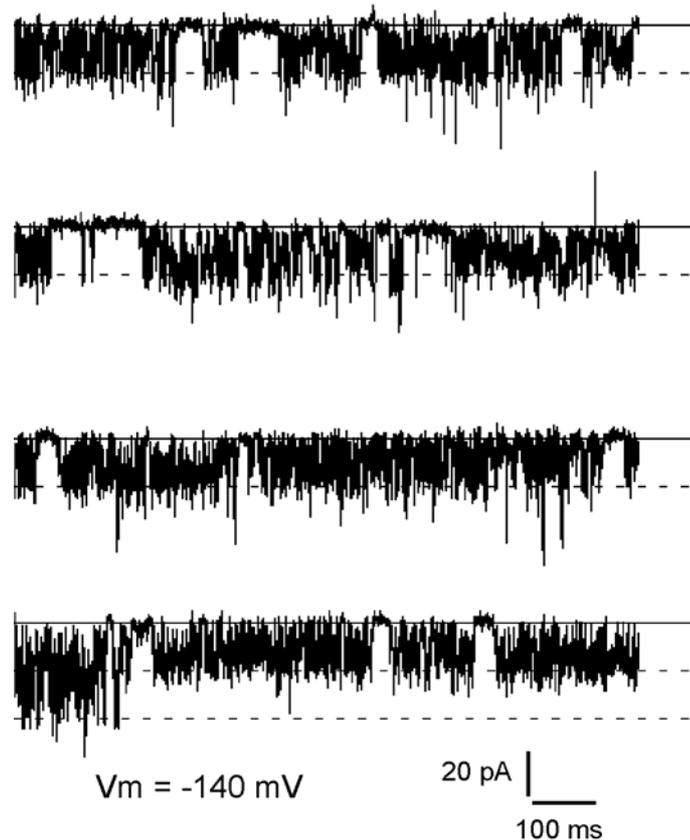


Abbildung 3.7 Einzelkanalaktivität im Plasmalemma von PLY246-KCO3

Einzelkanalereignisse im Plasmalemma von PLY246-KCO3 in Bad- und Pipettenlösung 1 bei einer Haltespannung von -140 mV. Gemessen wurde in der Whole-Cell-Konfiguration. Die durchgezogene Linie symbolisiert das Niveau, bei dem alle Kanäle geschlossen sind. Die gestrichelten Linien symbolisieren die Leitfähigkeitsniveaus für einen bzw. zwei offene Kanäle. Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet.

3.3.2 Funktionale Charakterisierung von Kco3p durch Wachstumsexperimente

Modulation von Kco3p durch monovalente Kationen

Die Funktion und Modulation von Kco3p durch externe Kationen wurde durch Wachstumsexperimente mit dem Stamm PLY246-KCO3 näher untersucht. Dazu wurden Experimente in Form von Tropftests wie in Abbildung 3.3 und in Form von Hemmhoftests durchgeführt. Um in diesen Experimenten verlässliche Informationen über die Funktion und Modulation des Ionenkanals zu erhalten, mussten die Experimente unter Bedingungen durchgeführt werden, unter denen das Wachstum des transformierten Hefestammes von der Aktivität des heterologen Ionenkanals abhängig ist.

Diese experimentellen Bedingungen sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Wie bereits in Abbildung 3.3 gezeigt, konnten in 100 mM KCl bei pH 6,5 sowohl die beiden

3. Ergebnisse

Kontrollstämme mit dem leeren Plasmid (PLY232-pFI61 und PLY246-pFI61), als auch die mit *KCO3* transformierte *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante (PLY246-KCO3) sehr gut wachsen (Abbildung 3.8, oben links). In 10 mM KCl war der Stamm PLY246-pFI61 nicht mehr in der Lage zu wachsen, während sowohl beim Wildtyp PLY232-pFI61 mit funktionalen Trk1p- und Trk2p-Kaliumaufnahmesystemen, als auch beim Stamm PLY246-KCO3 keine Beeinträchtigung des Wachstums zu beobachten war.

Ein ähnliches Wachstumsmuster wie unter limitierender Kaliumkonzentration (10 mM) war in hoher Kaliumkonzentration (100 mM) und saurem Medium (pH 3,5) zu beobachten. Bei pH 3,5 war die *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante trotz hohen Kaliumangebots nicht in der Lage zu wachsen, während sowohl Wildtyp als auch der mit *KCO3* transformierte Deletionsstamm annähernd normales Wachstum zeigten. Somit ist das Wachstum des Stammes PLY246-KCO3 sowohl in geringen Kaliumkonzentrationen (bei pH 6,5) als auch in hoher Kaliumkonzentration aber saurem Milieu von der Aktivität des *KCO3*-Genproduktes abhängig.

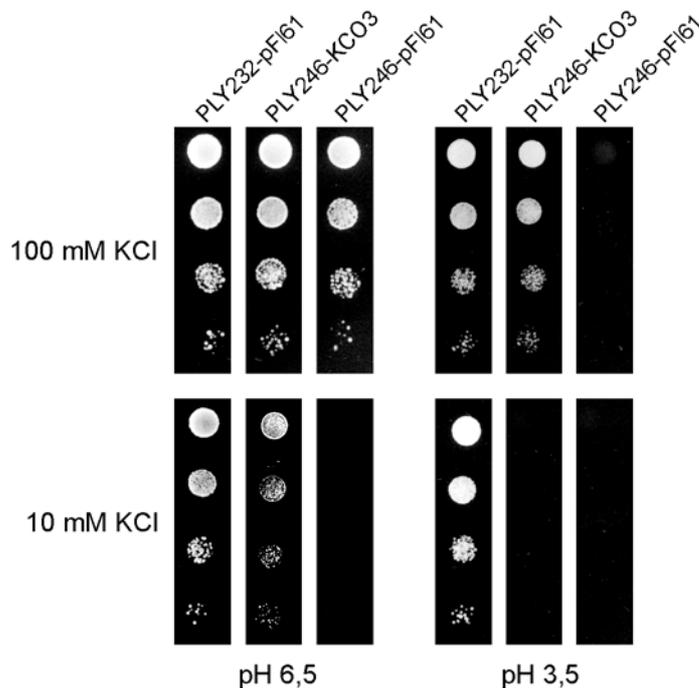


Abbildung 3.8 Wachstum bei saurem pH

Tropftest auf SDAP-Agarplatten mit 5 mM CaCl_2 und unterschiedlichem KCl-Angebot (siehe Angaben links) bzw. pH (jeweils unter der entsprechenden Spalte angegeben). Aufgetropft wurden je 7 μl einer Zellsuspension, oben beginnend mit $\text{OD}_{600} = 1,0$ und darunter die jeweiligen Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Abbildungen bei pH 6,5 (linke Spalte) stammen aus demselben Experiment wie in Abbildung 3.3. Zur besseren Übersicht werden die Tropfmuster der Stämme einzeln dargestellt, auch wenn das Wachstum jeweils auf derselben Platte erfolgte.

Die Erniedrigung der Kaliumkonzentration bei saurem pH (rechte Spalte, unten) hatte zur Folge, dass auch der Stamm PLY246-KCO3 nicht mehr wachsen konnte. Da jedoch das Wachstum des Kontrollstammes PLY232-pFI61 keinerlei Beeinträchtigung im Wachstum zeigte, muss angenommen werden, dass die Aktivität von Kco3p pH-abhängig ist.

Zur Untersuchung der Interaktion von Kco3p mit Alkalimetallkationen wurden Wachstumsexperimente mit PLY246-KCO3 in 10 mM KCl und in Anwesenheit der potentiell toxischen monovalenten Kationen Li^+ , Cs^+ und Na^+ durchgeführt. Bihler et al. (2002) konnten zeigen, dass beispielsweise 10 mM Li^+ im Außenmedium für Hefezellen toxisch ist, wenn ein Li^+ -permeables Transportsystem (Nsc1p) im Plasmalemma aktiv ist. In 5 mM CaCl_2 ist dieses nicht selektive Kationenaufnahmesystem vollständig gehemmt, was zur Folge hat, dass die *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante in 10 mM KCl nicht mehr wachsen kann (Abbildung 3.9). Sowohl der Wildtypstamm PLY232-pFI61 mit funktionalen Trk1p- und Trk2p-Kaliumaufnahmesystemen, als auch der *KCO3* exprimierende Stamm PLY246-KCO3 zeigten dagegen sehr gutes Wachstum. Das Wachstum von PLY232-pFI61 wurde weder durch 10 mM LiCl noch durch 10 mM CsCl oder 90 mM NaCl beeinflusst. Dies war auch nicht zu erwarten, da die *TRK*-Genprodukte eine hohe Affinität für Kalium zeigen und für Na^+ , Li^+ und Cs^+ nicht permeabel sind. Dagegen war das Wachstum des Stammes PLY246-KCO3, das unter diesen Bedingungen von der Aktivität des *KCO3* Genproduktes abhängt, in Gegenwart von 10 mM LiCl vollkommen und in 10 mM CsCl sehr stark gehemmt. Die Zugabe von 90 mM NaCl hatte jedoch keinen Effekt auf das *KCO3*-abhängige Wachstum.

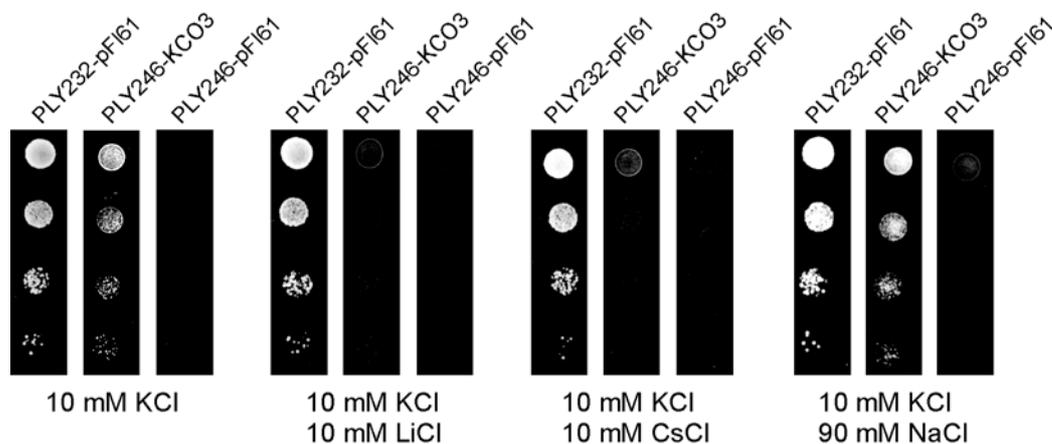


Abbildung 3.9 Wachstum in Gegenwart von Lithium, Cäsium und Natrium

Tropftests auf SDAP-Agarplatten mit unterschiedlichen Ionenverhältnissen in 5 mM CaCl_2 , pH 6,5. Aufgetropft wurden je 7 μl einer Zellsuspension, oben beginnend mit $\text{OD}_{600} = 1,0$ und darunter die jeweiligen Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Das Wachstum der Stämme erfolgte jeweils auf derselben Platte, zur besseren Übersicht werden die Tropfreihen jedoch getrennt dargestellt. Die Kontrollabbildungen in 10 mM KCl (links) stammen aus demselben Experiment wie in Abbildung 3.3.

Hemmhoftests zur Identifikation potentieller Inhibitoren von Kco3p

Hemmhoftests (Haloassays) sind gut geeignete Tests um den Einfluss mehrerer verschiedener Substanzen auf das Wachstum von Hefen oder Bakterien auf einer Agarplatte zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Dazu wird eine Suspension der Zellen in Weichagar möglichst gleichmäßig auf einer SDAP-Agarplatte der in den Abbildungen angegebenen Zusammensetzung verteilt. Nach Erstarren des Agars werden sterile Filterplättchen aufgelegt und diese mit 10 μl der zu untersuchenden sterilen Testlösung getränkt. Die Testlösung diffundiert in den Agar, und es bildet sich um das Filterplättchen ein nach außen hin abnehmender Gradient der Testsubstanz. Die Größe eines um das Filterplättchen herum entstehenden Hemmhofes ist ein Maß dafür, wie stark sich die Testsubstanz auf das Zellwachstum auswirkt. Unter den hier gewählten Wachstumsbedingungen (10 mM KCl, 5 mM CaCl_2) hängt die Kaliumaufnahme und somit das Wachstum von PLY246-KCO3 von der Funktion des heterologen Kaliumkanals ab. Die Entstehung eines Hemmhofes weist also auf eine Störung der Kaliumaufnahme über den exprimierten Kanal hin. Der Wildtyp PLY232-pFI61 wurde im Experiment als Kontrolle mitgeführt, um eine eventuelle toxische Wirkung der Testsubstanzen, die unabhängig von der Aktivität des KCO3-Genproduktes ist, identifizieren zu können.

Die nachfolgenden Abbildungen der Agarplatten wurden auf 50% ihrer Originalgröße (Originaldurchmesser 92 mm) verkleinert. Die angegebenen Durchmesser der

Hemmhöfe wurden direkt an der Platte vermessen, da die Hemmhöfe trotz hoher Auflösung und Nachbearbeitung am PC in den Abbildungen teilweise nur sehr undeutlich sind. Bei manchen der verwendeten Salzlösungen bildete sich um das Filterplättchen ein weißer Niederschlag, erkennbar als großer weißer Kreis in Abbildung 3.10. Dies war z.B. bei Lanthan (untere Reihe, jeweils rechts unten) und in geringerem Ausmaß auch bei Barium der Fall, da die Phosphate dieser Metalle schwer löslich sind.

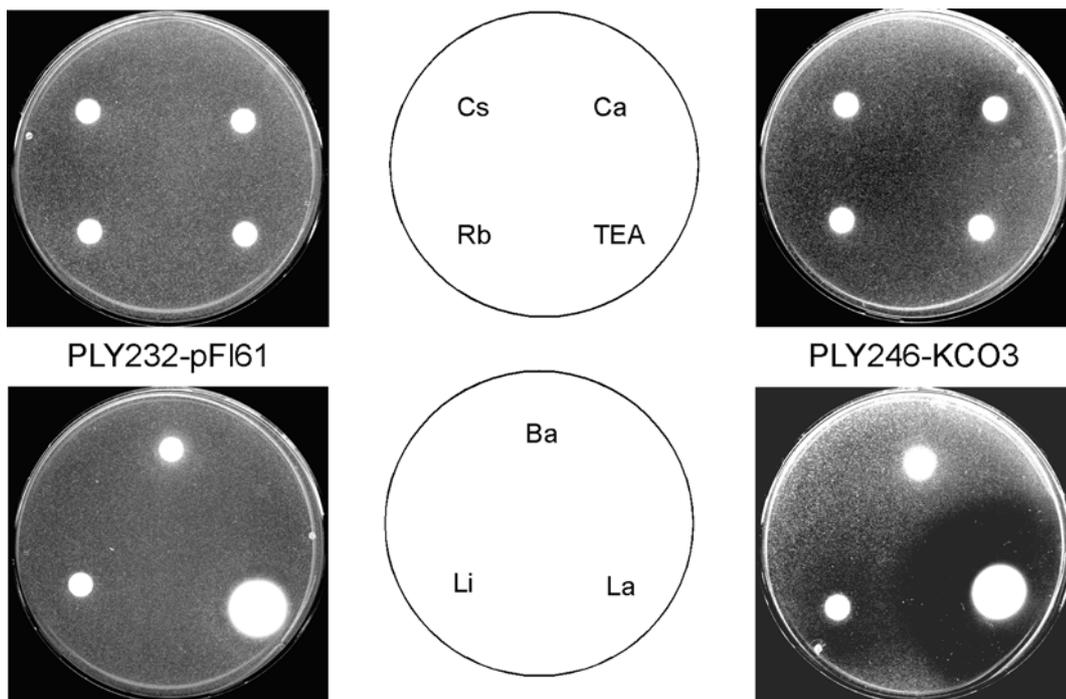


Abbildung 3.10 Hemmhofstest PLY232-pFI61 und PLY246-KCO3

Hemmhofstests auf SDAP-Agarplatten nach 72 Stunden Inkubation bei 30°C. Die Hemmlösungen wurden nach den abgebildeten Schemata aufgetropft. Ba=Bariumchlorid, Li=Lithiumchlorid, La=Lanthanchlorid, Cs=Cäsiumchlorid, Ca=Calciumchlorid, Rb=Rubidiumchlorid, TEA=Tetraethylammoniumchlorid. Die Medien enthielten 5 mM CaCl_2 und 1 mM KCl für PLY232-pFI61 bzw. 10 mM KCl für PLY246-KCO3. Die Größe der abgebildeten Platten beträgt 50% der Originalgröße.

Unter den gewählten Bedingungen zeigte keiner der getesteten potentiellen Inhibitoren einen Hemmhof auf den Agarplatten mit dem Kontrollstamm PLY232-pFL61 (Abbildung 3.10, linke Spalte). Da hier das Wachstum durch die Aktivität der *TRK*-Genprodukte bestimmt wird, diese aber durch keines der getesteten Ionen hemmbar sind, sollten auf diesen Agarplatten auch nur dann Hemmhöfe auftreten, wenn die getesteten Ionen einen unspezifischen cytotoxischen Effekt haben. Auf den Agarplatten mit dem *KCO3* exprimierenden Stamm bildete sich bei Calcium ein Hemmhof mit 2 cm Durchmesser. Bei Lithium betrug der Durchmesser des Hemmhofes 5 cm, bei Lanthan sogar 7 cm. Der dunkle Bereich um das Filterplättchen mit Rubidium (rechte Spalte, obere Platte) ist

3. Ergebnisse

ein durch den Scanvorgang entstandenes Artefakt. Auf der Originalplatte war hier kein Hemmhof erkennbar.

Die Ergebnisse der Hemmhoftests wie in Abbildung 3.10 sind in Tabelle 3.2 noch einmal numerisch dargestellt.

Stamm / Medium	Barium	Lanthan	Lithium	Cäsium	Calcium	Rubidium	TEA
PLY232-pFI61							
1 mM KCl; 5 mM CaCl ₂	0	0	0	0	0	0	0
PLY246-KCO3							
10 mM KCl; 5 mM CaCl ₂	0	7	5	0	2	0	0

Tabelle 3.2 Durchmesser der Hemmhöfe für PLY232-pFI61 und PLY246-KCO3
Angegeben ist jeweils der Durchmesser der Hemmhöfe zu Abbildung 3.10 in cm

3.3.3 Elektrophysiologische Identifizierung von Tpk4p im Plasmalemma von Hefe

Aus den Ergebnissen der Wachstumstests auf festen (Tropftests auf Agar) und in flüssigen Medien (OD_{600} -Messungen) lässt sich schließen, dass wie schon für *KCO3* gezeigt, auch *TPK4* funktional in Hefe exprimiert und die *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante komplementiert. Anders als *KCO3*, der das Wachstum der Hefemutante bis zu Kaliumkonzentrationen von etwa 5-10 mM ermöglichte, komplementierte *TPK4* die Hefemutante sogar bis zu Kaliumkonzentrationen von unter 1 mM. Wie *Kco3p* sollte daher auch *Tpk4p* im Plasmalemma lokalisiert und somit elektrophysiologisch zu identifizieren sein.

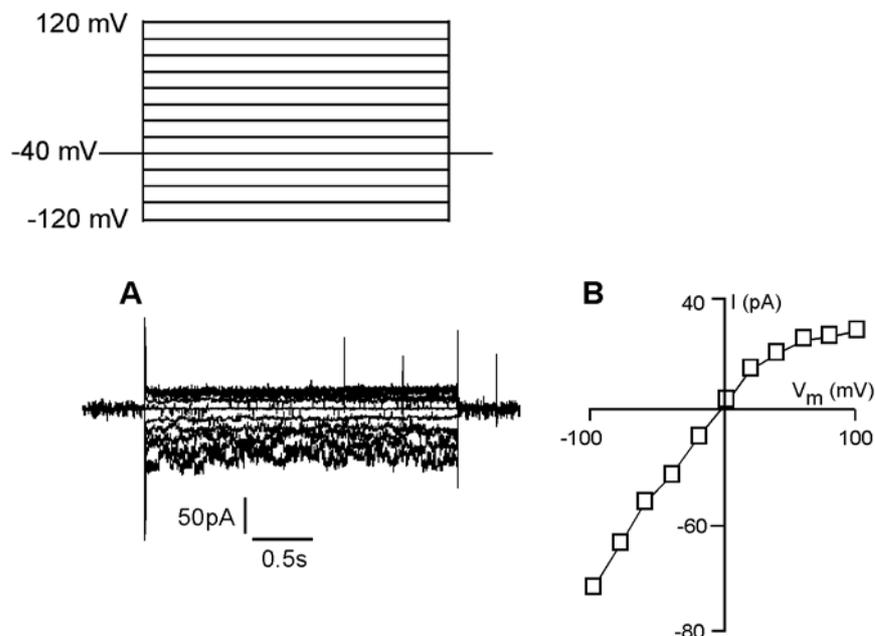


Abbildung 3.11 Kanalaktivität im Plasmalemma von PLY246-TPK4

A Stromantworten als Reaktion auf Spannungspulse von 2,5 s Dauer im Bereich von -120 mV bis 120 mV in Schritten von 20 mV. Die Haltespannung zwischen den Impulsen betrug -40 mV. Gemessen wurde in der Whole-Cell-Konfiguration mit Bad- und Pipettenlösung 1. Das verwendete Spannungsprotokoll ist links oben dargestellt.

B Strom-Spannungs-Kurve zu A

In Patch-Clamp-Experimenten an Hefeprotoplasten des *TPK4* exprimierenden Stammes PLY246-TPK4 traten in Ganzzelleableitungen deutliche Einwärtsströme auf (Abbildung 3.11 A), die bei genauer Betrachtung als diskrete Kanalereignisse mit bis zu 10 gleichzeitig aktiven Kanälen identifiziert werden konnten. Bei positiven Membranspannungen waren zwar Auswärtsströme zu beobachten, jedoch konnten diese nicht

3. Ergebnisse

als Einzelkanalereignisse in Form von diskreten Leitfähigkeitsänderungen aufgelöst werden.

Der makroskopische, mittlere Strom durch Tpk4p zeigte eine deutliche Einwärtsgleichrichtung, wie in der Strom-Spannung-Kurve in Abbildung 3.11 B zu sehen ist.

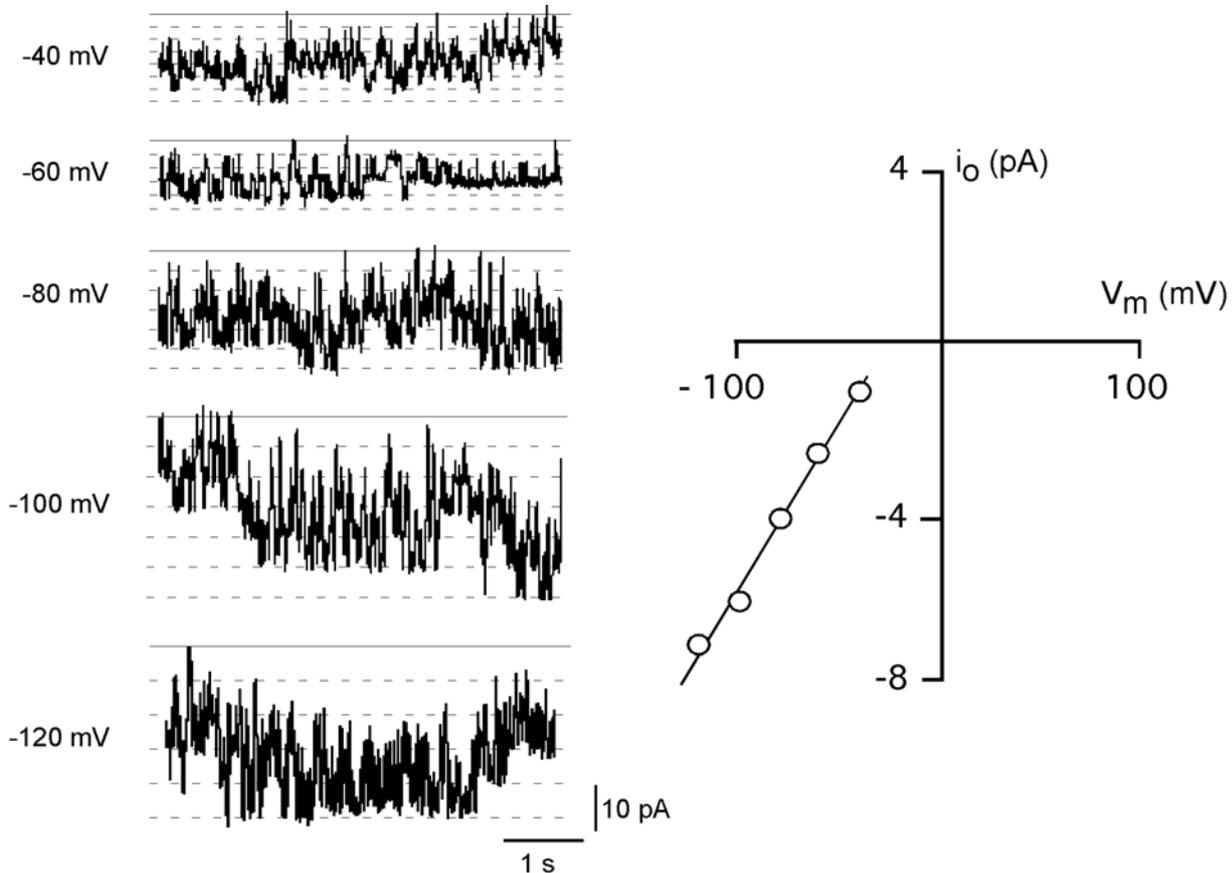


Abbildung 3.12 Einzelkanalaktivität im Plasmalemma von PLY246-TPK4

Links: Stromspuren als Reaktion auf die angegebenen Haltespannungen. Die durchgezogene Linie symbolisiert das Niveau, bei dem alle Kanäle geschlossen sind. Gemessen wurde in der Whole-Cell-Konfiguration mit Bad- und Pipettenlösung 1. Die Daten wurden bei 250 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet. Rechts ist die dazu gehörende Strom-Spannung-Kurve der Offenkanalampplituden dargestellt.

Durch Analyse der Offenkanalströme aus Stromspuren wie in Abbildung 3.12 (links) konnte im Spannungsbereich von -40 mV bis -120 mV eine lineare Strom-Spannungs-Beziehung und eine Offenkanalleitfähigkeit von Tpk4p von etwa 77 pS bestimmt werden (Abbildung 3.12, rechts). Da in diesem Spannungsbereich keine Spannungsabhängigkeit in der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals zu beobachten war, muss davon ausgegangen werden, dass die Asymmetrie (Einwärtsgleichrichtung) des makroskopischen Stroms in Abbildung 3.11 bereits durch die Strom-Spannungs-Charakteristik des Offenkanalstroms bestimmt wird. Dafür spricht auch die

Beobachtung, dass in den Stromspuren aus Abbildung 3.11 (links) nach Spannungssprüngen keine Aktivierungs-/Inaktivierungskinetik zu sehen ist.

3.3.4 Funktionale Charakterisierung von Tpk4p durch Wachstumsexperimente

Modulation von Tpk4p durch externe Kationen

Die Funktion und Modulation von Tpk4p durch externe Kationen wurde, ähnlich wie bei Kco3p, durch Wachstumsexperimente untersucht. Auch hier wurden die experimentellen Bedingungen so gewählt, dass das Wachstum des transformierten Hefestammes von der Aktivität des heterolog exprimierten Ionenkanals abhängig war.

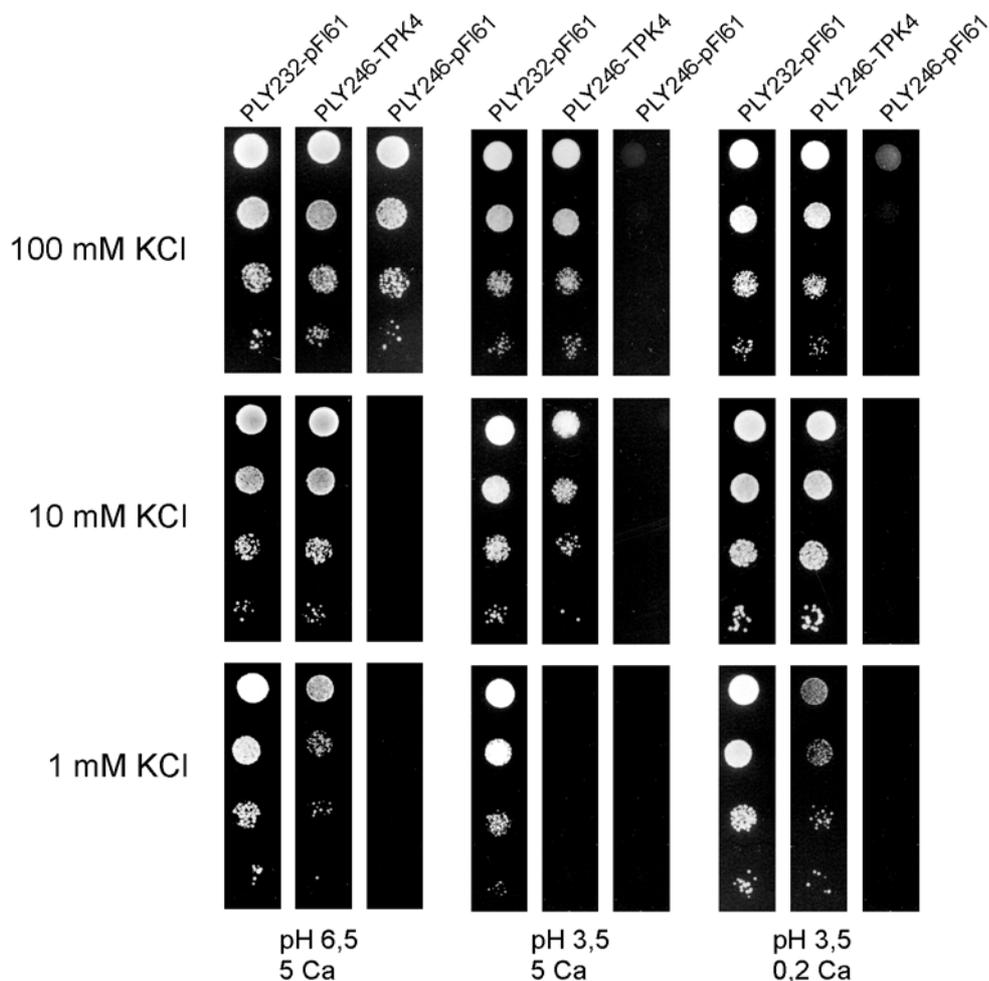


Abbildung 3.13 Effekte von Calcium und pH 3,5 auf das Wachstum

Tropftests auf SDAP-Agarplatten der angegebenen Zusammensetzungen. Aufgetropft wurden je 7 μ l einer Zellsuspension, oben beginnend mit $OD_{600} = 1,0$ und darunter die jeweiligen Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000. Das Wachstum der Stämme für 3 Tage bei 30°C erfolgte jeweils auf derselben Platte, zur besseren Übersicht werden die Tropfreihen jedoch getrennt dargestellt. Die Kontrollabbildungen bei pH 6,5 (links) stammen aus demselben Experiment wie in Abbildung 3.3.

3. Ergebnisse

Der Wildtyp (PLY232-pFI61) wuchs unter allen in Abbildung 3.13 dargestellten Bedingungen sehr gut. Weder die Ansäuerung des Mediums noch die Verringerung der Calciumkonzentration auf 0,2 mM bewirkten einen signifikanten Unterschied im Wachstum verglichen mit den Kontrollexperimenten bei pH 6,5 und 5 mM Calcium. Die Kaliumaufnahme über die funktionsfähigen TRK-Systeme war in allen drei getesteten Kaliumkonzentrationen und unabhängig vom pH-Wert oder der externen Calciumkonzentration immer ausreichend. Die *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante PLY246-pFI61 wuchs dagegen nur in 100 mM KCl und pH 6,5. Der saure pH-Wert verhinderte das Wachstum des Stammes auch in 100 mM Kalium, wie bereits in Abbildung 3.8 zu sehen war.

Der *TPK4* exprimierende Stamm PLY246-TPK4 wuchs in 100 mM KCl und in 10 mM KCl bei allen gezeigten Kombinationen aus pH-Wert und Calciumgehalt des Mediums sehr gut. Bei diesem recht hohen Kaliumangebot im Medium war die Versorgung der Zellen mit Kalium über den Ionenkanal auch bei pH 3,5 ausreichend. Auf den Platten mit 1 mM KCl verhinderte die Ansäuerung des Mediums auf pH 3,5 in Gegenwart von 5 mM Calcium aber das Wachstum dieses Stammes vollständig (Abbildung 3.13, unten in der Mitte). Da der Wildtyp (PLY232-pFI61) auch hier sehr gut wachsen konnte, kann davon ausgegangen werden, dass der saure pH-Wert einen hemmenden Einfluss auf die Kaliumaufnahme über Tpk4p besitzt, so dass bei sehr geringem Kaliumangebot keine ausreichende Kaliumaufnahme über Tpk4p mehr möglich ist. Wurde die Calciumkonzentration im Medium mit pH 3,5 jedoch auf 0,2 mM verringert (Abbildung 3.13, unten rechts), so zeigte PLY246-TPK4 auch in 1 mM KCl wieder ein Wachstum, das vergleichbar war mit dem Wachstum des Stammes im Kontrollexperiment (pH 6,5, 5 mM Calcium, 1 mM KCl). Diese Verbesserung des Wachstums von PLY246-TPK4 durch Erniedrigung der Calciumkonzentration im Medium ist ein Anzeichen dafür, dass Tpk4p durch Calcium gehemmt wird. Auf der Platte mit 1 mM KCl, 5 mM Calcium, pH 3,5 summieren sich offensichtlich die hemmenden Effekte von Calcium und saurem pH auf den Ionenkanal, so dass der *TPK4* exprimierende Stamm hier nicht mehr wachsen konnte.

In weiteren Tropftests wurde die Interaktion von Tpk4p mit Alkalimetallkationen untersucht (Abbildung 3.14). Wie auch bei den entsprechenden Experimenten zu Kco3p wurden die Bedingungen so gewählt (5 mM CaCl₂), dass eine Aufnahme der potentiell toxischen Kationen über Nsc1p nicht möglich war. Wie nicht anders zu erwarten und auch in Abbildung 3.9 bereits gezeigt, zeigte der Wildtyp PLY232-pFI61 in 10 mM KCl

keine Beeinträchtigung des Wachstums durch Lithium, Cäsium oder Natrium. In Abbildung 3.14 ist erkennbar, dass der Stamm auch in 1 mM KCl durch die Alkalikationen im Wachstum nicht sichtbar gehemmt wurde. Die Kaliumaufnahme des Stammes über die TRK-Systeme wurde offensichtlich nicht behindert.

Die Deletionsmutante PLY246-pFI61 zeigte dagegen bei den hier untersuchten Bedingungen kein Wachstum, da 10 mM KCl und 1 mM KCl für das Wachstum des Stammes in Gegenwart von 5 mM CaCl₂ nicht ausreichend waren.

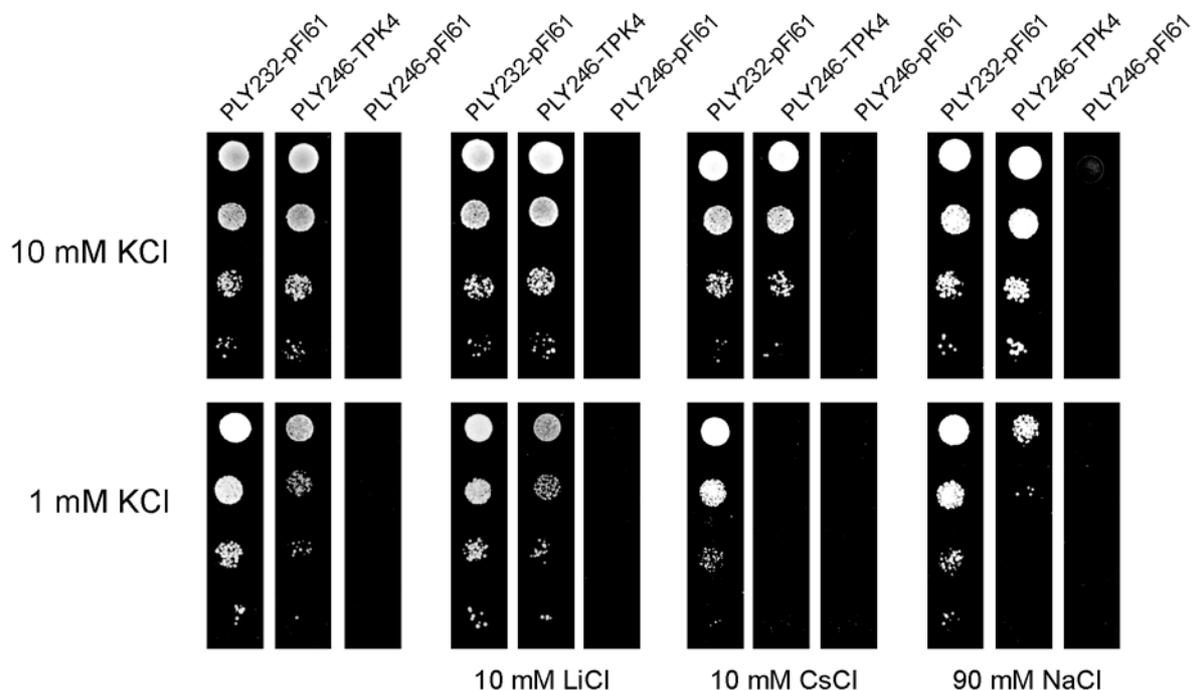


Abbildung 3.14 Wachstum in Gegenwart von Lithium, Cäsium und Natrium

Tropftests auf SDAP-Agarplatten mit unterschiedlichen Ionenverhältnissen in 5 mM CaCl₂, pH 6,5. Aufgetropft wurden je 7 µl einer Zellsuspension, oben beginnend mit OD₆₀₀ = 1,0 und darunter die jeweiligen Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000. Die Platten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert. Das Wachstum der Stämme erfolgte jeweils auf derselben Platte, zur besseren Übersicht werden die Tropfreihen jedoch getrennt dargestellt. Die Kontrollabbildungen in 10 mM KCl und 1 mM KCl (links) stammen aus demselben Experiment wie in Abbildung 3.3.

In 10 mM KCl hatten die untersuchten Kationen auf das Wachstum von PLY246-TPK4 keinen negativen Einfluss. Die Kaliumaufnahme über Tpk4p war hier auch in Gegenwart von 10 mM Li⁺, Cs⁺ oder Na⁺ immer ausreichend für ein gutes Wachstum. In 1 mM KCl bewirkte die Gegenwart von Cäsium im Gegensatz zum Wildtyp PLY232-pFI61 aber eine vollständige Hemmung des Wachstums des *TPK4* exprimierenden Stammes (Abbildung 3.14, untere Reihe, 2. Gruppe von rechts). Auch Natrium hatte in 1 mM KCl einen hemmenden Effekt auf PLY246-TPK4, der jedoch deutlich schwächer war als der von Cäsium. Lithium bewirkte im Experiment keine Hemmung der

3. Ergebnisse

Kaliumaufnahme über Tpk4p, so dass der *TPK4* exprimierende Stamm in Gegenwart von 10 mM LiCl nicht schlechter wuchs als im Kontrollexperiment.

Hemmhoftests zur Identifikation potentieller Inhibitoren von Tpk4p

Wie bereits in Abbildung 3.10 dargestellt, bewirkte keine der getesteten Substanzen einen Hemmhof bei PLY232-pFI61 (Abbildung 3.15, linke Spalte). Unspezifische cytotoxische Effekte der potentiellen Inhibitoren konnten damit ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zum Wildtyp trat beim *TPK4* exprimierenden Stamm PLY246-TPK4 sowohl bei Calcium (1,5 cm) als auch bei Cäsium (3,5 cm) ein Hemmhof auf (Abbildung 3.15, rechte Spalte, oben). Der hemmende Effekt dieser beiden Kationen auf Tpk4p konnte bereits in den Tropftests beobachtet werden (Abbildung 3.13 und 3.14). Barium hemmte das Wachstum des Stammes in einem Umkreis von 2 cm Durchmesser um das Filterplättchen, Lanthan in einem Umkreis von 3,6 cm (Abbildung 3.15, rechte Spalte, unten).

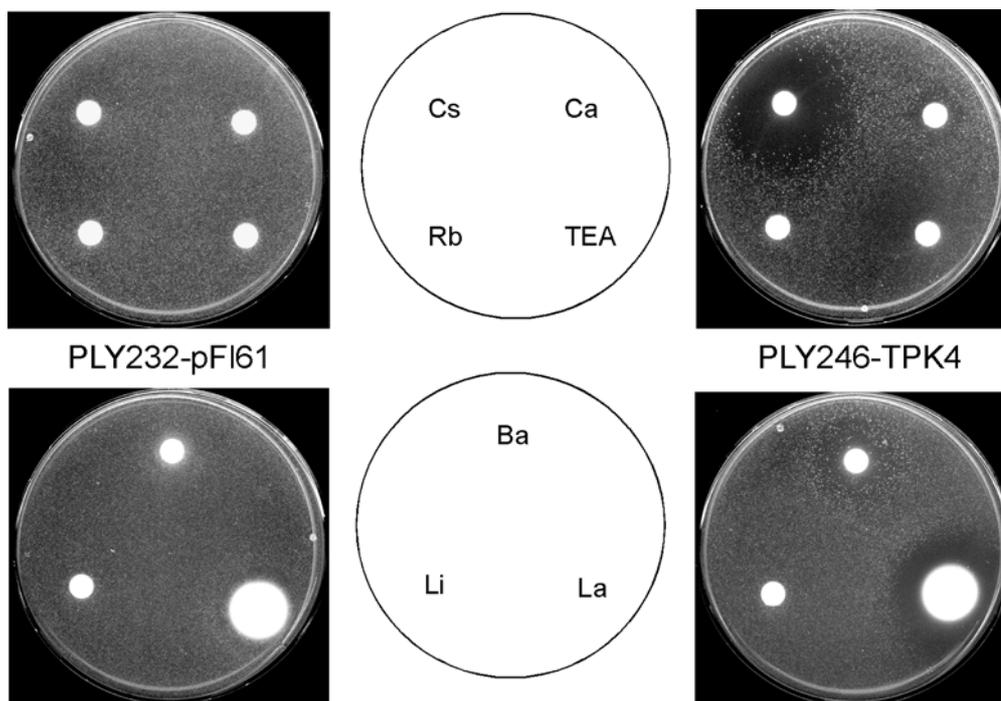


Abbildung 3.15 Hemmhoftest PLY232-pFI61 und PLY246-TPK4

Hemmhoftests auf SDAP-Agarplatten nach 72 Stunden Inkubation bei 30°C. Die Hemmlösungen wurden nach den abgebildeten Schemata aufgetropft. Ba=Bariumchlorid, Li=Lithiumchlorid, La=Lanthanchlorid, Cs=Cäsiumchlorid, Ca=Calciumchlorid, Rb=Rubidiumchlorid, TEA=Tetraethylammoniumchlorid. Die Medien enthielten 5 mM CaCl₂ und 1 mM KCl. Die Größe der abgebildeten Platten beträgt 50% der Originalgröße. Die Abbildungen zu PLY232-pFI61 entsprechen Abbildung 3.10.

Die Ergebnisse der Hemmhöftests in Abbildung 3.15 sind in Tabelle 3.3 nochmals numerisch dargestellt.

Stamm / Medium	Barium	Lanthan	Lithium	Cäsium	Calcium	Rubidium	TEA
PLY232-pFI61							
1 mM KCl; 5 mM CaCl ₂	0	0	0	0	0	0	0
PLY246-TPK4							
1 mM KCl, 5 mM CaCl ₂	2	3,6	0	3,5	1,5	0	0

Tabelle 3.3 Durchmesser der Hemmhöfe für PLY232-pFI61 und PLY246-TPK4
 Angegeben ist jeweils der Durchmesser der Hemmhöfe zu Abbildung 3.15 in cm

3.3.5 Funktionale Charakterisierung von Tpk1p im Tonoplast von Hefe

Durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *TPK1-GFP* exprimierenden Hefen (Abbildung 3.6) konnte gezeigt werden, dass Tpk1p in Hefe im Tonoplasten lokalisiert ist. Daher wurde eine Charakterisierung des Kanals in elektrischen Experimenten an Vakuolen eines *TPK1* exprimierenden Hefestammes versucht.

3.3.5.1 Elektrische Eigenschaften des Hefetonoplasten

Im Tonoplast von Hefe existiert ein von Bertl und Slayman (1990) beschriebener kationenselektiver Kanal, der als Yvc1p bezeichnet wird. Die Aktivität dieses Kanals wird beeinflusst von der Membranspannung, dem pH-Wert und dem cytosolischen Calciumgehalt. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass dieser Kanal redox-reguliert ist. Durch Zugabe von reduzierenden Reagenzien zur Badlösung erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals drastisch (Bertl und Slayman, 1990; Bihler et al., 2005).

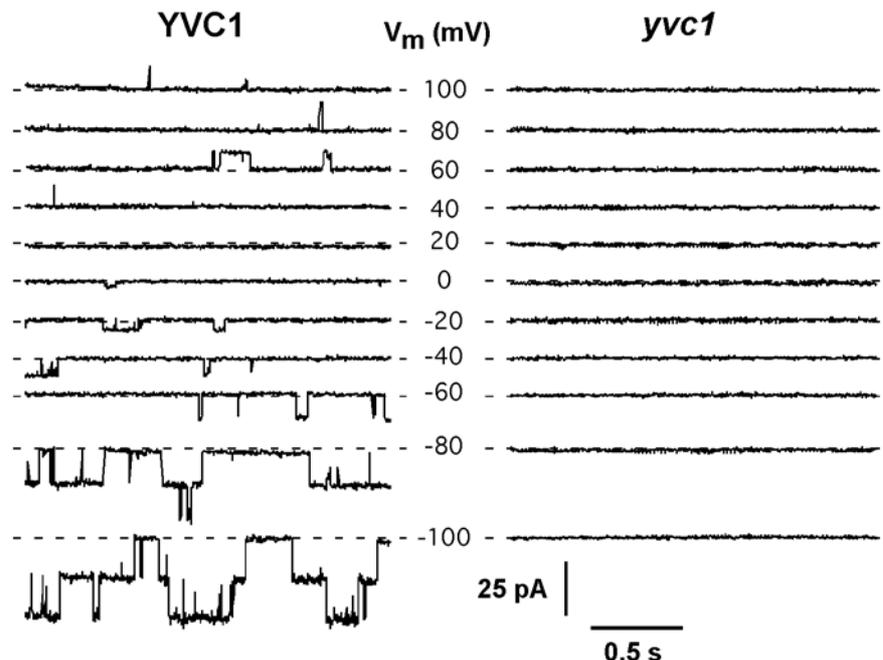


Abbildung 3.16 Einzelkanalaktivität im Hefetonoplasten

Patch-Clamp-Experimente an isolierten Vakuolen des Wildtyps YVC1 (links) und des Deletionsstammes *yvc1* (CEN.SR36-3c, rechts) bei den angegebenen Haltespannungen. Die Linien symbolisieren das Niveau, bei dem alle Kanäle geschlossen sind.

Bad- und Pipettenlösung enthielten symmetrisch 100 mM KCl, die Badlösung (entspricht der cytosolischen Seite der Membran) zusätzlich 10 μM Ca^{2+} . Die Daten wurden bei 250 Hz gefiltert.

Abbildung 3.16 zeigt Aufnahmen von Einzelkanalexperimenten an isolierten Hefevakuolen. Die Linien stellen die Grundlinie dar, bei der alle Kanäle geschlossen sind. Beim Wildtyp (YVC1) traten bei negativen Membranspannungen regelmäßig Einzelkanalereignisse auf. Bei positiven Membranspannungen waren die

Kanalereignisse sehr viel seltener zu beobachten. Die Offenwahrscheinlichkeit von Yvc1p ist bei negativer Membranspannung deutlich höher als bei positiven Spannungen, der Fluss von Ionen aus der Vakuole ins Cytosol ist also gegenüber der Gegenrichtung bevorzugt. Yvc1p zeigt somit das typische Verhalten eines Einwärtsgleichrichters mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von etwa 120 – 160 pS.

Die funktionale Charakterisierung des in der Vakuole exprimierenden Ionenkanals Tpk1p konnte nur in einem Hefestamm erfolgen, der über keinen funktionsfähigen YVC1-Kanal verfügt, da ansonsten eine Unterscheidung der durch Yvc1p bzw. Tpk1p verursachten Ströme kaum möglich gewesen wäre. Bei dem Hefestamm CEN.SR36-3c ist das für Yvc1p codierende Gen (YOR087w/088w) durch eine Insertionsmutation mit dem *HIS3*-Gen deletiert. Die untersuchten Tonoplasten dieses Stammes zeigten keine Kanalaktivität (Abbildung 3.16, rechts). CEN.SR36-3c erschien somit für die Charakterisierung von Tpk1p gut geeignet.

3.3.5.2 *TPK1* exprimiert funktional im Tonoplast von Hefe

Hefezellen des YVC1-Deletions-Stammes wurden mit dem Vektor p112A1XE, der die cDNA für Tpk1p trägt, transformiert. Das Gen steht in diesem Vektor unter der Kontrolle des ADH-Promotors, somit ist eine konstitutive Expression des Tpk1p-Proteins gewährleistet. Bei der Untersuchung von isolierten Hefevakuolen des transformierten Stammes zeigte sich in etwa 80% aller Experimente eine Kanalaktivität, die sicher auf das Produkt des *TPK1*-Gens zurückzuführen ist (Abbildung 3.17).

In manchen Vakuolen konnten bis zu acht gleichzeitig aktive Kanäle beobachtet werden. Wie aus Abbildung 3.17 ersichtlich wird, zeigt der Offenkanalstrom eine leichte Asymmetrie. Bei 60 mV beträgt die Amplitude des Offenkanalstroms etwa 2 pA, bei -60 mV beträgt sie etwa -5 pA. Die Einwärtsströme sind also größer als die Auswärtsströme. Bei 0 mV treten aufgrund der in diesem Experiment symmetrischen Ionenverteilung keine Ströme auf.

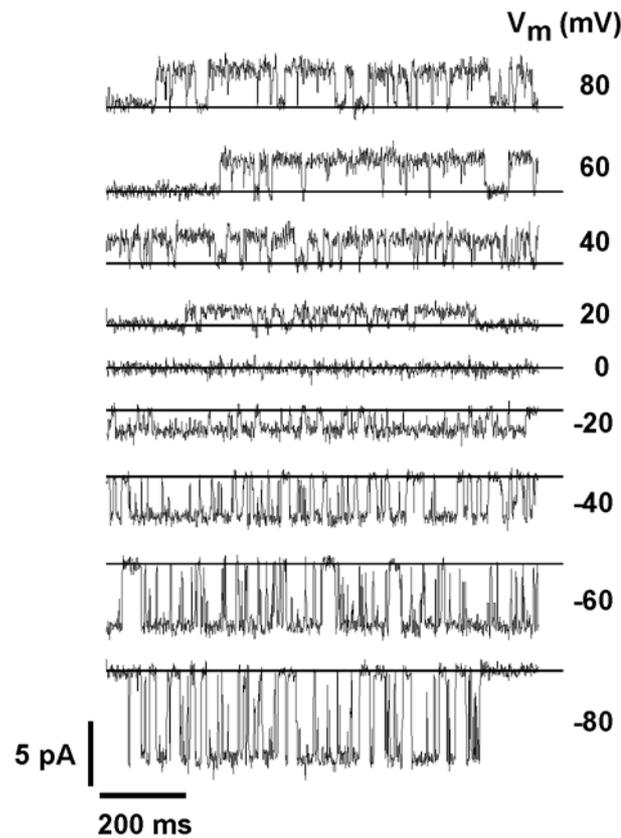


Abbildung 3.17 Funktionale Expression von *TPK1* in Hefevakuolen

Einzelkanalmessungen aufgenommen in der Whole-Vacuole-Konfiguration an Vakuolen des *ycv1*-Deletionsstammes nach der Expression von *TPK1*. Bad- und Pipettenlösung enthielten symmetrisch 100 mM KCl, die Badlösung zusätzlich 1 mM CaCl_2 . Die Daten wurden bei 250 Hz gefiltert. Die Linien symbolisieren das Niveau, bei dem alle Kanäle geschlossen sind.

Die Darstellung der Offenkanalamplituden gegen die jeweils angelegte Membranspannung ergibt für die Strom-Spannungs-Kurve eine annähernd lineare Beziehung mit einem leichten Knick im Ursprung des Koordinatensystems (Abbildung 3.18). Die Leitfähigkeit des Kanals, die jeweils der Steigung der Geraden entspricht, beträgt etwa 75 pS für Einwärtsströme und etwa 40 pS für Auswärtsströme.

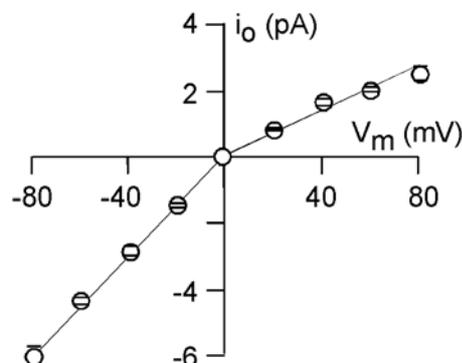


Abbildung 3.18 Strom-Spannungs-Kurve für den Offenkanalstrom

Grafische Darstellung der Offenkanalstromamplituden, aufgetragen gegen die jeweilige Membranspannung. Die Werte sind Mittelwerte aus zwölf unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar.

3.3.5.3 Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit von Tpk1p

Die vakuoläre Membran von Zellen des *TPK1* exprimierenden Stammes wurde in der Whole-Vacuole-Konfiguration auf Spannungen zwischen -80 mV und 80 mV geklemmt und die Stromspuren bei jeder Spannung für mehrere Minuten aufgezeichnet. Die Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals für die jeweilige Membranspannung erfolgte über Amplitudenhistogramme wie unter 2.6.5 beschrieben.

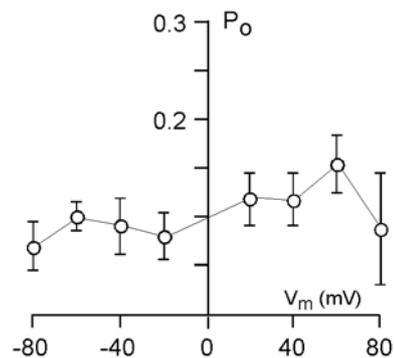


Abbildung 3.19 Offenwahrscheinlichkeit von Tpk1p

Offenwahrscheinlichkeit (P_o) des Kanals bei verschiedenen Membranspannungen, bestimmt durch Amplitudenhistogramme. Die Werte sind gemittelt aus 12 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar.

Wie Abbildung 3.19 demonstriert, wurde aus den Experimenten keine klare Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von der Membranspannung ersichtlich.

Durch Multiplikation der Offenwahrscheinlichkeit mit der Amplitude des Offenkanalstromes (Abbildung 3.18) der entsprechenden Spannung erhält man die Strom-Spannungs-Kennlinie des mittleren Stromes für den Kanal (Abbildung 3.20). Der mittlere Strom durch Tpk1p zeigt keine gleichrichtenden Eigenschaften, es wird also keine Flussrichtung für den Strom bevorzugt. Somit ergibt sich im Bereich von -60 mV bis $+60$ mV eine lineare Beziehung zwischen mittlerem Strom und der Membranspannung. Anhand dieser Kurve lässt sich eine Aussage über die Größe des makroskopischen Stromes machen, der bei einer bestimmten Membranspannung durch eine Population von n Kanälen fließt. Hierzu wird der mittlere Strom bei der betrachteten Membranspannung mit der Anzahl der Kanäle multipliziert. In einem Experiment an einer Vakuole mit 1000 Tpk1p-Kanälen würde man bei einer Haltespannung von 60 mV also einen makroskopischen Strom von etwa $0,3$ nA erwarten.

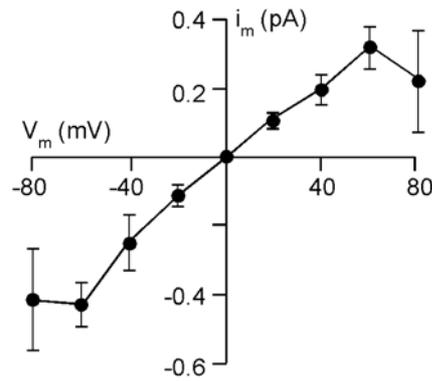


Abbildung 3.20 Beziehung zwischen mittlerem Strom (i_m) und der Membranspannung

Der mittlere Strom durch den Kanal ist das Produkt aus Offenkanalstrom und Offenwahrscheinlichkeit der entsprechenden Membranspannung.

3.3.5.4 Calciumabhängigkeit von Tpk1p

Tpk1p besitzt im C-terminalen Bereich des Proteins zwei als EF-Hände bezeichnete Strukturen, die die Fähigkeit besitzen, Calciumionen zu binden. Eine Regulation bzw. Beeinflussung von Tpk1p durch die Calciumkonzentration des Milieus erschien somit wahrscheinlich. Um die Frage zu klären, welchen Effekt Calcium auf Tpk1p hat, wurden elektrophysiologische Experimente an Tonoplasten des *TPK1*-exprimierenden Hefestammes durchgeführt und dabei die Calciumkonzentration in der Badlösung (cytosolische Seite der Membran) variiert. Die Haltespannung betrug -60 mV.

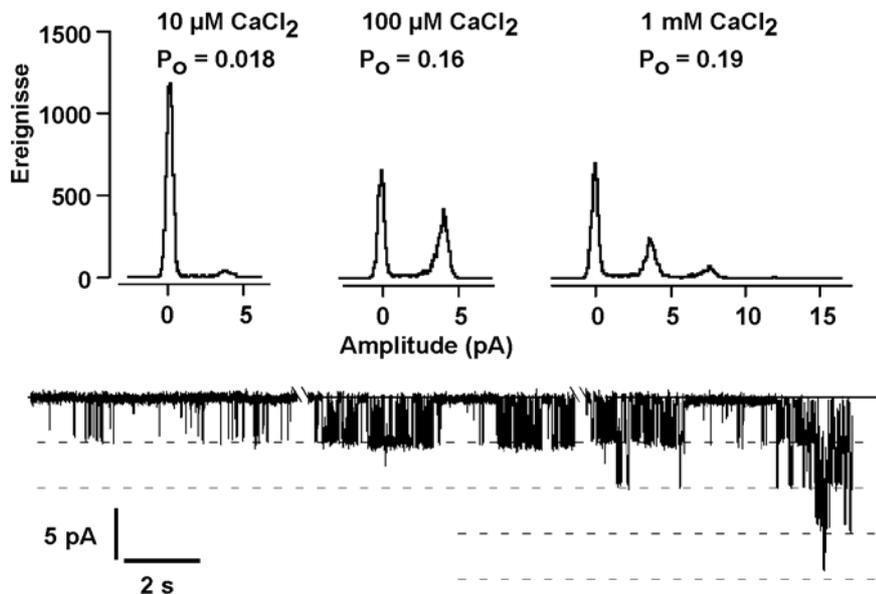


Abbildung 3.21 Die Aktivität von Tpk1p wird moduliert durch Calcium

Unten: Einzelkanalmessungen aufgenommen in der Whole-Vacuole-Konfiguration an Vakuolen von CEN.SR36-3c-TPK1 bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen in der Badlösung (siehe ganz oben). Die Haltespannung war -60 mV, die Kaliumkonzentration betrug symmetrisch 100 mM. Die Daten wurden bei 100 Hz gefiltert und aufgezeichnet mit 1 kHz.

Oben: Amplitudenhistogramme zu den entsprechenden Experimenten und die daraus errechnete Offenwahrscheinlichkeit.

Es ist erkennbar, dass die Offenwahrscheinlichkeit von Tpk1p mit steigender cytosolischer Calciumkonzentration ansteigt (Abbildung 3.21). Bei 10 μM Ca^{2+} in der die Messküvette durchlaufenden Badlösung zeigte sich nur eine sehr schwache Kanalaktivität. Das Amplitudenhistogramm, das die Summe aller Ereignisse bei einer bestimmten Stromamplitude wiedergibt, zeigt für diese Calciumkonzentration einen deutlichen Gipfel bei 0 pA, die Kanäle lagen hier also fast ausschließlich im geschlossenen Zustand vor. Die errechnete Offenwahrscheinlichkeit beträgt 0,018, also weniger als 2%. Nach Änderung der Calciumkonzentration der Badlösung auf 100 μM wurde einige Minuten gewartet und erneut die Kanalaktivität bei -60 mV bestimmt. Im Amplitudenhistogramm sind nun zwei Gipfel bei 0 und ca. 4 pA zu erkennen. Die Anzahl der Kanäle, die sich im offenen Zustand befanden, ist also gestiegen. Es errechnet sich eine Offenwahrscheinlichkeit von 0,16. Bei 1 mM Ca^{2+} sind in der Stromspur bis zu vier gleichzeitig geöffnete Kanäle erkennbar. Im Amplitudenhistogramm zeigen sich drei deutliche Gipfel bei 0, 4 und 8 pA. Für diese Bedingungen lässt sich eine Offenwahrscheinlichkeit von 0,19 berechnen.

Das Experiment demonstriert eine starke Abhängigkeit der Aktivität von Tpk1p von der Verfügbarkeit freier Ca^{2+} -Ionen auf der cytosolischen Seite der vakuolären Membran.

3.3.5.5 Selektivität von Tpk1p

Die Selektivität für bestimmte Ionen ist eine grundlegende Eigenschaft eines Ionenkanals, die meist bedingt wird durch spezielle Strukturen im Kanalprotein. Sie kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Tpk1p besitzt in beiden Porenloops die charakteristische Signatursequenz für Kaliumkanäle (GYGD), daher sollte die Permeabilität des Kanals für Kalium deutlich höher sein als für andere Kationen.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden elektrophysiologische Experimente an Vakuolen des *TPK1* exprimierenden Hefestammes durchgeführt. Dabei wurde sowohl in der Badlösung als auch - in einem zweiten Experiment - in der Pipettenlösung Kalium durch Natrium ersetzt. In symmetrisch 100 mM KCl ließen sich sowohl Einwärts- als auch Auswärtsströme beobachten (Abbildung 3.22 A).

Bei Versuchsbedingungen mit 100 mM KCl in der Pipette, was der vakuolären Seite der Membran entspricht, und 100 mM NaCl in der Badlösung (auf der cytosolischen Seite) konnten bei positiver Membranspannung keine (von Na^+ -Ionen) getragenen Auswärtsströme beobachtet werden. Bei negativen Spannungen traten jedoch deutliche

3. Ergebnisse

(von K^+ -Ionen getragene) Einwärtsströme auf (Abbildung 3.22 B). Diese einwärts gerichteten Ströme konnten auch bei einer Haltespannung von 0 mV beobachtet werden, wobei hier allein der chemische Gradient die treibende Kraft für den Durchtritt der Ionen durch den Kanal war.

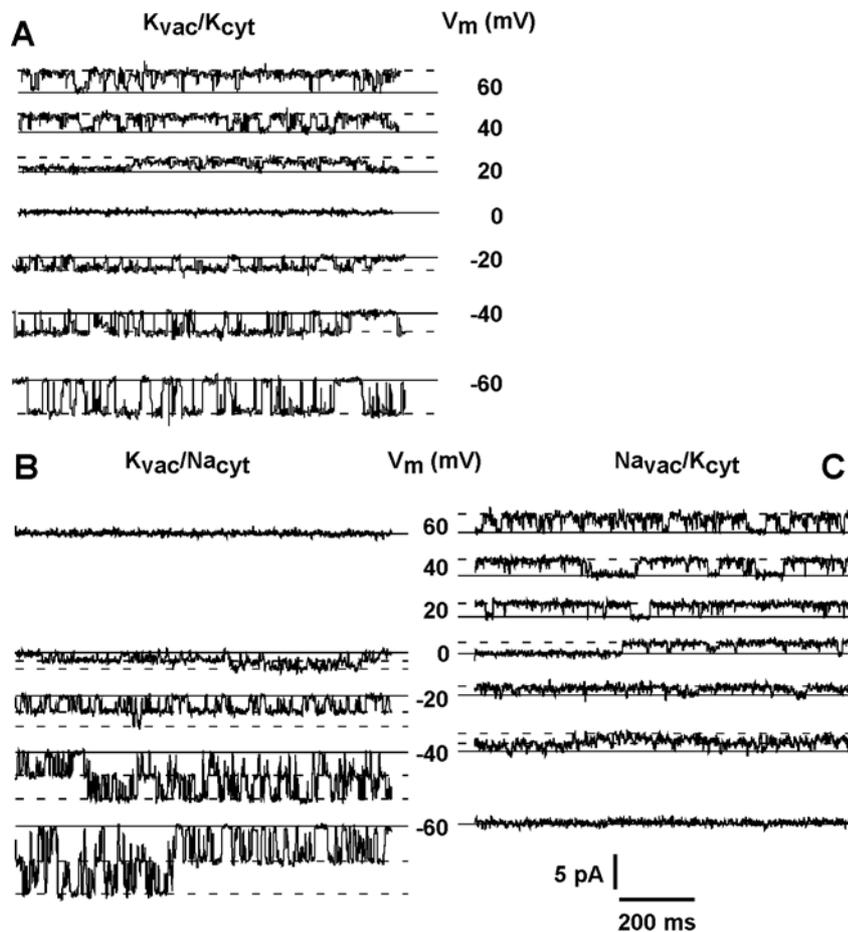


Abbildung 3.22 Selektivität von Tpk1p für K^+ gegenüber Na^+

Einzelkanalableitungen an Vakuolen des *TPK1* exprimierenden Hefestammes bei unterschiedlichen Ionenverhältnissen. Die Badlösungen enthielten jeweils zusätzlich 1 mM $CaCl_2$. Die Daten wurden bei 100 Hz gefiltert.

- A** Mit symmetrisch 100 mM KCl waren sowohl Einwärts- als auch Auswärtsströme messbar.
- B** Mit 100 mM KCl auf der vakuolären Seite der Membran und 100 mM NaCl auf der cytosolischen Seite traten nur Einwärtsströme auf.
- C** Mit 100 mM KCl auf der cytosolischen Seite und 100 mM NaCl auf der vakuolären Seite waren nur Auswärtsströme messbar.

Wurden die Ionenverhältnisse umgekehrt (NaCl in der Pipette und KCl in der Badlösung, Abbildung 3.22 C) konnten bei Spannungen von -40 mV bis 60 mV nur Auswärtsströme beobachtet werden.

Bei keiner der ausgewählten Versuchsbedingungen war ein Na^+ -Fluss durch Tpk1p zu beobachten. Dieses Ergebnis spricht für eine starke Selektivität des Kanals für Kalium gegenüber Natrium. Auch die Strom-Spannungs-Kurven für diese Experimente in Abbildung 3.23 verdeutlichen diese Kanaleigenschaft. Im untersuchten Bereich von

–60 mV bis +60 mV kommt es bei beiden Ionenverteilungen nicht zu einem Vorzeichenwechsel der Offenkanalströme.

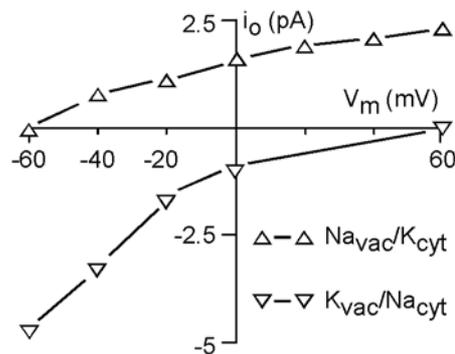


Abbildung 3.23 Selektivität von Tpk1p: Strom-Spannungs-Kurven

Grafische Darstellung der Offenkanalströme aus Abbildung 3.22 B und C gegen die entsprechende Membranspannung für die beiden Experimente.

3.3.5.6 Modulation von Tpk1p durch 14-3-3 Proteine

Die Untereinheiten des Ionenkanals besitzen am N-terminalen Ende eine mögliche Bindestelle für 14-3-3-Proteine. Um eine eventuelle Modulation des Kanals durch 14-3-3-Proteine zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Experimente an isolierten Vakuolen des *TPK1* exprimierenden Stammes in Gegenwart von zwei verschiedenen GRFs (General Regulating Factor) aus *A. thaliana* durchgeführt. Die Proteine Grf1p (14-3-3 χ) und Grf6p (14-3-3 λ) wurden mir freundlicherweise von Dirk Becker, Würzburg, zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen der beiden Proteine finden sich im Anhang.

Abbildung 3.24 zeigt die Einzelkanalableitung eines repräsentativen Experimentes. Zu Beginn traten nur gelegentliche Kanalereignisse auf ($P_o = 0,005$), doch bereits etwa 30 Sekunden nach Zugabe einer Lösung von Grf6p zur Badlösung (Endkonzentration ca. 150 nM) stieg die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals deutlich an. Zwei Minuten nach Zugabe des Proteins öffneten bis zu fünf Kanäle gleichzeitig.

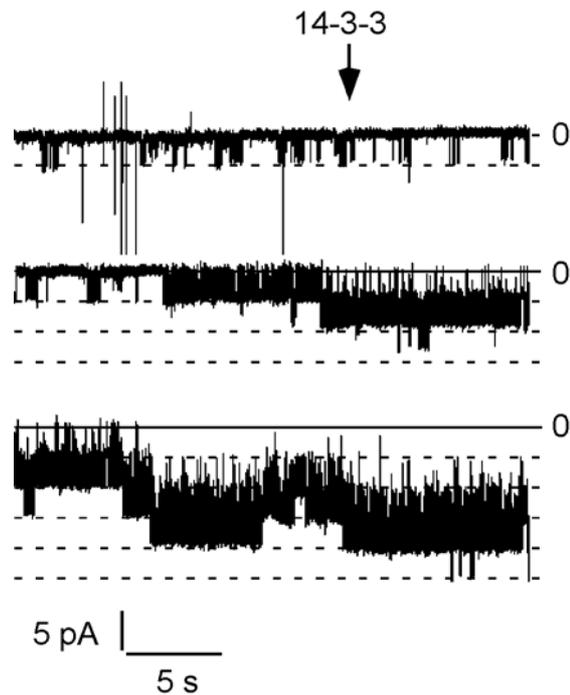


Abbildung 3.24 Modulierung der Kanalaktivität durch Grf6p

Einzelkanalspuren eines repräsentativen Experimentes in der Whole-Vacuole-Konfiguration an einer isolierten Vakuole des *TPK1* exprimierenden Stammes mit Bad- und Pipettenlösung 2. Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Zugabe von Grf6p, die Endkonzentration des Proteins in der Badlösung betrug ca. 150 nM. Die Haltespannung betrug -60 mV. Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert.

Diese starke Erhöhung der Aktivität von Tpk1p verdeutlicht auch die grafische Darstellung der Offenwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Zeit nach Zugabe von Grf6p in Abbildung 3.25. Vor Zugabe des Proteins lag die Offenwahrscheinlichkeit unter 0,01, erreichte einige Minuten danach jedoch Werte zwischen 0,5 und 0,6. Durch die Zugabe von Grf6p (14-3-3 λ) erhöhte sich die Offenwahrscheinlichkeit von Tpk1p also auf das 60-fache des Ausgangswertes.

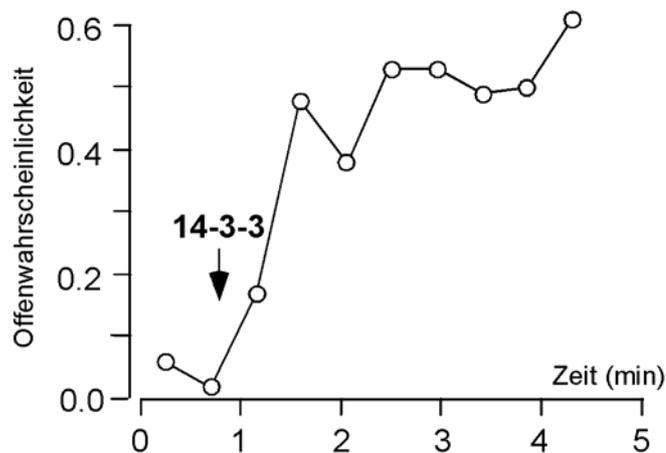


Abbildung 3.25 Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit durch Grf6p

Darstellung der Offenwahrscheinlichkeit aus Abbildung 3.25 in Abhängigkeit der Zeit nach Zugabe von 14-3-3-Protein. Jeder Datenpunkt repräsentiert die durchschnittliche Offenwahrscheinlichkeit während 27 Sekunden. Die Offenwahrscheinlichkeit wurde über Amplitudenhistogramme bestimmt.

Die Zugabe von Grf1p (14-3-3 χ) bewirkte in keinem von fünf durchgeführten Experimenten eine Änderung der Offenwahrscheinlichkeit. Der Kanal scheint folglich zwischen den beiden Proteinen unterscheiden zu können.

3.4 Kanalaktivität im Tonoplast von *Arabidopsis thaliana*

Tpk1p ist in Pflanzen und auch in Hefe im Tonoplast lokalisiert. Schönknecht et al. diskutieren eine Beteiligung von Tpk1p am sogenannten SV-Kanal pflanzlicher Tonoplasten. Dieser Kanal aktiviert langsam bei einer Depolarisierung der Membran. Er wird durch hohe cytosolische Calciumkonzentrationen und durch die Gegenwart reduzierender Reagenzien aktiviert. SV-Kanäle werden durch eine Ansäuerung des Cytoplasmas inaktiviert (Pottosin et al., 2001). Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Tpk1p und SV-Kanal darstellen zu können, erfolgte eine funktionale Charakterisierung des SV-Kanals im Tonoplast von *Arabidopsis*.

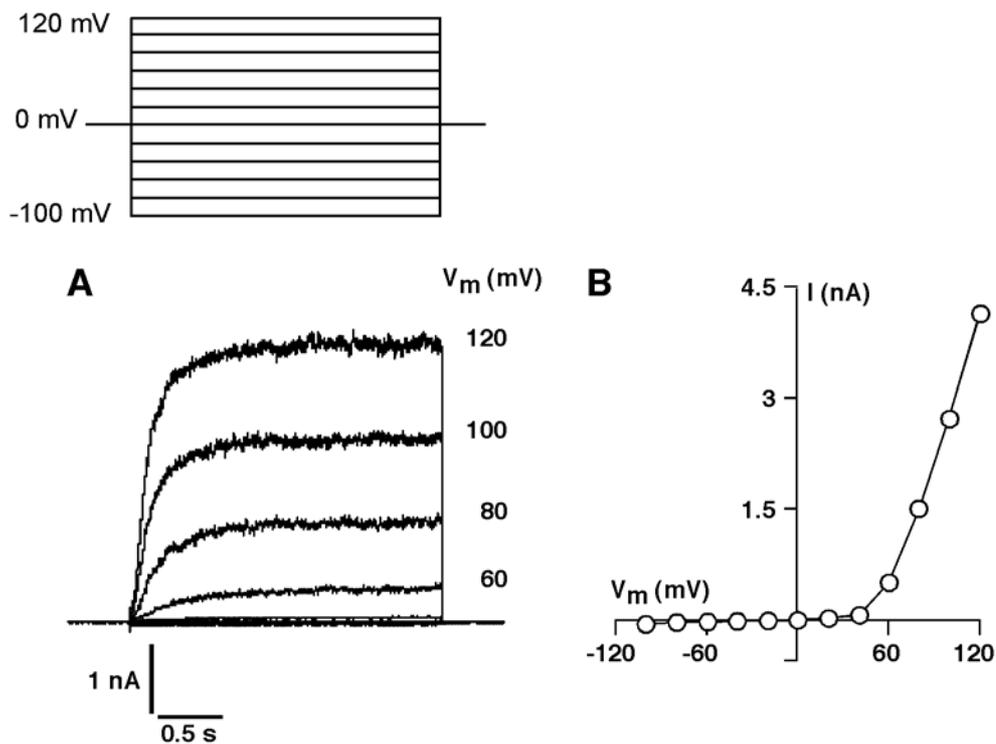


Abbildung 3.26 Typische SV-Kanal-Aktivität in der Membran pflanzlicher Vakuolen

A Makroskopische SV-Kanal-Ströme, gemessen an einer isolierten Vakuole aus Mesophyllzellen von Wildtyp-*Arabidopsis* (Columbia-0) als Antwort auf Spannungspulse von 2,5 s Dauer in Bad- und Pipettenlösung 3. Die Haltespannung zwischen den Spannungspulsen betrug 0 mV. Das Spannungsprotokoll ist links oben dargestellt. Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet.

B Makroskopische Strom-Spannungs-Kurve für das Experiment in A. Die Abbildung zeigt die über die letzten 150 ms des Spannungspulses gemittelten Gleichgewichtsströme aufgetragen gegen die jeweilige Membranspannung.

Die Abbildung 3.26 zeigt die Ergebnisse eines Patch-Clamp-Experimentes an isolierten Vakuolen aus Mesophyllzellen von *A. thaliana*. Hierbei konnte bei positiven Spannungen der für SV-Kanäle typische, langsam aktivierende Strom beobachtet

werden (Abbildung 3.26 A). Die Zeitkonstante der Aktivierung betrug etwa 150 ms bei +120 mV. Sehr deutlich zeigte sich der auswärts-gleichrichtende Charakter des Kanals darin, dass bei negativen Spannungen praktisch kein Strom floss. Abbildung 3.26 B zeigt die zugehörige Strom-Spannungs-Kurve, in der die Gleichgewichtsströme gegen die entsprechende Membranspannung aufgetragen sind. Auch diese Darstellung verdeutlicht, dass im Bereich von -100 mV bis +120 mV keine relevanten Einwärtsströme auftraten.

Durch rasches Zurückziehen der Messpipette wurde aus der Membran ein kleiner Fleck (Patch) isoliert. Die viel geringere Anzahl von Kanälen in der kleineren Fläche ermöglichte die Beobachtung der Aktivität einzelner Kanäle, so dass aus diesem Experiment die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals bestimmt werden konnte. Wie aus Abbildung 3.27-A ersichtlich wird, traten sowohl bei positiven als auch bei negativen Membranspannungen Einzelkanalereignisse auf. Die Häufigkeit dieser Ereignisse war jedoch bei positiven Spannungen (bei +60 mV öffneten bis zu vier Kanäle gleichzeitig) um ein Vielfaches höher als bei negativen Spannungen. Dies deutet darauf hin, dass die Offenwahrscheinlichkeit des SV-Kanals bei negativen Membranspannungen sehr viel geringer ist als bei positiven Membranspannungen.

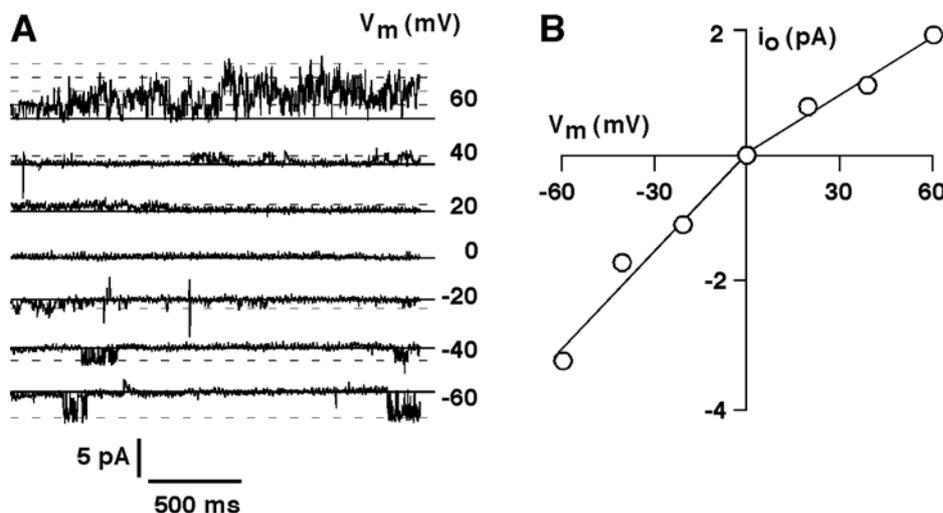


Abbildung 3.27 Einzelkanalaktivität in der Membran pflanzlicher Vakuolen

A SV-Kanal-Ströme an einem isolierten Membranpatch einer Vakuole von Mesophyllzellen aus Wildtyp-Arabidopsis, gemessen mit Bad- und Pipettenlösung 3. Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet.

B Strom-Spannungs-Kurve der Offenkanalamplituden zum Experiment aus A

Bei den gewählten symmetrischen Ionenverteilungen in diesem Experiment trat bei einer Membranspannung von 0 mV kein Strom auf. Bei 60 mV betrug die Amplitude des Einzelkanalstromes etwa 2 pA, bei -60 mV etwa -3 pA. Die grafische Darstellung der

Offenkanalströme gegen die Membranspannung führt zur Strom-Spannungs-Kurve des Einzelkanals (Abbildung 3.27-B). Aus der Steigung der Geraden kann jeweils die Leitfähigkeit des Kanals abgelesen werden, die etwa 35 pS bei positiven Spannungen und etwa 60 pS bei negativen Spannungen beträgt.

Auch wenn die Offenkanalamplitude der beobachteten Einwärtsströme größer ist als die der Auswärtsströme, bewirkt die sehr geringe Offenwahrscheinlichkeit bei negativen Membranspannungen und die sehr hohe Offenwahrscheinlichkeit bei positiven Membranspannungen die im makroskopischen Strom vorhandene Auswärtsgleichrichtung.

3.4.1 Calciumabhängigkeit des SV-Kanals

Zur Überprüfung, in wie weit die Aktivität des SV-Kanals von der cytosolischen Calciumkonzentration abhängt, wurden Patch-Clamp-Experimente an isolierten Vakuolen aus *Arabidopsis* (Wildtyp) durchgeführt und dabei die Konzentration von Ca^{2+} in der Badlösung (cytosolische Seite der Membran) variiert. Abbildung 3.28 zeigt zwei charakteristische Whole-Vacuole-Ableitungen in Badlösung ohne Calcium bzw. mit 1 mM Calcium. Im Experiment ohne freies Calcium auf der cytosolischen Seite der Membran traten nur sehr kleine makroskopische Ströme auf (Abbildung 3.28, links). Nach mehrminütiger Perfusion der Messkammer mit Badlösung, die 1 mM CaCl_2 enthielt, waren die für SV-Kanäle typischen, langsam aktivierenden Auswärtsströme zu erkennen (Abbildung 3.28, rechts). Der Gleichgewichtsstrom betrug in diesem Experiment bei 120 mV etwa 1 nA.

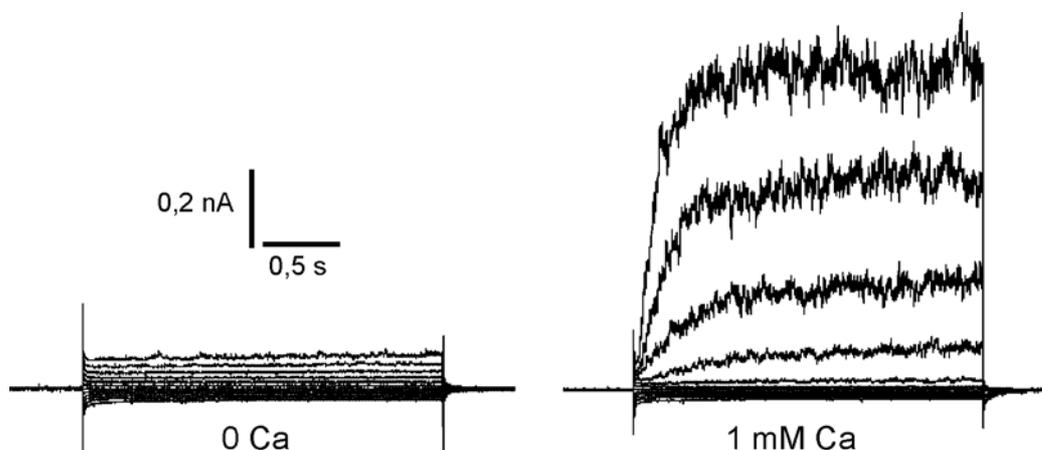


Abbildung 3.28 Modulation der SV-Kanal-Aktivität durch cytosolisches Calcium

Whole-Vacuole-Ableitungen an derselben *Arabidopsis*-Vakuole des Wildtyps in symmetrisch 100 mM KCl im Bereich von -100 bis 120 mV. Die Badlösung im rechten Experiment enthielt zusätzlich 1 mM CaCl_2 . Es wurde dasselbe Spannungsprotokoll verwendet wie in Abbildung 3.26. Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet.

3.4.2 Selektivität des SV-Kanals

Um eine Aussage über die Selektivität des Kanals machen zu können, wurden Patch-Clamp-Experimente an isolierten Membranflecken des Tonoplasten von Wildtyp-*Arabidopsis* durchgeführt. Hierbei wurden beide möglichen Orientierungen der Membran untersucht:

1. Exposition der cytoplasmatischen Seite der Membran zur Pipettenlösung (Inside-Out-Konfiguration)
2. Exposition der cytoplasmatischen Seite der Membran zur Badlösung (Outside-Out-Konfiguration)

Unter symmetrischen Ionenverhältnissen (100 mM KCl cytosolisch und vakuolär) traten bei der Ausrichtung der vakuolären Membranseite zur Badlösung bei positiven Membranspannungen die für den SV-Kanal typischen langsam aktivierenden Auswärtsströme auf (Abbildung 3.29 A, oben). Einwärtsströme waren praktisch nicht vorhanden. Nach dem Austausch von KCl in der Badlösung gegen 100 mM NaCl ergab sich nahezu dasselbe Bild, die Auswärtsströme blieben unverändert (Abbildung 3.29 A, unten). Dementsprechend sind auch die Strom-Spannungs-Kurven für die beide Ionenverhältnisse fast identisch (Abbildung 3.29 B).

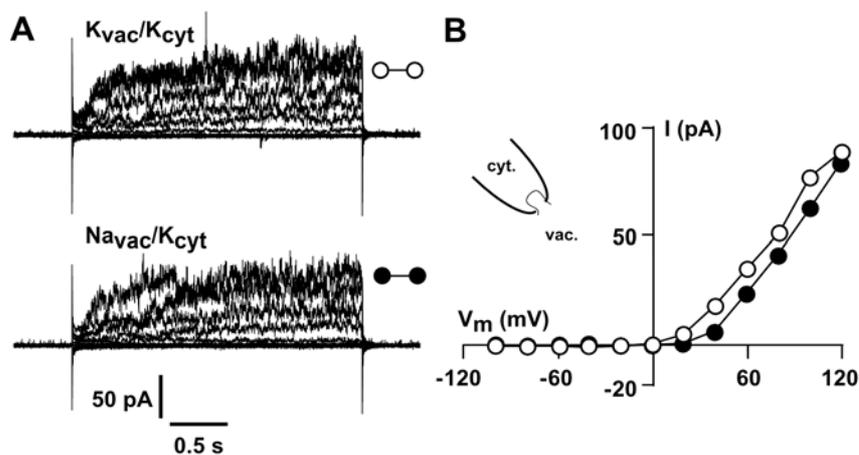


Abbildung 3.29 Selektivität des SV-Kanals in der Inside-Out-Konfiguration

A SV-Kanal-Ströme an einem isolierten Membranpatch einer Vakuole aus Mesophyllzellen von Wildtyp-*Arabidopsis*. Gemessen wurde mit 100 mM KCl in der Pipette und 100 mM KCl bzw. NaCl in der Badlösung. Die Pipettenlösung enthielt zusätzlich 1 mM CaCl_2 . Es wurde dasselbe Spannungsprotokoll wie in Abbildung 3.26 verwendet. Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet.

B Strom-Spannungs-Kurven zu den Experimenten in A

Wählt man die Konfiguration des untersuchten Membranstücks umgekehrt, erhält die cytosolische Membranseite Kontakt zur Badlösung. Bei symmetrischen Ionenverhältnissen (100 mM KCl beidseitig, Abbildung 3.30 A, oben) zeigten sich

3. Ergebnisse

Auswärtsströme, die mit denen in Abbildung 3.29 A vergleichbar sind. Wurde nun in der Badlösung KCl durch NaCl ersetzt, ergaben sich wiederum nur geringe Unterschiede in der Kinetik des Kanals oder in der Amplitude des auswärts gerichteten Gleichgewichtsstromes (Abbildung 3.30 A, unten). Dies wird auch im sehr ähnlichen Verlauf der Strom-Spannungs-Kurven (Abbildung 3.30 B) deutlich.

Natrium und Kalium können den Kanal gleich gut passieren, wobei die auswärts gerichtete Eigenschaft des Kanals für beide Ionensorten erhalten bleibt.

Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass der SV-Kanal keine Selektivität für K^+ -Ionen gegenüber Na^+ -Ionen besitzt.

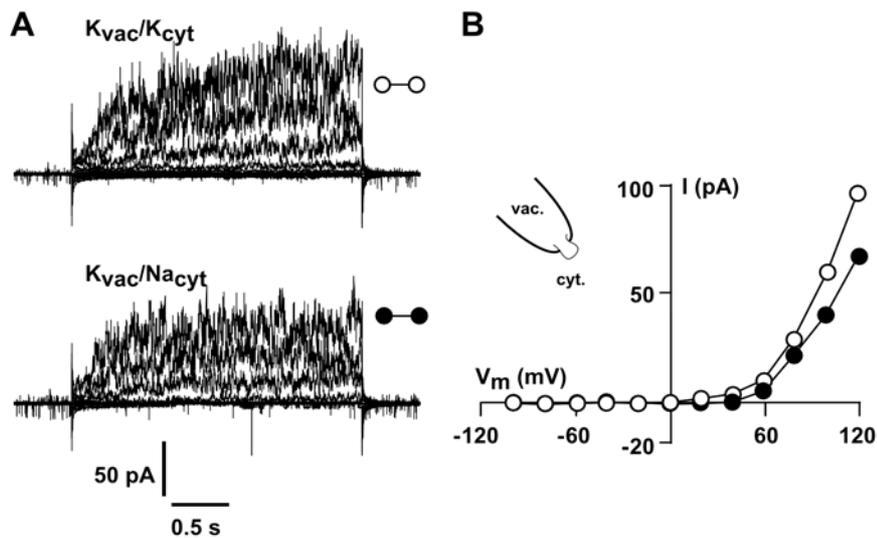


Abbildung 3.30 Selektivität des SV-Kanals in der Outside-Out-Konfiguration

A SV-Kanal-Ströme an einem isolierten Membranpatch einer Vakuole aus Mesophyllzellen von Wildtyp-*Arabidopsis*, gemessen wurde mit 100 mM KCl in der Pipette und 100 mM KCl bzw. NaCl in der Badlösung. Die Badlösung enthielt zusätzlich 1 mM $CaCl_2$. Es wurde dasselbe Spannungsprotokoll wie in Abbildung 3.26 verwendet. Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet.

B Strom-Spannungs-Kurven zu den Experimenten in A

3.5 Kanalaktivität im Tonoplast von *tpc1*-Deletionsmutanten

Ein möglicher Kandidat für das Gen, das für die SV-Kanal-Aktivität im Tonoplast von *Arabidopsis* verantwortlich sein könnte, ist *TPC1* (At4g03560). Die Topologie des von *TPC1* codierten Proteins erinnert an zwei fusionierte Untereinheiten des Shaker-Kanals. Das Protein besitzt zwei EF-Hände, was eine Beeinflussung durch Ca^{2+} sehr wahrscheinlich macht. Pflanzen einer Linie von *A. thaliana*, bei der das Gen *TPC1* durch eine Insertionsmutation deletiert wurde, wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik auf die Aktivität des SV-Kanals im Tonoplasten untersucht. Im elektrophysiologischen Experiment zeigte sich, dass in der *tpc1*-Mutante (*tpc1-2*) der typische durch die SV-Kanal-Aktivität verursachte Strom fehlt (Abbildung 3.31).

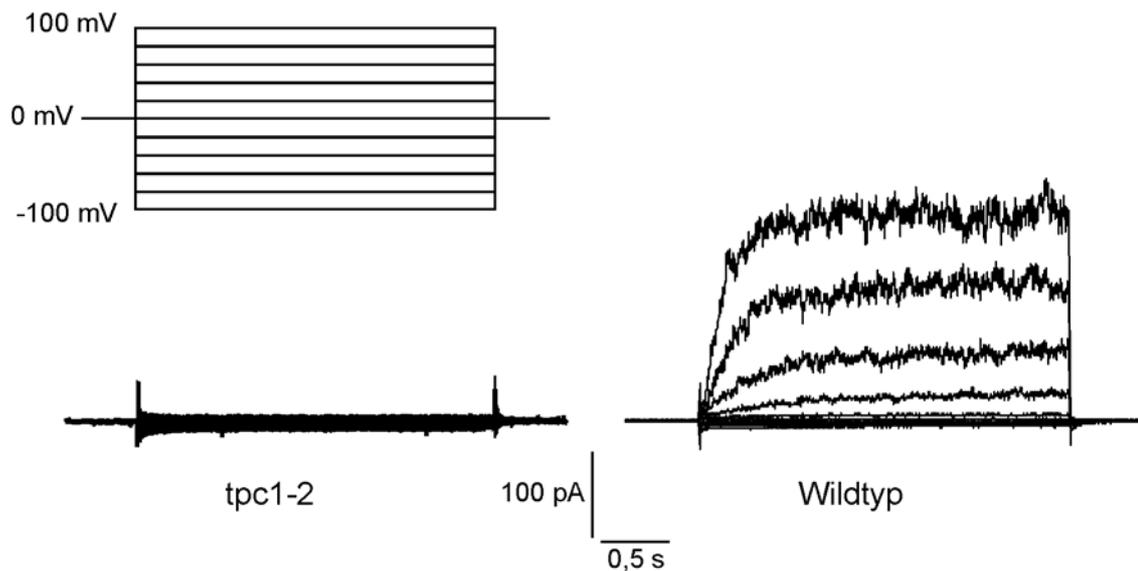


Abbildung 3.31 Keine SV-Kanal-Aktivität in *tpc1-2*

Whole-Vacuole-Ableitungen an Arabidopsis-Vakuolen der *tpc1*-Deletions-Mutante (*tpc1-2*, links) und an Columbia-0 (Wildtyp, rechts) in Bad- und Pipettenlösung 3. Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet. Das verwendete Spannungsprotokoll ist links oben dargestellt.

Während beim Wildtyp langsam aktivierende Auswärtsströme mit einer Amplitude von 350 pA bei 100 mV beobachtet werden konnten (Abbildung 3.31, rechts), war in der Deletionsmutante im vergleichbaren Experiment im Bereich von -100 mV bis 100 mV kein makroskopischer Strom erkennbar (Abbildung 3.31, links).

Bei höherer Verstärkung des Signals ließ sich bei *tpc1-2* jedoch in einigen Experimenten bei negativen Spannungen die Aktivität von Einzelkanälen beobachten. Abbildung 3.32 zeigt ein typisches Experiment.

3. Ergebnisse

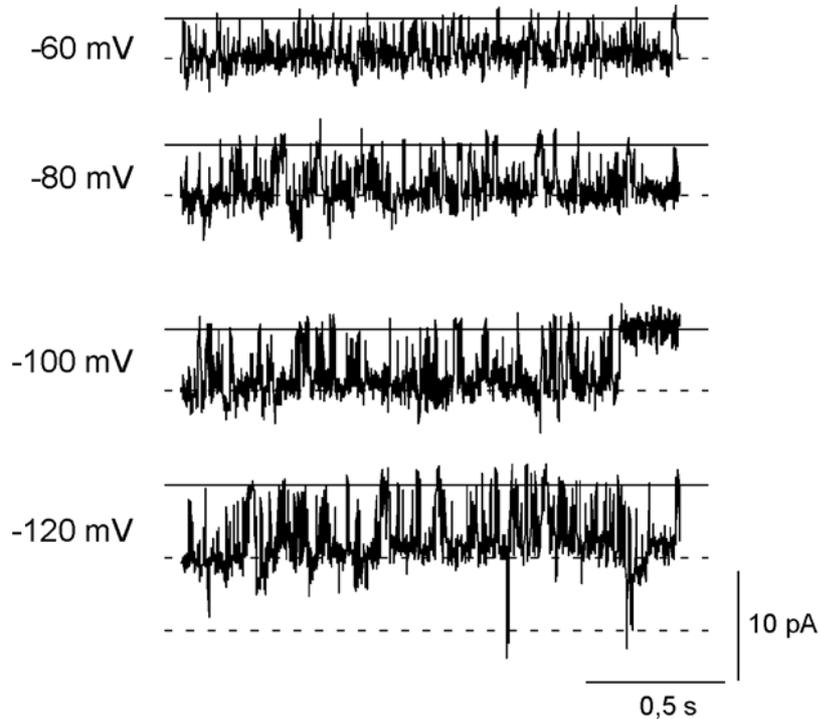


Abbildung 3.32 Einzelkanal-Aktivität in *tpc1-2*

Stromspuren in einer Whole-Vacuole-Ableitung an Arabidopsis-Vakuolen der *tpc1*-Knock-Out-Mutante (*tpc1-2*) bei verschiedenen Haltespannungen in symmetrisch 100 mM KCl. Die Badlösung enthielt zusätzlich 1 mM CaCl_2 . Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet.

Die grafische Darstellung der Stromamplituden aus Abbildung 3.32 gegen die entsprechende Membranspannung ergibt die Strom-Spannungs-Kurve für den Offenkanalstrom. Bei negativen Spannungen besitzt der Kanal eine Offenkanalleitfähigkeit von etwa 55 pS.

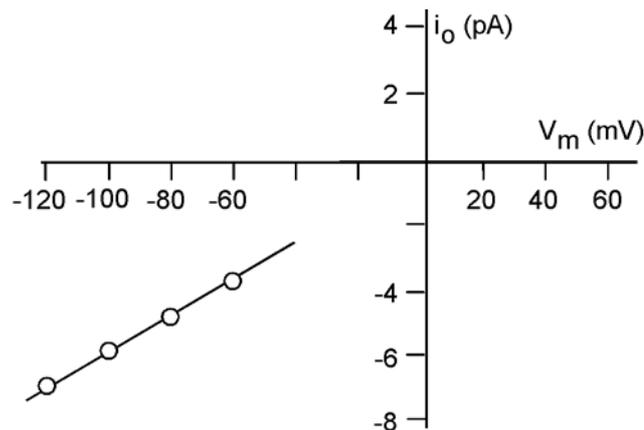


Abbildung 3.33 I-V-Diagramm des Offenkanalstroms in *tpc1-2*

Strom-Spannungs-Kurve zum Experiment in Abbildung 3.32.

3.6 Kanalaktivität im Tonoplast von *tpk1*-Deletionsmutanten

Da in der Vergangenheit ein Zusammenhang zwischen Tpk1p und der Aktivität des SV-Kanals am Tonoplasten von *A. thaliana* diskutiert wurde (Schönknecht et al., 2002), wurden Patch-Clamp-Experimente an Vakuolen einer *tpk1*-Deletions-Mutante (*tpk1 Δ) durchgeführt, bei der das Gen *TPK1* durch eine T-DNA-Insertion deletiert wurde. Die entsprechenden Stromantworten eines typischen Experimentes als Reaktion auf Spannungspulse im Bereich von -100 mV bis 140 mV sind in Abbildung 3.34 dargestellt.*

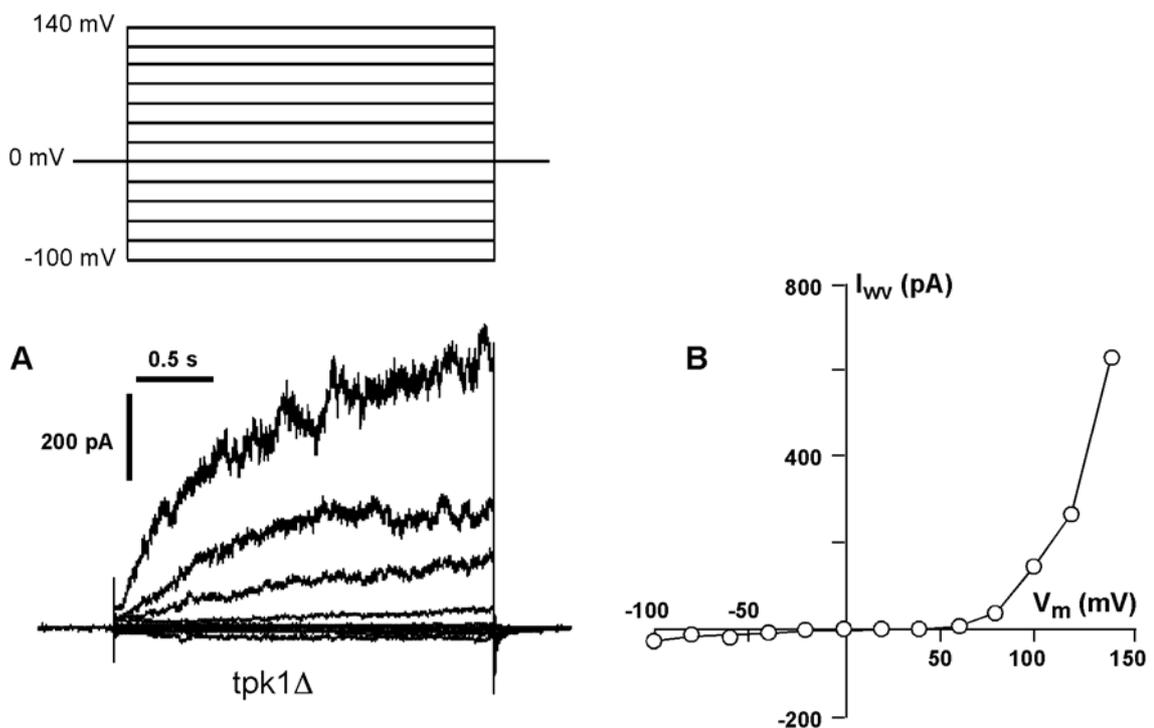


Abbildung 3.34 Typische SV-Kanal-Aktivität in *tpk1 Δ*

A Stromantworten in einer Whole-Vacuole-Ableitung als Reaktion auf Spannungspulse von -100 mV bis 140 mV an einer Arabidopsis-Vacuole der *tpk1*-Knock-Out-Mutante (*tpk1 Δ) in symmetrisch 100 mM KCl. Die Badlösung enthielt zusätzlich 1 mM CaCl_2 . Die Daten wurden bei 400 Hz gefiltert und mit 1 kHz aufgezeichnet. Das Spannungsprotokoll ist links oben dargestellt.*

B Strom-Spannungskurve des Gleichgewichtsstroms durch die Vacuole (I_{wv}) zu A

Die auftretenden Ströme waren den in Experimenten an Vakuolen aus dem Wildtyp beobachteten Strömen sehr ähnlich. Bei positiven Spannungen zeigten sich die für SV-Kanäle typischen, langsam aktivierenden Auswärtsströme. Der Verlust des Gens *TPK1* hat somit keinen Einfluss auf die Aktivität des SV-Kanals.

3.7 Stomatäre Öffnungsweite verschiedener *Arabidopsis*-Linien

Eine mögliche physiologische Funktion von Tpc1p und Tpk1p ist eine Beteiligung an der Schließzellbewegung. Die Bewegung der Schließzellen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, unter anderem auch durch das Phytohormon Abscisinsäure. Abscisinsäure (ABA) reguliert zahlreiche Vorgänge im Wachstum und in der Entwicklung von Pflanzen. Es ist bereits mehrfach gezeigt worden, dass ABA auch einen Einfluss auf Ca^{2+} -abhängige und Ca^{2+} -unabhängige Signalwege hat (Schroeder et al., 2001). Zu den bekanntesten Wirkungen von ABA zählt neben der Hemmung der Stomataöffnung sicherlich die Unterbindung der Samenkeimung.

Die Regulierung der Öffnungsweite der Stomata ist auch ein Ca^{2+} -abhängiger Prozess, zumal eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration eine deutliche Reduzierung der Öffnungsweite der Spaltöffnungen bewirken soll (McAinsh et al., 1995). In der *tpc1*-Knock-Out-Mutante (*tpc1-2*) wurde der Verlust dieser Reaktion der Stomata auf eine Erhöhung der Calciumkonzentration beobachtet (Peiter et al., 2005).

Zur Überprüfung, in wie weit der Verlust von Tpc1p bzw. Tpk1p einen Einfluss auf die Öffnungsweite der Stomata unter verschiedenen Bedingungen hat, wurden Rosettenblätter verschiedener Linien von *A. thaliana* in den angegebenen Lösungen inkubiert. Anschließend wurde die Epidermis in Streifen abgezogen und die Öffnungsweiten der Stomata bestimmt.

Abbildung 3.35 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der Öffnungsweite der Stomata bei Columbia-0 (Wildtyp), *tpc1-2* und *tpk1Δ*.

Der Wildtyp zeigte in 10 μM ABA eine Reduzierung der Öffnungsweite auf etwa 55% des Kontrollwertes, 10 mM CaCl_2 im Medium bewirkten eine Reduzierung auf 75%.

Auch bei *tpc1-2* bewirkte 10 μM ABA eine Reduzierung der Öffnungsweite auf 55%, die Erhöhung der Calciumkonzentration verringerte die Stomataöffnung jedoch nur auf 95%. Der Effekt von 10 mM Calcium war hier deutlich weniger stark ausgeprägt als beim Wildtyp.

Die Öffnungsweite der Stomata in 10 μM Abscisinsäure betrug für *tpk1Δ* ebenfalls 55% der Kontrolle, in 10 mM Calcium wurde die Öffnungsweite auf 70% reduziert. Die Effekte von Calcium und ABA waren bei dieser Linie ungefähr so deutlich wie beim Wildtyp.

Die absoluten Öffnungsweiten der Spaltöffnungen im Kontrollmedium betrugen für Columbia-0 $3,48 \pm 0,15 \mu\text{m}$, für *tpc1-2* $3,13 \pm 0,14 \mu\text{m}$ und für *tpk1Δ* $3,57 \pm 0,16 \mu\text{m}$.

Die Deletion von *TPK1* oder *TPC1* hatte keinen Einfluss auf den durch Abscisinsäure hervorgerufenen Stomataschluss. Die Deletion von *TPC1* verhinderte aber den Schließvorgang in Gegenwart hoher extrazellulärer Calciumkonzentrationen, wogegen die Deletion von *TPK1* auch auf die Verringerung der Öffnungsweite in 10 mM CaCl_2 keinen Einfluss hatte.

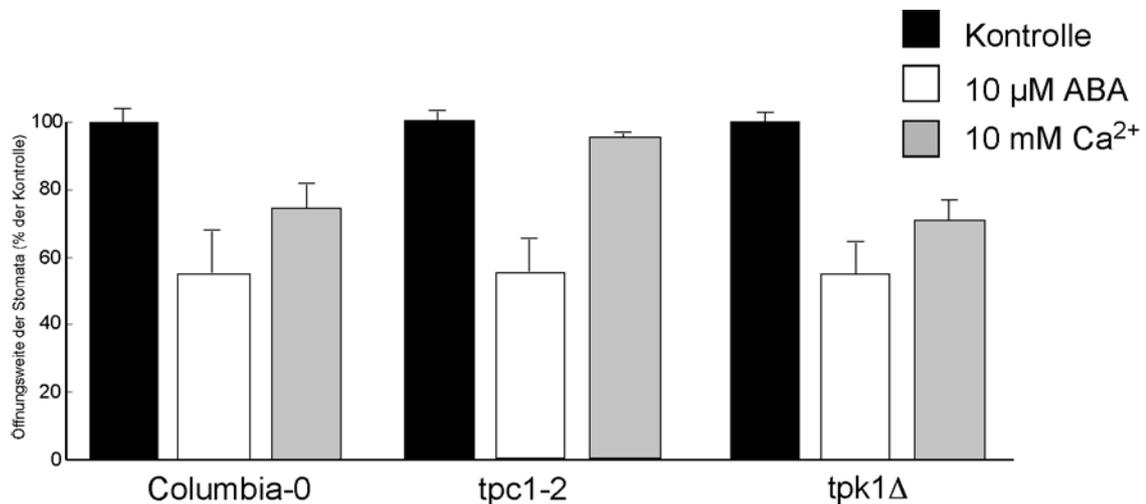


Abbildung 3.35 Öffnungsweite der Stomata

Öffnungsweite der Stomata in Standardmedium (Kontrolle), Standardmedium mit 10 μM Abscisinsäure (ABA) und Standardmedium mit 10 mM CaCl_2 . Die Daten sind die relativen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar. In jedem Experiment wurden 75 Spaltöffnungen pro Linie und Inkubationsmedium vermessen.

3.8 Bestimmung der Keimungsrate verschiedener *Arabidopsis*-Linien

Peiter et al. (2005) diskutieren einen Einfluss des Expressionsgrades von *TPC1* auf die Abscisinsäure-abhängige Hemmung der Keimung von Arabidopsissamen. Dabei stellte sich heraus, dass die Keimung der *tpc1*-Deletionsmutante weniger sensitiv für Abscisinsäure ist als der Wildtyp. Besonders empfindlich reagierten Samen einer Mutante, die *TPC1* überexprimiert. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Keimungsversuchen konnte kein Unterschied im Keimungsverhalten von Columbia-0, *tpc1-2* oder *tpk1Δ* in Gegenwart verschiedener Abscisinsäurekonzentrationen festgestellt werden. Die drei Arabidopsislinien unterschieden sich nicht in ihrer Empfindlichkeit für ABA (Daten hier nicht gezeigt). Eine Rolle von Tpc1p oder Tpk1p bei der Abscisinsäure-abhängigen Keimung konnte hier nicht nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1 Funktionale Expression und Charakterisierung von *KCO3* in Hefe

Die Expression von *KCO3* in der *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante PLY246 führt zu einer deutlichen Verbesserung des Wachstums des transformierten Hefestammes, der nun in Medien mit 5 – 10 mM Kalium (Abbildung 3.3 und 3.5) bereits wachsen kann, während die nicht transformierte (oder mit dem leeren Vektor transformierte) Deletionsmutante wesentlich höhere Kaliumkonzentration (50 – 100 mM) zum Wachsen benötigt. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass *KCO3* in Hefe funktional im Plasmalemma exprimiert, was auch durch die elektrophysiologischen Experimente bestätigt wurde (Abbildung 3.7). Zur Lokalisation von Kco3p in der pflanzlichen Zelle gibt es bisher zwar noch keine Angaben, es ist aber anzunehmen, dass der Kanal auch dort in der Plasmamembran lokalisiert ist.

Kco3p ist ein Kanal vom 2TM-1P-Typ, die häufig als K_{ir} -Typ-Kanäle bezeichnet werden. K_{ir} -Kanäle sind in der Regel einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle, die zuerst in tierischen Zellen beschrieben wurden. Für $K_{ir}2.3$ wird eine Hemmung der Ströme durch eine Ansäuerung des extrazellulären Mediums beschrieben (Zhu et al., 1999). Diese Hemmung durch ein saures pH teilt Kco3p mit $K_{ir}2.3$, was dadurch deutlich wird, dass das Kco3p-abhängige Wachstum unter K^+ -Limitierung durch eine Ansäuerung des Mediums gehemmt wird (Abbildung 3.8).

Neben dem sauren extrazellulären pH besitzt auch Calcium einen hemmenden Effekt auf Kco3p (Abbildung 3.10 und Tabelle 3.2). Da das Kanalprotein eine als EF-Hand bezeichnete Struktur, die spezifisch Calciumionen binden kann, besitzt, war eine Interaktion mit Ca^{2+} zu vermuten. Die Interaktion mit Ca^{2+} scheint die Aktivität von Kco3p zu hemmen, was im Haloassay zur Bildung eines Hemmhofes bei Calcium führt (Abbildung 3.10). Allerdings ist eher zu vermuten, dass die Hemmung von Kco3p nicht durch Interaktion von Ca^{2+} mit der cytosolischen EF-Hand, sondern durch Bindung an der extrazellulären Seite des Kanalproteins (Poreneingang) erfolgt. Die wachstumshemmende Wirkung von Lanthan, ein dreifach geladenes Kation, im Haloassay dürfte ebenfalls auf eine Hemmung der Kaliumaufnahme durch extrazelluläre Bindung von Lanthan und Blockierung von Kco3p zurückzuführen sein.

Auch Lithium und Cäsium hemmen das Wachstum von PLY246-KCO3 unter Bedingungen, bei denen die Zellen auf die Aktivität von Kco3p angewiesen sind

(Abbildung 3.9). Diese Wachstumshemmung kann dadurch entstehen, dass die Ionen Kco3p passieren können und in der Zelle cytotoxisch wirken. Kco3p besitzt eine leicht abgewandelte Signatursequenz für Kaliumkanäle: Das Tyrosin im Porenloop ist durch ein Phenylalanin ersetzt (GYG → GFG), was im Shaker-Kanal zu einer etwas geringeren Selektivität führt (Heginbotham et al., 1994). Es ist aber durchaus auch denkbar, dass Lithium und Cäsium einen negativen Effekt auf die Kaliumaufnahme durch den Kanal haben, z.B. indem Li^+ oder Cs^+ mit K^+ um den Eintritt in die Kanalpore konkurriert. Dies verdeutlicht, dass Wachstumsexperimente (Tropftests oder Hemmhofversuche) zwar grundsätzlich als erster „Screen“ geeignet sind, um eine potentielle Interaktion von Substraten mit dem zu untersuchenden Kanalprotein zu identifizieren, die Frage nach dem jeweiligen Mechanismus, der der Wachstumshemmung zugrunde liegt, kann jedoch endgültig nur durch elektrophysiologische Analysen am Kanalprotein (hier Kco3p) beantwortet werden.

4.2 Funktionale Expression und Charakterisierung von *TPK4* in Hefe

Tpk4p ist sowohl in Hefe als auch in der Pflanze im Plasmalemma lokalisiert (Becker et al., 2004). Die Expression von *TPK4* in der Deletionsmutante PLY246 führt zu einer deutlichen Verbesserung des Wachstums des Stammes in geringen Kaliumkonzentrationen (Abbildung 3.3 und 3.5). Offensichtlich wird Tpk4p in Hefe funktional im Plasmalemma exprimiert und kann den Zellen als alternatives Kaliumaufnahmesystem dienen. Die Versorgung der Zellen mit Kalium über Tpk4p funktioniert so gut, dass der *TPK4* exprimierende Stamm auch in 1 mM KCl ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum zeigt.

Bei der funktionalen Charakterisierung in Oocyten und auch in Hefe wurde Tpk4p im elektrischen Experiment als instantan aktivierend, spannungsunabhängig und einwärts gleichrichtend charakterisiert (Becker et al., 2004). Diese Eigenschaften konnten durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigt werden (Abbildung 3.11 und 3.12). Der Grund für die Gleichrichtung des Kanals ist nicht die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit, sondern die geringe Einzelkanalleitfähigkeit bei positiven Spannungen (Becker et al., 2004).

Tpk4p wurde in Oocyten als Kaliumkanal mit einer hohen Selektivität für Kalium über Natrium (und andere Kationen) beschrieben, der durch extracelluläres Cs^+ blockiert wird (Becker et al., 2004). Dies ist konsistent mit den Beobachtungen in Hefe. Wie für einen kaliumselektiven Kanal zu erwarten, scheint Tpk4p nicht Na^+ -permeabel zu sein,

sodass relative hohe Natriumkonzentrationen das Tpk4p-abhängige Wachstum des *TPK4*-exprimierenden Hefestammes nur geringfügig beeinflussen. Somit ist weder davon auszugehen, dass Na^+ durch Tpk4p aufgenommen wird, noch dass Na^+ mit der Kanalpore interagiert und so die Kaliumaufnahme behindern könnte. Anders stellt sich die Situation mit extrazellulärem Cs^+ dar. Zwar ist Tpk4p auch für Cs^+ nicht permeabel (Becker et al., 2004), sodass eine toxische Wirkung durch hohe intrazelluläre Cs^+ Konzentrationen auszuschließen ist, dennoch hemmt extrazelluläres Cs^+ das Tpk4p-abhängige Wachstum der Hefemutante sowohl im Tropftest als auch im Hemmhofversuch. Es ist also davon auszugehen, dass Cs^+ , das ja sowohl in der elektrischen Ladung als auch in seiner Größe dem Kaliumion sehr ähnlich ist, mit einer extrazellulären Bindestelle interagiert und so die Kaliumaufnahme durch Tpk4p behindert. Inwiefern eine Interaktion des positiv geladenen Cs^+ -Kations mit den negativen Ladungen der Asparaginsäuren (D) in unmittelbarer Nachbarschaft zum Selektivitätsfilter dabei eine Rolle spielt, muss durch detaillierte elektrophysiologische Analysen eruiert werden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass neben Cs^+ auch alle getesteten, mehrfach geladenen Kationen (Ca^{2+} , Ba^{2+} , La^{3+}) potente Inhibitoren von Tpk4p sind, was aus den deutlichen Hemmhöfen in Abbildung 3.15 geschlossen werden kann. Eine ähnliche Hemmung durch divalente Kationen, insbesondere Ba^{2+} , wurde für einen tierischen Ionenkanal mit einer 4TM-2P Topologie, *ORK1* aus *Drosophila*, ebenfalls im heterologen Expressionssystem Hefe berichtet (Goldstein et al., 1996). Inwiefern die besondere Geometrie der 2P-Kanäle für die Interaktion der Kanalpore mit extrazellulären Kationen von Bedeutung ist, kann hier nicht beantwortet werden. Allerdings kann festgehalten werden, dass sich die pharmakologischen Eigenschaften des 2P-Kanals Tpk4p deutlich von den Eigenschaften des 1P-Kanals Kco3p unterscheiden. So zeigt sich Tpk4p sehr empfindlich gegenüber extrazellulärem Ba^{2+} , aber völlig insensitiv gegenüber Li^+ , während Kco3p Li^+ -empfindlich, aber Ba^{2+} -insensitiv ist. Starke Ba^{2+} -Empfindlichkeit, die auch wie erwähnt für Ork1p berichtet wurde (Goldstein et al., 1996), scheint also eher typisch für 2P-Kaliumkanäle zu sein. Dies ist auch beim 2P-Kaliumkanal aus Hefe (Tok1p) der Fall (90% Hemmung durch 1 mM Ba^{2+} ; Bertl et al., 1998, Bertl persönliche Mitteilung), während 1P-Kaliumkanäle wie z.B. Kco3p (siehe oben) oder Kat1p und Akt1p aus *Arabidopsis* weit weniger sensitiv gegenüber Ba^{2+} reagieren (nur 50% Hemmung von Kat1p durch 10 mM Ba^{2+} , Bertl et al., 1995).

4.3 Ist Tpk1p eine Komponente des SV-Kanals?

Die Membran pflanzlicher Vakuolen besitzt eine ganze Reihe von Ionenkanälen, von denen der SV-Kanal sicherlich am besten untersucht und beschrieben ist. Ungeachtet dieses sehr detaillierten Wissens herrscht über die physiologische Funktion des SV-Kanals immer noch Uneinigkeit. Die Entdeckung der neuen Familie der Zwei-Porenloop-Kanäle in *Arabidopsis* und die Tatsache, dass Tpk1p in der vakuolären Membran lokalisiert ist (Czempinski et al., 2002; Schönknecht et al., 2002), legten die Vermutung nahe, dass das Genprodukt von *TPK1* etwas mit der Aktivität des SV-Kanals in pflanzlichen Vakuolen zu tun haben könnte.

Neben der Lokalisation im Tonoplasten gab es noch andere Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Tpk1p und SV-Kanal. So zeigt der SV-Kanal eine deutliche Abhängigkeit der Aktivität von der cytosolischen Calciumkonzentration. Da Tpk1p zwei mögliche calciumbindende Domänen, sogenannte EF-Hände, besitzt, konnte auch hier von einer Modulierung der Aktivität des Kanals durch Calciumionen ausgegangen werden. Tatsächlich wurde dann auch ein kausaler Zusammenhang zwischen Tpk1p und SV-Kanalaktivität postuliert (Schönknecht et al., 2002).

Die experimentellen Befunde, die einen direkten Zusammenhang zwischen SV-Kanal und dem *TPK1*-Genprodukt herstellen sollten, waren jedoch wenig deutlich, zumal die Deletion des *TPK1*-Gens in *Arabidopsis* nicht zu einem Verlust der für den SV-Kanal typischen, langsam aktivierenden Auswärtsströme führte (Abbildung 3.34). Vielmehr wurde von einer Reduktion der Stromdichte als Folge der *TPK1*-Deletion berichtet, wobei jedoch die für SV-Kanäle typische Aktivierungskinetik erhalten blieb. Dies führte dann auch zu der Aussage, dass das *TPK1*-Genprodukt lediglich eine Komponente des SV-Kanals darstellt (Schönknecht et al., 2002).

Bei der Betrachtung der strukturellen Merkmale von Tpk1p fallen einige Unstimmigkeiten im Vergleich mit den bekannten Eigenschaften der SV-Kanäle auf:

Eine charakteristische Eigenschaft der SV-Kanäle ist ihre Spannungsabhängigkeit mit einer sehr ausgeprägten Auswärtsgleichrichtung. In Tpk1p gibt es jedoch, wie bei den meisten 4TM-2P-Kanälen, keinen typischen Spannungssensor. Aufgrund des Fehlens eines solchen Spannungssensors mit einer Anhäufung (positiv) geladener Aminosäuren, wie es zum Beispiel das S4 Segment in Shaker-Kanälen darstellt, wäre eine starke Abhängigkeit der Kanalaktivität von der Membranspannung bei Tpk1p eher nicht zu erwarten.

Ebenso wäre die Architektur der Kanalpore von Tpk1p mit der für Kalium-selektive Ionenkanäle charakteristischen Aminosäuresequenz GYGD in beiden Porenloops mit der praktisch nicht vorhandenen Selektivität des SV-Kanals kaum in Einklang zu bringen. Eine heteromere Organisation des SV-Kanals aus Tpk1p und Tpk3p (ehemals Kco6p), wie sie diskutiert wurde (Schönknecht et al., 2002), könnte zwar erklären, weshalb die Deletion von *TPK1* nur eine Reduktion, nicht aber ein völliges Verschwinden der SV-Kanalaktivität bewirkt. Dennoch wäre die Pore auch in dieser heteromeren Organisation aus vier GYGD Motiven aufgebaut, was für einen unselektiven Kationenkanal schwer vorstellbar wäre.

Die funktionale Charakterisierung von Tpk1p im Tonoplast von *Saccharomyces cerevisiae* zeigte dann auch einige Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche funktionale Unterschiede zwischen Tpk1p und SV-Kanälen in *Arabidopsis*.

Beide Kanäle, Tpk1p und SV-Kanal, sind im Tonoplast lokalisiert. Tpk1p konnte fluoreszenzoptisch als GFP-Fusionsprotein sowohl in *Arabidopsis* (Czempinski et al., 2002), als auch in Hefe im Tonoplasten nachgewiesen werden (Abbildung 3.6). Elektrophysiologisch konnte die Aktivität des *TPK1*-Genprodukts in Hefe, sowie die SV-Kanalaktivität in *Arabidopsis* jeweils in der vakuolären Membran gezeigt werden. Auch die Offenkanalleitfähigkeit von Tpk1p mit etwa 75 pS ist der des SV-Kanals (60 pS) unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen recht ähnlich. Allerdings sollte hier bemerkt werden, dass die Offenkanalleitfähigkeit nicht unbedingt als hartes Kriterium für die Identifizierung eines Ionenkanals angesehen werden kann, liegen doch die Werte für die meisten pflanzlichen Kaliumkanäle im Bereich von 50 – 120 pS und selbst für SV-Kanäle wurden in unterschiedlichen Präparationen Leitfähigkeiten von 40 – 280 pS berichtet (Ivashikina and Hedrich, 2005).

Neben der ähnlichen Leitfähigkeit und der Lokalisation in der vakuolären Membran ist den beiden Kanälen auch die starke Abhängigkeit von der cytosolischen Calciumkonzentration gemein. Sowohl Tpk1p, als auch SV-Kanal werden durch mikromolare Calciumkonzentrationen aktiviert (Abbildung 3.21 und 3.28; Hedrich und Neher, 1987).

Dagegen unterscheiden sich die beiden Kanäle deutlich in ihrer Abhängigkeit von der Membranspannung. Während der SV-Kanal in Vakuolen von *Arabidopsis*-Blattmesophyllzellen eine sehr ausgeprägte Auswärtsgleichrichtung des makroskopischen Stroms aufweist, die aus einer hohen Offenwahrscheinlichkeit bei positiven Membranspannungen und einer extrem geringen Offenwahrscheinlichkeit bei negativen

Membranspannungen resultiert, zeigte sich die Aktivität (Offenwahrscheinlichkeit) von Tpk1p über den gesamten untersuchten Bereich spannungsunabhängig, ganz wie in Analogie zu anderen 4TM-2P Kanälen und dem Fehlen eines typischen Spannungssensors zu erwarten gewesen wäre. Der makroskopische Strom von Tpk1p ist demnach auch im Bereich von +60 mV bis -60 mV linear und zeigt keine Gleichrichtung.

Wie bereits das Vorhandensein der sogenannten Kaliumkanal-Signatursequenz (GYGD, Doyle et al., 1998) vermuten ließ, zeigt Tpk1p eine sehr deutliche Selektivität für Kaliumionen gegenüber Natriumionen. Durch Na⁺ getragene Ströme konnten in den Experimenten nicht beobachtet werden, da Na⁺-Ionen den Kanal weder von der vakuolären Seite der Membran ins Cytosol noch in die Gegenrichtung passieren können (Abbildung 3.22 und 3.23). Im Gegensatz dazu unterscheidet der SV-Kanal praktisch nicht zwischen K⁺ und Na⁺, die Selektivität ist hier sehr gering ausgeprägt (Abbildung 3.29 und 3.30). Für SV-Kanäle wird auch der Transport von zweiwertigen Kationen wie Ca²⁺ und auch von Anionen diskutiert (Pottosin et al., 2001).

Die Aminosäuresequenz von Tpk1p weist neben den EF-Händen noch ein typisches Motiv für die Bindung von 14-3-3-Proteinen auf, was auf eine Regulierung von Tpk1p durch 14-3-3-Proteine (GRFs) schließen lässt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Tpk1p im Tonoplast von Hefe durch Zugabe von Grf6p (14-3-3 λ) auf der cytosolischen Seite sehr stark erhöht wird (Abbildung 3.24). Im Gegensatz dazu werden SV-Kanäle durch 14-3-3-Proteine inhibiert. Zugabe von 14-3-3-Protein führte zu einer Reduzierung der Amplitude der SV-Kanal-Ströme in Gerstevakuolen von bis zu 80% (Van den Wijngaard et al., 2001). Eine Regulation durch 14-3-3-Proteine wurde auch am sogenannten Slowpoke-K⁺-Kanal in *Drosophila* beobachtet (Zhou et al., 1999). Diese Regulation ist allerdings indirekt und benötigt die Beteiligung eines dritten Proteins. Ob die Regulation von Tpk1p oder des SV-Kanals ein direkter oder ein indirekter Prozess mit Beteiligung weiterer Proteine ist, kann aus den bisherigen Experimenten nicht geschlossen werden.

4.4 Kodiert *TPC1* für den SV-Kanal?

In *Arabidopsis* wurde ein putativer Ca²⁺-Kanal beschrieben, dessen Sekundärstruktur einer halben α -Untereinheit von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen sehr ähnlich ist. Die Topologie dieses als Tpc1p (**T**wo-**P**ore-**C**hannel; Genlocus At4g03560) bezeichneten Proteins weist zwei konservierte homologe Domänen auf, die jeweils aus

sechs Transmembranhelices (S1-S6) und einem Porenloop zwischen S5 und S6 in jeder der beiden Domänen bestehen. Auffallend ist auch die Anhäufung positiv geladener Aminosäuren in der vierten Transmembranhelix einer jeden Domäne (S4 und S10), was sehr stark an einen typischen Spannungssensor in spannungsabhängigen Ionenkanälen erinnert:

S4: PFRIAPYV**RV**IIFILSI**REL**R

S10: YLL**L**AR**MLRL**IL**LL**MNV**Q**RY**R**

Erste experimentelle Befunde aus Komplementationsversuchen an Ca^{2+} -Transport defizienten Hefemutanten (*cch1*) deuteten auf eine Funktion von Tpc1p als spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal im Plasmalemma hin (Furuichi et al., 2001). Überraschenderweise wurde Tpc1p als GFP-Fusionsprotein jedoch im Tonoplasten von *Arabidopsis* Blattmesophyllzellen lokalisiert und die Deletion von *TPC1* führte in *A. thaliana* zu einem Verlust der typischen SV-Kanal-Aktivität im Tonoplasten (Abbildung 3.31 und Peiter et al., 2005).

Hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen bewirken eine Verringerung der Öffnungsweite der Stomata. In der *tpc1*-Deletionsmutante ist diese Reaktion auf hohe Calciumkonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert (Abbildung 3.35 und Peiter et al., 2005). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass Tpc1p eine Rolle bei der Reaktion auf hohe Calciumkonzentrationen spielt. Die physiologische Funktion von Tpc1p könnte z.B. in einem Beitrag zur Kationen-Homöostase der Zelle liegen, denkbar wäre aber auch eine Beteiligung an der Regulation des Turgors, evtl. auch als Glied in einem Calcium-abhängigen Signalweg. Eine Funktion des SV-Kanals beim Schließvorgang der Stomata durch Freisetzung größerer Mengen von K^+ und Ca^{2+} aus der Vakuole ist bereits mehrfach diskutiert worden (z.B. Allen und Sanders, 1996).

Auch Abscisinsäure bewirkt eine deutliche Verringerung der Öffnungsweite der Stomata. Dieser Effekt ist bei der *tpc1*-Deletionsmutante ähnlich stark ausgeprägt wie beim Wildtyp, so dass Tpc1p entweder keine Rolle beim Abscisinsäure-vermittelten Verschluss der Stomata spielt, oder der Verlust von Tpc1p durch die Aktivität anderer Kationentransporter kompensiert werden kann. Da die Beteiligung von Calciumionen an Reaktionen pflanzlicher Zellen auf Abscisinsäure umstritten ist, wäre auch die Rolle eines Calcium-aktivierten und Calcium-permeablen Ionenkanals beim Abscisinsäure-vermittelten Stomataschluss ohnehin fragwürdig.

Neben der Schließzellbewegung hat Abscisinsäure unter anderem einen stark hemmenden Einfluss auf die Samenkeimung. Peiter et al. (2005) beobachteten in

Gegenwart von Abscisinsäure bei der *tpc1*-Deletionsmutante eine höhere Keimungsrate als beim Wildtyp. Dieses Ergebnis konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente jedoch nicht bestätigt werden, da bei der Abscisinsäure-abhängigen Keimung keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *tpc1*-Deletionsmutante deutlich wurden.

Auch wenn die Charakterisierung von Tpc1p in *Arabidopsis* noch weitgehend unvollständig ist und weder seine Funktion als „Ca²⁺-induced Ca²⁺-release“ Mechanismus, noch die Selektivität des *TPC1*-Genproduktes in *Arabidopsis* tatsächlich gezeigt wurde (Peiter et al., 2005), lässt das Fehlen der Kaliumkanalsignatursequenz (GYGD) in den Porenloops vermuten, dass die Selektivität des Tpc1p-Kanals für K⁺ nicht stark ausgeprägt ist. Das Vorhandensein von typischen Calcium-Bindemotiven (EF-Hände) in Tpc1p deutet ebenfalls auf eine Modulation des Kanals durch cytosolisches Calcium hin.

Es spricht also vieles dafür, dass es sich bei *TPC1* tatsächlich um das für den SV-Kanal codierende Gen handelt.

4.5 Aktivität von Tpk1p in *Arabidopsis*

Der in Patch-Clamp-Experimenten an Hefe gemessene, durch Tpk1p bedingte Strom ist instantan und spannungsunabhängig. Solche Ströme können in Whole-Cell oder in Whole-Vacuole-Experimenten fälschlicherweise leicht als Leckstrom abgetan werden. Die von Schönknecht et al. (2002) beschriebene Reduzierung der Gesamtstromdichte in *Arabidopsis*vakuolen eines *tpk1*-Deletionsstammes unter Beibehaltung der charakteristischen SV-Kinetik könnte durch das Fehlen eines solchen instantanen und spannungsunabhängigen Stromes erklärt werden.

Es stellt sich nun die Frage, ob die in der *Arabidopsis* *tpc1*-Knock-Out-Mutante beobachteten Einzelkanalströme auf die Aktivität von Tpk1p zurückzuführen sind. Dies könnte durch weitere Untersuchungen des Kanals z.B. bezüglich der Selektivität oder der Calciumabhängigkeit geklärt werden. Allerdings zeigten die in *tpc1-2* beobachteten Einzelkanäle eine ganz ähnliche Leitfähigkeit wie Tpk1p in Hefe, ein vergleichbares Schaltverhalten und eine spannungsunabhängige Aktivität (Offenwahrscheinlichkeit). Ähnliche K⁺-selektive Kanäle sind bereits mehrfach an pflanzlichen Vakuolen beobachtet (Gradmann und Bertl, 1989; Ward und Schröder, 1994, Potossin et al., 2003) und als VK-Kanäle bezeichnet worden. Sie sind Ca²⁺-aktiviert und

spannungsunabhängig und besitzen eine Offenkanalleitfähigkeit von ca. 40-70 pS in symmetrisch 100 mM KCl.

Da VK-Kanäle also mit Tpk1p in den charakteristischen Eigenschaften übereinstimmen, ist es durchaus denkbar, dass das Genprodukt von *TPK1* für die Aktivität der VK-Kanäle in pflanzlichen Vakuolen verantwortlich ist.

Im Gegensatz zur Deletion von *TPC1* bewirkt die Deletion von *TPK1* keine Änderung der Reaktion der Schließzellen auf hohe Calciumkonzentrationen. Auch beim Abscisinsäure-abhängigen Verschluss der Stomata oder bei der Hemmung der Samenkeimung durch Abscisinsäure bewirkt der Verlust von Tpk1p keinen Unterschied zum Wildtyp. Eine Rolle von Tpk1p bei der Reaktion der Stomata auf Abscisinsäure und Calcium oder bei der Abscisinsäure-abhängigen Keimung erscheint demnach unwahrscheinlich.

Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Genprodukt von *TPK1* und der SV-Kanal nicht identisch sein können, sondern dass es sich hierbei um zwei voneinander unabhängige Ionenkanäle im Tonoplast von *A. thaliana* handelt. Es ist aber durchaus ein Zusammenspiel von SV-Kanal und Tpk1p denkbar, z.B. unter Bedingungen wie Salzstress. Da SV-Kanäle durch 14-3-3-Proteine inhibiert werden (Van den Wijngaard et al., 2001), Tpk1p aber durch 14-3-3 λ aktiviert wird, wäre hiermit ein Regulationsmechanismus gegeben, der die Leitfähigkeit der vakuolären Membran für Na^+ herabsetzt und für K^+ erhöht. Eine solche Verschiebung der Selektivität des Tonoplasten würde die K^+ -Homöostase zwischen Vakuole und Cytosol gewährleisten, während der Rückfluss von Na^+ Ionen aus der Vakuole ins Cytosol verhindert wird.

5. Zusammenfassung

In elektrophysiologischen Experimenten und durch Wachstumstests konnte gezeigt werden, dass der K_{ir} -Typ Kaliumkanal Kco3p aus *Arabidopsis* funktional im Plasmalemma von Hefe exprimiert. Der Kco3p Kanal, der eine 2TM-1P-Topologie aufweist, komplementiert die Kaliumaufnahme einer *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante bis etwa 10 mM K^+ . Hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen, Lithium, Lanthan und ein extrazelluläres $pH < 4$ hemmen diesen K_{ir} -Typ Kaliumkanal.

Tpk4p ist in Hefe wie auch in *Arabidopsis* in der Plasmamembran lokalisiert. Anhand von elektrophysiologischen Experimenten und Wachstumsversuchen konnte gezeigt werden, dass dieser 2P-Typ Kanal mit einer 4TM-2P-Topologie in Hefe einen funktionalen Kaliumkanal bildet. In elektrophysiologischen Ganzzelleableitungen zeigte die Offenwahrscheinlichkeit von Tpk4p keine Abhängigkeit von der Membranspannung, sodass nach plötzlichen Veränderungen der Membranspannung keine ausgeprägte Aktivierungs-/Inaktivierungskinetik zu beobachten war. Zwar zeigte sich eine leichte Einwärtsgerichtung des makroskopischen Stroms, diese resultiert jedoch aus einer Asymmetrie des Offenkanalstroms. Tpk4p komplementiert die Kaliumaufnahme einer *trk1trk2tok1*-Deletionsmutante bis 1 mM Kalium. Der Kanal wird durch saures pH und hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen sowie durch Lanthan, Cäsium und Barium gehemmt.

Durch elektrophysiologische Messungen konnte gezeigt werden, dass Tpk1p funktional im Tonoplasten von Hefe exprimiert. Der Kanal, der wie Tpk4p zur Familie der Tandem-Pore-Kaliumkanäle (4TM-2P) gehört, benötigt zur Aktivierung relativ hohe cytoplasmatische Calciumkonzentrationen ($> 10 \mu M$) und besitzt eine hohe Selektivität für Kalium gegenüber Natrium. Tpk1p ist spannungsunabhängig, wird durch Grf6p (14-3-3 λ) aktiviert und unterscheidet sich deutlich vom SV-Kanal pflanzlicher Vakuolen. Ein Zusammenspiel von Tpk1p und SV-Kanal bei der Schließzellbewegung oder unter Bedingungen wie Salzstress ist durchaus denkbar. Für die SV-Kanalaktivität im Tonoplast von Pflanzen scheint das Genprodukt von *TPC1* verantwortlich zu sein, da in *tpc1*-Deletionsmutanten von *A. thaliana* die für den SV-Kanal typischen Ströme fehlen. Dagegen bleiben die typischen SV-Kanalströme in Vakuolen von *Arabidopsis*-Blattmesophyllzellen nach Deletion des *TPK1*-Gens erhalten.

6. Literatur

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

Alonso, J., Stepanova, A., Leisse, T., Ki, C., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D., Zimmermann, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schimdt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, d., Carter, d., Marchand, T., Risseeuw, E., Brodgen, D., Zeko, A., Crosby, W., Berry, C., Ecker, J. 2003. Genome-Wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *SCIENCE* 301: 653-657

André, B. 1995. An Overview of Membrane Transport Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *YEAST* 11:1575-1611

Ashcroft, F.M. 2000. Ion Channels and Disease. Academic Press, San Diego, California

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Editoren). 1999. Short Protocols In Molecular Biology. John Wiley & Sons. New York

Barkla, B., Pantoja, O. 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.* 47: 159-184

Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K., Hedrich, R. 2004. AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. *PNAS* 101:15621-15626

Bertl, A., Bihler, H., Reid, J. D., Kettner, C., Slayman, C.L. 1998(a). Physiological Characterization of the Yeast Plasma Membrane Outward Rectifying K⁺ Channel, DUK1 (TOK1), in Situ. *J. Membrane. Biol.* 162:67-80

Bertl, A., Bihler, H., Kettner, C., Slayman, C.L. 1998(b). Electrophysiology in the eukaryotic model cell *Saccharomyces cerevisiae*. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 436:999-1013

Bertl, A., Blumwald, E., Coronado, R., Eisenberg, R., Findlay, G., Gradmann, D., Hille, B., Köhler, K., Kolbe, H.-A., Mac-Robby, E., Meissner, G., Miller, C., Neher, E., Palade, P., Pantoja, O., Sanders, D., Schroeder, J., Slayman, C.L., Spanswick, R., Williams, A. 1992. Electrical measurements on endomembranes. *Science* 258:873-874

Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martinez, P., Ljungdahl, P. 2003. Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Molecular Microbiology* 47:767-780

Bertl, A., Slayman, C. 1990. Cation-selective channels in the vacuolar membrane of *Saccaromyces*: dependence on calcium, redox state and voltage. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7824-7828

Bertl, A., Slayman, C.L., Gradmann, D. 1993. Gating and Conductance in an Outward-Rectifying K^+ Channel from the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Membrane Biol.* 132:183-199

Bignell, G.R., Evans, I.H. Genomic Yeast DNA Clone Banks. From: *Methods in Molecular Biology*, Vol.53: Yeast Protocols Edited by: Evans Humana Press Inc. Totowa, NJ. 1996.

Bihler, H., Slayman, C.S., Bertl, A. 1998. NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 432:59-64

Bihler, H., Eing, C., Hebeisen, S., Roller, A., Czempinsky, K., Bertl, A. 2005. TPK1 is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar cation channel. *Plant Physiol.* 139: 417-424

Brüggemann, L., Pottosin, I., Schönknecht, G. 1999. Selectivity of the fast activating vacuolar cation channel. *J. Exp. Bot.* 50: 873-876

Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of the Plants.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland

Carpaneto, A., Cantu, A., Gambale, F. 1999. Redox agents regulate ion channel activity in vacuoles from higher plant cells. *FEBS Lett* 442: 129-132

Czempinski, K., Frachisse, J., Maurel, C., Barbier-Brygoo, H., Müller-Roeber, B. 2002. Vacuolar membrane localization of the Arabidopsis two-pore K^+ -channel KCO1. *Plant Journal* 29: 809-820

Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Müller-Roeber, B. 1997. New structure and function in plant K^+ -channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca^{2+} -dependency. *EMBO Journal* 16: 2565-2575

Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Müller-Roeber, B. 1997b. New structure and function in plant K^+ -channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca^{2+} -dependency. *EMBO Journal* 16: 6896

Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, A.K., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R. 1998. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K^+ Conduction and Selectivity. *Science* 280:69-77

Fuglsang, A., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., Jensen, O., Aducci, P., Palmgren, M. 1999. Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr⁹⁴⁶-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr⁹⁴⁷. *J. Biol. Chem.* 274: 36774-36780

- Furuichi, T., Cunningham, K., Muto, S. 2001.** A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca^{2+} -flux in Arabidopsis leaf cells. *Plant Cell Physiol.* 42: 900-905
- Gradmann, D., Bertl, A., 1989.** Physiological control of membrane currents in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 587-593
- Gustin, M.C., Martinac, B., Saimi, Y., Culbertson, M.R., Kung, C. 1986.** Ion channels in yeast. *Science* 233:1195-1197
- Hedrich, R., Neher, E. 1987.** Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature* 329: 833-835
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., MacKinnon, R. 1994.** Mutations in the K^+ channel signature sequenz. *Biophys. J.* 66:1061-1067.
- Ivashikina, N., Hedrich, R. 2005.** K^+ currents through SV-type vacuolar channels are sensitive to elevated luminal sodium levels. *Plant J.* 41:606-614
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., Goldstein, S.A.N. 1995.** A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376:690-695
- Kleinig, H., Maier, U. 1999.** Zellbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Kyte J., Doolittle, RF. 1982.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 157:105-132
- Läuger, P. 1991.** Electrogenic Ion Pumps. Sinauer Associated Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA
- Liang, H., Ko, C.H., Herman, T., Gaber, R.F. 1998.** Trinucleotide insertions, deletions and point mutations in glucose transporters confer K^+ -uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Moll. Cell. Biol.* 18: 926-935
- MacKinnon, R., Yellen, G. 1990.** Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K^+ channels. *Science* 250:276-279
- McAinsh, M.R., Webb, A.A., Taylor, J.E., Hetherington, A.M. 1995.** Stimulus-induced oscillations in guard cell cytoplasmic free calcium. *Plant Cell* 7: 1207-1219
- Numberger, M., Draguhn, A. 1996.** Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akad. Verl.
- Peiter, E., Maathuis, F., Mills, L., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A., Sanders, D. 2005.** The vacuolar Ca^{2+} -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *NATURE* 434: 404-408
- Rodríguez-Navarro, A. 2000.** Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469:1-30
- Pottosin, I., Dobrovinskaya, O., Muniz, J. 2001.** Conduction of monovalent and divalent cations in the slow vacuolar channel. *J. Membr. Biol.* 181:55-65

Pottosin, I., Martínez-Estévez, M., Dobrovinskaya, O., Muniz, J. 2003. Potassium-selective channel in the red beet vacuolar membrane. *J. Exp. Botany* 54:663-667

Sambrook, J., Russel, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Schönknecht, G., Spoomaker, P., Steimeyer, R., Brüggeman, L., Ache, P., Dutta, R., Reintanz, B., Godde, M., Hedrich, R., Palme, K. 2002. KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel. *FEBS Lett.* 511: 28-32

Singer, S. J. & Nicolson, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731

van den Wijngaard, P., Bunney, T., Roobeek, I., Schönknecht, G., de Boer, A. 2001. Slow vacuolar channels from barley mesophyll cells are regulated by 14-3-3 proteins. *FEBS Lett.* 488: 100-104

Ward, J., Schroeder, J. 1994. Calcium-activated K⁺-channels and Calcium-induced Calcium-release by Slow Vacuolar ion channels in guard cells implicated in the control of stomatal closure. *The Plant Cell* 6: 669-683

Webster, J. 1983. Pilze. Springer Verlag, Heidelberg

Internet-Literatur (Stand: Dezember 2005)

NASC-Homepage: www.arabidopsis.info

7. Anhang

Codierende DNA-Sequenzen von *TPK1*, *TPK4* und *KCO3*

TPK1

ATGTCGAGTGATGCAGCTCGTACGCCATTGTTACCCACTGAGAAGATAGATACCATGGCT
 CAAGATTTCAACCTGAACTCAAGAACTTCTTCTTCAAGAAAACGAAGATTGCGTCGCTCT
 AGAAGTGCTCCTCGTGGTGATTGTATGTACAATGATGATGTCAAAATCGACGAACCACCT
 CCTCATCCGAGTAAAAATCCCAATGTTTCAGTGATCTAAACCCGAATCTCAGGCGAGTGATC
 ATGTTCTTGGCTTTATATCTTACCATTGGTACGCTCTGTTTCTACCTCGTGAGAGACCAG
 ATCTCCGGTCATAAAACCAGTGGTGTGGTAGATGCTCTCTATTTCTGTATAGTAACGATG
 ACAACTGTTGGATACGGTGACCTTGTCCTAATAGTTCCGCCTCAAGGCTACTTGCTTGT
 GCCTTCGTCTTCTCGGGAATGGTCCCTCGTTGGTCACCTCTTAAGTCGAGCGGCGGATTAT
 CTAGTGGAGAAACAAGAGGCTTTGCTCGTTAGGGCTTCCATTTGCGTCAAAGCTTTGGT
 CCAACAGACATTCTCAAGGAGTTGCATACTAACAAGTTGAGATACAAATGCTATGCTACA
 TGCCTTGTCTTGTAGTCCCTCTTCATTGTTGGCACGATTTTCCCTTGTAATGGTTGAGAAA
 ATGCCGTTTATCTCAGCTTTCTACTGCGTCTGCTCCACGGTTACAACATTGGGTTATGGA
 GATAAGAGCTTTAACTCGGAAGCCGGACGCCTTTTTGCTGTGTTTTGGATCTTGACGAGC
 AGCATATGTTTGGCTCAGTTTTTCTTTATGTAGCTGAGCTAAATACAGAAAACAAACAG
 AGGGCGTTGGTGAAATGGGTTTTAACGCGAAGAATCACAAACAATGATCTCGAAGCAGCT
 GATCTCGATGAAGATGGAGTTGTTGGAGCTGCAGAGTTTATTGTGTATAAACTGAAAGAA
 ATGGGTAAGATTGATGAGAAAGATAATTTCTGGGATAATGGATGAGTTCGAGCAACTTGAT
 TACGATGAATCAGGAACCTCACGACTTCTGACATCGTTTTAGCTCAGACCACGTCTCAG
 ATTCAAAGGTAA

TPK4

ATGGAAGAAGAGAACCCTTCTCAATGAGAACCTTCTCCATCCCAACGAGTCCTCACCGGAA
 GAAACTCAAGTCACCACCGTATCAAAATCGAAATGGACCATTCTTGTACTAGCCATGATC
 CTCTCTTGGTCTACTTAACTTTCGGGGTTTGACATACTCATTCTTTCGAGACCAATTC
 TCCGGAACCGAGACCAATCTTTTCGTCGACGCTTTCTATTTCTCCATCGTCACATTCTCT
 ACAGTCGGTTACGGGGACATTGTCCCGTCAACTTCAACGACCAAGATCTTGACCATCGTC
 TTGGTATCAACCGCGTCGTATTTCTTGATTATCTACTCAACCGCGTCGTGAGTCACGTT
 CTAAGTCTTCAAGAAAACGCGATTCTTGATCGAATCAACAAGACAAGAAACAGAGCGATT
 AGAGATCACATTGCCGAAGATGGCAAGATAAGGTTAAAGTGGAACCTTTGTTTAGCGTTT
 TGCGCCGTTGGTCTCTGCGTCGGAAGTGGAGCTTTGTTTCTTACGTTTTCGAGAGATTG
 GATTGGTTGGATTTCGTTTTACTTGTGCGTTATCTCCGTTACGACGGTTGGTTACGGAGAT
 AAAACGTTTAAAGACGGTTGAAGGGAGAGGCTTCGCAGTGTTTTGGCTTCTTCTTCAACT
 ATTGCAATGGCTACTCTGTTTTCTTTACTTGGCTGAGATGAGAATCGATCGTACTACTGTC
 ATGAAATTGCCCCCGAGTGAATCAGAGTTTATTGTGTTCAAGCTTAGAGAAAGTGGGAGG
 ATTAGTGAGGATGATATAAAGCAGATCGTAAGAGAGTTCGAGAATCTTGAAGAAGTGCCA
 TCAAGCGGATCATGA

KCO3

ATGCCAATGACTCCATCGGAATTCAAAAACCGATTACTCTTCGGCTCATTACCTCGGTCA
 TCCTCCGATCCCACAGACCTACAATTTACGGAGCCTAACGTACCACCGTCTCTGTTTTCT
 TTACCAGAACACAACGACGACACAGCTACTGATATGGCTCCTGACCAGGAAACAGAGCAA
 TCAGTTTCGAAATCCATTGCAAGACAAGCACTTGCTTTGCTTGTGTATCTCTCTTTA
 GGTGTGCTTATCTATTGGCTGACTCTAGATAGCGACAATGCGTATCAGACTCATCTGTT
 GCTGTTGCTTTGTACTTTTTTTGTTGTAACATTTTTGTGGCTTTTTTAATTTGTGATTTTGT
 GTGAAAATCGGGTGGTTGGATTTCGTTTTGTTTTCTCGGTTATGATGGTTACTACAGTTGGG
 TTTGGTGATCGGGCTTTTTAATACATGGCTTGGTACGTTTCTTGGCTGCGTTTTGGTTGCTT
 GTTCTACTTTAGCCGTTGCTCGAGCGTTTTTTGTTTTTGGCTGACGCAAGAGCTGATAAG
 AGAAATAGAGAGCGGGCCAAGAAAGTGCTTGGCGAGAGCATATCTATATCTCAGTTCTTT
 GCTGCGGATATTGACAACGATGGTCGCTTGGTGGTTAGCAGAGTTTGAATATACAAACCTA
 AAGCAGATGGAGAAAATAACCCAAGAGGACTTTATACAAATCTGTAACCAGTTTGAACAAG
 CTTGACCGAACCCAAAGTGGAAAGGATCACTCTTGTGATTTAACACCGCAACTTCTGTT
 TAG

Aminosäuresequenzen von Tpk1p, Tpk4p und Kco3p

Tpk1p

MSSDAARTPLLPTEKIDTMAQDFNLNSRTSSSRKRRLR**RSRSAP**RGDC**MYN**DDVKIDEPP
PHPSKIPMFSDLNPNLRRVIMFLALYLTIGTLCFYLVLDQISGHKTSGVVDALYFCIV**TM**
TTVGYGDLVPNSSASRLACAFVFSGMVLVGHLLSRAADYLVEKQEALLVRAFHLRQSF
PTDILKELHTNKLRYKCYATCLVLVVLVIVGTIFLVMVEKMPVISAFYCVCS**TVTT****LGYG**
DKSFNSEAGRLFVFWILTSSICLAQFFLYVAELNTENKQALVKWVLTTRITNNDLEAA
DLDEDGVVGAAEFIVYKLEMGKIDEKDISGIMDEF**EQLDYDESGTLT****TS**DIVLAQTTSQ
IQR

Tpk4p

MEEENLLNENLLHPNESSPEETQVTTVSKSKWTILVLAMILLLVYLTFGVCTYSFFRDQF
SGTETNLFVDAFYFSIV**TFSTVGYG**DIVPSTSTTKILTIVLVSTGVVFLDYLLNRVSHV
LSLQENAILDRINKTRNRAIRDHIAEDGKIRLKWKLCLAFCAVGLCVGSGALFLHVFERL
DWLDSVYLSVIV**SVTTVGYG**DKTFKTVEGRGFVFWLLLSTIAMATLFLYLAEMRIDRTTV
MKLPPSESEFIVFKLRESGRISED DIKQIVREFENLEEVPSGS

Kco3p

MPMTPSEFKNRLLFGSLPRSSSDPTDLQFTEPNVPPSLFSLPEHNDDTATDMAPDQETEQ
SVSKSIARQALALLVVYLSLGVLIYWLTLDSDNAYQTHPVAVALYFFVVTFCGFLIVHFV
VKIGWLDSFCFSVMM**VTTVGF**GDRAFNTWLGTFLLAAVWLLVSTLAVARAFLLADARADK
RNRERAKKVLGESISISQFF**AADIDNDGR**LSLAEFAIYKLEKQMEKITQEDFIQICNQFDK
LDRTQSGRITLVDLTTATSV

Blau: 14-3-3 Konsensus-Motiv, Rot: Porenloops, Grün: EF-Hand-Motive

Aminosäuresequenz von Grf1p (14-3-3) und Grf6p (14-3-3)

Grf1p / 14-3-3

MATPGASSARDEFVYMAKLAEQAERYEEMVEFMKAVAKAVDKDELTVVEERNLLSVAYKNVI
GARRASWRIISSIEQKEESRGNDHVS LIRDYRSKIETELSDICDGILKLLDTILVPAAAS
GDSKVFYLMKMGDYHRYLAEFKSGQERKDAEHTLTAYKAAQDIANSELAPTHPIRLGLAL
NFSVFFYYEILNSPDRACNLAKQAFDEAIAELDTLGEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDMQ
DDVADDIKEAAPAAAKPADEQOS

Grf6p / 14-3-3

MAATLGRDQYVYMAKLAEQAERYEEMVQFMELVTGATPAEELTVVEERNLLSVAYKNVIGSL
RAAWRIVSSIEQKEESRKNDEHVSLVKDYRSKVESELSSVCSGILKLLDHLIPAGASESK
VFYLMKMGDYHRYMAEFKSGDERKTAEDTMLAYKAAQDIAADMAPTHPIRLGLALNFSVF
YYEILNSSDKACNMAKQAFEEAIAELDTLGEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDMQEQMDEA

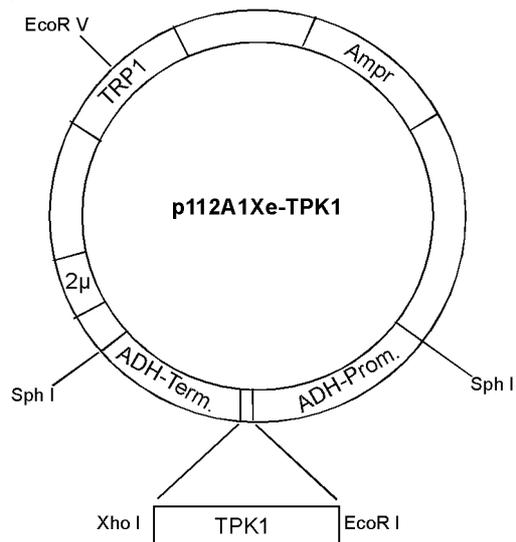
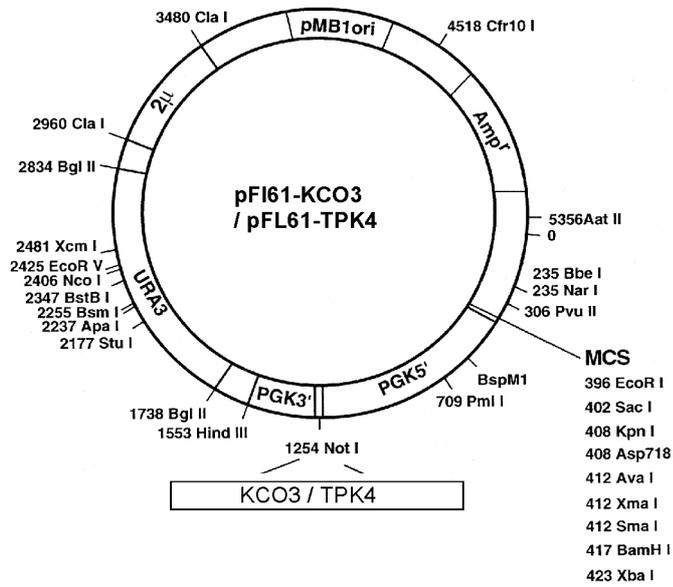
Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

Alter Name	Neuer Name	Genort	Länge genomische Sequenz	Anzahl Introns	Länge codierende Sequenz	Länge AS-Sequenz	MG in kDA	Anzahl TM-Domänen	Anzahl Poren-loops	EF-Hände	Bindestelle für 14-3-3
KCO1	TPK1	At5g55630	1758	1	1092	364	40,7	4	2	2	1
KCO2	TPK2	At5g46730	2194	1	1332	444	49,3	4	2	1	1
KCO3	KCO3	At5g46360	1401	1	783	261	29,1	2	1	1	0
KCO4	TPK4	At1g02510	937	1	855	285	32,1	4	2	0	0
KCO5	TPK5	At4g01840	1876	1	1227	409	46,3	4	2	0	1
KCO6	TPK3	At4g18160	2038	1	1311	437	48,7	4	2	1	1

Tabelle 7.1 Mitglieder der TPK (KCO) - Familie aus *A. thaliana*

Karten der verwendeten Expressionsvektoren



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christian Eing (geb. Ziegler)
Geburtsdatum, -ort: 21. August 1973, Karlsruhe
Anschrift: Bienwaldstr. 51
76287 Rheinstetten
Telefon/Fax: 0721 – 9 51 26 14
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet seit 29.07.1997 mit Bianka Eing, Lehrerin

Ausbildung

1981 - 1984 Grundschule Daxlanden, Karlsruhe
1984 - 1993 Walahfrid-Strabo-Gymnasium, Rheinstetten
Mai 1993 Allgemeine Hochschulreife
August 1993 -
Oktober 1994 Zivildienst im Sekretariat des DPWV, Karlsruhe
WS 94/95 -
WS 01/02 Studium der Biologie, Universität Karlsruhe
Hauptfächer Botanik und Mikrobiologie,
Nebenfächer Biochemie und organische Chemie
November 2001 Diplom in Biologie

Berufstätigkeiten

Januar 2002-
September 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Botanischen
Institut 1 der Universität Karlsruhe
Juni 2003-
Dezember 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Botanischen
Institut 1 der Universität Karlsruhe (Promotion)