

# Regulation des Kaliumausstroms im ABA- und Jasmonatvermittelten Stomaschluss



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Sabrina Förster

aus Würzburg

Würzburg, 2015



# Prüfungskommission

Eingereicht am: 03.07.2015

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Becker
2. Gutachterin: Dr. Susanne Berger

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Urkunde ausgehändigt am:.....



# Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
1.1 Verschießbare Poren kontrollieren den Gasaustausch im Blatt .....	2
1.1.1 Einfluss verschiedener Stimuli auf die Öffnungsweite der Poren .....	2
1.1.2 Mechanismus der Schließzellbewegungen .....	5
1.1.3 Verarbeitung und Weiterleitung von Ca <sup>2+</sup> -Signalen .....	6
1.2 Das Stresshormon Abscisinsäure .....	9
1.2.1 Synthese von Abscisinsäure .....	9
1.2.2 Wirkungen von Abscisinsäure .....	11
1.2.3 Regulation der Stomabewegungen durch Abscisinsäure.....	12
1.3 Jasmonate.....	14
1.3.1 Synthese von Jasmonaten .....	15
1.3.2 Signaltransduktion von Jasmonaten .....	17
1.3.3 Wirkungen von Jasmonaten .....	18
1.4 Immunabwehr .....	20
1.4.1 Ablauf einer Infektion.....	20
1.4.2 Stomaschluss nach Pathogenerkennung.....	22
1.5 Kontrolle des Kaliumeffluxes in Schließzellen durch GORK .....	24
1.6 Ziele dieser Arbeit.....	27
II. Material und Methoden .....	28
2.1. Methoden mit <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
2.1.1 Anzuchtbedingungen.....	28
2.1.2 Analyse von Stomaschlussweiten.....	29
2.1.3 Protoplastierung und Transformation von Protoplasten .....	30
2.1.4 Infektion mit <i>Pseudomonas syringae</i> .....	31
2.1.5 Gesamt-RNA- Isolation aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
2.2 Methoden mit RNA.....	33
2.2.1 Generation von cDNA aus Gesamt-RNA.....	33
2.2.2 <i>In Vitro</i> Transkription von cRNA .....	35
2.2.3 Qualitäts- und Quantitätskontrolle von RNA .....	36
2.3 Methoden mit DNA .....	37
2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion .....	37

2.3.2 Gelelektrophorese mit DNA .....	38
2.3.3 PCR-Aufreinigung.....	39
2.3.4 Klonierung nach der USER™ – Strategie .....	39
2.3.6 Restriktionsverdau.....	40
2.3.7 Sequenzierung.....	42
2.4 Quantitative Echtzeit- Polymerasenkettenreaktion (qRT-PCR).....	42
2.4.1 Auswertung von qRT-PCR-Analysen .....	44
2.4.2 Primerdesign und Synthese.....	44
2.5 Kultivierung und Techniken mit <i>E.coli</i> .....	44
2.5.1 Wachstumsbedingungen von <i>E. coli</i> .....	45
2.4.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien .....	45
2.4.3 Isolation von Plasmid-DNA .....	46
2.4.4 Kryokonservierung von <i>E. coli</i> .....	46
2.6 Elektrophysiologie .....	47
2.6.1 Präparation von <i>Xenopus</i> - Oozyten.....	47
2.6.2 Mikroinjektion von cRNA.....	48
2.6.3 Elektroden .....	48
2.6.4 Durchführung einer DEVC-Messung.....	49
2.6.5 Spannungsprotokolle.....	50
2.6.6 Datenerfassung und Auswertung.....	51
2.7. Fluoreszenzmikroskopie .....	51
2.7.1 Oozyten .....	51
2.7.2 Protoplasten .....	52
2.7.3 FRET-basierte Messung der ABA-Konzentrationsänderungen.....	52
III. Ergebnisse.....	54
3.1 Regulation des Kaliumkanals GORK durch reversible Phosphorylierung.....	54
3.1.1 Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern von GORK.....	55
3.1.2 GORK wird durch die Phosphatase ABI2 partiell inhibiert .....	57
3.1.3 Antagonistische Regulation von GORK durch ABI2 und einige Kinasen.....	59
3.1.4 Interaktionen zwischen GORK, PP2Cs und Kinasen.....	62
3.1.5 CIPK5/CBL1 aktiviert GORK calciumabhängig.....	64
3.2 Bedeutung der GORK-Regulation im Stomaschluss .....	67
3.2.1 Expression der Signalwegskomponenten in Schließzellen.....	67
3.2.2 Stomata reagieren unterschiedlich auf Reize.....	69
3.2.3 Einfluss der experimentellen Bedingungen auf die Stoma-Antworten.....	71

3.2.4 Verlustmutanten der Signalwegskomponenten sind MeJA-insensitiv.....	73
3.2.5 Die Rolle von GORK in der stomatären Verteidigung.....	76
3.3 Crosstalk zwischen MeJA, ABA und Coronatin in der Stomaregulation.....	78
3.3.1 Perzeption und Synthese von ABA und Jasmonaten.....	79
3.3.2 Einfluss von ABA auf die Kinetik der Stoma-Wiederöffnung durch Coronatin .....	82
3.3.3 Transiente ABA-Insensitivität durch Coronatin.....	85
3.3.4 Der MeJA- vermittelte Stomaschluss involviert Proteindegradation.....	86
IV. Diskussion.....	88
4.1 Regulation von GORK in Stomata .....	89
4.1.1 ABI2 verbindet GORK mit dem ABA-Signalweg.....	89
4.1.2 Kinasen aktivieren GORK .....	91
4.1.3 Interaktionen zwischen GORK, PP2Cs und Kinasen.....	93
4.1.4 Details der CBL1-CIPK5 Aktivierung von GORK.....	94
4.2 Der GORK-Signalknoten ist essentiell für den MeJA-vermittelten Stomaschluss .....	97
4.2.1 Expression der GORK-Regulatoren in Wurzeln und Schließzellen .....	97
4.2.2 MeJA-, aber nicht ABA-Insensitivität von Schließzellen der Verlustmutanten .....	99
4.2.3 <i>P. syringae</i> öffnet die Stomata mit Coronatin.....	102
4.2.4 Stomatäre Verteidigung gegen biotrophe und nekrotrophe Pathogene.....	104
4.3 Crosstalk der Signalwege zwischen ABA, JA und Coronatin.....	105
4.3.1 Antagonismus der ABA- und der COR-vermittelten Stomabewegung.....	106
4.3.2 ABA-Beteiligung an der Jasmonat-Signaltransduktion.....	108
4.3.3 Die Bedeutung der JAZ-Proteine und der JA-Ile–Synthese für den Stomaschluss .....	109
4.3.4 Gezielter Proteinabbau im Stomaschluss.....	110
4.3.5 physiologische Rolle des JA-induzierten Stomaschlusses .....	112
4.4 Ausblick.....	113
V. Zusammenfassung .....	90
VI. Summary .....	117
VII. Anhang .....	117
7.1 Referenzen .....	117
7.2 Abkürzungsverzeichnis .....	129
5.3 Abbildungsverzeichnis.....	131
5.4 Tabellenverzeichnis .....	132
5.5 Primerverzeichnis.....	132
5.6 Verwendete <i>Arabidopsis</i> - Mutanten.....	133



## I. Einleitung

Im Laufe ihres Lebens sind Pflanzen Umwelteinflüssen wie Temperaturschwankungen, Wassermangel und -überschuss, UV-Strahlung und Ozon ausgesetzt. In Abhängigkeit von Standort und Jahreszeit können zusätzlich Bedingungen wie beispielsweise ein Mangel an Licht oder Nährstoffen, ein Salz- oder Schwermetallbelasteter Boden das Pflanzenwachstum negativ beeinflussen. Neben diesen abiotischen Faktoren müssen Pflanzen auch Fraßfeinde abwehren, wie zum Beispiel herbivore Säugetiere oder Insekten, Bakterien, Pilze, Viren, Nematoden oder parasitische Pflanzen. Die Schädlingsabwehr benötigt, ebenso wie die Adaption an abiotische Stressoren, wichtige Ressourcen, die andernfalls für Wachstum und Entwicklung verwendet werden könnten (Yang et al., 2012). Über mehrere hundert Millionen Jahre hinweg entwickelte sich in Pflanzen ein komplexes System aus Signalwegen, das es ihnen ermöglicht, differenziert und rasch auf ihre Umwelt zu reagieren, um trotz negativer Umwelteinflüsse so effektiv wie möglich zu wachsen (Nardmann und Werr, 2007; Hauser et al., 2011). Dabei spielen Phytohormone und die direkt von ihnen gesteuerten Signalwege als auch deren Wechselwirkung untereinander eine große Rolle.

Eines der größten universal auftretenden abiotischen Stressfaktoren für das Wachstum von Landpflanzen stellt limitierte Verfügbarkeit von Wasser dar. Seit der ersten erfolgreichen Landbesiedelung der Pflanzen vor etwa 475 Millionen Jahren entwickelten sich zahlreiche Adaptionen, durch die Pflanzen einen ausgeglichenen Wasserhaushalt aufrecht erhalten können (Wellman et al., 2003). Dazu gehören beispielsweise eine mit Cuticula überzogene Epidermis als Verdunstungsschutz, kontrollierbare Porenöffnungen zum Gasaustausch und die Entwicklung eines Leitgewebes für den Wasser-, aber auch Nährstofftransport zwischen Wurzeln und oberirdischem Gewebe (Raven 2002). Dadurch gelingt es Pflanzen, trotz einer variierenden Wasserversorgung über die Wurzeln und Wasserverlust durch Verdunstung Einfluss auf ihren Wassergehalt zu nehmen.



### 1.1 Verschießbare Poren kontrollieren den Gasaustausch im Blatt

Stomata stellen ein eindrucksvolles Beispiel für die Anpassungsfähigkeit von Pflanzen dar, weil sie über einen komplexen Regulationsmechanismus verfügen, der trotz enormer Fortschritte noch immer nicht in allen Einzelheiten verstanden ist. Stomata sind Poren in der Epidermis, die von einem Schließzellenpaar umgeben sind. Diese können durch eine Änderung ihrer Form die Öffnung zu dem dahinter liegenden gasgefüllten Zwischenraum im photosynthetisch aktiven Blattgewebe, dem Mesophyll, öffnen oder schließen. Die auf Volumenregulation basierte Formänderung der Schließzellen wird dadurch erreicht, dass Ionen über die Zellmembran der Schließzellen transportiert werden und Wasser passiv nachströmt. Die Hauptaufgabe der Schließzellregulation besteht darin, den CO<sub>2</sub>-Bedarf der Photosynthese gegen den Wasserverlust durch Transpiration zu balancieren, um so einerseits eine bestmögliche Wachstumsrate zu erzielen, andererseits aber auch die vegetativen Pflanzenteile vor Austrocknung zu schützen sowie eine kontinuierlichen Wassersäule im Xylem aufrechtzuerhalten (Raven, 2002). Gleichzeitig dient der durch die Stomaweite kontrollierte Transpirationssog im Xylem durch die Stomata auch dem Nährstofftransport von den Wurzeln zu den Blättern. Jedoch stellen Stomata Eintrittsorte für pathogene Bakterien und Pilze dar, sodass ein Schließen der Porenöffnung auch der Abwehr von Pathogenen dient (Sawinski et al., 2013).

#### 1.1.1 Einfluss verschiedener Stimuli auf die Öffnungsweite der Poren

Schließzellen sind in der Lage, eine Vielzahl von abiotischen und biotischen Effektoren wahrzunehmen und in eine Signalantwort zu integrieren. Dazu gehören beispielsweise Lichtqualität und -quantität, Luftfeuchtigkeit, CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Blattinneren sowie PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, Pathogen-assoziierte molekulare Muster; Darwin, 1898; Vahisalu et al., 2010; Sawinski et al., 2013). Phytohormone wie Abscisinsäure (ABA), Jasmonate (JA), Salicylsäure (SA), Ethylen, Cytokinine und Auxin beeinflussen die Öffnungsweite der Pore und ermöglichen der Pflanze so auch eine systemische Antwort

(Daszkowska-Golec und Szarejko, 2013; Montillet et al., 2013; Pantin et al., 2013). Die Wahrnehmung und Signalweiterleitung für einige dieser Stimuli konnte bereits weitgehend entschlüsselt werden, während über andere weniger bekannt ist. Ersteres trifft auf die Öffnung der Pore durch Licht zu (Shimazaki et al., 2007). Blaues Licht wird von den Photorezeptoren Phototropin1 und 2 wahrgenommen und führt durch Phosphorylierung und der Beteiligung von 14-3-3- Proteinen zur Aktivierung der H<sup>+</sup>-ATPase der Plasmamembran (Amodeo et al., 1992; Emi et al., 2001; Kinoshita et al., 2001; Takemiya et al., 2006). Rotes Licht wirkt erst bei hoher Intensität, trägt aber zur Öffnung der Stomata bei, indem es in Chloroplasten die Photosynthese stimuliert (Kollist et al., 2014). Die dadurch gebildeten oder möglicherweise auch durch Stärke-Abbau gewonnenen Zucker besitzen osmotische Wirkung, was geöffnete Poren begünstigt (Shimazaki et al., 2007).

Dunkelheit führt dagegen zu einem Schließen der Pore, weil sich dann durch die Zellatmung CO<sub>2</sub> anreichert (Young et al., 2006). CO<sub>2</sub> öffnet bei niedriger und schließt die Poren bei hoher CO<sub>2</sub>-Konzentration und in Abhängigkeit vom Wasserstatus der Pflanze (Mansfield et al., 1990). Über die Perzeption und Signalwirkung von CO<sub>2</sub> in Schließzellen ist vergleichsweise wenig bekannt. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit von Stomata in intakten Blättern im Vergleich zu solchen in isolierten Epidermisstreifen deutet darauf hin, dass auch im Mesophyll CO<sub>2</sub>- Sensoren und Signalwege vorhanden sind, welche die Öffnungsweite der Stomata beeinflussen (Mott, 2009). Einige Studien legen dennoch nahe, dass CO<sub>2</sub> direkt von Schließzellen wahrgenommen wird und der CO<sub>2</sub>-Signalweg schließlich auf den Kernelementen des Stomaschluss-Signalwegs wie der Kinase OST1 (OPEN STOMATA 1) und dessen Zielen mündet (siehe Abschn. 1.1.2) (Vavasseur und Raghavendra, 2005; Xue et al., 2011). Die Expression von Karbonanhydrasen scheint für die Wahrnehmung von CO<sub>2</sub> benötigt zu werden, sodass HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anstelle von CO<sub>2</sub> von Schließzell-Sensoren erkannt werden könnte (Hu et al., 2010; Xue et al., 2011).

Auch über die direkte Erkennung von Ozon durch die Pflanze ist noch wenig bekannt. Da Ozon an der Zellwand in reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) wie Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zerfällt, könnten anstelle von Ozon auch diese durch die Schließzellen wahrgenommen werden. Kürzlich wurde eine plasmamembranstämmige Rezeptorkinase identifiziert, die als Rezeptor für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fungieren und so den Stomaschluss einleiten könnte (Hua et al., 2012). ROS selbst sind schon seit längerem für ihre Funktion im Stomaschluss bekannt (Song et al., 2014). Ozon verursacht einen Schluss der Pore innerhalb

weniger Minuten und aktiviert Anionenkanäle in Schließzellen, die auch als Zielproteine anderer Signalketten fungieren (Vahisalu et al., 2010).

Bereits bei den ersten Anzeichen von Druckabfall in der Wassersäule wird der Stomaschluss eingeleitet. Dieser Prozess wird nicht nur durch intrazelluläre Signaltransduktion in den Schließzellen, sondern auch durch ein hydraulisches Signal über das Leitgewebe von den Wurzeln zu den Blättern vermittelt (Pantin et al., 2013). Das Phytohormon Abscisinsäure ist maßgeblich daran beteiligt, und die genaue Wirkweise des Hormons ist Gegenstand zahlreicher Studien (siehe Abschn. 1.2). Daneben wurde auch ein ABA-unabhängiger Signalweg postuliert, über den jedoch noch nicht allzu viel bekannt ist (Xie et al., 2006; Marten et al., 2007).

Stomata stellen, ähnlich wie offene Wundstellen und Hydathoden, Eintrittspforten für eine Reihe von Pathogenen dar (siehe Abschn. 1.4.2). Entscheidend für die erfolgreiche Abwehr von invasiven Pathogenen ist die Erkennung durch die Pflanze. Ähnlich dem angeborenen Immunsystem von Tieren, besitzen Pflanzenzellen Muster-Erkennungsrezeptoren (PRR; *Pattern Recognition Receptors*) in der Plasmamembran, die MAMPs, PAMPs oder DAMPs (*Microbe-, Pathogen- oder Damage-Associated Molecular Patterns*, Mikroben-, Pathogen- oder Verwundungs-Assoziierte Molekulare Muster), wie beispielsweise Flagellin, Chitin, oder Lipopolysaccharide spezifisch binden und eine Signalkaskade auslösen (Nürnberger et al., 2004; Postel und Kemmerling, 2009). Nach Erkennung der PAMPs durch PRRs kommt es innerhalb weniger Minuten zur Depolarisierung der Plasmamembran, der Ansäuerung des Cytoplasmas und schließlich zum Stomaschluss. Dieser wird durch den Efflux von  $K^+$  und  $Cl^-$  und dem daraus resultierenden passiven Wasserausstrom ausgelöst (Jeworutzki et al., 2010; Koers et al., 2011). Neben ABA sind auch klassische Abwehrhormone wie Jasmonate und Salicylsäure an der Signalweiterleitung beteiligt (vgl. Abschn. 1.4.2).

### 1.1.2 Mechanismus der Schließzellbewegungen

Wie alle pflanzlichen Wachstums- und Bewegungsvorgänge basiert auch die Schließzellbewegung auf Turgor-abhängigen Volumenänderungen. Zu den Hauptosmotika der Schließzellen gehören neben dem Kation Kalium ( $K^+$ ) die Anionen Chlorid ( $Cl^-$ ), Malat und Nitrat ( $NO_2^-$ ) (Hedrich, 2012). Die Stomaöffnung wird durch die Aufnahme von Kaliumionen ausgelöst, welche durch spannungsabhängige Kaliumaufnahmekanäle und Protonengekoppelte Kaliumtransporter vermittelt wird. Die hierfür erforderliche Energetisierung der Plasmamembran wird durch die Aktivität einer Protonen pumpenden ATPase gewährleistet (Roelfsema und Hedrich, 2005). Als Gegenion für  $K^+$  können  $Cl^-$  oder  $NO_2^-$  aus dem Apoplasten über Anionen-Transporter aufgenommen oder Zucker wie Malat synthetisiert werden. Die anorganischen Ionen werden in der Vakuole gespeichert (Kollist et al., 2014). Die mit dem Einstrom der Ionen verbundene Absenkung des Wasserpotentials führt zum Wassereinstrom in die Schließzellen und dadurch zum Anstieg des Turgors (Hedrich, 2012). Angrenzende Schließzellen stoßen sich schließlich entlang ihrer Porenachse ab und die Pore öffnet sich.

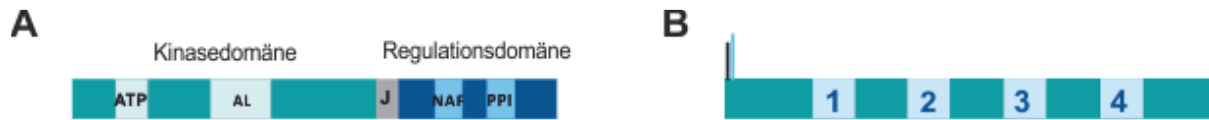
Beim Stomaschluss kehren sich diese Nettoflüsse faktisch um. In einer konzertierten Aktion verschiedener Kanäle und Transporter fließen die Ionen beim Stomaschluss erst über die Tonoplastenmembran und werden schließlich über die Plasmamembran in den Apoplasten transportiert (Kollist et al., 2014). An der Plasmamembran werden die Anionen über die Kanäle SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL 1), SLAH3 (SLAC1 HOMOLOG 3) sowie QUAC1 (QUICK ANION CHANNEL- ASSOCIATED 1) transportiert (Hedrich, 2012). Kalium wird durch den Schließzellen-Auswärtsgleichrichter GORK (GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING  $K^+$ -CHANNEL) sowie durch Mitglieder der KUP-Familie ( $K^+$  UPTAKE TRANSPORTER) in den Apoplasten entlassen (Ache et al., 2000; Osakabe et al., 2013a). Der massive Verlust an Osmotika lässt Wasser nachströmen, sodass der Turgordruck im Inneren der Zellen sinkt. Der Druck der umliegenden Epidermiszellen verschließt die Pore, die nun nicht mehr durch den Gegendruck der Schließzellen offen gehalten wird. Die dadurch bedingte Formveränderung der Schließzellen wird durch eine Umstrukturierung des Cytoskeletts und durch Endozytose von Membranbestandteilen unterstützt (Shope et al., 2003; Eisinger et al., 2012; Jiang et al., 2014b).

Zwischen Perzeption der Effektoren und Aktivierung der Ionenkanäle ist ein komplexes Netzwerk aus sekundären Botenstoffen und verschiedenen, teilweise redundanten Signalwegskomponenten geschaltet. Dazu gehören Calcium, ROS, NO, Kinasen verschiedener Familien wie CPKs (CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE), SnRK2s (SUCROSE NON-FERMENTING1 RELATED PROTEIN KINASE 2), MAPKs (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES), Phosphatasen, Phosphatidylinositol, GTPasen und Veränderungen des pH-Wertes (Kwak et al., 2008). Die Redundanz vieler Komponenten führt zur Robustheit des Netzwerks, erlaubt möglicherweise aber auch dessen Feinabstimmung. So wird beispielsweise der Anionenkanal SLAC1 durch verschiedene Kinasen aktiviert, wie die Rezeptorkinase (GHR1 GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE-RESISTANT1), OST1 (OPEN STOMATA 1), CBL1/9-CIPK23 sowie mehrerer CPKs (Brandt et al., 2012; Hedrich, 2012; Hua et al., 2012; Maierhofer et al., 2014). Nach Bindung an die jeweiligen Rezeptoren laufen die teilweise noch unbekanntes Signalwege der verschiedenen Stimuli vermutlich oberhalb oder bei OST1 zu einer einheitlichen Signalkette zusammen (Acharya et al., 2013). Zentraler Knotenpunkt des Stomaschlusses ist die SnRK-Kinase OST1, die mit einer Vielzahl von Kanälen und weiteren Proteinen interagiert, die an der Stomaregulation beteiligt sind. Verlust von OST1 führt zu einer Insensitivität der Schließzellen auf alle bisher untersuchten Reize (Melotto et al., 2006; Vahisalu et al., 2010; Xue et al., 2011; Acharya et al., 2013).

### 1.1.3 Verarbeitung und Weiterleitung von Ca<sup>2+</sup>-Signalen

Der sekundäre Botenstoff Ca<sup>2+</sup> ist in Pflanzen von essentieller Bedeutung für ihr Überleben und vielseitig in seinen Funktionen. Ca<sup>2+</sup> spielt nicht nur bei Entwicklungsprozessen wie Fortpflanzung oder der Wurzelbildung eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Toleranz von abiotischem Stress, wie Trockenheit, Hitze oder Salz, bei circadianen Prozessen, sowie bei Symbiose mit Mikroorganismen und der Abwehr von Pathogenen (Dodd et al., 2010). Gemeinsam mit ROS stellt Ca<sup>2+</sup> den wohl wichtigsten sekundären Botenstoff in der Regulation der Schließzellbewegungen dar (Song et al., 2014; Murata et al., 2015). Um diese Vielseitigkeit auf zellulärer Ebene signalspezifisch in eine Antwort zu übersetzen, benötigt es stark regulierte und sensible Systeme zur Perzeption und Weiterleitung des Ca<sup>2+</sup>-Signals. Dieses spezifische

Signal, auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Signatur genannt, stellt eine Oszillation der cytosolischen freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) dar, die je nach Reiz in Frequenz, Amplitude sowie Dauer variieren kann (McAinsh und Hetherington, 1998; McAinsh und Pittman, 2009). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signatur wird durch den kontrollierten Ein- bzw. Ausstrom durch Transporter und/oder Pumpen in der Plasmamembran und den Membranen von intrazellulären Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum und der Vakuole erzeugt. Unter normalen Bedingungen liegt die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei etwa 100 nM, um bei Auslösen eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals um auf das bis zu 100-fache anzusteigen. Intrazelluläre Kompartimente und auch der Apoplast besitzen deutlich höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und dienen als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Stael et al., 2012). Verlieren Mutanten ihre Fähigkeit zur Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , sind sie weniger tolerant gegenüber biotischem wie abiotischem Stress (Michal Johnson et al., 2014). Diese spezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale werden durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteine dekodiert und weitergeleitet. Anders als bei Hormonen existiert kein spezieller Rezeptor für den sekundären Botenstoff. Viele Proteine, die als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor fungieren, besitzen ein spezielles Strukturmotiv zur Erkennung von  $\text{Ca}^{2+}$ , die EF-Hände (Snedden und Fromm, 2001). Der Name leitet sich von den Helices E und F von Calmodulin ab, die eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle flankieren, die der Form einer Hand ähnelt (McCormack et al., 2005). Pflanzliche Zellen besitzen mehrere Familien von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren mit EF-Händen, wie beispielsweise Calmodulin (CaM) und Calmodulin-ähnliche (CML, *Calmodulin-like*),  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen (CPKs,  $\text{Ca}^{2+}$ -DEPENDENT PROTEIN KINASE) und den CBLs (CALCINEURIN B-LIKE), die als Sensorprotein mit den CIPKs (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE) interagieren (Dodd et al., 2010). *Arabidopsis* besitzt 7 CaMs und 50 CMLs, die selbst keine Enzymaktivität besitzen, sondern nur das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal weiterleiten. Nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an ihre EF-Hände ändert sich die Konformation des Proteins, was die Interaktion mit den Zielproteinen von CaMs und CMLs verändert, wodurch deren Aktivität beeinflusst wird (McCormack et al., 2005). Die insgesamt 34 CPKs in *Arabidopsis* besitzen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Binde-domäne, die Calmodulin ähnelt, sowie eine Kinasedomäne. Nach Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung leiten sie das Signal durch Phosphorylierung ihrer Zielproteine weiter (Das und Pandey, 2010). CPKs sind an zahlreichen Signalwegen beteiligt, etwa im Stomaschluss, bei dem CPK6 den Anionenkanal SLAC1 aktiviert, oder bei der Immunreaktion auf bakterielles Flagellin, nach dessen Perzeption CPK5 die NADPH-Oxidase RBOHD phosphoryliert (Dubiella et al., 2013).



**Abb. 1.1: Modelle von CIPKs und CBLs.**

A), Modell von CIPK5. ATP, ATP-Bindestelle; AL, Aktivierungsloop; J, Verbindungsdomäne zwischen Kinase- und Regulationsdomäne; NAF, CBL-Interaktionsstelle benannt nach konserviertem Asn-Ala-Phe-Motiv, PPI, PP2C-Interaktionsstelle. B), Modell von CBL1. Senkrechte Striche deuten Myristoylierung und S-Acylierung an. 1-4, EF-Hände.

Die Familie der CBLs besteht in *A. thaliana* aus 10 Mitgliedern, die als reine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren fungieren. Sie interagieren mit 26 CIPKs, die ihrerseits eine Vielzahl von Zielproteinen phosphorylieren (Modelle in Abb. 1.1; Batistic und Kudla, 2009). Durch die Trennung in Sensor und Kinase und die flexiblen Kombinationsmöglichkeiten zwischen CBLs und CIPKs wird ein komplexes Netzwerk geformt. CBLs besitzen vier EF-Hände und ändern nach Calciumbindung ihre Konformation, wodurch auch die Konformation ihrer interagierenden CIPK beeinflusst wird (Kolukisaoglu et al., 2004). Einige CBLs besitzen Palmitoylierungs- und Myristoylierungsstellen zur Verankerung in der Plasmamembran oder dem Tonoplast, wodurch die Sensoren näher an die Quelle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaturen und ihre Zielproteine gebracht werden (Cheng et al., 2002; Batistic et al., 2008; Batistic et al., 2010). Je nach CBL-Partner kann eine CIPK somit auf intrazellulärer Ebene unterschiedlich lokalisiert sein, wie beispielsweise CIPK24. In Abhängigkeit der Interaktion mit CBL4 oder CBL10 kann die Kinase entweder an der Plasmamembran oder den Tonoplasten verankert sein (Halfter et al., 2000; Quan et al., 2007). CIPKs bestehen aus einer N-terminalen Kinase- und einer C-terminalen autoinhibitorischen Regulationsdomäne (Abb. 1.1A). Durch Bindung von CBLs an die sogenannte NAF-Domäne, die nach dem konservierten Motiv aus Asn-Ala-Phe benannt ist, wird vermutlich die Kinasedomäne durch eine Konformationsänderung zugänglich und aktiviert (Guo et al., 2001). Eine weitere Domäne, die sogenannte PPI-Domäne (*Protein- Phosphatase Interaction*), ist für die Interaktion mit Phosphatasen der Klasse PP2C verantwortlich (Ohta et al., 2003).

Die Ziele der CBL-CIPK-Komplexe sind vielfältig. Die NADPH-Oxidase RBOHF wird durch CBL1/9-CIPK26 phosphoryliert, die durch ROS-Produktion zum Stomaschluss beiträgt (Desikan et al., 2006; Drerup et al., 2013). CBL1/9-CIPK23 unterstützt die  $\text{K}^+$ -Homöostase, indem er die  $\text{K}^+$ -Aufnahme in den Wurzeln durch AKT1 aktiviert (Lee et al., 2007). CBL1 und 9 scheinen darüber hinaus beide an Wachstum und Keimung des Pollenschlauchs beteiligt zu sein (Mahs

et al., 2013). CBL-CIPK-Interaktionspartner werden häufig mit der ABA-Signalgebung und abiotischem Stress wie Kälte oder Salz in Verbindung gebracht, während über eine CBL-CIPK-vermittelte Adaption gegen biotischem Stress noch wenig bekannt ist (Albrecht et al., 2003; Cheong et al., 2003; Chen et al., 2013).

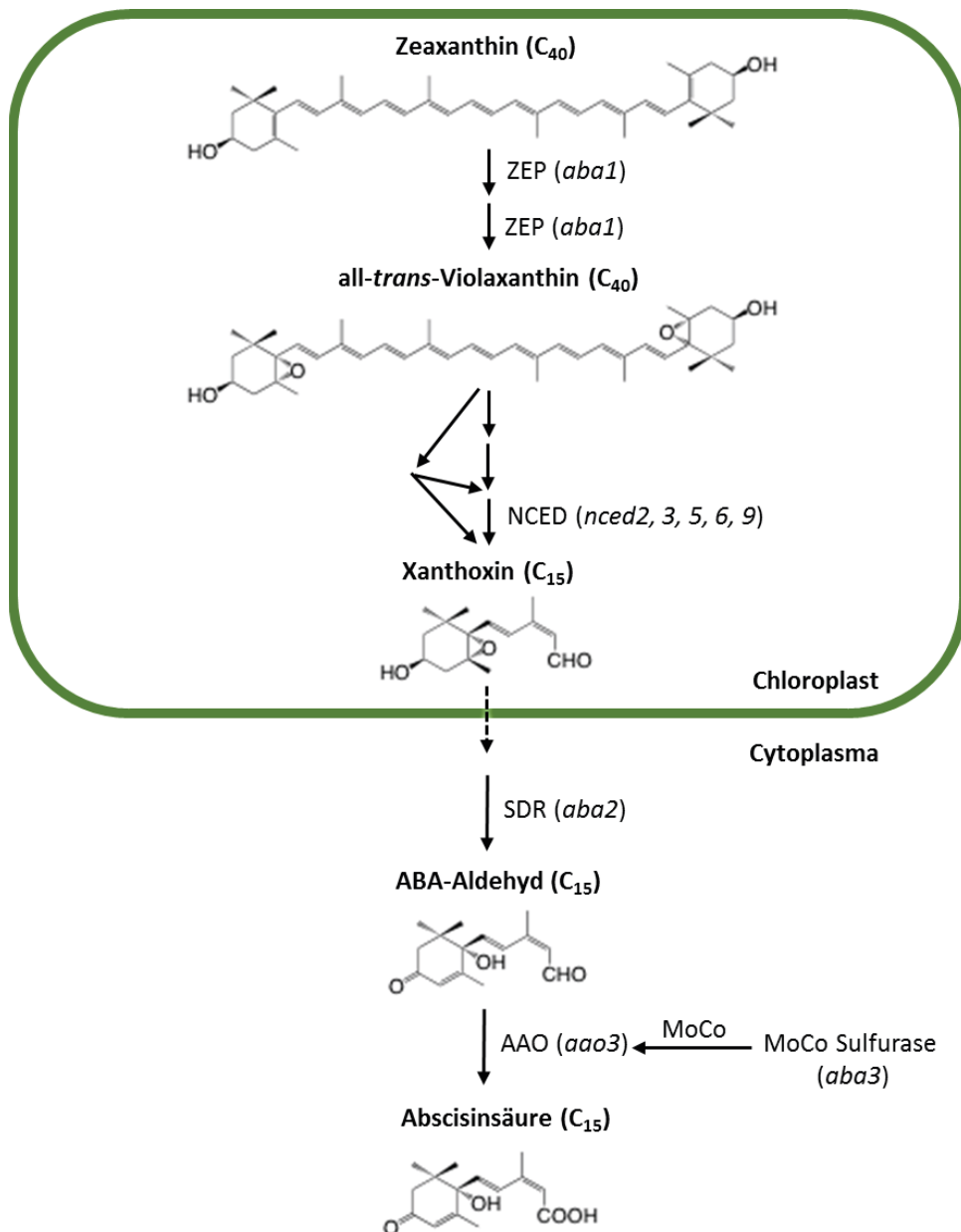
## 1.2 Das Stresshormon Abscisinsäure

Die Rolle von Abscisinsäure (ABA) ist früh entstanden und in Pflanzen hochkonserviert. Bereits in Moosen und Hornblattgewächsen löst das Hormon den Stomaschluss aus (Hartung et al., 1987; Raven, 2002), und es ist in allen Domänen des Lebens außer *Archaea* als Stresshormon bekannt (Hauser et al., 2011). Die Synthese von ABA scheint in höheren Pflanzen durch jede Form von limitierter zellulärer Wasserverfügbarkeit ausgelöst zu werden (Hauser et al., 2011).

### 1.2.1 Synthese von Abscisinsäure

Das Phytohormon Abscisinsäure ist ein Terpenoid bestehend aus 15 Kohlenstoff-Atomen. Es wird durch Spaltung von C<sub>40</sub>-Carotinoiden wie Zeaxanthin gebildet, die auf dem Methylerythritolphosphat- (MEP-)Weg entstanden sind (zusammengefasst von Nambara und Marion-Poll, 2005). Die ersten Schritte laufen in den Plastiden ab, während alle Weiteren im Cytosol stattfinden (Abb. 1.2). Das Sesquiterpen Xanthoxin wird durch oxidative Spaltung von 9-*cis*-Violaxanthin oder 9'-*cis*-Neoxanthin erzeugt und in das Cytoplasma exportiert. Xanthoxin wird dort zu ABA-Aldehyd umgewandelt. Der letzte Schritt, die Oxidierung des Abscisinsäure-Aldehyds, wird von der Abscisin-Aldehydoxidase 3 (AAO3) katalysiert und benötigt einen Molybdän-Cofaktor (MoCo). Ist die Synthese des MoCos durch Mutationen in den beteiligten





**Abb. 1.2: Syntheseweg von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*.**

Die ersten Schritte ABA-Synthese sind in Plastiden lokalisiert. Nach Export von Xanthoxin in das Cytoplasma finden dort die letzten zwei Schritte statt. Das Carotenoid Zeaxanthin wird auf dem MEP-Syntheseweg gebildet. Nach Umwandlung zu Violaxanthin wird der C<sub>40</sub>-Körper zu Xanthoxin (C<sub>15</sub>) und ein C<sub>25</sub>-Metabolit oxidativ gespalten. Xanthoxin wird zu ABA-Aldehyd reduziert und schließlich zu ABA oxidiert. In Klammern sind bekannte Biosynthese-Mutanten angegeben. ZEP, Zeaxanthin Epoxidase; NCED, 9-cis- Epoxycarotenoid Dioxygenase; SDR, Short-chain Dehydrogenase Reductase; AAO, Abscisic Aldehyde Oxidase.

Genen gestört, weisen die betreffenden Pflanzen einen schweren ABA-Mangel auf, wie beispielsweise im Falle von ABA3, welches für eine MoCo-Sulfurase codiert (Xiong et al., 2001). Neben der *de novo*-Synthese von ABA stellen auch Konjugation und Abbau des Hormons wichtige Regulationsmechanismen für die Kontrolle des ABA-Levels in Pflanzen dar, der durch ständige Balance dieser Stoffwechselwege eingestellt wird, beispielsweise durch Rückkopplungsschleifen (Finkelstein, 2013).

### 1.2.2 Wirkungen von Abscisinsäure

Abscisinsäure gilt als Stresshormon, da es die Toleranz der Pflanze gegenüber abiotischem, aber zum Teil auch biotischem Stress fördert. Am besten bekannt ist das Phytohormon für seine Wirkung unter Trocken- und Salzstressbedingungen, bei denen der ABA-Gehalt stark ansteigt (Seki et al., 2007). Bereits bei den ersten Anzeichen von Wassermangel leitet ABA den Stomaschluss ein und nimmt Einfluss auf die Genexpression. Die veränderte Genexpression zielt darauf ab, den osmotischen Haushalt der Zelle aufrechtzuhalten und entstandene Schäden zu reparieren (Zhu, 2002). So führt der gestiegene ABA-Gehalt bei Trockenheit beispielsweise zu einer gesteigerten Produktion von Cuticula-Wachsen, um die Transpiration über die Blattoberfläche zu verringern, und zur erhöhten Herstellung von Zuckern, Zuckeralkoholen und Aminosäuren wie Sorbitol, Mannitol und Prolin, die den Zellturgor aufrechterhalten und so die Zelle stabilisieren sollen (Seki et al., 2007; Seo und Park, 2011).

Auch bei Wachstum und Entwicklung spielt ABA eine wichtige Rolle, meist antagonistisch zu anderen Phytohormonen, wie Auxine, Giberelline, Cytokinine und Ethylen (Finkelstein et al., 2008; Arc et al., 2013; Yang et al., 2014). Zu den am besten untersuchten ABA-Effekten gehört die Aufrechterhaltung der Samenruhe und die Hemmung der Seitenwurzelbildung unter Trockenstressbedingungen (De Smet et al., 2006; Finkelstein et al., 2008). Andererseits scheinen basale ABA-Level in Abwesenheit von Stressfaktoren für eine optimale Entwicklung benötigt zu werden. Mutanten im ABA-Syntheseweg weisen häufig ein vermindertes Wachstum auf, das durch eine geringe ABA-Gabe normalisiert werden kann (Barrero et al., 2005).

Bei biotischem Stress spielt ABA eine untergeordnete Rolle gegenüber den Abwehrhormonen JA, SA und Ethylen (Pieterse et al., 2009). Die Funktionen von ABA variieren stark, je nach Art des Pathogens und den beteiligten Abwehrhormonen, mit denen ABA teils synergistisch, teils antagonistisch wechselwirkt. ABA schwächt zwar die durch SA geförderte systemische erworbene Resistenz (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) ab, fördert allerdings die Jasmonsäure-vermittelte Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen (Adie et al., 2007; Yasuda et al., 2008). So vermittelt das Hormon beispielsweise die Kallosebildung bei einer Infektion mit dem Pilz *Leptosphaeria maculans* und dem Bakterium *Pseudomonas syringae* (Oide et al., 2013). Manche Pathogene, wie *P. syringae*, machen sich auch die antagonistischen Eigenschaften von ABA zu eigen, um das Immunsystem der Pflanze zu schwächen (vgl. Abschn. 1.4.1)(Melotto et al., 2006).

### 1.2.3 Regulation der Stomabewegungen durch Abscisinsäure

Wie bereits erwähnt, ist Abscisinsäure das wichtigste Hormon bei Trockenstress und ist maßgeblich an der Regulation der Stomabewegungen beteiligt. Die ersten Schritte der Hormon-Erkennung und Signalweiterleitung werden durch ein zentrales Signalmodul vermittelt, welches aus drei Proteinklassen besteht: Mitglieder der PYR (PYRABACTIN RESISTANCE)/ PYL (PYR-LIKE)/ RCAR (REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR)-Rezeptorfamilie, welche spezifisch ABA erkennen und binden, Phosphatasen der PP2C-Klasse (PROTEIN PHOSPHATASE 2 C), welche als Negativregulatoren fungieren, und Kinasen der SnRK2s (SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2s), die meist als Positivregulatoren wirken. Nach Bindung von ABA an einen der PYR/PYL-Rezeptoren bildet dieser einen Komplex mit einer oder mehreren Mitgliedern der PP2C-Familie wie ABI1 und ABI2, was zur Inhibierung der Phosphatase-Aktivität führt (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Santiago et al., 2009). Durch die Freisetzung der SnRKs, die- vermutlich durch Autophosphorylierung- konstitutiv aktiv sind, können diese ihrerseits weitere Zielproteine phosphorylieren (Belin et al., 2006; Furihata et al., 2006). Die SnRK2-Kinase SnRK2.6/ OST1 besitzt, wie bereits erwähnt, eine zentrale Funktion in Schließzellen. Sie hemmt beispielsweise den K<sup>+</sup>-Kanal KAT1 (K<sup>+</sup> CHANNEL OF A. THALIANA) und die H<sup>+</sup>-ATPasen der Plasmamembran, und aktiviert die NADPH-Oxidasen

RbohD/F (RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D/F), den Anionenkanal SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL- ASSOCIATED 1) sowie Mitglieder der KUP ( $K^+$  UPTAKE TRANSPORTER) - Familie (Geiger et al., 2009b; Sato et al., 2009; Sirichandra et al., 2009; Hayashi et al., 2011; Osakabe et al., 2013a). Neben OST1 sind auch SnRK2.2 und SnRK2.3 mit dem ABA-Signalweg in Verbindung gebracht worden (Fujii et al., 2007).

Die ABA-Signalweiterleitung besteht neben diesem zentralen Signalgebungsknoten auch aus weiteren sekundären Botenstoffen wie  $Ca^{2+}$ , zyklischer ADP-Ribose (cADPR), Inositol-1,4,5-Trisphosphat ( $InsP_3$ ), Inositol-Hexakisphosphat ( $InsP_6$ ), Phosphatidsäure, ROS, NO und  $H_2S$  (Schroeder et al., 2001; Desikan et al., 2004; Bright et al., 2006; Garcia-Mata und Lamattina, 2013; Gayatri et al., 2013; Jiang et al., 2014b). Diese sekundären Botenstoffe wirken auf zahlreiche Ziele in der Stomaregulation und wechselwirken auch miteinander. Abscisinsäure führt durch  $Ca^{2+}$ - abhängige Phosphorylierung zur Aktivierung der NADPH-Oxidase RBOHF (RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG F), die ROS produziert (Sirichandra et al., 2009; Drerup et al., 2013). Durch eine positive Rückkopplungsschleife verstärken sich ROS und  $Ca^{2+}$  gegenseitig in ihrer Signalwirkung (Wang et al., 2013). Auch NO führt zu einem Anstieg des cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Gehalts und benutzt cGMP sowie reversible Phosphorylierungen, vermutlich durch MAPKs, zur Weiterleitung des ABA-Signals (Neill et al., 2002; Desikan et al., 2004; Sokolovski et al., 2005). Neben den SnRK2s sind auch weitere Kinaseklassen in ABA-vermittelten Stressantworten involviert, wie MAPK-Kaskaden und die  $Ca^{2+}$ -abhängigen CPKs und CBL-CIPKs (Boudsocq und Sheen, 2013; Danquah et al., 2013). Die Signalgebung durch  $Ca^{2+}$  stellt ein wichtiges Regulationsprinzip bei der Einleitung des Stomaschlusses dar (vgl. Abschn. 1.1.3).

Abscisinsäure führt nicht nur aktiv zu einer Schließung der Pore, sondern verhindert auch die Öffnung der Schließzellen, indem es die hierfür verantwortlichen Kanäle und Signalkomponenten inhibiert (Sato et al., 2009; Hayashi et al., 2011; Yin et al., 2013). Hierfür scheinen unterschiedliche Isoformen des ABA-Rezeptors verantwortlich zu sein (Yin et al., 2013). Eine hohe Spezifität- und teilweise auch Redundanz- dieses Kernkomplexes der ABA-Signalgebung wird durch die Tatsache erreicht, dass 14 PYR/PYL-Rezeptoren mit mindestens sechs PP2Cs und drei SnRKs und möglicherweise noch weiteren Regulatoren interagieren können (Boudsocq et al., 2004; Schweighofer et al., 2004; Belin et al., 2006; Fujii et al., 2007; Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Daneben wurden einige andere ABA-bindende Proteine beschrieben, wie die chloroplastenlokalisierte H-Untereinheit der Mg-Chelatase (CHLH) und

die GTGs (G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-TYPE G-PROTEIN), doch deren Funktion als ABA-Rezeptoren konnte noch nicht abschließend geklärt werden (Shen et al., 2006; Pandey et al., 2009; Du et al., 2012; Jaffe et al., 2012; Kharenko et al., 2013). Neben der Signaltransduktion durch ABA wurde auch ein ABA-unabhängiger, oxylinvermittelter, und/oder ein  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger Signalweg für den Stomaschluss postuliert, auch wenn noch nicht geklärt ist, wie die einzelnen Mechanismen und Signalwegskomponenten miteinander wechselwirken (Levchenko et al., 2005; Marten et al., 2007; Montillet et al., 2013).

### 1.3 Jasmonate

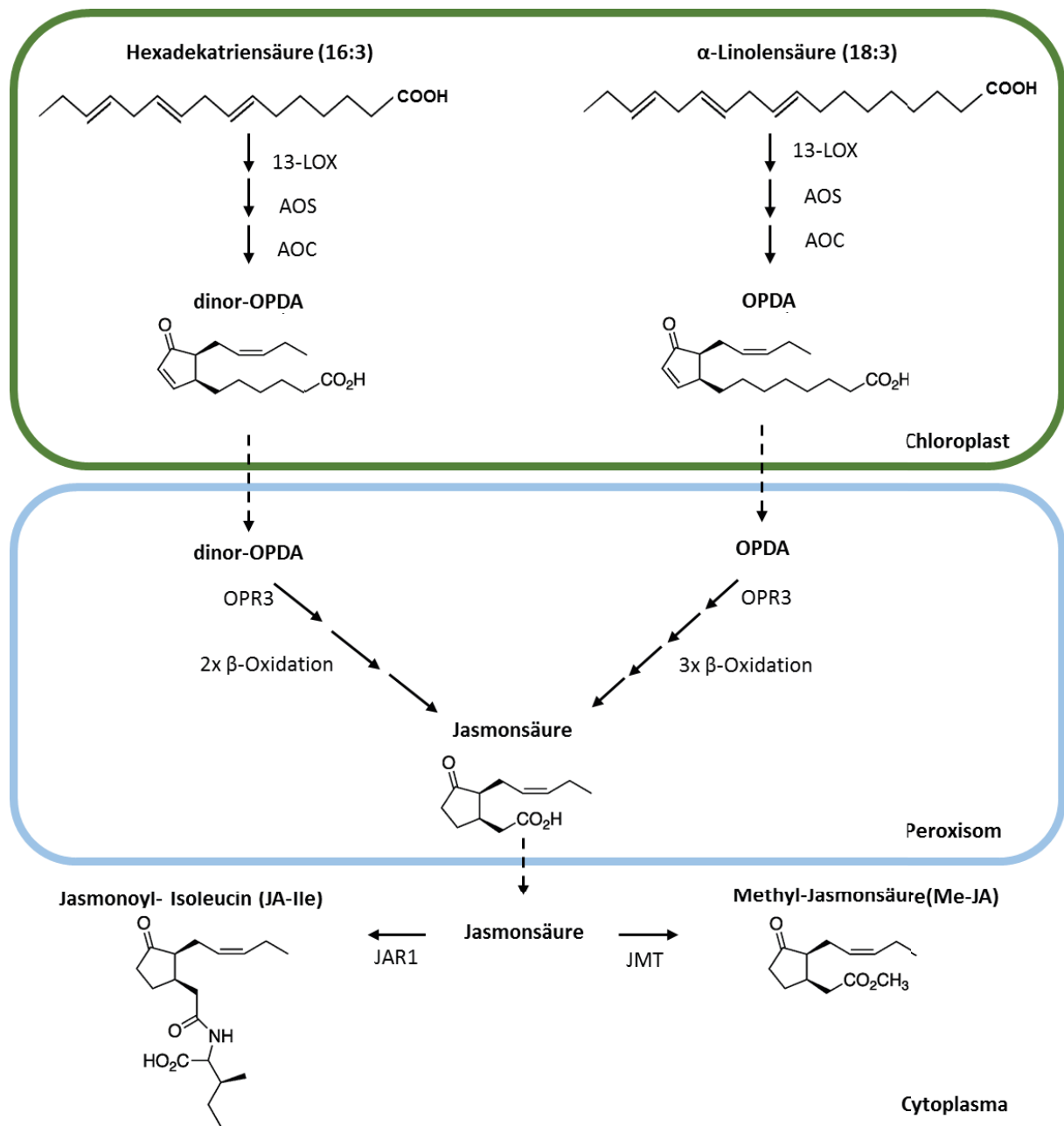
Die Stoffklasse der Jasmonate (JA) ist gemeinsam mit Salicylsäure (SA) und Ethylen (ET) eines der wichtigsten Hormone, die die Abwehr der Pflanze gegen Pathogene steuern. Nach dem derzeitigen Modell induziert SA hauptsächlich die Verteidigung gegen biotrophe Pathogene, wohingegen JA die Abwehr von nekrotrophen Pathogenen und kauend-beißende Insekten vermittelt (Pieterse et al., 2012). Durch die gegenseitige Wechselwirkung der Signalwege zwischen JA und SA, dem sogenannten JA-SA-Crosstalk, wird das Immunsystem unter Beteiligung anderer Hormone feinjustiert (Pieterse et al., 2009).

JA stellen eine Familie der Oxylipine dar, die durch enzymatische Oxygenierung von mehrfach ungesättigten  $\text{C}_{16}$ - und  $\text{C}_{18}$ -Fettsäuren gebildet werden (Wasternack und Kombrink, 2010). Die am besten beschriebenen biologisch aktiven JA sind JA-Ile und seine Vorstufe cis-(+)-12-Oxophytodiensäure (OPDA), wobei in der Pflanzenforschung aus historischen Gründen meist das Derivat Methyljasmonat verwendet wird (Acosta und Farmer, 2010; Wasternack und Hause, 2013). *Pseudomonas syringae* produziert ein funktionelles und strukturelles Mimikry von JA-Ile, Coronatin, um das Immunsystem der Pflanze zu manipulieren (Brooks et al., 2005). Ähnlich wie ABA sind auch JA als Hormone evolutiv alt. Das Moos *Physcomitrella patens* besitzt bereits Enzyme zur OPDA-Synthese, bildet allerdings noch kein JA (Stumpe et al., 2010; Thaler et al., 2012). Damit ist der Signalweg des Hormons vermutlich etwas später entstanden als der von ABA.

### 1.3.1 Synthese von Jasmonaten

Der Syntheseweg von JA verläuft analog zum Syntheseweg von Prostaglandinen aus Arachidonsäure in Tieren, welche dort eine wichtige Rolle bei Verwundungsreaktionen spielen (Schaller et al., 2004). Die Biosynthese von JA ist durch den Einsatz von Verlust-Mutanten gut untersucht und in den letzten Jahren ausführlich beschrieben worden (Feussner und Wasternack, 2002; Acosta und Farmer, 2010; Wasternack und Kombrink, 2010; Wasternack und Hause, 2013). In *Arabidopsis* werden die Enzyme, die an der JA-Biosynthese beteiligt sind, konstitutiv in allen voll entwickelten Geweben exprimiert (Stenzel et al., 2003). Deshalb ist bereits wenige Minuten nach einer Verwundung durch Herbivoren ein rapider Anstieg des JA-Gehalts zu beobachten (Glauser et al., 2008).

Ähnlich wie bei der Synthese von ABA (s. Abschn. 1.2.1), finden die ersten Syntheseschritte im Chloroplasten statt (Abb. 1.3). Das Substrat für die Jasmonatbiosynthese ist  $\alpha$ -Linolensäure (18:3), welche durch eine Lipase aus Galactolipiden der Chloroplastenmembran freigesetzt wird. Durch eine spezifische Lipoxygenase werden zwei Sauerstoffatome auf das C<sub>13</sub>-Atom von  $\alpha$ -Linolensäure übertragen (Feussner und Wasternack, 2002). Die dadurch entstehende dreifach ungesättigte Hydroperoxid-Fettsäure wird zu OPDA zyklisiert, welches aus den Chloroplasten exportiert und in die Peroxisomen importiert wird. Dort wird das Cyclopentenon reduziert. Durch drei aufeinanderfolgende  $\beta$ -Oxidationsschritte wird die saure Seitenkette zu (+)-7-Isojasmonsäure verkürzt, welche nach Export in das Cytoplasma durch JAR1 (JA- AMINO ACID SYNTHETASE 1) mit der Aminosäure Isoleucin zu Jasmonoyl-Isoleucin (JA-Ile) konjugiert wird (Staswick und Tiryaki, 2004; Wasternack und Kombrink, 2010). Auch Hexadekatriensäure (16:3) kann als Substrat für Jasmonsäure dienen; dieser Syntheseweg nimmt den Umweg über dinor-OPDA, um schließlich reduziert und durch  $\beta$ -Oxidation weiterverarbeitet zu werden (Wasternack und Kombrink, 2010). Obwohl es zahlreiche Jasmonsäurekonjugate in Pflanzen gibt, ist Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile) die bisher am besten untersuchte bioaktive Form, die an den Rezeptor COI1 (CORONATINE-INSENSITIVE 1) binden kann (Fonseca et al., 2009).



**Abb. 1.3: Syntheseweg von JA-Ile in *Arabidopsis thaliana*.**

Die ersten drei Schritte der Jasmonatsynthese finden im Chloroplasten statt, bis OPDA bzw. dinor-OPDA über noch unaufgeklärte Transporter aus dem Chloroplasten exportiert und in das Peroxisom importiert werden (gestrichelte Linie). Dort wird durch wiederholte  $\beta$ -Oxidationsschritte das Lipidgerüst bis zur Jasmonsäure verkürzt. Nach dem Export wird diese durch weitere Modifikationsschritte in ihre aktive Form (Ja-Ile) oder in inaktive Formen, wie bspw. Me-JA, umgewandelt. 13-LOX, Lipoxygenase; AOS, Allene Oxide Synthetase; AOC, Allene Oxide Cyclase; OPDA, Oxophytodienoic acid; OPR3, OPDA Reductase 3; JAR1, JA-Amino acid Synthetase 1; JMT, Jasmonate Methyl Transferase; JA-Ile, Jasmonoyl- Isoleucin; Me-JA, Methyl- Jasmonat.

### 1.3.2 Signaltransduktion von Jasmonaten

JA bewirken den Abbau von Transkriptionsrepressoren, nach deren Entfernen jasmonatabhängige Gene exprimiert werden. In der Abwesenheit von bioaktiven JA unterdrücken JAZ-Repressoren (JASMONATE ZIM-DOMAIN) die Transkription jasmonat-abhängiger Gene, indem sie an Transkriptionsfaktoren wie MYC2 binden, die die Expression dieser Gene auslösen würden. JAZ-Proteine rekrutieren hierfür den NINJA-TPL- (NOVEL INTERACTOR OF JAZ- TOPLESS) Corepressorkomplex, um die Transkriptionsfaktoren zu inaktivieren (Pauwels et al., 2010). Wenn JA-Ile an seinen Rezeptor COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1) bindet, bildet dieser daraufhin mit einem JAZ-Protein als Corezeptor einen Komplex (Yan et al., 2009). Inositol-P<sub>5</sub> vervollständigt den Rezeptorkomplex und verstärkt die Interaktion zwischen COI1 und dem JAZ - Protein (Sheard et al., 2010). COI1 ist als F-Boxprotein Teil eines E3-Ligasekomplexes. Der SCF<sup>COI1</sup>-Komplex besteht neben COI1 aus ASK1 oder ASK2 (*ARABIDOPSIS* SKP1-LIKE1 oder 2), RBX1 (RING-BOX-PROTEIN1) und CUL1 (CULLIN1; Acosta und Farmer, 2010). Durch die Hormonbindung an den Rezeptor wird der Abbau der JAZ-Repressoren durch das Ubiquitin/26S-Proteasom-System eingeleitet, indem sie durch Rekrutierung einer E2-Ligase mehrfach ubiquitinyliert und abgebaut werden (Thines et al., 2007). Durch die nun freien Transkriptionsfaktoren wie MYC2, MYC3 und MYC4 wird die Genexpression jasmonatinduzierter Gene eingeleitet (Fernandez-Calvo et al., 2011). Die 13 in *Arabidopsis* bekannten JAZ-Proteine besitzen alternative Spleißformen, unterschiedlich hohe Proteinstabilität, bilden Homo- und Heterodimere und könnten dadurch zur Feinabstimmung der JA-Signalgebung beitragen (Kazan und Manners, 2012; Thireault et al., 2015). Der C-Terminus der JAZ-Proteine ist hochkonserviert und enthält die Jas-Domäne, die für die Interaktion mit Zielproteinen wie MYC2, und damit für die JA-Signalwirkung, benötigt wird (Chini et al., 2009). Durch alternatives Spleißen, bei der dieses Jas-Motiv verloren geht, können dominante JAZ-Varianten entstehen, die zu einer JA-Insensitivität der Pflanze führen. JAZ-Proteine sind im Zellkern lokalisiert, vermutlich durch eine Interaktion mit kernlokalisierten Transkriptionsfaktoren (Withers et al., 2012). Die Konzentration von JA-Ile in der Zelle scheint darüber zu entscheiden, mit welchem JAZ-Protein COI1 interagiert, und könnte eine weitere Ebene der Feinabstimmung in die Signalgebung durch JA einbringen (Shyu et al., 2012). Neben dem Jas-Motiv besitzen die meisten der JAZ-Proteine ein TIFY-Motiv (TIF[F/Y]XG) in der ZIM-Domäne, durch das sie mit dem Adapterprotein NINJA interagieren (Chico et al., 2008). Durch



NINJA schließlich werden weitere Corepressoren wie TPL in den Repressorkomplex rekrutiert (Pauwels et al., 2010). Die erst kürzlich entdeckte JAZ13 besitzt kein TIFY-Motiv, interagiert allerdings dennoch mit MYC2 sowie TPL und ist ein Repressor im JA-Signalweg (Thireault et al., 2015). JAZ13 beinhaltet allerdings putative Phosphorylierungsstellen im C-Terminus nahe der Jas-Domäne, was weitere, noch nicht untersuchte Möglichkeiten zur Regulation des JA-Signalwegs bieten würde. Der hier beschriebene Signalweg hat die differentielle Genexpression von JA-abhängigen Genen zur Folge. Vergleichsweise wenig ist dagegen über eine rasche JA-Antwort bekannt, wie etwa beim JA-ausgelösten Stomaschluss (siehe Abschn. 1.4.2).

JA teilen sich auch Komponenten ihres Signalwegs mit anderen Hormonen; so ist TPL auch ein Korepressor der auxin-responsiven Transkriptionsfaktoren (ARFs) und durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1) auch im Brassinosteroid-Signalweg involviert (Szemenyei et al., 2008; Oh et al., 2014). Für die Wechselwirkung zwischen JA und ABA wurden sowohl antagonistische wie synergistische Interaktionen beschrieben (Adie et al., 2007). MYC2 selbst wurde zunächst als Transkriptionsfaktor im ABA-Signalweg identifiziert (Abe et al., 2003). JA erhöhen auch die Expression eines ABA-Rezeptors, der wiederum die Produktion von Sekundärmetaboliten auslöst (Lackman et al., 2011).

### 1.3.3 Wirkungen von Jasmonaten

Die Hormonwirkung der JA äußert sich vor allem in der Immunantwort, insbesondere bei der Antwort auf mechanische Verwundungen oder durch herbivore Insekten und der Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene. JA regulieren durch Genexpression viele Sekundärmetabolite, die mit der Verteidigung gegen Schädlinge assoziiert sind, wie beispielsweise Glucosinolate, Pyridin-Alkaloide und Anthocyanin, aber auch toxische Proteine wie Protease-Inhibitoren (Wasternack und Hause, 2013). Die Rolle von JA in der Abwehr von Pathogenen wird stark durch den antagonistischen Crosstalk mit SA beeinflusst, das hauptsächlich die Resistenz gegen biotrophe Pathogene vermittelt (Robert-Seilaniantz et al., 2011). In starkem Kontrast zur Abwehrfunktion der JA steht ihre Beteiligung an Aufbau und Aufrechterhaltung der Symbiose mit arbuskulären Mykorrhiza und Rhizobien (Mortier et al., 2012; Song et al., 2013).

Nicht-pathogene Mikroben führen in Pflanzen oftmals zur sogenannten induzierten systemischen Resistenz (ISR), bei der die Sensitivität gegenüber JA erhöht und dadurch das Immunsystem der Pflanze gestärkt wird (Naznin et al., 2014). JA kontrollieren außerdem die verstärkte Bildung von Trichomen auf neugebildeten Blättern (Yoshida et al., 2009). In der pflanzlichen Entwicklung sind JA an der Fortpflanzung beteiligt, wie in der Blüten- und Pollenentwicklung. Mutanten von *A. thaliana*, die in der JA-Synthese und -Signalweiterleitung gestört sind, sind männlich steril (Nagpal et al., 2005; Browse, 2009). JA hemmen das Wachstum und fördern die Blattseneszenz, vermutlich als indirekte Folge einer Ressourcenumverteilung zu Gunsten der Verteidigung gegen Pathogene und Herbivore (Yang et al., 2012; Jiang et al., 2014a).

JA unterstützen auch die Toleranz gegenüber abiotischem Stress, wie beispielsweise Salz, Kälte und Trockenheit (Kazan, 2015). Bei Kälte, Trockenheit sowie Kaliummangel steigt der JA-Gehalt stark an (Troufflard et al., 2010; Hu et al., 2013; de Ollas et al., 2015). In Wurzeln kann MeJA die hydraulische Leitfähigkeit steigern und in den Blättern den Stomaschluss einleiten (Sanchez-Romera et al., 2014; Murata et al., 2015). Ob der durch MeJA eingeleitete Stomaschluss der Trockentoleranz oder der Immunabwehr dient, ist noch nicht abschließend geklärt (Montillet et al., 2013; McLachlan et al., 2014; Murata et al., 2015).

## 1.4 Immunabwehr

Die wichtigsten Phytohormone in der pflanzlichen Immunabwehr sind Jasmonate (JA), Salicylsäure (SA) und Ethylen. Doch auch andere Hormone, die das pflanzliche Wachstum regulieren, wie Auxine, Gibberelline, Cytokinine, Brassinosteroide sowie ABA, sind an Immunantworten beteiligt (Pieterse et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass die Kontrolle von Wachstum, Entwicklung und Verteidigung in einem komplexen Netzwerk von verschiedenen, miteinander wechselwirkenden Hormon-Signalwegen verknüpft ist. Aktivierung von Abwehrmechanismen geschieht auf Kosten der ökologischen Fitness, sodass sich die Hormonabhängigkeit der Immunantworten möglicherweise entwickelte, um den Ressourcenaufwand in Abwesenheit von Pathogenen gering zu halten (Walters und Heil, 2007). Das Ziel pflanzlicher Immunabwehr ist daher, mit einer spezifischen Antwort je nach Pathogenart, -anzahl, dem allgemeinen physiologischen Zustand und dem Zeitpunkt der Infektion im Tagesverlauf zu reagieren. Die gleichzeitige oder aufeinanderfolgende Infektion mit mehreren Pathogenen oder simultaner Befall mit verschiedenen Insekten sind in Pflanzen keine Seltenheit, sodass Pflanzen ihre Immunantwort dementsprechend feinabstimmen müssen (Syller, 2012; Humphrey et al., 2014).

### 1.4.1 Ablauf einer Infektion

Die Infektion einer Pflanze durch ein Pathogen folgt dem so genannten Zick-Zack-Modell, das die verschiedenen Phasen sowie die Entwicklung der pflanzlichen Immunabwehr beschreibt (Jones und Dangl, 2006). Am Anfang der Immunantwort steht die Erkennung von PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*, Pathogen-assoziiertes molekulares Muster) durch Rezeptoren, die eine erste, basale Immunantwort auslösen, die sogenannte PAMP-vermittelte Immunität (PTI; *PAMP-Triggered Immunity*). Um diese Reaktion zu unterdrücken oder zu umgehen, verwenden Pathogene Effektoren. Dieser Effektor-vermittelten Anfälligkeit (ETS; *Effector-Triggered Susceptibility*) gegenüber dem Pathogen setzen Pflanzen spezifische Resistenzproteine (R-Proteine) entgegen, die sie im evolutiven „Wettrüsten“ mit den

Pathogenen erworben haben. Durch die R-Proteine wird eine zweite Immunantwort ausgelöst, die sogenannte Effektor-vermittelte Immunität (ETI; *Effector-Triggered Immunity*). Gleichzeitig wird ein systemisches Signal ausgesendet, das in weiter entfernten Geweben eine Immunantwort auslöst, sodass diese auf einen noch bevorstehenden Befall vorbereitet sind. Die systemische erworbene Resistenz (SAR; *Systemic Acquired Resistance*) ist ein induzierbarer Verteidigungsmechanismus, der in noch nicht geschädigten, weiter entfernten Teilen der Pflanze über einen längeren Zeitraum aufgebaut und hauptsächlich durch SA vermittelt wird (Jones und Dangl, 2006).

Nach der ersten unspezifischen Reaktion, einer Freisetzung von ROS, reagieren Pflanzen sehr spezifisch auf Pathogene (Torres, 2010). Gegen Pathogene werden Proteine wie Chitinasen, Protease-Inhibitoren und Peroxidasen produziert, sowie antimikrobielle Toxine wie z.B. Phytoalexine (Gerhardt et al., 1997; Laluk und Mengiste, 2011; Lin et al., 2014; Mammarella et al., 2014). Bei Verwundung durch Herbivore werden nicht nur toxische Verbindungen, sondern beispielsweise auch Verdauungshemmer, wie beispielsweise Protease-Inhibitoren, synthetisiert. Auch die Bildung von Trichomen auf der Blattoberfläche und extrafloralen Nektarien, die andere Insekten anlocken, die wiederum die Herbivoren vertreiben, gehören zum Repertoire der Abwehr-mechanismen, die Pflanzen entwickelt haben (Yoshida et al., 2009; Laluk und Mengiste, 2011; De Geyter et al., 2012; Escalante-Perez et al., 2012).

Nicht nur pathogene Bakterien oder Pilze, sondern auch Blattläuse und sogar die Eier kauend-beißender Insekten wie *Pieris brassicae* setzen Toxine oder Effektoren ein, um die PTI zu umgehen (Allen et al., 2008; Bruessow et al., 2010). Diese Effektorproteine wirken auf zentrale Knotenpunkte des pflanzlichen Immunsystems ein, um die Widerstandsfähigkeit der Pflanze zu schwächen (Mukhtar et al., 2011). Manche Pathogene verwenden gezielt Phytohormon-Mimikry wie das bereits erwähnte Coronatin oder Gibberellin und greifen in hormonelle Signalwege ein, um die Immunabwehr zu schwächen oder den physiologischen Zustand der Wirtspflanze zu ihren Gunsten anzupassen (Robert-Seilaniantz et al., 2007).

### 1.4.2 Stomaschluss nach Pathogenerkennung

Viele Pathogene nutzen Öffnungen wie Hydathoden, Verwundungen im Blattgewebe und vor allem Stomata zur Invasion der Wirtspflanze. Zu diesen gehören nicht nur zahlreiche Bakterien wie *Pseudomonas syringae* oder *Pectobacterium carotovorum*, sondern auch Oomyceten und echte Pilze (Fungi), wie beispielsweise der Falsche Mehltau *Plasmopara viticola* und dem Grauschimmel *Botrytis cinerea* (Kiefer et al., 2002; Melotto et al., 2006; van Kan, 2006; Piisilä et al., 2015). Während Bakterien sich aktiv zu den Porenöffnungen bewegen, wachsen Pilze und Oomyceten mit ihren Keimschläuchen zu ihnen hin und durch die Spaltöffnung, um im substomatären Innenraum ihre Infektionsstrukturen, die Haustorien, auszubilden (Kroupitski et al., 2009; Laluk und Mengiste, 2010). Einige Pilze wie *B. cinerea* sind allerdings auch in der Lage, Cuticula und Zellwände aufzulösen und direkt das Pflanzengewebe zu besiedeln (Laluk und Mengiste, 2010). Einmal im Blattinneren angekommen, vermehren sich Pathogene auf Kosten der infizierten Pflanze. Daher ist es für Pflanzen von großer Bedeutung, eine Invasion von Pathogenen durch ein Verschließen der Pore zu hindern.

Wie bei allen Immunantworten beginnt das pathogeninduzierte Schließen der Stomata mit der Erkennung von PAMPs durch Rezeptoren auf der Außenseite der Plasmamembran. Danach wird das Signal weitergeleitet, um schließlich durch eine Aktivierung der Ionenkanäle den Stomaschluss zu verursachen (Sawinski et al., 2013). Der genaue Mechanismus der Signalweiterleitung ist noch nicht entschlüsselt, doch es gibt Hinweise darauf, dass viele Komponenten des ABA-Signalwegs auch nach PAMP-Erkennung aktiv sind. Dies ist auch der Fall, wenn Schließzellen anstelle von PAMPs mit Hormonen wie JA oder SA stimuliert werden. JA lösen die Produktion der sekundären Botenstoffe NO und ROS aus, führen zur Alkalisierung des Cytoplasmas und zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen (Suhita et al., 2004; Islam et al., 2010). Der Anionenkanal SLAC1 wird unter anderem durch CPK6 aktiviert, und die Verlustmutante *cpk6* reagiert auf Applikation von MeJA nicht mehr mit einem Schließen der Stomata (Munemasa et al., 2011a; Brandt et al., 2012). Auch der Jasmonat-Rezeptor COI1 wird für den JA-vermittelten Stomaschluss benötigt (Munemasa et al., 2007). Die Wirkung von JA selbst ist kontrovers diskutiert. In einer Reihe von Studien führt Me-JA nicht zum Stomaschluss, im direkten Widerspruch zu anderen Publikationen (Montillet et al., 2013; Savchenko et al., 2014). Möglicherweise ist dies auf Unterschiede in den experimentellen Bedingungen wie Aufzuchtbedingungen oder verwendeten Konzentrationen zurückzuführen (Arnaud und

Hwang, 2014). Coronatin, ein strukturelles Mimikry zu JA-Ile, scheint zunächst die Poren zu öffnen, um sie nach erfolgreicher Infektion durch die Bakterien zu verschließen, möglicherweise, um ein Austrocknen des Apoplasten der Pflanze zu verhindern (Freeman und Beattie, 2009). Ob und in welcher Weise ABA am Stomaschluss nach Pathogenerkennung involviert ist, ist noch nicht abschließend geklärt (Melotto et al., 2008; Montillet et al., 2013). Möglicherweise wird ABA, wie auch andere Phytohormone, von Pathogenen in Abhängigkeit von ihrem Infektionszyklus benutzt oder inhibiert, was eine einfache Aussage über die Rolle des Hormons erschwert. So scheinen einige Pathogene die ABA-Signalgebung zu unterdrücken, um eine Infektion zu ermöglichen, bevor sie die Synthese des Hormons stimulieren, wodurch die Pflanze hypersensitiv für ABA wird. Dadurch könnte einerseits die Immunantwort verringert werden, andererseits aber auch ein möglicher Wasserverlust entgegen gewirkt werden (Sawinski et al., 2013). Kürzlich wurde auch ein von ABA unabhängiger, durch Oxylipine vermittelter Signalweg postuliert, der nach PAMP-Erkennung zum Stomaschluss führt (Montillet et al., 2013).

Einige Pathogene besitzen Effektoren, die Stomata entweder öffnen oder einen Schluss verhindern. Eine weitere Strategie besteht darin, der Erkennung von PAMPs durch die Rezeptoren der Wirtspflanze zu entgehen (He et al., 2006). Der Pilz *Fusicoccum amygdale* produziert ein Toxin, Fusicoccin, das durch die Aktivierung der plasmamembranständigen H<sup>+</sup>-ATPase zur Öffnung der Stomata führt (Baunsgaard et al., 1998).

## 1.5 Kontrolle des Kaliumeffluxes in Schließzellen durch GORK

Wie in Abschn. 1.1.2 erwähnt, ist  $K^+$  als anorganisches Kation eines der Hauptosmotika, deren Transport über die Membran für das Öffnen oder Schließen der Pore entscheidet. Kalium gehört zu den drei am häufigsten vorkommenden Makronährstoffen in Pflanzen, neben Phosphor und Stickstoff. Kalium ist von essentieller Bedeutung, weil es dazu beiträgt, den Turgordruck innerhalb der Zellen aufrechtzuerhalten oder für das Zellwachstum zu erhöhen, das elektrische Membranpotential zu kontrollieren und die Aktivität einiger Enzyme zu regulieren (Gambale und Uozumi, 2006).

*A. thaliana* besitzt 15 kaliumselektive Kanäle und 13 Transporter (Maser et al., 2001). Zur ersten von insgesamt drei Familien gehört nur ein einziger,  $K_r$ -ähnlicher, Kanal namens KCO3 ( $K^+$ -CHANNEL,  $Ca^{2+}$ -ACTIVATED, OUTWARD-RECTIFYING), der zwei Transmembrandomänen und eine Porenregion besitzt (Czempinski et al., 1997). Durch Verdoppelung dieses Kanals entstanden die Familie der fünf TPKs (TANDEM PORE  $K^+$  - CHANNEL) (Voelker et al., 2010). Die letzte Familie, die sogenannten Shaker-Kanäle, enthält neun Kanäle, die aus jeweils sechs Transmembrandomänen und einer Pore bestehen (Gambale und Uozumi, 2006). Die 13 Kalium-Transporter gehören alle zur KUP/HAK/KT-Familie ( $K^+$ -UPTAKE/HIGH AFFINITY  $K^+$ / $K^+$ -TRANSPORTER), die vermutlich in der Kalium-homöostase und der Osmoregulation beteiligt sind. Erst kürzlich konnten einige KUPs mit dem Kalium-Efflux während des Stomaschlusses in Verbindung gebracht werden (Osakabe et al., 2013a). Die Kanäle der Shaker-Familie am besten untersucht hinsichtlich ihrer räumlichen und zeitlichen Expression, ihrer biophysikalischen Eigenschaften, ihrer Regulation und auch ihrer Affinität (Gambale und Uozumi, 2006; Dreyer und Blatt, 2009). Alle Shaker-Kanäle aus *Arabidopsis* sind  $K^+$ -selektiv und in der Plasmamembran lokalisiert, allerdings in unterschiedlichen Geweben, Umweltbedingungen und Entwicklungsstadien der Pflanze. Auch die biophysikalischen Eigenschaften der Kanäle unterscheiden sich, trotz einer hohen genetischen Ähnlichkeit. So ist beispielsweise AKT1 (*ARABIDOPSIS*  $K^+$ -TRANSPORTER1) für die  $K^+$ -Aufnahme aus dem Boden verantwortlich, während SPIK (SHAKER POLLEN INWARD  $K^+$ -CHANNEL) nahezu ausschließlich in Pollenschläuchen exprimiert ist (Dennison et al., 2001; Mouline et al., 2002). Sowohl AKT1 als auch SPIK sind Einwärtsgleichrichter, d.h. sie öffnen nur, wenn das Membranpotential negativer als das Umkehrpotential für Kalium ist und das elektrochemische

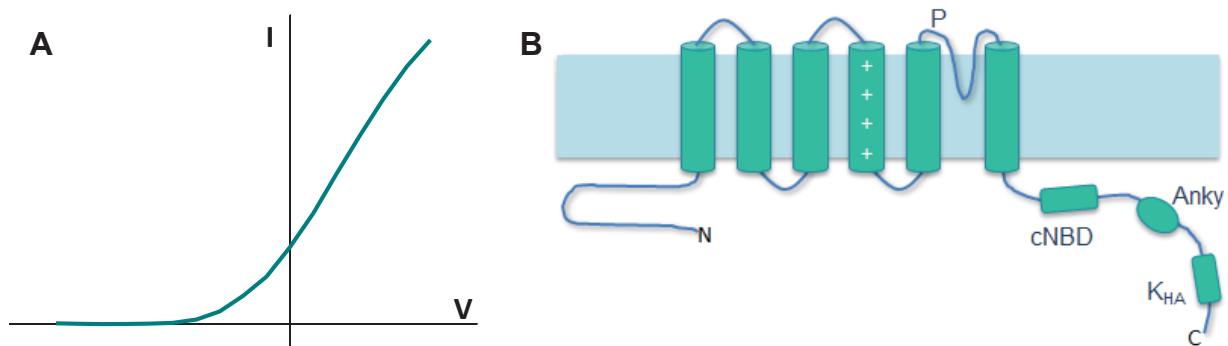
Potential das Kation aus dem Apoplasten in das Cytosol einströmen lässt. Umgekehrt verhält es sich für die beiden auswärtsgerichtenden Shaker-Kanäle, SKOR (STELAR K<sup>+</sup> OUTWARD RECTIFIER) und GORK (GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K<sup>+</sup>-CHANNEL), die erst bei einem Membranpotential öffnen, das positiver als das Umkehrpotential ist, sodass Kalium aus der Zelle ausströmt (s. Abb. 1.4A; Gambale und Uozumi, 2006). Zwei weitere Klassen, die stillen und die schwach gleichrichtenden Shaker, bilden Heterotetramere mit anderen Shakern, um deren Aktivität und Gleichrichtungsverhalten zu modifizieren (Marten et al., 1999; Lacombe et al., 2000; Geiger et al., 2009a). Dies gilt jedoch nicht für die Auswärtsgleichrichter, die ausschließlich als Homotetramere vorliegen (Dreyer et al., 2004). Die Untereinheiten der Tetramere sind so angeordnet, dass sie eine zentrale Transmembranpore bilden (Dreyer und Blatt, 2009).

Sowohl C- als auch N-Terminus von Shaker-Kanälen sind intrazellulär lokalisiert und enthalten Interaktionsstellen für Regulatoren, wie beispielsweise 14-3-3-Proteine oder zyklische Nucleotide (s. Abb. 1.4B; Li et al., 2006; Sottocornola et al., 2006; Sato et al., 2009). Inzwischen sind mehrere Beispiele bekannt, in denen Shaker-Kanäle durch Phosphorylierung reguliert werden (Lee et al., 2007; Sato et al., 2009; Held et al., 2011; Ronzier et al., 2014). Mindestens fünf der neun Shaker aus *Arabidopsis* sind in Schließzellen exprimiert, von denen KAT1 und GORK für ihre Rolle in der Stomaregulation am bekanntesten sind (Gambale und Uozumi, 2006). Während KAT1 für die Aufnahme von Kalium aus dem Apoplasten und damit für die Öffnung der Pore verantwortlich ist, übernimmt GORK einen Großteil des Kalium-Effluxes während des Stomaschlusses (Li et al., 1998; Hosy et al., 2003). Das unter normalen Bedingungen vorliegende Membranpotential von Schließzellprotoplasten ist mit etwa -200 bis -180 mV zu negativ für eine Aktivierung des Kanals bei physiologischen Konzentrationen (Levchenko et al., 2005). Daher kann der Kanal erst öffnen, wenn die Membran durch den Efflux von Anionen durch S- und R-Typ-Anionenkanäle depolarisiert wurde (Hedrich, 2012). GORK besitzt auch einen extrazellulären Kaliumsensor in der vierten Transmembranhelix, der dafür sorgt, dass der Kanal ausschließlich dann öffnet, wenn die treibende elektrochemische Kraft für K<sup>+</sup> nach außen gerichtet ist, sodass die Öffnung einen Netto-Efflux verursacht (Blatt und Gradmann, 1997; Dreyer und Blatt, 2009). Die extrazelluläre Kaliumkonzentration scheint auch die Lokalisation des Kanals innerhalb der Plasmamembran zu verändern, sodass GORK in der Membran entweder gleichmäßig verteilt oder fleckig assoziiert ist (Eisenach et al., 2014). Auch ROS scheinen die Kanalaktivität zu beeinflussen, entweder durch einen direkten



Mechanismus oder durch eine veränderte mRNA-Prozessierung (Demidchik et al., 2010; Tran et al., 2013). GORK wird ebenfalls durch die fortschreitende Alkalisierung des Cytosols aktiviert, welches durch eine Ansäuerung der Vakuole erreicht wird (Ache et al., 2000; Bak et al., 2013).

Neben Schließzellen wird der Shaker auch in Blüten, dem Leitgewebe sowie in Wurzelhaaren und -epidermis exprimiert, wo er zur Regulation der Kaliumhomöostase und -verteilung beiträgt (Ache et al., 2000; Ivashikina et al., 2001; Becker et al., 2003). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass GORK durch ABA aktiviert wird und damit zur Wachstumshemmung von Wurzeln und möglicherweise auch Samen und Keimlingen führt (Planes et al., 2015). Der Kanal spielt auch eine wichtige Rolle beim programmierten Zelltod und bei der SA-vermittelten Toleranz gegen Salzstress (Jayakannan et al., 2013; Tran et al., 2013). Dementsprechend wird die Expression des Kanals bei Trockenheit, Salzstress, ABA und ROS hochreguliert (Becker et al., 2003; Xie et al., 2014). Eine Regulation von GORK durch posttranskriptionale Modifizierungen wurde bislang noch nicht beschrieben.



**Abb. 1.4:** GORK ist ein auswärtsgerichtender Shakerkanal.

A) schematisches IV-Diagramm von GORK. Der Kanal ist strikt auswärtsgerichtet und öffnet nur bei Werten positiv des Umkehrpotentials von  $K^+$ . Verändert sich die extra- oder intrazelluläre Kaliumkonzentration, verschiebt sich die Aktivierungsschwelle des Kanals entsprechend dem Umkehrpotential. B), Modell des Shaker-Kanals GORK. Jede Untereinheit des Tetramers besteht aus sechs Transmembrandomänen und einer Pore, die aus einer Schleife zwischen fünfter und sechster Transmembran-Helix gebildet wird. Die vierte Helix enthält einen Spannungssensor aus mehreren positiv geladenen Aminosäuren. Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich im Cytosol. Im N-Terminus befindet eine zyklische Nucleotid-Bindedomäne (cNBD), ein Ankyrinmotiv (Anky) und eine Domäne, die mehrere hydrophobe und saure Reste enthält ( $K_{HA}$ ).

## 1.6 Ziele dieser Arbeit

Die Kontrolle der Schließzellbewegungen ist ein komplexer Prozess, der viele verschiedene Komponenten enthält, die miteinander auf verschiedenste Weisen interagieren können. Für viele der Kanäle, die an den Stomabewegungen beteiligt sind, konnten bereits Interaktionspartner und deren Regulationsmechanismen aufgeklärt werden (s. Abschn. 1.1.2 und 1.2.3). Für den Kaliumkanal GORK sind bisher jedoch noch keine Regulatoren bekannt. Daher wurde zunächst untersucht, ob der Kanal mit einigen Phosphatasen und Kinasen interagiert, und ob die Protein-Protein-Interaktion Auswirkungen auf die Aktivität des Kanals hat. Dies sollte anhand der DEVC-Methode elektrophysiologisch untersucht werden. Durch gezielte Mutation an putativen Schlüsselaminosäuren sollten Einzelheiten der Regulation durch die Kinase analysiert werden, wie etwa die ATP- oder Calciumabhängigkeit.

Da die Hauptrolle von GORK in der Vermittlung des  $K^+$ -Ausstroms während des Stomaschlusses liegt, war auch zu klären, ob dieser Regulationsmechanismus eine Relevanz *in vivo* besitzt. Hierfür wurden die Porenöffnungen verschiedener Verlustmutanten von *A. thaliana* nach Behandlung mit ABA und MeJA ausgemessen, und *gork1-2*-Verlustmutanten wurden mit *P. syringae* infiziert, um den Beitrag von GORK auf die Immunabwehr zu untersuchen.

Während der Signalweg für ABA bereits gut beschrieben ist, sind viele Aspekte des Jasmonat-vermittelten Stomaschlusses noch ungeklärt, insbesondere das hormonelle Wechselspiel von JA mit ABA sowie die Tatsache, dass das JA-Ile-Mimikry Coronatin zur Öffnung führt, obwohl JA das Gegenteil bewirkt. Einige Puzzleteile dieses Signalwegs sollten in dieser Arbeit identifiziert und eingeordnet werden, wie die ABA-Biosynthese und den Proteinabbau durch das Ubiquitin/26S-Proteasom-System.

Der zeitliche Ablauf der Signalwahrnehmung scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Signalantwort zu haben, und so wurde auch die Kinetik von Langzeitbehandlungen mit ABA, MeJA und Coronatin bis zu fünf Stunden nach Experimentbeginn untersucht.

## II. Material und Methoden

Wenn nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien von Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) oder von AppliChem (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) bezogen; Enzyme und Enzympuffer wurden bei Fermentas (Fermentas/ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) erworben. In dieser Arbeit verwendete Lösungen und Medien wurden, sofern nicht anders bezeichnet, in ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

### 2.1. Methoden mit *Arabidopsis thaliana*

#### 2.1.1 Anzuchtbedingungen

##### **Sussmann-Medium**

2,5 mM NaNO<sub>3</sub>

2,5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

5 mM K-Gluconat

4,6 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2 mM MgSO<sub>4</sub>

25 μM CaCl<sub>2</sub>

100 μM FeNaEDTA

25 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

2 μM ZnSO<sub>4</sub>

0,5 μM CuSO<sub>4</sub>

2 μM NaMoO<sub>4</sub>

0,01 μM CoCl<sub>2</sub>

1 % Saccharose

1,2 % Agar

pH 6,5 (Tris)

*Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden auf Einheitserde Typ P (Patzner GmbH & Co. KG, Sinnatal-Jossa, Deutschland) in einer Pflanzenkammer unter Kurztagbedingungen (8 h Tag, 16 h Nacht) bei 22 °C/ 16 °C Tag/Nacht- Temperatur in ca. 60 % relativer Luftfeuchtigkeit und einer Photonenflussdichte von 100 μmol/m<sup>2</sup>s für 5 bis 7 Wochen angezogen. Wenn nicht anders

angegeben, wurden in dieser Arbeit Mutanten vor Columbia-0 Hintergrund verwendet. Für die Isolation von Wurzel-RNA wurden Pflanzen auf sterilem Sussmann-Medium ausgesät und in einer Inkubationskammer gezogen (s. 2.2.1.).

Eine Liste der benutzten Mutanten befindet sich im Anhang (Tabelle 5.2).

## 2.1.2 Analyse von Stomaschlussweiten

### ***Arabidopsis* Blattinkubationspuffer**

30 mM KCl

50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>

10 mM Mes-KOH, pH 6,15

Blätter von etwa 5-7 Wochen alten, ungestressten Pflanzen wurden mit einer Rasierklinge abgeschnitten und in Stoma-Puffer für zwei Stunden mit der Blattoberseite nach oben unter den Wachstumslichtbedingungen inkubiert. Um den Effekt verschiedener Stimuli auf die Stomaöffnung zu messen, wurden die Effektoren für eine weitere Stunde in den Puffer zugegeben, beziehungsweise für die in den Kinetik-Messungen angegebenen Zeiträume. Pro Experimentansatz wurden je 20 Stomata an zwei Blättern gemessen. Die Messungen wurden an mindestens zwei unabhängigen Tagen durchgeführt. Für die Isolierung von Epidermisstreifen wurden gesunde große Blätter in einem Mixer (4142 MX32, Braun, Kronberg, Deutschland) und 200 ml kaltem Wasser mechanisch zerkleinert. Mit einem 210  $\mu$ m Nylonnetz wurde zerstörtes Mesophyllgewebe entfernt, und die noch vorhandenen Epidermisstreifen wurden in eine Petrischale mit Blattinkubationspuffer überführt. Die Zellen wurden für zwei Stunden im Licht inkubiert, bevor sie vereinzelt und mit medizinischem Kleber auf Deckgläschen fixiert wurden. Die so präparierten Streifen wurden für eine weitere Stunde mit den zu testenden Phytohormonen behandelt, bevor sie an einem Mikroskop aufgezeichnet wurden. Die Stomata von ganzen Blättern wurden mit einem digitalen Mikroskop (Keyence Corporation, Osaka, Japan) bei einer Vergrößerung von ca. 20000 aufgezeichnet, während die Schließzellen in Epidermisstreifen mit einem Durchlichtmikroskop (Axioskop2, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) dokumentiert wurden. Länge und Breite der

Stomaweite wurden mit ImageJ 1.47v (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) gemessen, um das Stomaweitenverhältnis (Länge/Breite) zu erhalten.

### 2.1.3 Protoplastierung und Transformation von Protoplasten

#### **Enzymlösung**

20 mM MES, pH 5,7

0,4 M Mannitol

20 mM KCl

1-1,5% Cellulase R10 (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)

0,1-0,4% Macerozym R10 (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)

Die Enzymlösung wurde für 10 min bei 55 °C inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde zugegeben:

10 mM CaCl<sub>2</sub>

0,1% BSA

Die Lösung wurde in eine Petrischale sterilfiltriert.

#### **PEG- Lösung**

PEG4000

0,2 M Mannitol

0,1 M CaCl<sub>2</sub>

Die Lösung wurde für mindestens 3 h bei Raumtemperatur gerührt.

#### **W5- Puffer**

154 mM NaCl

125 mM CaCl<sub>2</sub>

5 mM KCl

2 mM MES, pH 5,7

#### **MMg- Lösung**

0,4 M Mannitol

15 mM MgCl<sub>2</sub>

4 mM MES, pH 5,7

Ungefähr 20-30 kleine Blätter von 4-5 Wochen alten *Arabidopsis* Pflanzen wurden auf einer Glasplatte gestapelt und in 0,5-1 mm dünne Streifen geschnitten, welche in Enzymlösung in einer abgedunkelten Petrischale überführt wurden. Die Blattstreifen wurden zunächst 10 min in einem Exsikkator und anschließend für mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die dadurch entstandenen Protoplasten wurden mit Hilfe eines 50 µm Filternetzes und W5 Puffer in ein 50 ml Falcon überführt auf 40 ml aufgefüllt. Die Protoplasten wurden bei 100 g für 2 min und Raumtemperatur zentrifugiert und in 2 ml W5 Puffer resuspendiert, bevor

sie für mindestens 30 min auf Eis inkubiert wurden. Nach Entfernen des dabei entstehenden Überstands wurden die Protoplasten in 2 ml MMg Lösung resuspendiert. Je 200 µl der Protoplastensuspension wurden mit 220 µl PEG und 15 µg Plasmid-DNA pro BiFC-Konstrukt gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 0,8 µl W5-Puffer zugegeben. Um den MMg-Puffer zu entfernen, wurden die Protoplasten zentrifugiert (1 min @100 g). Die Protoplasten wurden in 2 ml W5-Puffer aufgenommen und in Petrischalen gegeben, welche für 1-2 Tage in einer dunklen Schachtel aufbewahrt wurden.

#### 2.1.4 Infektion mit *Pseudomonas syringae*

##### LB Medium

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l NaCl  
± 1.5% Agar-Agar (Kobe, Roth)  
50 µg/ml Rifampicin (in DMSO)

##### KB Medium

40g/l Proteose Peptone 3  
20 g/l Glycerin (87%)  
+/- 12g/l Agar-Agar  
Nach dem Autoklavieren wurde hinzugefügt:  
10 ml/l 10% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
10 ml/l 10% MgSO<sub>4</sub>  
50 µg/ml Rifampicin (in DMSO)

Dieser Assay wurde wie von Katagiri *et al.* (2002) beschrieben durchgeführt. Bakterien des virulenten Stammes *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 wurden auf LB-Platten, die 50 µM Rifampicin enthielten, für 1-2 Tage bei 28 °C gezogen, bevor sie in flüssiges KB-Medium überführt wurden. Hier wurden sie für 6-8 h in einem 28 °C Wärmeschrank vermehrt, bis sie mittlere bis späte logarithmische Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> = 0,6- 1,0) erreicht hatten. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 2500 g wurden die Bakterien in 10 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die Bakteriendichte wurde auf eine OD<sub>600</sub> = 0,2 eingestellt, was etwa 1x 10<sup>8</sup> cfu/ml entspricht. Um die Anheftung der Bakterien auf den Blättern zu verbessern, wurde 0,05 % Silwet-L77 zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde auf die Blätter gesprüht, bis diese triefend nass waren. Die Pathogen-Anzahl in den Blättern wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Hierzu wurden die Blätter zunächst abgeschnitten und die Oberfläche wurde mit 70% Ethanol sterilisiert. Mit einem Korkbohrer wurden Blattscheiben ausgestanzt (6 mm Durchmesser) und mit 100 µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O in einer Kugelmühle gemahlen (MM300, Retsch, Haan, Deutschland). Eine Verdünnungsreihe wurde für jede Probe angelegt (bis zu 10<sup>-</sup>

<sup>5</sup>), und 10 µl jeder Verdünnung wurden auf einer LB-Agarplatte mit 50 µM Rifampicin pipettiert. Nach 2 Tage Inkubation bei 28 °C wurden die koloniebildenden Einheiten (cfu, engl. Colony forming units) gezählt. Die Bakterielle Wachstumskurve wurde erhalten, indem die kultivierbare Bakterienzahl pro cm<sup>2</sup> gegen die Zeit auf einer logarithmischen Skala aufgetragen wurde. Fünf Tage nach der Infektion wurden Aufnahmen der Pflanzen genommen, um die Krankheitssymptome visuell zu vergleichen.

### 2.1.5 Gesamt-RNA- Isolation aus *Arabidopsis thaliana*

#### 2.1.5.1 Gesamt-RNA Isolation aus Blättern

Ungefähr ein halbes Blatt (ca. 40-50 mg) einer 5-6 Wochen alten Pflanze wurde mit einer Rasierklinge abgeschnitten und sofort in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Blattproben wurden zweimal in einer Kugelmühle (1 min, 75 Hz; Tissue Lyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) mit Keramikugeln gemörsert und dazwischen mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die RNA-Isolation wurde mit dem „E.Z.N.A. Plant RNA Kit“ (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration und Qualität der RNA wurde photometrisch überprüft (2.2.3.1). Sie wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C aufbewahrt.

#### 2.1.5.2 Gesamt-RNA- Isolation aus angereicherten Schließzellen

Rosettenblätter von 4-5 Wochen alten Pflanzen wurden mit einer Rasierklinge abgeschnitten und von der Mittelrippe befreit. Das Blattgewebe wurde in einem kommerziell erhältlichen Mixer (4142 MX32, Braun, Kronberg, Deutschland) mit ca. 300 ml eiskalten H<sub>2</sub>O für 45 s zerkleinert. Die dadurch entstandenen Epidermis-Fragmente wurden mit einem 210 µm Filternetz aufgefangen und der Durchfluss verworfen. Der Zerkleinerungsprozess wurde ein zweites Mal wiederholt. Das übriggebliebene Pflanzengewebe wurde mit einem Spatel aufgenommen und mit einem Papiertuch getrocknet, bevor das Pellet in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Zur RNA-Isolierung wurden die Gewebeproben wie Blatt-Gewebeproben behandelt, mit der Ausnahme, dass die RNA mit zweimal 12 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert wurde.

### 2.1.5.3 Gesamt-RNA-Isolation aus Wurzelgewebe von Arabidopsis-Keimlingen

Wurzelgewebe von 7-10 Tage alten Keimlingen wurde abgeschnitten und vorsichtig vom Plattenmedium entfernt, ohne die Wurzelhaare zu beschädigen. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und in einer stickstoffgekühlten Kugelmühle zerkleinert (1min, 75 Hz; Tissue Lyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland). Anschließend wurden die Proben in 800 µl TRI Reagent für 5 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. 200 µl Chloroform wurden hinzugefügt, die Proben gründlich gemischt und für 15 Minuten inkubiert, bevor für weitere 15 Minuten (12000 g @ 4 °C) zentrifugiert wurde. Von den daraus entstehenden drei Phasen wurde die oberste, wässrige Phase abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben, in dem die Proben mit 500 µl Isopropanol versetzt wurden. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde für zehn Minuten zentrifugiert (12000 g @4 °C). Das daraus resultierende Pellet wurde mit RNase-freiem 75% Ethanol gewaschen, 5 Minuten zentrifugiert (7500 g @4 °C) und nach Abnahme des Überstandes für 10-15 min bei 37 °C getrocknet. Die entstandene RNA wurde in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und sofort weiterverarbeitet.

## 2.2 Methoden mit RNA

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit RNase-freien sterilen Reaktionsgefäßen und Chemikalien durchgeführt. Das Wasser für diese Anwendungen wurde entweder kommerziell erworben, oder es wurde HPLC-Wasser mit 1 ml/l DEPC versetzt, über Nacht gerührt und dann autoklaviert.

### 2.2.1 Generation von cDNA aus Gesamt-RNA

#### 2.2.1.1 DNase I- Verdau

DNA-Verunreinigungen wurden durch einen enzymatischen Verdau entfernt.



**Tabelle 2.1: Standardreaktionsansatz für den DNase I-Verdau.**

RNA	0,75-2,5 µg
10x DNase Puffer	3 µl
DNase I (10 U/µl)	1 µl
RNAse-Inhibitor (40 U/µl)	0,5
H <sub>2</sub> O	x µl
	30 µl

Die Reaktion wurde für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.1.2 RNA-Fällung

Um weitere Verunreinigungen zu entfernen, wurde die Gesamt-RNA gefällt.

**Tabelle 2.2: Standardfällungsansatz für Gesamt-RNA**

DNase I-verdaute RNA	30 µl
5 M NH <sub>4</sub> Ac (100 mM EDTA)	10 µl
Glycogen (Roche, 20 mg/ml)	1 µl
Isopropanol	75 µl
H <sub>2</sub> O	70 µl
	186 µl

Der Ansatz wurde 1 h zentrifugiert (12000 g @ 4 °C) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, indem es für 20 min zentrifugiert (12000 g @ 4 °C) wurde. Der Überstand wurde verworfen und der restliche Alkohol für 15 min bei 37 °C getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 7 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.2.1.3 Reverse Transkription

Für die eigentliche Erzeugung von cDNA aus einer RNA-Vorlage wurde das Enzym Reverse Transkriptase (MLV-RT, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

**Tabelle 2.3: Standardreaktionsansatz einer reversen Transkription.**

Gefällte RNA	7 µl
5x RT Puffer (Promega)	2 µl
10 mM dNTP's (Fermentas; dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	0,5 µl
100 µM oligo dT	0,5 µl
	10 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 2 min bei 70 °C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Nachdem die Probe auf Eis abgekühlt hatte, wurde 0,4 µl MLV-RT (engl. *Murine Leukimia Virus- Reverse Transcriptase*, 100 U/µl) hinzugeben und für weitere 60 min

bei 42 °C inkubiert. Für weitere Anwendungen wurden 1:20-Verdünnungen der cDNA mit H<sub>2</sub>O hergestellt.

### 2.2.2 *In Vitro* Transkription von cRNA

cRNA wurde anhand einer DNA-Vorlage erzeugt, um sie in *Xenopus laevis*- Oozyten für elektrophysiologische Messungen (vgl.2.6.2) zu injizieren. Dies wurde entweder mit dem AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben oder nach dem folgenden Reaktionsprotokoll durchgeführt.

**Tabelle 2.4: Mastermix einer IVT-Reaktion**

5x T7 Transkriptionspuffer	500 µl
0,1 M DTT	250 µl
BSA (Bovine Serum Albumin, 1,25 mg/ml)	250 µl
100 mM dNTP's (dATP, dUTP, dCTP, dGTP)	100 µl
H <sub>2</sub> O	925 µl
	2025 µl

Der Mastermix wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 2.5: Standard- IVT-Reaktionsansatz**

DNA-Vorlage	1 µg
Mastermix	40 µl
PPase	0.1 µl
RNAse- Inhibitor	0.5 µl
CAP	0.3 µl
T7- RNA Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl
	50 µl

Der IVT-Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor 0,5 µl 100 mM GTP hinzugefügt wurden. Beide Reaktionsprotokolle beinhalteten einen Inkubationsschritt von 4 h bei 37 °C. Um die entstandene cRNA zu fällen, wurden 50 µl 5 M NH<sub>4</sub>Ac (in 100 mM EDTA) hinzugefügt und der Reaktionsansatz über Nacht bei -20 °C stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die RNA für 60 min zentrifugiert (20000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 700 µl 70 %

Ethanol gewaschen und für weitere 5 min zentrifugiert (14000 x g, 4 °C). Nachdem die RNA bei 37 °C für 15 min getrocknet wurde, wurde sie in 10-15 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.3 Qualitäts- und Quantitätskontrolle von RNA

#### 2.2.3.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration der erzeugten RNA zu bestimmen, wurden sowohl Gesamt- als auch cRNA photometrisch mit einem Photometer (Nanodrop 2000c; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) gemessen. Das Gerät misst die Absorption bei den Wellenlängen 230, 260, 280 und 320 nm. Die Quotienten dieser Wellenlängen können Informationen liefern über Verunreinigungen der Proben mit Proteinen, Lösemitteln, etc., beziehungsweise über die Reinheit der Probe.

#### 2.2.3.2 Gelelektrophorese mit RNA

Diese Methode wurde sowohl für eine qualitative als auch eine quantitative Kontrolle für cRNA verwendet.

#### **10x MEN**

200 mM MOPS  
10mM Na<sub>2</sub>EDTA  
50mM NaAc  
pH 7,0 (NaOH)

#### **2x RNA-Probenpuffer**

95 % Formamid  
0,025 % SDS  
0,025 % Bromophenol-Blau  
0,025% Xylencyanol FF  
0,5 mM EDTA

**Tabelle 2.6: 1.5 % Agarosegel für RNA**

1x MEN	36 ml
Agarose	680 mg
GelRed (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA)	4,5 µl
Formaldehyd	9 ml
	45 ml

Die Agarose wurde in 1x MEN zum Kochen gebracht. Sowohl GelRed als auch Formaldehyd wurden zugegeben, nachdem das Gel auf ca. 60 °C abgekühlt war. Das Gel wurde dann in einen Gelschlitten gegossen, in dem ein Gelkamm für Geltaschen steckte. Während das Gel auspolymerisierte, wurden die RNA-Proben vorbereitet, indem sie zu gleichen Teilen mit RNA-Probenpuffer versetzt wurden. Die RNA-Sekundärstrukturen wurden für 10 min bei 60 °C denaturiert. Nachdem die Proben für 2 min auf Eis abgekühlt wurden, wurden die Proben in die Geltaschen des Gels in der Gelelektrophoresekammer, die mit 1x MEN gefüllt war, pipettiert. Durch das Anlegen von 80 V für ca. 1 h wurden die RNA-Banden der Größe nach aufgetrennt. Das Bandenmuster wurde mit einem UV Imager (Intas UV Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) dokumentiert.

## 2.3 Methoden mit DNA

### 2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA oder cDNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Genauigkeit der DNA-Sequenz wurde durch den Einsatz von spezifisch bindenden Primern und der korrekturlesenden Polymerase Phusion F530 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) erreicht. Das in dieser Arbeit verwendete Enzym wurden im Institut überexprimiert und aufgereinigt.

Die Annealing-Temperatur variierte in Abhängigkeit der Primereigenschaften, während die Dauer des Elongationsschrittes je nach Länge des DNA-Abschn.es gewählt wurde.

**Tabelle 2.7: Standard PCR-Ansatz**

DNA-Vorlage (0,05- 0,2 µg)	1-3 µl
dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, cTTP, 10 mM)	1 µl
Puffer (10x)	5 µl
Forward-Primer (10 µM)	0,5 µl
Reverse-Primer (10 µM)	0,5 µl
+/- DMSO	0,5 µl
Polymerase	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	Add 50 µl
Gesamtvolumen	50µl

**Tabelle 2.8: Standard-PCR-Programm**

	Reaktionsschritt	T [°C]	t [s]	
1	Denaturierung	96	60	} 35 x
2	Denaturierung	96	15	
3	Annealing	45-55	20	
4	Elongation	72	Je nach Länge	
5	Elongation	72	300	
6	Lagerung	4	∞	

### 2.3.2 Gelelektrophorese mit DNA

#### 5x DNA Probenpuffer

0,25% Bromophenol Blau

0,25% Xylencyanol FF

100 mM EDTA

50% Glycerin

#### 25x TAE-Puffer (4 l)

484 g Tris

114,2 ml Eisessig

74,4 g Na<sub>2</sub>EDTA 2 H<sub>2</sub>O

Analog zur Durchführung einer RNA-Gelelektrophorese wurden DNA-Gele hergestellt, indem 1% Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht wurde, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. 1x GelGreen (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) wurde hinzugefügt, nachdem das Gel auf ca. 60 °C abgekühlt war. Das Gel wurde in einen Gelschlitten (Owl B1A EasyCast Mini Gel, Thermo

Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) gegossen, in dem ein Kamm für Taschen mit einer Dicke von ca. 0,5 cm steckte. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Gelelektrophorese-Kammer gesteckt, der Kamm entfernt und die Taschen mit den Proben beladen. Hierzu wurden die Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt (2:1 bis 5:1). Um die Größe der DNA-Fragmente zu identifizieren, wurde eine  $\lambda$ -*Pst*I DNA-Leiter (vgl. 2.3.6.) parallel zu den Proben aufgetragen. Die Gele liefen in 1x TAE-Puffer bei 100 mV für ca. 30 min, bevor sie auf einem UV-Imager (Intas UV Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) dokumentiert wurden.

### 2.3.3 PCR-Aufreinigung

Die PCR-Proben wurden entweder direkt aus dem Reaktionsgefäß heraus mit Hilfe des „QIAGEN PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt, oder, wenn die Gelelektrophorese mehr als eine DNA-Bande zeigte, mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit 250“ (Qiagen, Hilden, Deutschland). In diesem Fall wurde ein Gel mit einer höheren Schichtdicke als normal (1-1,5 cm) mit breiteren Taschen gegossen, damit ein höheres Proben-volumen (bis zu 50  $\mu$ l) aufgetragen werden konnte. Nach einer ausreichenden Laufzeit wurde das Gel auf einen UV-Tisch (UV Band Elutor, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) platziert und die gewünschte Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die daran anschließende Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.3.4 Klonierung nach der USER<sup>TM</sup> – Strategie

Bei der USER-Methode (engl. Uracil specific excision reagent) werden spezielle uracilhaltige Primer verwendet, die dazu dienen, zusammen mit den Enzymen Uracil-DNA-Glykosylase und einer Endonuklease (DNA-Glykosylase-Lyase-Endonuklease VIII) acht bp lange Überhänge zu

erzeugen. Diese Überhänge hybridisieren leicht und orientierungsspezifisch mit einem Vektor, der komplementierende Überhänge enthält. Diese Überhänge werden erzeugt, indem der Vektor mit den Enzymen *PacI* und *Nt.BbvCI* verdaut wird, die in der sogenannten „USER-Kassette“ im Vektor schneiden. Eine detailliertere Beschreibung des USER-Klonierungssystems wurde von Nour-Eldin et al. (2006) angefertigt. Die USER-Varianten der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren wurden in vorangehenden Arbeiten hergestellt und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dietmar Geiger (Botanik I, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Nach der PCR-Reaktion mit USER-Primern wurde das PCR-Produkt mit *DpnI* verdaut, um die DNA-Vorlage zu entfernen (vgl. 2.3.6). Anschließend wurde der USER-Reaktionsansatz in zwei aufeinanderfolgenden Schritten inkubiert (30 min @ 37 °C, 30 min @ 25 °C).

**Tabelle 2.9: USER-Reaktionsansatz**

PCR-Produkt	4 µl
Vektor	1,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	3,5 µl
USER Enzymmix	1 µl
Gesamtvolumen	<u>10 µl</u>

Nach den Inkubationen wurde der Reaktionsansatz zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* eingesetzt (vgl. 2.4.2).

### 2.3.6 Restriktionsverdau

Enzymatischer Verdau von DNA durch Restriktionsendonucleasen wurde für die folgenden Anwendungen eingesetzt:

- Zur Erzeugung einer  $\lambda$ -*PstI* DNA- Leiter
- Zum Entfernen einer DNA-Vorlage aus einem PCR-Produkt
- Zur Vorbereitung eines USER-Vektors für eine Klonierung
- Zur Überprüfung einer Klonierung mit klonspezifischen Restriktionsstellen

Alle Puffer und Restriktionsenzyme wurden über Fermentas/ Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) bezogen, wenn nicht anders erwähnt. Die in dieser Arbeit verwendete  $\lambda$ -*PstI* DNA-Leiter wurde erzeugt, indem 100  $\mu\text{g}$  DNA des  $\lambda$ -Bakteriophagen mit 10u *PstI* in 1x Puffer O über Nacht bei 37 °C verdaut wurden. Die fragmentierte DNA wurde mit 5x DNA-Probenpuffer gemischt. Je 2-4  $\mu\text{l}$  wurden als Leiter in der Gelelektrophorese eingesetzt. Das durch den Verdau erzeugte charakteristische Bandenmuster wurde zur Identifikation der Größe von DNA-Banden verwendet. Um eine DNA-Vorlage aus einem PCR-Ansatz zu entfernen, wurde dieser mit dem folgenden Reaktionsmix vermischt.

**Tabelle 2.10: Standardansatz für *DpnI*-Verdau**

PCR-Produkt	17 $\mu\text{l}$
Puffer Tango	2 $\mu\text{l}$
<i>DpnI</i>	1 $\mu\text{l}$
	20 $\mu\text{l}$

Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde das Enzym für weitere 20 min bei 80 °C inaktiviert. Ein USER-Vektor wurde durch einen enzymatischen Verdau mit *PacI* und *Nt.BbvCI* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) vorbereitet.

**Tabelle 2.11: *PacI*-*Nt.BbvCI* Verdau eines USER-Vektors**

USER Vektor	10 $\mu\text{g}$
<i>PacI</i> (10U/ $\mu\text{l}$ )	7 $\mu\text{l}$
10x NEBuffer 1	20 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	add 200 $\mu\text{l}$

Nach einer Übernacht-Inkubation bei 37 °C wurden 4  $\mu\text{l}$  *Nt.BbvCI* (10U/ $\mu\text{l}$ ) und 2  $\mu\text{l}$  *PacI* für weitere 2 h zugegeben. Der Vektor wurde anschließend mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Für einen analytischen Verdau wurden passende Restriktionsenzyme anhand der DNA-Sequenz des zu überprüfenden Vektors herausgesucht. Die Schnittstellen wurden so gewählt, dass 2-3 Banden von unterscheidbarer Größe in einer Gelelektrophorese identifiziert werden konnten. Entweder ein oder zwei Restriktionsenzyme wurden gemeinsam eingesetzt.



**Tabelle 2.12: Standardansatz für einen analytischen Verdau**

Plasmid-DNA	2 $\mu$ l
Puffer	2 $\mu$ l
Enzym I	0,3 $\mu$ l
Enzym II	0,3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	15,4 $\mu$ l
	<hr/>
	20 $\mu$ l

Nach 1-2h Inkubation bei 37 °C wurde das Ergebnis des Verdau auf einem DNA-Gel überprüft. Die Größe der Banden wurden durch Vergleich mit dem Bandenmuster der  $\lambda$ -*Pst*I-Leiter abgeschätzt.

### 2.3.7 Sequenzierung

Um eine erfolgreiche Klonierung zu bestätigen und um Mutationen in der Sequenz auszuschließen, wurde die DNA des Klons durch eine Sanger-Sequenzierung analysiert. Alle Sequenzierungen in dieser Arbeit wurden durch GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

## 2.4 Quantitative Echtzeit- Polymerasenkettenreaktion (qRT-PCR)

Für die quantitative Analyse der Genexpression in einer cDNA-Probe wurde eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt (engl. Quantitative Real Time PCR, qRT-PCR). Durch den Einsatz von SYBR Green (Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) als Fluoreszenzindikator für die Vermehrung des DNA-Gehalts und einem DNA-Standard als Bezugsgröße ist es möglich, den Gehalt von mRNA in einem Pflanzengewebe zum Zeitpunkt der Präparation zu ermitteln. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe des

untersuchten Fragments eingesetzt (20 fg, 2 fg, 0,2 fg und 0,02 fg) und gleichzeitig mit den Proben gemessen. Sowohl die Standard- als auch die zu untersuchenden 1:20- Verdünnungen der cDNA-Proben wurden mit tRNA-haltigem HPLC-H<sub>2</sub>O (10 µg/µl tRNA) hergestellt.

**Tabelle 2.13: Standardansatz einer qRT-PCR**

cDNA/ Standard	2 µl
Primermix (je 0,5-1 µM)	8 µl
SYBR Green	10 µl
	<hr/> 20 µl

Die optimale Annealingtemperatur wurde in Vorversuchen ermittelt, um eine einzige spezifische Bande mit ausreichender Dicke zu erhalten. Nach der eigentlichen Amplifizierung wurde eine Schmelzkurve durchgeführt, um die spezifische Synthese des gewünschten PCR-Produkts zu überprüfen.

**Tabelle 2.14: Standardprogramm für eine qRT-PCR**

	Reaktionsschritt	T [°C]	t [s], Lightcycler	t [s], Realplex
1	Denaturierung	95	15 min	15 min
2	Denaturierung	95	15	15
3	Annealing	45-55	20	20
4	Elongation	72	20	20
5	Messung	79	5	10
6	Denaturierung	95	5	10
7	Schmelzkurve	75	30	15
8	Elongation	95	0,3 °C/s	0,3 °C/s
9	Abkühlen	40	30	120
10	Lagerung	4	∞	∞

Für die Durchführung der qRT-PCR-Messungen wurde entweder ein Mastercycler EP Realplex<sup>2</sup> (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) oder ein LightCycler 1.0 (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) eingesetzt. Für ersteren wurde die dazugehörige 96-Well-Platte (Twin.tec PCR Plate 96, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), für letzteren Glaskapillare (LightCycler Capillaries, 20 µl, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) verwendet.

### 2.4.1 Auswertung von qRT-PCR-Analysen

Die relative Anzahl an vorhandenen Transkripten des untersuchten GenAbschn.es in der Probe wurde durch Normierung auf die Transkriptmengen der Haushaltsgene Actin2 und Actin8 bestimmt. Die Primer für diese Gene wurden so gewählt, dass sie ein 435 bp langes Fragment erzeugen. Da 1 fg von 1000 bp langer doppelsträngiger DNA 910 DNA-Moleküle enthält, entspricht 1 fg Actin2/8 DNA 2091 Molekülen. Die Normierung auf 10.000 Transkripte ergibt demnach 4,78 fg Actin2/8. Zur Ermittlung der relativen Transkriptanzahl des untersuchten GenAbschn.es wurde daher folgende Formel angewandt:

$$\text{rel. Transkriptmenge} = \frac{\text{Fragmentmenge [fg]} \times 4,78 \text{ fg} \times 910 \text{ bp}}{\text{Fragmentlänge [bp]}}$$

### 2.4.2 Primerdesign und Synthese

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden entweder mit "Vector NTI 10.3.7" 2007 (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) für USER-Klonierungen oder mit der Primeranalyse-Software „Oligo“ Version 6.63 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, USA) entworfen. Klonierungsprimer wurden über Metabion International AG (Planegg, Deutschland) bezogen, während Primer für qRT-PCR-Messungen von Tib Molbiol Syntheselabor GmbH (Berlin, Deutschland) synthetisiert wurden.

## 2.5 Kultivierung und Techniken mit *E.coli*

In dieser Arbeit wurden nur Bakterien des *E.coli*-Laborstamms XL-1 MRF' Blue für Klonierungen, Vermehrung und Aufreinigung von Plasmid-DNA eingesetzt. Weil dieser Stamm rekombinationsdefizient ist, müssen die Bakterien kompetent gemacht werden für die Aufnahme von Plasmid-DNA.

### 2.5.1 Wachstumsbedingungen von *E. coli*

Die Bakterien wurden entweder in flüssigem oder festem LB-Medium (s. 2.1.4) vermehrt. Zur Selektion nach erfolgreichen Transformanten enthielt das Medium Antibiotika, die zu den Resistenzgenen des jeweiligen Plasmids passten. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert, um Kolonien wachsen zu lassen. Wenn flüssiges LB-Medium verwendet wurde, wurde eine einzelne Kolonie oder einige Bakterien einer Kryokultur in 3-5 ml LB-Medium in ein 15 ml Röhrchen überführt und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttel-Inkubator (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) inkubiert. Als Antibiotika wurden entweder 50 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin zum Medium hinzugefügt.

### 2.4.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

#### **TFB1**

30 mM Kalium-Acetat  
100 mM RbCl  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
pH 5,8 (HCl)  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
15% Glycerin

#### **SOB**

20 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
0,5 g/l NaCl  
5 g/l MgSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O

#### **TFB2**

10 mM Na-MOPS, pH 7 (NaOH)  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM RbCl  
pH 6,8 (NaOH)  
15% Glycerin

#### **SOC**

SOB + 0,4% Glycerin

Um eine erfolgreiche Transformation zu ermöglichen, wurden *E. coli* durch die Ionen Mangan und Rubidium nach dem Protokoll von Hanahan (1983) kompetent gemacht. Hierfür wurden die Bakterien zunächst auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Tetracyclin bei 37 °C, dann in 10 ml LB<sub>Tet</sub> über Nacht angezogen und schließlich in 1l SOB wachsen gelassen, bis eine optische Bakteriendichte von 0,6 erreicht war. Nach Kühlung auf 4 °C wurden je 50 ml Bakterienkultur für 15 min bei 4000 g zentrifugiert (5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die Pellets wurden in je 15 ml TFB1 aufgenommen und 30 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert (15 min, 4000 g) und in je 2 ml TFB2 resuspendiert. Die Bakterien

wurden zu je 50 µl aliquotiert und entweder direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert. Die Transformation wurde nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990) durchgeführt. Kompetente *E. coli* wurden entweder mit 0,1-0,3 µg Plasmid-DNA oder mit einem USER-Reaktionsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 50 s) wurden die Bakterien weitere 2 min auf Eis gekühlt, bevor 400 µl SOC zugegeben wurde. Die Bakterien wurden für 45 min bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf einer Antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen.

### 2.4.3 Isolation von Plasmid-DNA

*E.coli* wurden in Flüssig-LB-Medium über Nacht bei 37 °C angezogen und dann durch Zentrifugation geerntet. Für kleine Präparationen wurden 3 ml Medium in 15 ml-Falcons angeimpft, die in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße umgefüllt und zentrifugiert wurden (1 min, 12000 g bei RT). Die Isolierung wurde mit dem „Plasmid Mini Prep“ Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Wenn mehr Plasmid-DNA gebraucht wurde, wurden 100 ml Medium in 500 ml Schikane-Kolben angeimpft, welche nach Überführung in 50 ml Röhrchen zentrifugiert wurden (10 min, 4500 g @ 4 °C). Die DNA wurde mit dem „QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

### 2.4.4 Kryokonservierung von *E. coli*

Für eine langfristige Lagerung von transformierten *E.coli* wurden Glycerinstocks hergestellt. Hierzu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur zentrifugiert (1 min, 14000 g @RT), um die Bakterien anzureichern. Das Pellet wurde in ca. 100 µl Überstand resuspendiert und mit dem selben Volumen 50 % Glycerin vermischt. Die Bakterienkultur wurde gründlich mit dem

Glycerin vermischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, bevor sie bei - 80 °C gelagert wurden.

## 2.6 Elektrophysiologie

Elektrophysiologische Messungen wurden in dieser Arbeit mit der „Doppelelektroden-Spannungsklemme“ (engl. Double electrode voltage clamp, DEVC) an Oozyten von *Xenopus laevis* wie unten beschrieben durchgeführt.

### 2.6.1 Präparation von *Xenopus*- Oozyten

#### **ND96-Lösung**

96 mM NaCl

2 mM KCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM HEPES, pH 7,4

$\pi$ = 220 mosmol (Sorbitol)

± 100 µg/ml Gentamycin

± 1 mM CaCl<sub>2</sub>

Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) wurden durch einen operativen Eingriff entnommen. Hierfür wurde der Frosch mit 0,75 g/l Tricain 30 min im Voraus betäubt. Zur Entnahme des oozytenhaltigen Ovargewebes wurde ein kleiner Schnitt in die Bauchhaut und das Muskelgewebe darunter gesetzt, der im Anschluss wieder zugenäht wurde, um eine vollständige Heilung zu erlauben. Im Institut wurde diese Operation pro Frosch zweimal im Jahr durchgeführt, um eine Regeneration des Ovargewebes zu ermöglichen. Nach Entnahme des Gewebes wurden die Oozyten mechanisch grob vereinzelt, um einen besseren Collagenase-Verdau zu erzielen. Die Oozyten wurden einige Male mit Ca<sup>2+</sup>-freier ND96-Lösung gewaschen, um Gewebe- und Blutreste zu entfernen, bevor sie für eineinhalb Stunden in 6 mg/ml Collagenase auf einem Schüttler (K2, Edmund Bühler GmbH, Tübingen, Deutschland)

inkubiert wurden. Die verdauten Gewebe- Blut- und Follikelzellreste sowie die Collagenase wurden durch gründliches Waschen mit ND96 entfernt. Die Oozyten wurden in  $\text{Ca}^{2+}$ - und gentamycinhaltiger ND96-Lösung bei 16 °C aufbewahrt.

### 2.6.2 Mikroinjektion von cRNA

Die zu injizierende cRNA wurde, wie in 2.2.2 beschrieben, durch *in vitro* Transkription hergestellt und auf eine Konzentration von 300 ng/ $\mu\text{l}$  eingestellt. Die Einstellung der Injektionsvorrichtung (Drummond Nanoinject, Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) wurde so gewählt, dass in jede Oozyte 50,6 nl injiziert wurde. Dies entsprach 15 ng RNA pro Oozyte und Konstrukt. Als Mikropipetten wurden Glaskapillaren (3,5'' Drummond #3-00-203-G/X, Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) verwendet, die mit einem vertikales Laserziehgerät (Narishige Scientific Instrument Lab., Tokio, Japan) gezogen wurden, um eine möglichst feine Öffnung zu erhalten. Die Spitze der Injektionskapillare wurde an einem Microforge-Draht (ID03, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) soweit abgebrochen, bis die Öffnung einen Durchmesser von ca. 25-30  $\mu\text{m}$  aufwies. Für gleichmäßige Injektionsvolumina wurde die Kapillare luftblasenfrei mit einem neutralen gefärbten Mineralöl gefüllt und an dem Mikromanipulator des Nanoinjektors befestigt. Ungefähr ein Drittel des Öls wurde durch die Spitze der Kapillare ausgestoßen, um die RNA damit aufziehen zu können. Pro Ansatz wurden 15-20 Oozyten injiziert. Die Oozyten wurden für 3-4 Tage in einem 16 °C-Schrank aufbewahrt, bevor die Messungen durchgeführt wurden.

### 2.6.3 Elektroden

Für den Einstich in die Oozyte wurde eine Kapillare an einem vertikalen Laserziehgerät (Narishige Scientific Instrument Lab., Tokio, Japan) in der Mitte so auseinander geschmolzen, dass zwei Einstichkapillaren entstanden, die in Badlösung einen Pipettenwiderstand von 0,3-

1,0 M $\Omega$  aufwiesen. Zur Stromübertragung wurde Silberdraht verwendet, der durch elektrolytische Chlorierung in 3M KCl zu einer Ag/AgCl-Elektrode wurde. Die Kapillare wurden luftblasenfrei mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und an den Mikromanipulatoren der Potential- und der Stromelektrode so befestigt, dass der chlorierte Silberdraht in die KCl-Lösung tauchte. Als Referenz-Elektrode diente ein chlorierter Silberdraht, der in einem mit 3 M KCl befülltem Polyvinylschlauch steckte und dessen Öffnung mit KCl-haltigem Agar (2%, 3 M KCl) verschlossen war. Zur Erdung wurde ein ebenfalls chlorierter Silberdraht direkt in die Badlösung eingetaucht.

#### 2.6.4 Durchführung einer DEVC-Messung

##### **Badlösung DEVC**

10 mM KCl

90 mM LiCl

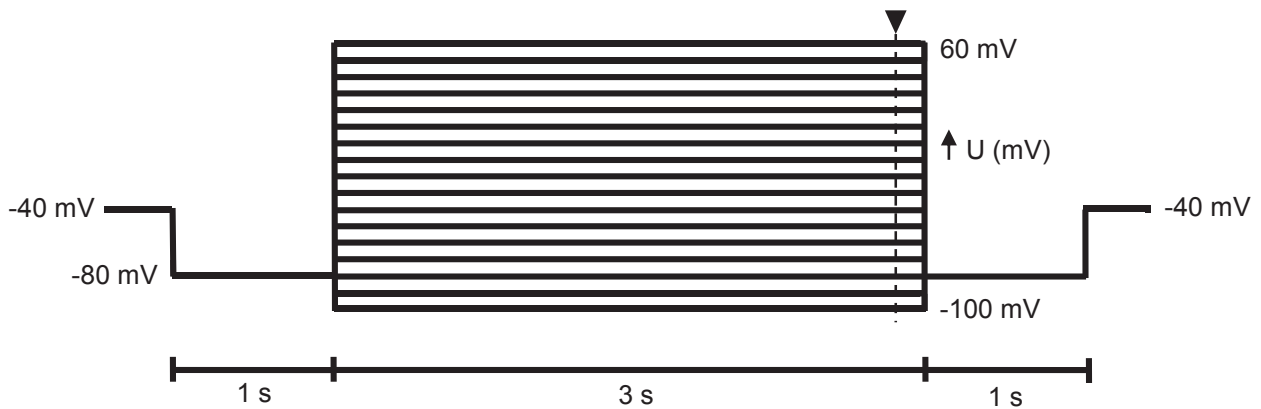
1 mM CaCl<sub>2</sub>

1 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM Tris/MES pH 7,5

Vor der eigentlichen Messung wurden die mit 3 M KCl gefüllten Messelektroden an den Mikromanipulatoren (Märzhäuser MM33, Drummond Scientific Company, Broomall, USA) der Strom- bzw. Spannungselektrode befestigt und das Perfusionssystem luftblasenfrei mit Messlösung befüllt. Der Pipettenwiderstand wurde vor dem Einstich überprüft (<0,1 M $\Omega$ ) und das Offset-Potential der Elektroden auf 0 mV abgeglichen. Nachdem eine Oozyte in der mit Messlösung gefüllten Messkammer platziert wurde, wurde mit beiden Elektroden gleichzeitig in die Zelle eingestochen (vgl. Abb. 2.1). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde eine Haltespannung von -40 mV angelegt, bei der gesunde Zellen, deren Membran durch den Einstich nicht oder nur wenig beschädigt wurde, keinen Nettostrom oder nur schwach positive Stromwerte (< 20 nA) besaßen. Per Konvention wird das extrazelluläre Potential als Null definiert, sodass ein Kationeneinstrom als negativer, ein -ausstrom dagegen als positiver Strom aufgezeichnet wird. Aufgrund der umgedrehten Vorzeichenregelung verhält sich dies bei Anionen spiegelverkehrt, sodass ein Anioneneinstrom als positiver und ein -ausstrom als negativer Strom gemessen wird.





**Abb. 2.1:** Spannungsprotokoll für DEVC-Messungen

Ausgehend von einem Vorpuls von -80 mV wurde für 3 s die jeweilige Testspannung appliziert, bevor wieder zu -80 mV gewechselt wurde. Zwischen den einzelnen Messreihen wurde eine Haltespannung von -40 mV angelegt. Die gestrichelte Linie zeigt die Stelle an, an der der Steady-State-Strom abgegriffen wurde.

### 2.6.5 Spannungsprotokolle

Die Spannungspulse wurden mit dem Programm WinWCP V4.4.7 (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Glasgow, Großbritannien) auf einem Computer vorgegeben und mit einem angeschlossenen Verstärker (Turbo TEC-03X, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) generiert. Mit dem Programm wurde eine Ruhespannung von -40 mV vorgegeben. In dieser Arbeit wurde ein modifiziertes Einfachpulsprotokoll eingesetzt, in dem ein Spannungspuls von -80 mV vor den eigentlichen Testspannungen appliziert wurde, der zur vollständigen Deaktivierung der spannungsabhängigen Kanäle führen sollte (s. Abb. 2.1). Ausgehend von -100 mV wurde in 10 mV-Schritten sukzessive zu positiveren Testspannungen gewechselt, bis eine Spannung von +60 mV erreicht war. Die Testspannungen wurden für jeweils 3 s gehalten, bevor auf -80 mV zurückgewechselt wurde.

### 2.6.6 Datenerfassung und Auswertung

Die Stromantworten, die der Verstärker aufzeichnete, wurden über einen integrierten AD/DA-Wandler in den Messcomputer übersetzt und dort mit dem Programm WinWCP V4.4.7 (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Glasgow, Großbritannien) aufgezeichnet. Die Rohdaten wurden mit WinWCP voranalysiert und mit Microsoft Office Professional Plus 2013 (Microsoft, Redmont, WA, USA) weiterführend ausgewertet. Repräsentative Rohspuren wurden mit Igor Pro 6.0 (ADDITIVE, Soft- und Hardware für Technik und Wissenschaft GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland) aufbereitet. Die statistische Auswertung (Mann-Whitney *U*-Test) wurde von Christian Remmele (Lehrstuhl für Bioinformatik, Universität Würzburg) mit R (Team, 2014) durchgeführt.

## 2.7. Fluoreszenzmikroskopie

Alle in dieser Arbeit aufgenommenen Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Leica TCS SP5II (LSM; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Die hier benutzten Expressionssysteme wurden dazu verwendet, um die Interaktion zwischen zwei Proteinen durch bimolekulare Fluoreszenz-Komplementierung (engl. *Bimolecular Fluorescence Complementation*, BiFC) zu untersuchen. Diese Methode wurde von Kerppola (2008) sowie von Waadt et al. (2008) ausführlich beschrieben.

### 2.7.1 Oozyten

Die Oozyten wurden, wie in 2.5.2 beschrieben, vorbereitet. Die Konstrukte, die auf Interaktion untersucht wurden, waren mit je einer Hälfte des fluoreszierenden Proteins Venus-YFP fusioniert. Zur Dokumentation des Fluoreszenz-Signals wurde das Schälchen mit den Oozyten

auf den Objektisch gelegt und ein Objektiv mit 10facher Vergrößerung verwendet. Die rekonstituierten Fluoreszenzproteine wurden mit einem Argon-Laser mit der Wellenlänge 500 nm angeregt und bei einer emittierten Wellenlänge von 700 nm aufgezeichnet. Die Spaltweite, innerhalb der das emittierte Licht aufgezeichnet wurde, betrug 200 nm.

### 2.7.2 Protoplasten

Mesophyll-Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* wurden, wie in 2.1.4 beschrieben, mit den zu untersuchenden Konstrukten transformiert. Ein Tropfen Protoplastensuspension wurde auf einen Objektträger gegeben, worauf ein Deckgläschen mit Abstandshaltern (ca. 1 mm) gelegt wurde. Zur Fluoreszenzdetektion wurde ein Objektiv mit 25x-Vergrößerung und die gleichen Filtereinstellungen wie bei Oozyten-Aufnahmen gewählt. Zusätzlich wurde ein weiterer Kanal so eingestellt, dass die Chlorophyll-Fluoreszenz der Chloroplasten aufgezeichnet werden konnte.

### 2.7.3 FRET-basierte Messung der ABA-Konzentrationsänderungen

#### **ABAleon2.1 Inkubationspuffer**

5 mM KCl  
50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>,  
10 mM MES-Tris pH 5.6

Konzentrationsänderungen von ABA wurden mittels des ABAleon2.1-Reportersystems visualisiert (Waadt et al., 2014). Die Messungen wurden mit Dr. Rainer Waadt (Centre for Organismal Studies, Universität Heidelberg) durchgeführt. ABAleon2.1-Pflanzen wurden auf 0,5 MS-Agar in einer Klimakammer (Convion Europe Ltd, Isleham, Großbritannien) angezogen. Vier Blätter von 19-20 Tage alten Keimlingen wurden in Puffer bei 22°C und 100  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Blätter mit entweder 10  $\mu$ M (+)-ABA, 10

$\mu\text{M}$  MeJA oder 0.01% Ethanol für eine weitere Stunde behandelt, bevor Epidermisstreifen mit Hilfe eines Blenders gesammelt wurden (s. Abs. 2.1.2). Die Epidermisstreifen wurden auf einen Objektträger überführt. Die Fluoreszenzemission von mTurquoise (465-505 nm) und cpVenus173 (520-550 nm) wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgezeichnet. Die Experimente wurden zweimal in Triplikaten mit Blindbehandlung durchgeführt. Die Bilder wurden prozessiert (Emissionsratio-Berechnung), analysiert und kalibriert mit Fiji (Schindelin et al., 2012).

### III. Ergebnisse

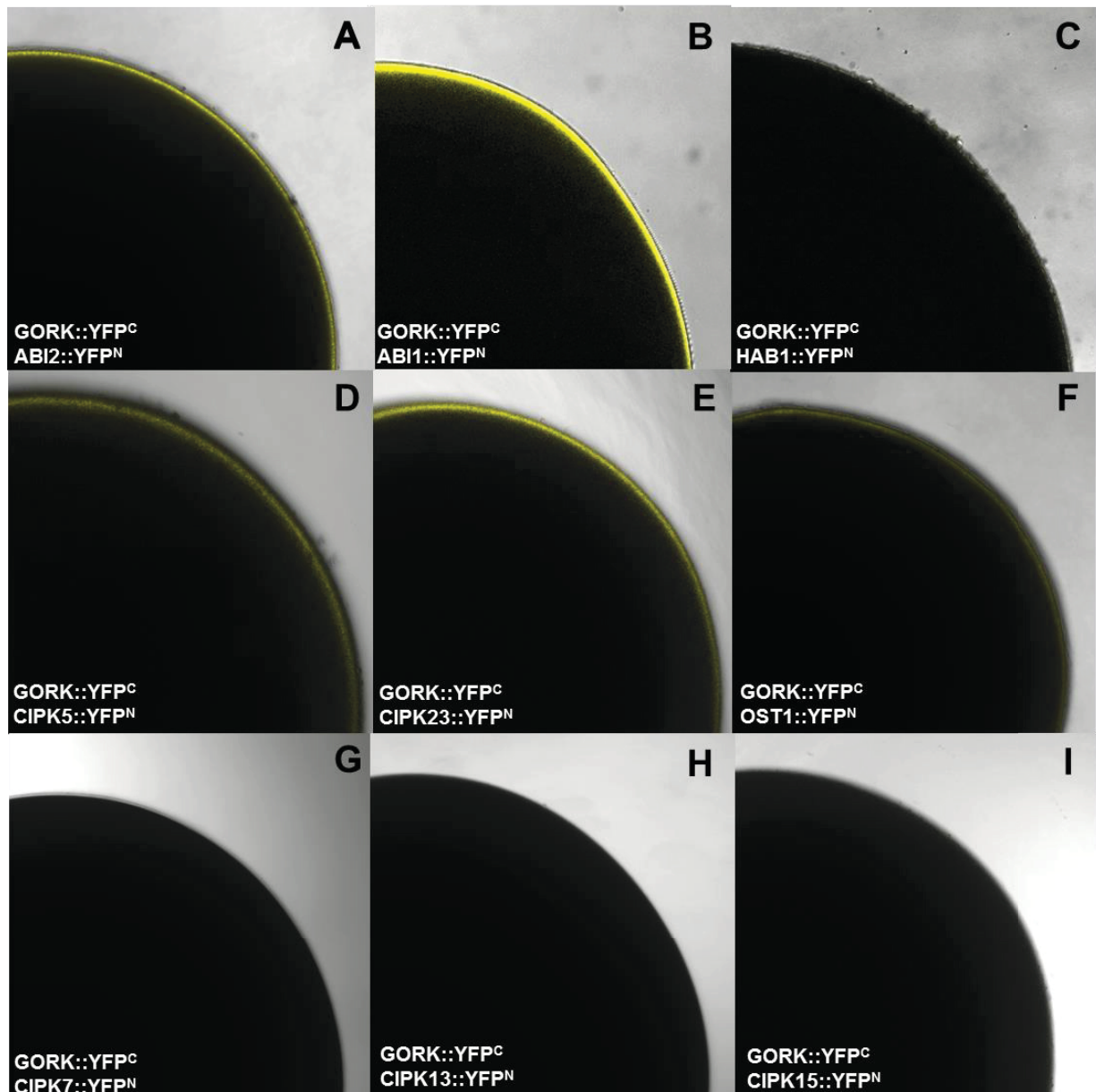
#### 3.1 Regulation des Kaliumkanals GORK durch reversible Phosphorylierung

Der Shaker-Kanal GORK (GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K<sup>+</sup>- CHANNEL) aus *Arabidopsis thaliana* wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits elektrophysiologisch charakterisiert (Ache et al., 2000; Becker et al., 2003). Neben der dort beschriebenen Regulation auf transkriptioneller Ebene konnten erst kürzlich zwei neue Arbeiten zeigen, dass die Aktivität von GORK möglicherweise auch durch ROS eingeleitetes Spleißen der prä-mRNA sowie durch Komplexbildung in der Plasmamembran in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration beeinflusst wird (Tran et al., 2013; Eisenach et al., 2014). Des Weiteren konnte der Kanal als Ziel der ABA-Signaltransduktion in Wurzeln und Samen identifiziert werden (Planes et al., 2015). Eine posttranslationale Regulation durch reversible Phosphorylierung, wie bereits für andere Ionenkanäle beschrieben, wurde jedoch für diesen Kaliumkanal bisher nicht gezeigt (Mori et al., 2006; Lee et al., 2007; Geiger et al., 2009b; Sato et al., 2009; Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011; Brandt et al., 2012; Scherzer et al., 2012). Daher war es zunächst das Ziel dieser Arbeit, mögliche Interaktionspartner von GORK zu identifizieren und diese mit Hilfe der DEVC-Methode in *Xenopus*-Oozyten hinsichtlich einer möglichen Kanalregulation zu überprüfen.

### 3.1.1 Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern von GORK

In Schließzellen sind vor allem einige Phosphatasen der Klasse PP2C,  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kinasen wie OST1, sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen der CPK- und der CIPK-Familie als Regulatoren von Anionen- und Kaliumkanälen bekannt. Deshalb wurde die Interaktion von GORK mit Mitgliedern dieser Familien näher untersucht, mit Fokus auf CIPK/CBLs. Basierend auf MicroArray-Daten (Bauer et al., 2013) wurde eine Vorauswahl an möglichen Interaktionspartnern getroffen, die in Schließzellen exprimieren und somit in Frage kamen. Dabei wurden in Vorarbeiten zu dieser Arbeit Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudien (Y2H) durchgeführt (Dr. U. Anschütz, Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg), um die Interaktion zwischen diesen Proteinen und GORK zu überprüfen. Bei Membranproteinen wie z. B. Ionenkanälen stellen häufig intrazelluläre C- und N-Termini sowie intrazelluläre „Loop“-Regionen zwischen den Transmembranbereichen mögliche Ziel-Domänen für die posttranslationale Regulation dar. Aus diesem Grund wurden sowohl der C- als auch der N-Terminus von GORK als „Köder“ eingesetzt. Im Zuge der Y2H-Analysen konnten sowohl die Kinase CIPK5 als auch die Phosphatase ABI2 als potentielle Interaktionspartner identifiziert werden, die mit beiden terminalen Enden von GORK interagierten. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde als alternatives System zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen die Methode der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) angewendet, die in *Xenopus*-Oozyten durchgeführt wurde (Abb. 3.1A-I). Nach Koexpression des GORK Kanals mit den PP2C-Phosphatasen trat sowohl bei ABI2 als auch bei ABI1 ein starkes Interaktionssignal auf, wohingegen mit HAB1 keine Fluoreszenz beobachtet werden konnte (Abb.3.1A-C). Bei den untersuchten Kinasen konnte für die Kinasen CIPK5 und CIPK23 ein deutliches Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 3.1D, E). Ein vergleichsweise schwächeres Signal wurde für die Interaktion von GORK mit OST1 festgestellt (Abb. 3.1F). Für die Kinasen CIPK7, CIPK13 und CIPK15 konnte dagegen keine erfolgreiche Fluoreszenzkomplementation mit GORK beobachtet werden (Abb.3.1G-I).

Sowohl CIPK5 als auch ABI2 konnten somit in beiden Methoden (Y2H und BiFC) als potentielle Interaktionspartner von GORK identifiziert werden. CIPK23, OST1 und ABI1 konnten aufgrund der Ergebnisse des BiFC-Experiments als mögliche Regulatoren jedoch nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.1:** GORK interagiert mit mehreren Phosphatasen und Kinasen in einer BiFC-Analyse.

Die Fluoreszenzkomplementation von GORK::YFP<sup>C</sup> wurde in *Xenopus* Oozyten mit verschiedenen Kinasen oder Phosphatasen der Klasse PP2C untersucht. Ein deutliches Fluoreszenzsignal wurde für die Interaktion von GORK::YFP<sup>C</sup> mit A) ABI2::YFP<sup>N</sup>, B) ABI1::YFP<sup>N</sup>, D) CIPK5::YFP<sup>N</sup> und E) CIPK23::YFP<sup>N</sup> detektiert. Eine im Vergleich dazu schwächere Fluoreszenzintensität wurde für F) OST1::YFP<sup>N</sup> aufgezeichnet. Für die anderen Kombinationen, GORK::YFP<sup>C</sup> mit C) HAB1::YFP<sup>N</sup>, G) CIPK7::YFP<sup>N</sup>, H) CIPK13::YFP<sup>N</sup> und I) CIPK15::YFP<sup>N</sup> konnte keine Fluoreszenz festgestellt werden. Eine Interaktion wird durch eine sichtbare, gelb dargestellte Fluoreszenzantwort wiedergegeben. Repräsentative Bilder von mindestens drei unabhängigen Experimenten werden gezeigt.

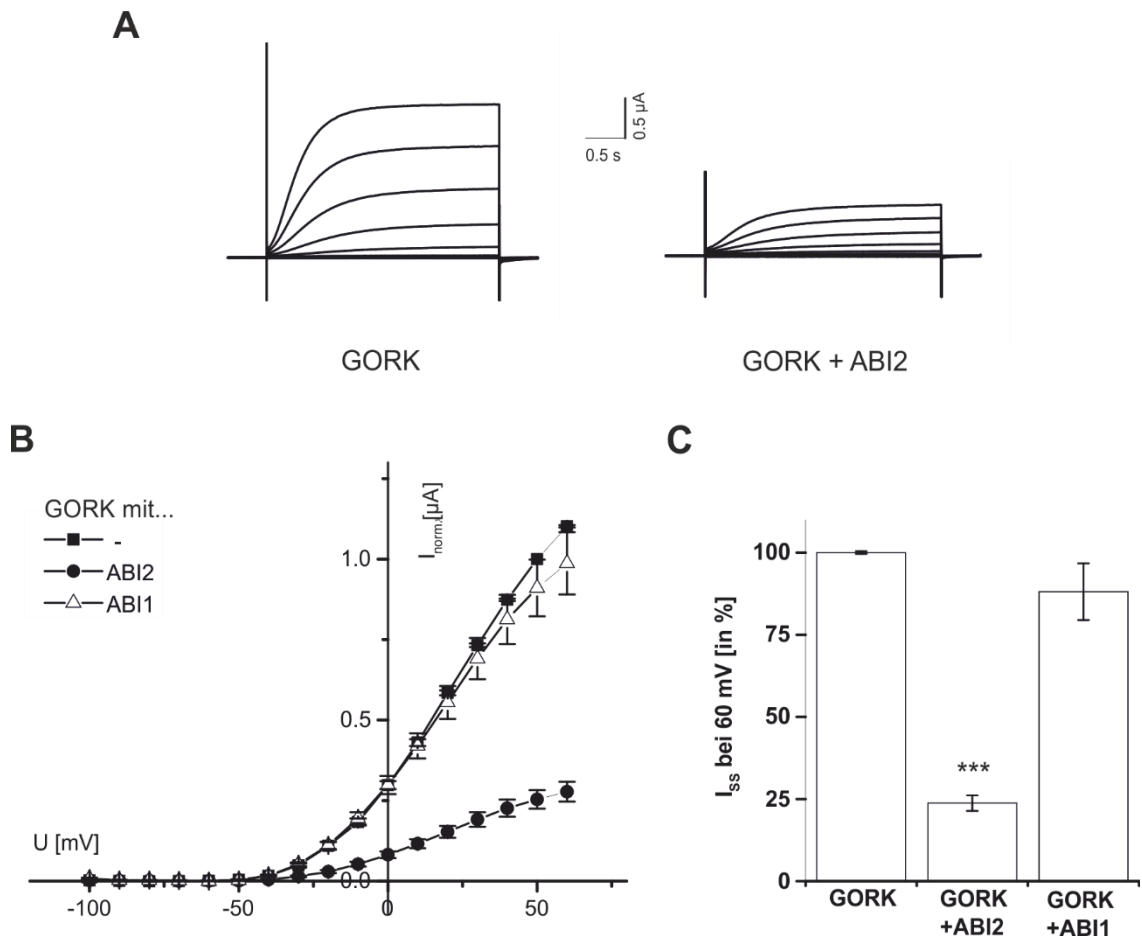
### 3.1.2 GORK wird durch die Phosphatase ABI2 partiell inhibiert

Wie in Abschn. 3.1.1 beschrieben, konnten mit Hilfe von Y2H- und BiFC-Experimenten einige potentielle Regulatoren von GORK identifiziert werden. Im nächsten Schritt galt es zu klären, welchen Effekt diese Interaktionspartner auf die Kanalaktivität haben. Hierfür wurden Oozyten von *Xenopus laevis* als heterologes Expressionssystem für GORK gewählt, weil die elektrischen Eigenschaften des Kanals bereits in diesem System charakterisiert werden konnten (Ache et al., 2000). Zur Untersuchung einer Interaktion wurde GORK mit jeweils einem der in Frage kommenden Interaktionspartner in *Xenopus*-Oozyten koexprimiert. Die Stromantworten bei +60 mV wurden auf den Wert von GORK ohne Interaktionspartner normiert.

Bereits anhand der Rohspuren konnte ein deutlicher Unterschied zwischen GORK (Abb. 3.2A, links) und Koexpression von ABI2 (Abb. 3.2A, rechts) festgestellt werden: in Anwesenheit von ABI2 war die Höhe des GORK-Stroms deutlich verringert. Die charakteristische langsame Öffnungskinetik schien dabei nicht durch Koexpression der Phosphatase beeinflusst worden zu sein, ebenso wie sein strikt auswärtsgerichtendes Öffnungsverhalten. Wurde die Stromhöhe im Steady-State-Bereich gegen die jeweilige Spannung in einem Diagramm aufgetragen, bestätigte sich dieser erste Eindruck (Abb. 3.2 B). In Anwesenheit von ABI2 begann der Kanal ab derselben Spannung (-30 mV) wie in Abwesenheit der Phosphatase zu aktivieren, allerdings verlief die Steigung bei Koexpression von ABI2 wesentlich flacher als ohne. Dieser Effekt von ABI2 schien spezifisch zu sein, da die Phosphatase ABI1 trotz einer hohen Sequenzähnlichkeit (80 % auf Aminosäure-Basis) nicht zu einer Verringerung des Kanalstroms führte (Rodriguez et al., 1998). Eine Normierung der Steady-State-Ströme bei +60 mV machte schließlich deutlich, dass ABI2 den GORK-Strom signifikant ( $p > 0,001$ ) um  $74 \pm 1,9\%$  reduzierte, wohingegen ABI1 keine signifikante Verminderung des Kanalstroms verursachte ( $11,9 \pm 8,6\%$ ; Abb. 3.2C). Somit konnte ABI2, aber nicht ABI1 als Negativregulator von GORK identifiziert werden.

Der experimentelle gleiche Ansatz wurde für GORK und verschiedene Kinasen wiederholt, um einen Positivregulator zu identifizieren, der die Stromantwort des Kanals erhöhen würde (Abb. 3.3). Hierbei wurde der GORK-Strom in Oozyten bei gleichzeitiger Expression mit CIPK5/CBL1

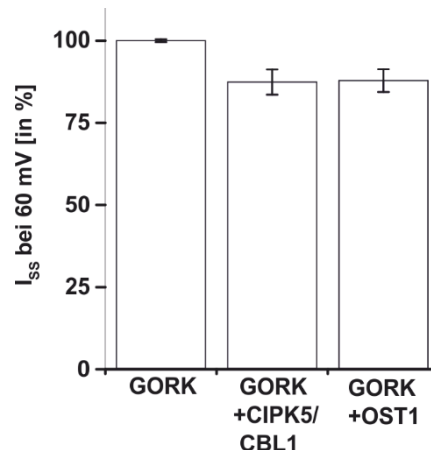




**Abb. 3.2:** Die PP2C ABI2, aber nicht ABI1 ist ein Negativregulator von GORK.

A) repräsentative Rohspuren von GORK (links) sowie GORK und ABI2 (rechts) exprimierenden Oozyten. Gezeigt sind die Stromantworten von -100 bis +60 mV in 20 mV-Schritten. B), Strom-Spannungs-Diagramm der Steady-State-Ströme von GORK in Oozyten von *Xenopus laevis* mit koexprimierten ABI1 oder ABI2. C) normalisierten Stromwerte bei 60 mV von GORK sowie GORK mit ABI1 oder ABI2. ABI2 reduziert den GORK-Strom um 74%, während ABI1 nur zu einer geringen Reduktion der Kanalaktivität führt ( $n \geq 16$ ,  $\pm$  Standardfehler). Sterne bedeuten eine Signifikanz von  $p > 0.001$  (Mann-Whitney U-Test).

und OST1 gemessen. Beide Kinasen führten zu einer leichten Abschwächung des GORK-Stroms anstelle einer Erhöhung (CIPK5/CBL1:  $12,6 \pm 3,8$  %; OST1:  $12,1 \pm 3,4$  %). Mit diesen Experimenten konnte somit eine negative Regulation des Kanals durch ABI2 nachgewiesen werden, wohingegen zunächst kein Nachweis für eine den Kanal aktivierende Kinase gefunden werden konnte.



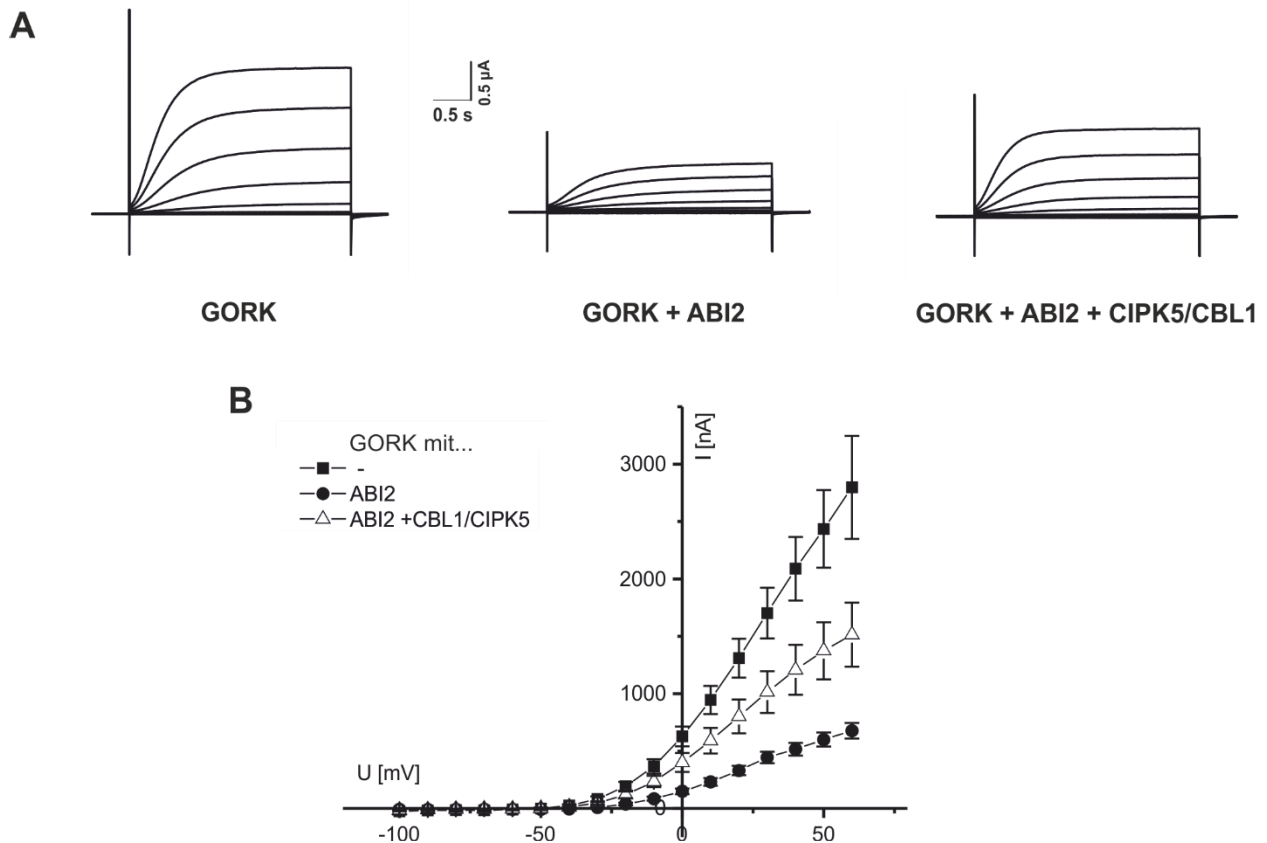
**Abb. 3.3: Koexpression von GORK mit CIPK5/CBL1 oder OST1 führt nicht zu einer Stromerhöhung.**

Vergleich der normalisierten Stromwerte bei +60 mV von GORK sowie GORK mit den Kinasen CIPK5/CBL1 oder OST1. Keine der verwendeten Kinasen zeigte einen positiven, steigernden Effekt auf die Kanalaktivität; lediglich eine schwache Reduktion gegenüber GORK allein war zu beobachten ( $n \geq 7$ ,  $\pm$  Standardfehler).

### 3.1.3 Antagonistische Regulation von GORK durch ABI2 und einige Kinasen

Durch das in Abschn. 3.1.2 beschriebene Experiment konnte ein Negativregulator von GORK, die Phosphatase ABI2, eindeutig identifiziert werden, ein positiv regulierender, den Kanal aktivierender Interaktionspartner dagegen nicht. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass GORK, ähnlich wie KAT1, in *Xenopus*-Oozyten durch endogene Kinasen phosphoryliert wird, wurde die Phosphorylierung des Kanals durch CIPK5/CBL1 im folgenden Experiment bei gleichzeitiger Expression von ABI2 untersucht (Sato et al., 2010). Da CIPK5 sowohl in Yeast-2-Hybrid-, als auch in BiFC-Experimenten positiv mit GORK interagiert, wurde zunächst der Fokus auf diese Kinase gemeinsam mit CBL1 gelegt. Für die Kinasen der CIPK-Familie ist schon seit längerem bekannt, dass diese mit CBL Proteinen interagieren und dies deren Aktivität beeinflusst (Batistic und Kudla, 2009). CIPK5 wird beispielsweise durch Interaktion mit CBL3 an den Tonoplasten lokalisiert (Schlücking et al., 2013). Daher wurden die Plasmamembran-lokalisierten CBLs 1 und 9 verwendet.

Analog zur Koexpression von ABI2 mit GORK (s. Abschn. 3.1.2), wurden zunächst die Stromspuren von repräsentativen Oozyten betrachtet (Abb. 3.4A). Zusätzliche Expression von

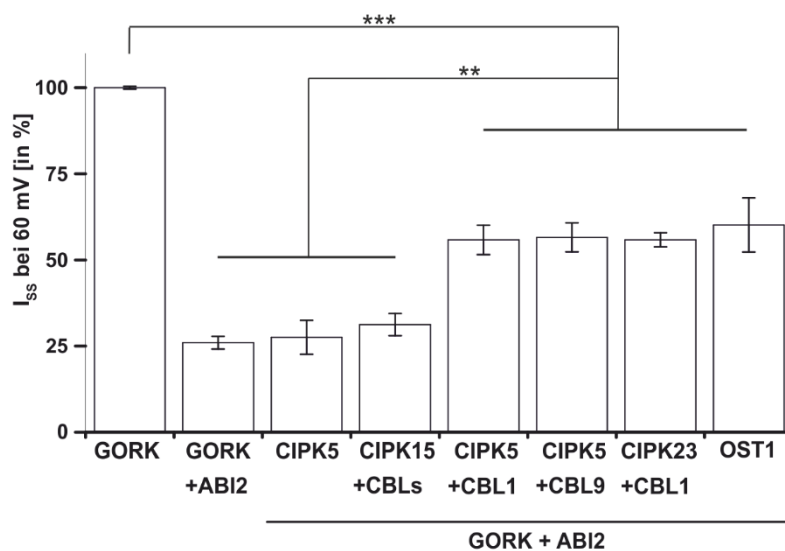


**Abb. 3.4:** CIPK5/CBL1 kann die ABI2-Inhibierung des GORK-Stroms teilweise aufheben.

A) Repräsentative Rohspuren von GORK (links), GORK koexprimiert mit ABI2 (Mitte) und mit ABI2 und CIPK5/CBL1 (Rechts). Durch zusätzliche Expression von CIPK5/CBL1 wird der ABI2-Block partiell geschwächt. Gezeigt sind die Stromantworten von -100 bis +60 mV in 20 mV-Schritten. B), Dazugehöriges Strom-Spannungs-Diagramm für GORK sowie GORK koexprimiert mit ABI2 und CBL1/CIPK5 ( $n \geq 6$ , Fehlerbalken zeigen Standardfehler).

CIPK5 und CBL1 zu GORK und ABI2 (rechts) veränderten weder das Aktivierungsverhalten noch die Öffnungskinetik des Kanals gegenüber dem allein exprimierten Kanal (links). Während ABI2 jedoch den Maximalstrom im Steady-State-Bereich reduzierte (Mitte), konnte die Kinase CIPK5 in Verbindung mit CBL1 dieser Reduktion der GORK-Aktivität entgegenwirken und eine Kanalaktivität bewirken, die zwischen der des inhibierten (Mitte) und dem nicht inhibierten (links) Kanal lag. In einem Strom-Spannungsdiagramm, in dem die Steady-State-Stromwerte gegen die applizierten Spannungen aufgetragen wurden (Abb. 3.4B), wird deutlich, dass die Interaktion mit ABI2 und CIPK5/CBL1 keinen Einfluss auf die spannungsabhängige Öffnung des Kanals hatte, sondern nur auf die Höhe des jeweils gemessenen Stroms, und damit auf die Steigung des Kurvenverlaufs bei Spannungen positiv der Aktivierungsschwelle. Der Kanal aktivierte unter den verwendeten Lösungsbedingungen in allen drei Ansätzen bei etwa -40 bis

-30 mV, ein Bereich, der einen Nettoausstrom an Kaliumionen aufweist. Für GORK allein verlief die Kurve am steilsten, während bei Koexpression von ABI2 die Kurve am flachsten ist. Bei zusätzlicher Expression von CIPK5 und CBL1 lag die Steigung dazwischen. Ein Vergleich der Steady-State-Ströme bei einer Spannung von +60 mV zeigte (Abb. 3.5), dass CBL1 oder CBL9 benötigt wurden, damit CIPK5 den ABI2-Block von GORK wieder teilweise aufheben konnte (ABI2:  $26,0 \pm 1,9\%$  des GORK-Stroms). Beide Calcium-Sensoren waren hierbei in gleichem Maße effizient in ihrer Wirkung (CBL1:  $55,8 \pm 4,3\%$ , CBL9:  $56,6 \pm 4,3\%$  des GORK-Stroms). CIPK5 alleine war dazu jedoch nicht in der Lage ( $27,6 \pm 4,9\%$ ). Auch der Effekt von CIPK15, CIPK23 und OST1 wurde nach dem gleichen Versuchsansatz untersucht (Abb. 3.5). Für CIPK23 wurde CBL1 als Partner gewählt, weil bereits gezeigt werden konnte, dass der Kaliumaufnahme Kanal AKT1 von CIPK23/CBL1 aktiviert wird (Lee et al., 2007). CIPK15 wurde mit einem Mix aus CBL1, CBL4, CBL5 und CBL9 getestet, weil für diese Kinase noch keine näheren Informationen über ihre Interaktion mit CBLs bekannt waren.



**Abb. 3.5:** Auch CIPK5/CBL9, CIPK23/CBL1 und OST1 können den ABI2-Effekt abschwächen, aber nicht CIPK5 allein oder CIPK15/CBLs.

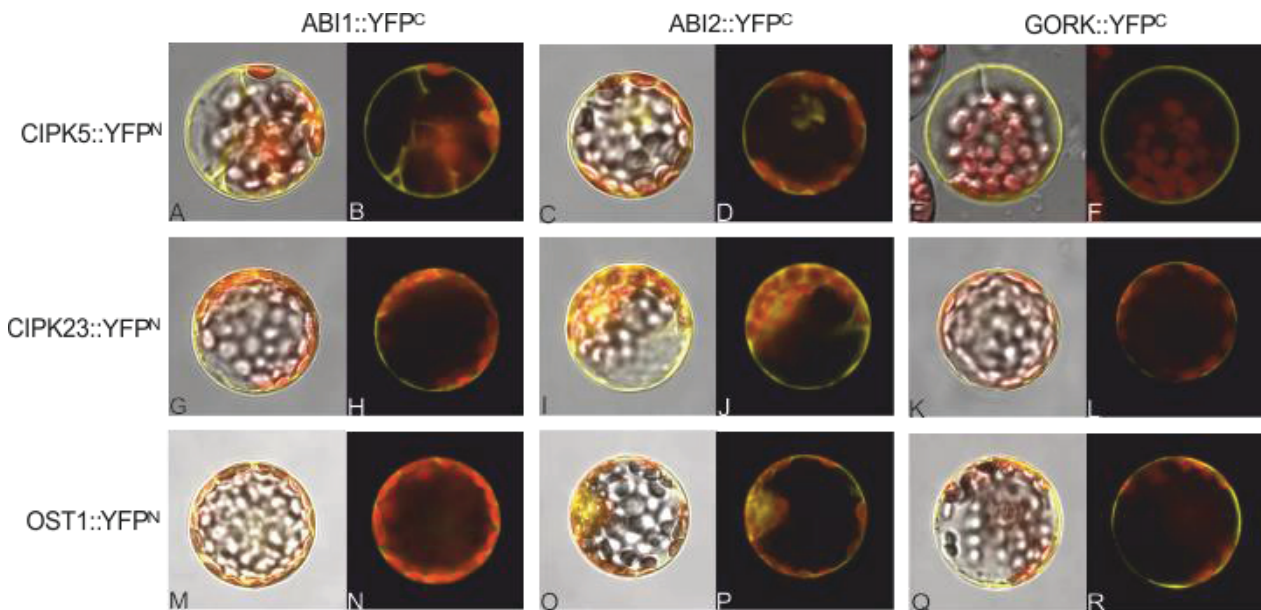
GORK kann spezifisch durch OST1, CIPK5 und CIPK23 in Verbindung mit den CBLs CBL1/9 aktiviert werden, nicht jedoch durch CIPK15/CBLs. CIPK5 benötigt hierfür zwingend einen CBL-Partner. Steady-state-Ströme von GORK bei +60 mV bei gleichzeitiger Expression von ABI2 und den Kinasen CIPK5, CIPK15, CIPK23 und OST1 ( $n = 4$ ). CIPK5 wurde ohne CBL-Partner oder mit CBL1 bzw. CBL9 injiziert. CIPK15 wurden mit einer Mischung aus CBL1, 4, 5 und 9 gemessen ( $n \geq 7$ , Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler). Sterne bilden das Signifikanzniveau ab (Mann-Whitney U-Test).

Die genannten CBLs lokalisieren an der Plasmamembran und sollten daher in der Lage sein, ihren CIPK-Partner dorthin zu rekrutieren (Batistic et al., 2010). Wie CIPK5/CBL1 bzw. CBL9, konnten auch CIPK23/CBL1 und OST1 der ABI2-Inhibierung entgegenwirken und die GORK-Aktivität erhöhen ( $55,6 \pm 2,0\%$  bzw.  $60,3 \pm 7,9\%$ ). Koexpression mit CIPK15/CBLs hingegen hatte nicht diesen Effekt auf GORK und wirkte somit nicht antagonistisch zu ABI2 ( $31,3 \pm 3,2\%$ ). Somit konnten CIPK5 in Verbindung mit CBL1 oder CBL9, sowie CIPK23/CBL1 und OST1 als positive Regulatoren von GORK und Antagonisten von ABI2 identifiziert werden, nicht aber CIPK15 mit den getesteten CBLs.

### 3.1.4 Interaktionen zwischen GORK, PP2Cs und Kinasen

Anstelle einer direkten Aktivierung von GORK wäre es auch möglich, dass ABI2 von Kinasen phosphoryliert und dadurch inaktiviert wird, sodass die Inhibierung von GORK durch ABI2 abgeschwächt wird. Auch eine kompetitive Hemmung wäre denkbar, dass also ABI2 nicht nur GORK, sondern auch die Kinasen als Zielproteine haben und daher im Zuge einer Koexpression schwächer mit GORK interagieren könnte. Dies trifft auf die Regulation des ebenfalls am Stomaschluss beteiligten Anionenkanals SLAC1 zu, dessen Inhibitor AB1 über einen verzweigten Regulationsmechanismus nicht nur direkt mit dem Kanal interagiert, sondern auch die Kinasen dephosphoryliert und damit inaktiviert, die SLAC1 durch Phosphorylierung aktivieren (Geiger et al., 2009b; Brandt et al., 2012).

Mit Hilfe von BiFC-Experimenten sollte daher *in planta* überprüft werden, ob die in den obigen Experimenten verwendeten Proteine bei heterologer Expression in Mesophyll-Protoplasten von *A. thaliana* miteinander interagieren können. Hierfür wurden Protoplasten mit ABI1::YFP<sup>C</sup>, ABI2::YFP<sup>C</sup> und GORK::YFP<sup>C</sup> jeweils paarweise mit CIPK5::YFP<sup>N</sup>, CIPK23::YFP<sup>N</sup> oder OST1::YFP<sup>N</sup> transformiert (Abb. 3.6). Nach Transformation mit CIPK5::YFP<sup>N</sup> und ABI1::YFP<sup>C</sup> war ein Fluoreszenzsignal an der Peripherie der rot dargestellten Chloroplasten, im Cytoplasma und in den Cytoplasmafäden erkennbar (Abb. 3.6A und B). Bei Kotransformation von CIPK5::YFP<sup>N</sup> mit ABI2::YFP<sup>C</sup> war das Fluoreszenzsignal ebenfalls deutlich um die Chloroplasten lokalisiert, was auf eine Lokalisation des Proteinkomplexes im Cytoplasma hinweist (Abb. 3.6C und D).



**Abb. 3.6:** CIPK5, CIPK23 und OST1 interagieren sowohl mit PP2Cs als auch mit GORK in einer BiFC-Analyse.

Die Kinasen, die GORK aktivieren, sowie ABI1 und ABI2 führen in einer BiFC-Analyse an Mesophyll-Protoplasten von *A. thaliana* zu einer deutlichen Fluoreszenzkomplementation jeweils sowohl untereinander als auch mit GORK. Links nach rechts: ABI1::YFP<sup>C</sup>, ABI2::YFP<sup>C</sup>, GORK::YFP<sup>C</sup>. Von oben nach unten: CIPK5::YFP<sup>N</sup>, CIPK23::YFP<sup>N</sup>, OST1::YFP<sup>N</sup>. Hochgestelltes C oder N weist auf die YFP-Hälfte hin, mit der das Protein fusioniert ist (C steht für C-Terminus, N für N-Terminus von YFP). A, C, E, G, I, K, M, O und Q zeigen Durchlichtbilder kombiniert mit den Kanälen für Chlorophyllfluoreszenz (rot) und YFP-Fluoreszenz (gelb) von repräsentativen Zellen. B, D, F, H, J, L, N, P und R zeigen die dazugehörige Kombination aus Chlorophyll- (rot) und YFP-Fluoreszenzsignal (gelb).

Dagegen war eine Interaktion zwischen CIPK5::YFP<sup>N</sup> bzw. CIPK23::YFP<sup>N</sup> und GORK::YFP<sup>C</sup> ausschließlich an der Plasmamembran zu beobachten (Abb. 3.6E, F, K und L). Sowohl mit ABI1::YFP<sup>C</sup> als auch mit ABI2::YFP<sup>N</sup> fand eine Interaktion im Cytoplasma statt (Abb. 3.6G-J). Das Fluoreszenzsignal war außerhalb der Chloroplasten, sowie in Cytoplasmafäden durch die Vakuole erkennbar (Abb. 3.6J). Die Interaktion mit GORK::YFP<sup>N</sup> trat, wie mit CIPK5::YFP<sup>N</sup>, an der Plasmamembran auf, bedingt durch die dortige Lokalisation des Kanals (Abb. 3.6L). Dasselbe Ergebnis konnte auch für OST1::YFP<sup>N</sup> mit ABI1::YFP<sup>C</sup>, ABI2::YFP<sup>C</sup> oder GORK::YFP<sup>C</sup> beobachtet werden (Abb. 3.6M-R). Mit ABI1::YFP<sup>C</sup> und ABI2::YFP<sup>C</sup> war ein Fluoreszenzsignal im Cytoplasma detektierbar, während GORK::YFP<sup>C</sup> mit OST1::YFP<sup>N</sup> an der Plasmamembran interagierte.

Insgesamt ist damit festzustellen, dass das Fluoreszenzsignal bei Interaktion mit GORK auf eine Lokalisation an der Plasmamembran hinweist (Abb. 3.6F, L, R), wohingegen Kinasen und Phosphatasen auch im Cytoplasma zu interagieren scheint (Abb. 3.6B, D, H, J, N, P). Mit diesem

Ansatz konnte für alle der untersuchten Kinasen- CIPK5, CIPK23 und OST1- eine Interaktion sowohl mit den PP2Cs ABI1 und ABI2, als auch mit GORK detektiert werden, sodass ein verzweigter Regulationsmechanismus zwischen Kanal, Phosphatase und Kinase nicht ausgeschlossen werden kann.

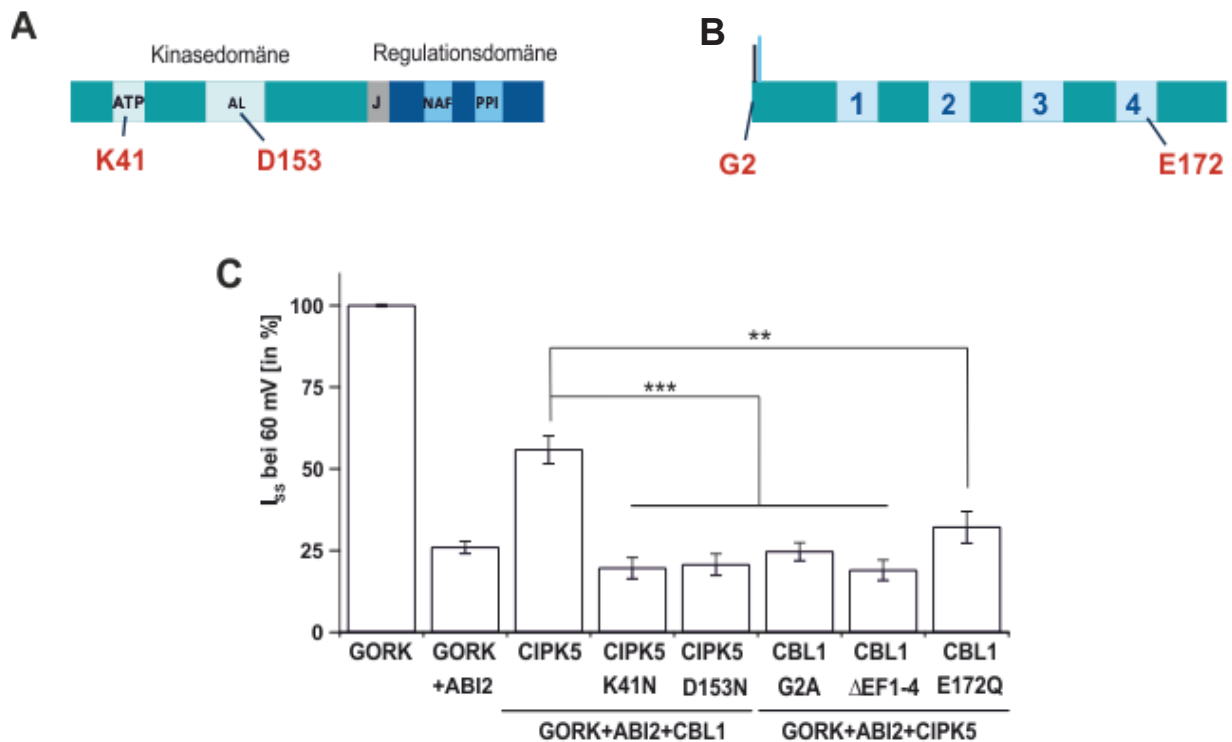
### 3.1.5 CIPK5/CBL1 aktiviert GORK calciumabhängig

Die Regulation von GORK durch CIPK5 und seinen Calciumsensor CBL1 sollte durch verschiedene gerichtete Mutationen näher untersucht werden, indem die mutierte Kinase bzw. CBL1 anstelle des Wildtyps analog zu den Messungen in Abschn. 3.1.3 in *Xenopus*-Oozyten koexprimiert und die Stromantwort des Kanals gemessen wurde. Die Kinaseaktivität von CIPKs verbraucht ATP, weshalb eine Mutation in der ATP-Bindestelle (CIPK5 K41N) auch die Kinaseaktivität stören könnte (Gong et al., 2002; Li et al., 2006; Maierhofer et al., 2014). Durch eine Mutation in der Aktivierungsschleife, D153N, sollte die postulierte Konformationsänderung nach Aktivierung des CBL-Partners verhindert und somit die Aktivität der Kinase verringert werden (Hashimoto et al., 2012) (Abb. 3.7A).

Wie bereits in Abs. 1.1.3 erwähnt, besitzen CBLs EF-Hände zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ . In den folgenden DEVC-Messungen sollte daher untersucht werden, ob die Aktivierung von GORK durch den CIPK5/CBL1- Komplex calciumabhängig ist und wie sich ein Verlust der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung auf die Aktivität des Komplexes auswirkt. Hierfür wurden zwei Mutanten verwendet, CBL1 E172Q, die nicht mehr in der Lage sein sollte, in der vierten EF-Hand Calcium binden zu können, und die Quadrupelmutante CBL1 E56Q D91N E128Q E172Q (im Folgenden CBL1  $\Delta\text{EF}1-4$ ), bei der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung in allen vier EF-Händen verhindert sein soll (Abb. 3.7B).

Eine weitere CBL1-Mutante, CBL1 G2A, wurde daraufhin untersucht, ob die Myristoylierungsstelle am Glycin2 für die Plasmamembranlokalisierung und die physiologische Funktion des CIPK5/ CBL1- Komplexes notwendig ist. Für CIPK5 ist bereits bekannt, dass CBL3 in der Lage ist, die Kinase aus dem Cytoplasma an den Tonoplasten zu bringen, und für CBL1 wurde publiziert, dass die Myristoylierungsstelle für eine Lokalisierung des Calciumsensorproteins in der Plasmamembran entscheidend ist (Batistic et al., 2008;

Schlücking et al., 2013). Die Lokalisation an unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten könnte einen Einfluss auf die Zielproteine der Kinase, und damit ihre Funktion, haben. Daher sollte überprüft werden, ob CIPK5 in Gegenwart von CBL1 an die Plasmamembran relokalisiert wird bzw. ob CIPK5 auch ohne Verankerung in der Plasmamembran durch den CBL-Partner zur Aktivierung von GORK führen kann.



**Abb. 3.7: Gezielte Mutationen in CIPK5 und CBL1 verhindern eine Aktivierung von GORK.**

Durch gerichtete Mutationen in Schlüsselpositionen wurde die Funktionsweise von CIPK5 und CBL1 näher analysiert, indem der Effekt der Mutation auf die GORK-Aktivierung gemessen wurde. Alle untersuchten Mutationen führten dazu, dass der CIPK5/CBL1-Komplex nicht mehr länger der Inhibierung des GORK-Stroms durch ABI2 entgegenwirken konnte. Die Modelle von CIPK5 (A) und CBL1 (B) zeigen die Positionen der getesteten Mutationen an. A), Modell der Kinase CIPK5. ATP, ATP-Bindestelle mit Lys41; AL, Aktivierungsloop mit Asp153; J, Verbindungsdomäne zwischen Kinase- und Regulationsdomäne; NAF, CBL-Interaktionsstelle benannt nach konserviertem Asn-Ala-Phe-Motiv, PPI, PP2C-Interaktionsstelle. B), Modell des Calciumsensors CBL1. Senkrechte Striche deuten Myristoylierung an Gly2 und S-Acylierung an. 1-4, EF-Hände, mit Glu172 in der 4. EF-Hand. C), Steadystate-Ströme bei 60 mV von CIPK5- und CBL1- Verlustmutanten CIPK5 K41N, CIPK5 D153N, CBL1 G2A, CBL1  $\Delta$ EF1-4 und CBL1 E172Q in *Xenopus*-Oozyten. Balken zeigen normalisierte Mittelwerte ( $n \geq 8$ ,  $\pm$  Standardfehler) von injizierten Oozyten nach 4 Tagen. Sterne repräsentieren die Signifikanzunterschiede der Ergebnisse (Mann-Whitney U-Test).



Die verwendeten Mutanten wurden von Prof. Dr. Jörg Kudla (Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Westfälische Wilhelms- Universität Münster) zur Verfügung gestellt. Die DEVC- Messungen wurden nach demselben Schema durchgeführt wie in Abschn. 3.1.3 beschrieben (Abb. 3.7). Anstelle von Wildtyp-CIPK5 bzw. CBL1 wurden die jeweiligen zu untersuchenden Mutanten koexprimiert.

Bei Koexpression beider Kinase-Mutanten war die Stromantwort signifikant niedriger als bei Wildtyp-CIPK5 (CIPK5 K41N:  $19,6 \pm 3,2\%$  und CIPK5 D153N:  $20,3 \pm 3,3\%$  des Ausgangswerts von GORK; für beide:  $p < 0.001$ ). Demnach scheinen sowohl ATP als auch eine Konformationsänderung nötig zu sein für die Aktivierung der Kinase und damit der Aktivierung des GORK Kanals. Für die gemessenen CBL1-Mutanten ergab sich ein ähnliches Bild. Durch die fehlende Plasmamembranlokalisierung des CIPK5/CBL1-Komplexes bei CBL1 G2A war CIPK5 nicht mehr in der Lage, mit GORK zu interagieren und führte nicht länger zu einer partiellen Aufhebung der ABI2-Hemmung ( $24,7 \pm 2,7\%$ ;  $p < 0.001$ ). Bei Verlust aller vier EF-Hände- und somit einer fehlenden Aktivierung der CBL durch  $\text{Ca}^{2+}$ - wurde die Stromantwort von GORK bei CBL1  $\Delta\text{EF1-4}$ /CIPK5- Koexpression ebenfalls nicht erhöht ( $19,0 \pm 3,1\%$ ;  $p < 0.001$ ). Wenn nur die vierte EF-Hand mutiert wurde, zeigte der Komplex aus CIPK5/CBL1 E172Q eine leichte Kanalaktivierung, blieb aber deutlich niedriger als Wildtyp CBL1 ( $32,1 \pm 4,8\%$ ;  $p < 0.01$ ).

Mit diesen Versuchen konnte somit nachgewiesen werden, dass CIPK5 durch CBL1 an die Plasmamembran gebracht werden musste, um mit GORK interagieren zu können, und dass sowohl ATP als auch eine Konformationsänderung der Kinase, wie sie durch Interaktion mit CBL1 ausgelöst wird, für die Aktivierung des Kaliumkanals durch CIPK5 benötigt wurde. Die Bindung von Calciumionen an CBL1 schien für die Aktivierung des CIPK5/CBL1-Komplexes ebenfalls von großer Bedeutung zu sein. Die vierte EF-Hand schien dabei eine wichtige Rolle zu spielen, jedoch ist sie vermutlich nicht allein für die Auslösung der Konformationsänderung des Proteins verantwortlich. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der CIPK5/CBL1-Komplex zu einer calciumabhängigen Phosphorylierung von GORK führt.

## 3.2 Bedeutung der GORK-Regulation im Stomaschluss

In den vorangegangenen Experimenten (Abschn. 3.1) konnte mittels DEVC-Experimenten an *Xenopus*- Oozyten ein Regulationsmechanismus des Kaliumkanals GORK aufgedeckt werden, der aus einer PP2C-Phosphatase (ABI2) und zweier Kinasen vom CIPK-Typ sowie deren CBL-Partner (CIPK5 und CIPK23 mit jeweils CBL1 oder CBL9) sowie OST1 besteht.

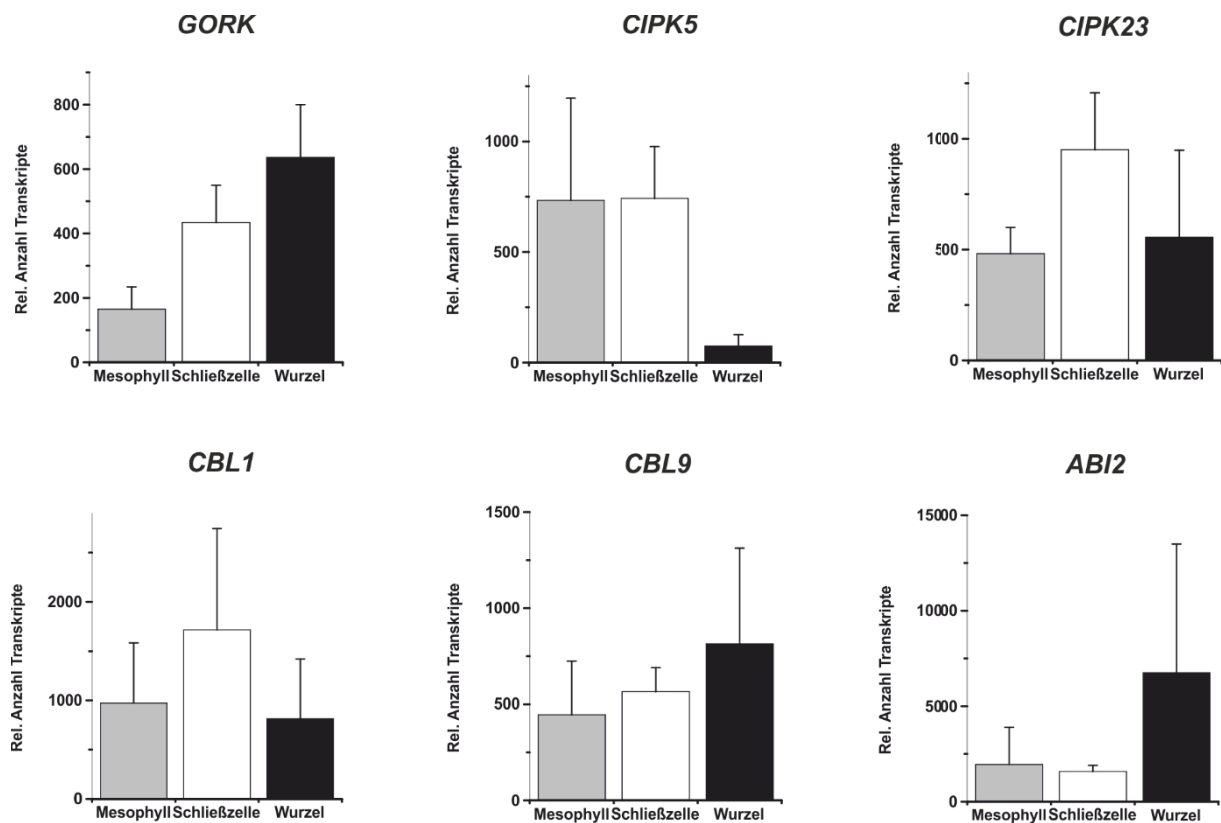
Für GORK ist bereits bekannt, dass dieser Kanal für den Kaliumefflux während des Stomaschlusses hauptverantwortlich ist (Becker et al., 2003). Deshalb wurde zunächst überprüft, ob die Komponenten der GORK-Regulation spezifisch in Schließzellen exprimiert werden, und schließlich wurde der Effekt der entsprechenden Verlustmutanten dieser potentiellen Signalwegs-komponenten auf den Stomaschluss untersucht.

### 3.2.1 Expression der Signalwegskomponenten in Schließzellen

OST1 wurde, ebenso wie GORK und ABI2, bereits als in Schließzellen exprimiertes Gen identifiziert (Becker et al., 2003; Geiger et al., 2009b). Auch für CIPK23, CBL1 und CBL9 konnte histochemisch eine Expression in Schließzellen nachgewiesen werden (Cheong et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transkriptmengen von GORK, ABI2, CIPK5, CIPK23, CBL1 und CBL9 mit Hilfe von qRT-PCR gemessen (Abb. 3.8). Hierfür wurden angereicherte Schließzellen, Blattgewebe sowie Keimlingswurzeln von *A. thaliana* verwendet. Im Fall von GORK konnten die qRT-PCR Experimente bestätigen, dass der Kanal am stärksten in Schließzellen und Wurzeln, jedoch nur in geringen Mengen im Blattgewebe exprimiert wurde (Abb. 3.8A). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Kinasen CIPK5 und CIPK23 vergleichbar stark in Schließzellen exprimiert waren. Während CIPK5-Transkripte in ähnlicher Menge im Mesophyll vorlagen, war die Expression von CIPK23 hier nur etwa halb so hoch wie in Schließzellen (Abb. 3.8B, C). Die Expression von CIPK5 war in Wurzeln fast gar nicht detektiert worden, dagegen waren Transkripte von CIPK23 hier zu finden. Die beiden Calciumsensoren CBL1 und CBL9 (Abb. 3.8D, E) wurden in allen der drei getesteten

Gewebetypen exprimiert. Dies trifft auch auf die PP2C-Phosphatase ABI2 zu, die allerdings eine hohe Varianz der Transkriptmenge in den Keimlingswurzeln zeigte (Abb. 3.8F).

Zusammenfassend ist für die quantitative Transkriptionsanalyse festzuhalten, dass alle putativen Signalwegskomponenten in Schließzellen und mit Ausnahme von CIPK5 in Wurzeln exprimiert wurden. Deshalb wurde in den folgenden Kapiteln der Fokus auf die Untersuchung der GORK-Regulation durch CBL1/9-CIPK5 und ABI2 in Schließzellen gelegt.



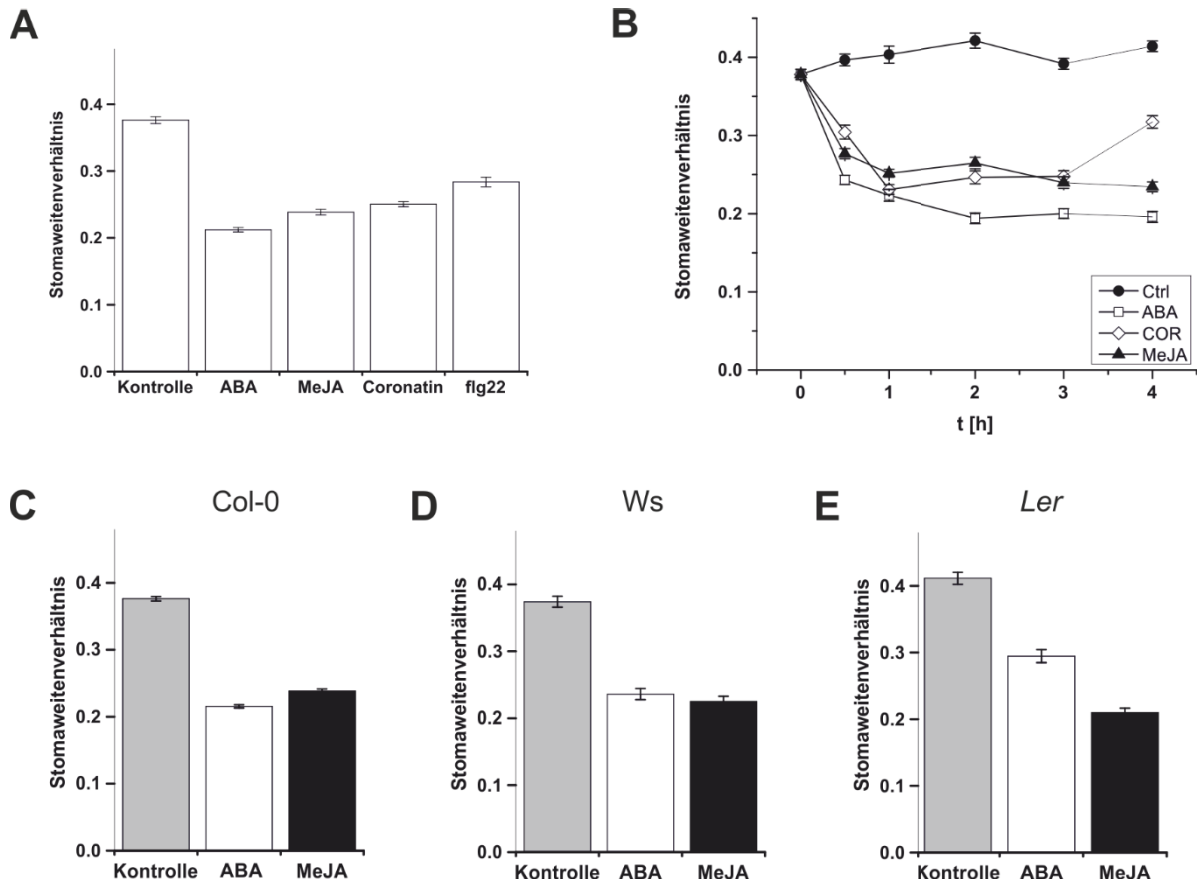
**Abb. 3.8:** Alle der getesteten Signalwegskomponenten werden in Schließzellen exprimiert.

Zum Nachweis der Expression in Schließzellen, Mesophyll oder in Keimlingswurzeln wurden qRT-PCR-Messungen mit RNA der entsprechenden Gewebe für die Gene von GORK, CIPK5, CIPK23, CBL1, CBL9 und ABI2 durchgeführt. Während alle Transkripte in Schließzellen nachgewiesen wurden, fehlte GORK im Blattgewebe. CIPK5 Transkripte konnten nicht in Wurzeln detektiert werden, im Gegensatz zu den anderen getesteten Genen. Die ermittelte Anzahl Transkripte wurde auf die Expression der Haushaltsgene Actin2/8 normalisiert (relativ zu 10.000 Transkripten). Balken stellen Mittelwerte dar ( $n \geq 4$ ,  $\pm$  Standardabweichung). Messungen wurden von Sophia Guttenberger (Botanik I, Universität Würzburg) durchgeführt.

### 3.2.2 Stomata reagieren unterschiedlich auf Reize

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass ABA und JA wie MeJA sowie das bakterielle MAMP Flagellin (flg22) den Stomaschluss auslösen (Munemasa et al., 2011b; Sawinski et al., 2013). Bakterien wie *Pseudomonas spec.* produzieren das Phytotoxin Coronatin, ein Struktur-Analogon des bioaktiven Phytohormons JA-Ile, und nutzen die stomatäre Porenöffnung als Eintrittspforte zur Infektion des Blattes. Die Wirkung von Coronatin als auch von MeJA auf Schließzellen wird in der Literatur widersprüchlich beschrieben: während Coronatin zur Öffnung der Poren führt, verursacht MeJA meist einen Schluss der Poren (Suhita et al., 2004; Melotto et al., 2006; Munemasa et al., 2011b; Montillet et al., 2013; Savchenko et al., 2014). Um die Rolle des GORK Kanals sowie seiner hier identifizierten Regulatoren für den Stomaschluss zu untersuchen, wurden daher zunächst die Öffnungsweiten der Schließzellen von *A. thaliana* Wildtyppflanzen (Col-0) nach einstündiger Inkubation mit den oben genannten Effektoren bestimmt, um Stoma-Assays als Methode zu etablieren (Abb. 3.9A). Anstelle des kompletten bakteriellen Flagellinproteins wurde ein 22 Aminosäuren langes Fragment (flg22) gewählt, welches in *Arabidopsis* an den Rezeptor FLS2 bindet (Chinchilla et al., 2006). Dabei verursachten ABA, MeJA und flg22, aber auch Coronatin das Schließen der Stomata (Abb.3.9A), anders als in der Literatur beschrieben (Melotto et al., 2006).

Um zu überprüfen, ob die Poren bei Inkubation mit Coronatin nur vorübergehend schließen und nach einiger Zeit wieder öffnen, wurden Blätter von Col-0 in einer Zeitreihe unterschiedlich lange mit ABA, Coronatin und MeJA behandelt, bevor die Stomaweiten analysiert wurden (Abb. 3.9B). Unter Kontrollbedingungen blieben die Poren über den gesamten Zeitraum der Messung geöffnet und fluktuierten in der Öffnungsweite nur zwischen  $0,37 \pm 0,01$  und  $0,40 \pm 0,01$  (geschlossene Kreise). Im Gegensatz dazu führten sowohl ABA als auch MeJA über einen Zeitraum von vier Stunden hinweg zu einem dauerhaften Stomaschluss, welcher bereits nach einer halben Stunde Inkubation begann (ABA:  $0,24 \pm 0,01$ ; offene Quadrate; MeJA:  $0,28 \pm 0,01$ ; geschlossene Dreiecke). Anders verhielten sie sich, wenn die Schließzellen mit Coronatin behandelt wurden: Hier schlossen zunächst die Zellen ( $0,23 \pm 0,01$  nach einer Stunde; offene Dreiecke), um nach vier Stunden wieder zu öffnen ( $0,34 \pm 0,01$ ).



**Abb. 3.9.** Die Reaktionen von Stomata können bei verschiedenen Stimuli und Ökotypen gemessen werden.

A) Antworten von Schließzellen (Col-0) nach 1h Inkubation mit verschiedenen Stimuli (20  $\mu\text{M}$  ( $\pm$ ) ABA, 10  $\mu\text{M}$  MeJA, 10  $\mu\text{M}$  Coronatin oder 5  $\mu\text{M}$  flg22). Die Poren wurden vor dem Verlauf durch 2h Inkubation in Puffer und Licht geöffnet, sodass durch die Behandlung ein Stomaschluss hervorgerufen wurde. B) Stomaschlusskinetik von Col-0 nach ABA, MeJA oder Coronatin-Behandlung; inkubiert wurde für die angegebenen Zeiten. C-E) Vergleich zwischen der Stoma-schlussantworten auf ABA- oder MeJA-Behandlung bei den Arabidopsis Ökotypen Col-0 (C), Ws (D) und *Ler* (E). A-E), Balken stellen Mittelwerte aus zwei oder mehr unabhängigen Experimenten dar ( $n \geq 80$ ,  $\pm$  Standardfehler). Das Stomawertenverhältnis wurde als Ratio aus Weite durch Länge bestimmt.

Demnach traten in diesem Experiment nach vier Stunden deutliche Unterschiede zwischen MeJA und Coronatin auf, obwohl sowohl JA-Ile als auch Coronatin an den Jasmonat-Rezeptor COI1 binden (Yan et al., 2009).

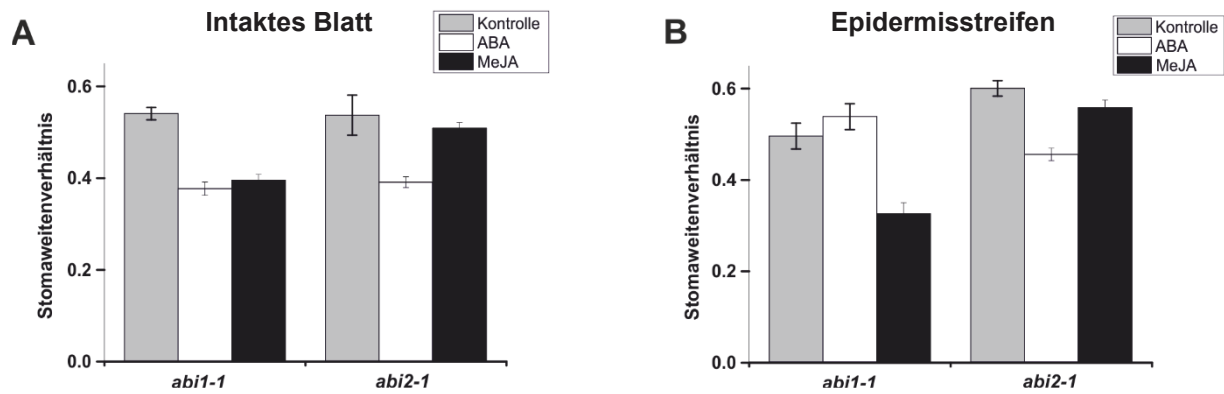
Um zu testen, ob auch die Ökotypen *Wassilewskija-0* (Ws) und *Landsberg erecta* (*Ler*) wie Col-0 auf ABA und MeJA reagieren, wurden die Stomawerten dieser Pflanzen auf die gleiche Weise untersucht (Abb. 3.9C-E). Die Schließzellen von *Ler* waren unter Kontrollbedingungen etwas weiter geöffnet als bei Col-0 und Ws (*Ler*:  $0,41 \pm 0,01$ ; Col-0:  $0,38 \pm 0,01$ ; Ws:  $0,38 \pm 0,01$ ). Bei

Behandlung mit Phytohormonen ähnelten sich die Antworten der drei Ökotypen. Stomata von *Ws* reagierten etwas stärker auf MeJA als auf ABA ( $0,23 \pm 0,01$  bzw.  $0,24 \pm 0,01$ ). Auffälliger ist dagegen *Ler*, deren Stomata deutlich besser auf MeJA reagierten als auf ABA ( $0,21 \pm 0,01$  bzw.  $0,29 \pm 0,01$ ). Insgesamt aber sind die Schließzellen aller drei untersuchten *Arabidopsis*-Ökotypen dazu in der Lage, sowohl auf ABA- als auch auf MeJA-Behandlung hin ihre Poren zu schließen.

### 3.2.3 Einfluss der experimentellen Bedingungen auf die Stoma-Antworten

Anhand der ABA-insensitiven Funktionsgewinn-Mutanten *abi1-1* sowie *abi2-1* wurde in früheren Studien gezeigt, dass Komponenten des ABA-Signalwegs für den Jasmonatsignalweg in Schließzellen benötigt werden (Munemasa et al., 2007; Islam et al., 2010). Eine weitere kürzlich erschienene Veröffentlichung zeigte, dass ABA nicht nur auf Stomata selbst, sondern auch auf das umgebende Gewebe wirkt und so indirekt die Öffnungsweite beeinflusst (Pantin et al., 2013). Pantin und Kollegen merkten auch an, dass es einige Hinweise in der Literatur darauf gibt, dass intakte Blätter auf einige Stimuli mit einer höheren Sensitivität reagieren als isolierte Epidermisstreifen.

Deshalb wurde überprüft, ob Stomata der Mutanten *abi1-1* und *abi2-1* unterschiedlich reagieren, wenn man ihre Öffnungsweiten in Epidermisstreifen oder ganzen Blättern untersucht (Abb. 3.10). Stomata an ganzen Blättern waren unter Kontrollbedingungen sowohl bei *abi1-1* als auch bei *abi2-1* weit geöffnet ( $0,54 \pm 0,04$  bzw.  $0,54 \pm 0,01$ ; Abb. 3.10A) und reagierten nur schwach auf ABA ( $0,38 \pm 0,01$  bzw.  $0,39 \pm 0,01$ ). Während *abi1-1* ( $0,40 \pm 0,01$ ) eine ähnlich verminderte Reaktion auf MeJA zeigte, führte die Behandlung mit MeJA bei *abi2-1* zu nahezu keiner Verringerung der Stomaweite ( $0,51 \pm 0,01$ ). Wurden die Stomata allerdings an Epidermisstreifen untersucht (Abb. 3.10B), schlossen sie bei *abi1-1* nach Inkubation mit ABA nicht und mit MeJA etwas besser als in intakten Blättern (Kontrolle:  $0,50 \pm 0,03$ ; ABA:  $0,54 \pm 0,03$ ; MeJA:  $0,33 \pm 0,02$ ). Dagegen verhielt sich *abi2-2* in Epidermisstreifen ähnlich wie in intakten Blättern. Auch hier führte ABA nur zu einer geringen Reduktion der Stomaweite ( $0,46 \pm 0,01$ ), wohingegen Stomata, die mit MeJA behandelt wurden, ähnlich weit geöffnet waren wie bei der Kontrolle ( $0,56 \pm 0,02$  bzw.  $0,60 \pm 0,02$ ).



**Abb. 3.10.** Verschiedene Experimentbedingungen können unterschiedliche Ergebnisse liefern.

Unterschiedliche Antworten von Schließzellen in ganzen Blättern (A) und Epidermisstreifen (B) von *abi1-1* und *abi2-1*. *Abi1-1* ist in Epidermisstreifen ABA-insensitiv, allerdings nicht in intakten Blättern, wohingegen *abi2-1* in beiden Experimenten ähnlich reagiert. Stomaweiten wurden jeweils nach einer Stunde Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  ABA, 10  $\mu\text{M}$  MeJA oder Kontrolle gemessen. A) Mindestens 80 Stomata ( $\pm$  Standardfehler) wurden in zwei oder mehr unabhängigen Experimenten gemessen. B), Porenöffnungen wurden in einem Experiment untersucht ( $n \geq 29$ ,  $\pm$  Standardfehler). Balken stellen Mittelwerte aus zwei oder mehr unabhängigen Experimenten dar. Angegeben ist das Stomaweitenverhältnis (Weite/ Länge).

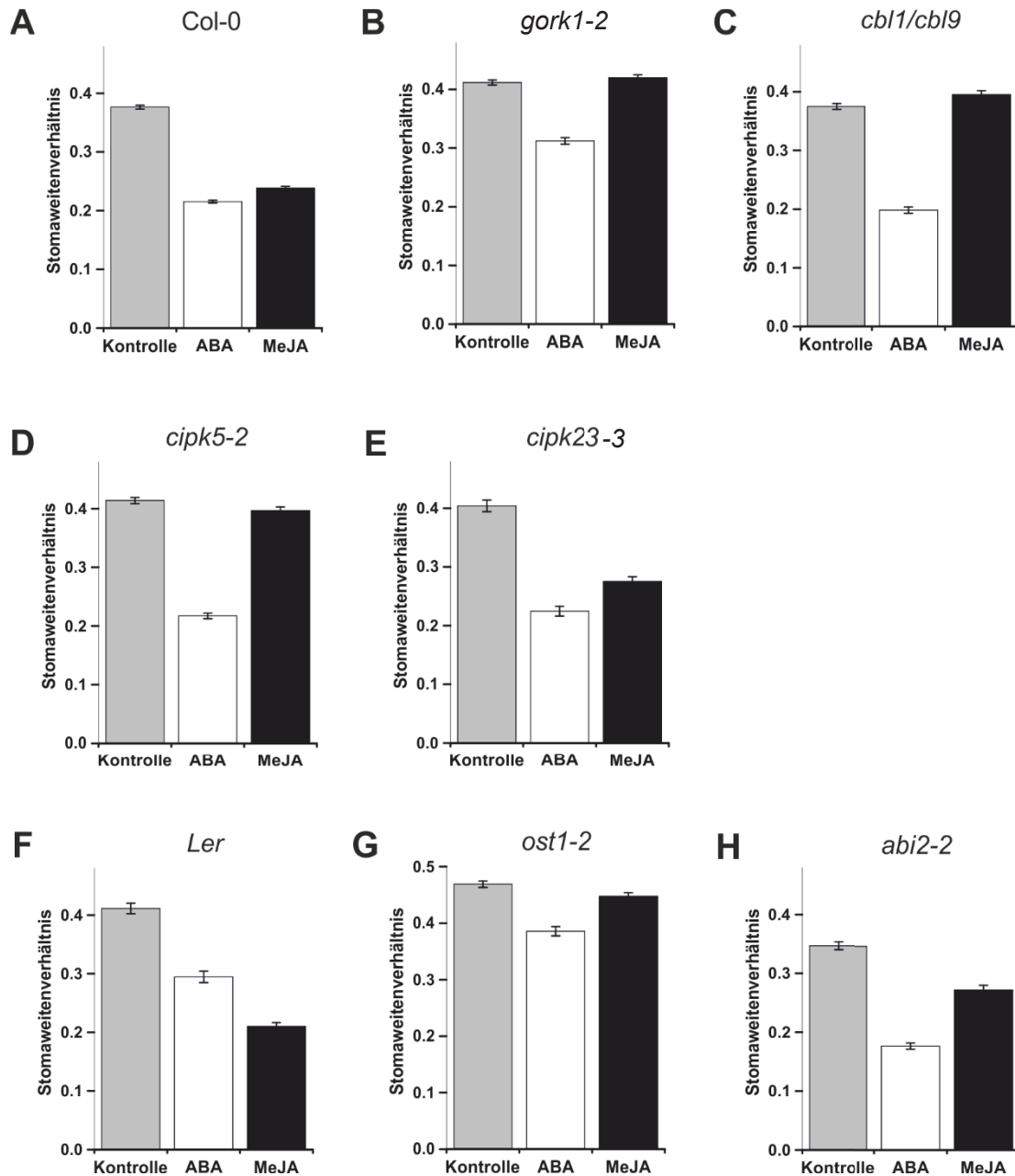
Ob Stomaweiten an intakten Blättern oder in Epidermisstreifen gemessen wurden, kann demnach deutliche Auswirkungen auf die Ergebnisse haben. So reagierten die Stomata der als ABA-insensitiv charakterisierte Punktmutante *abi1-1* in intakten Blättern sehr wohl auf ABA, nicht aber in Epidermisstreifen. Die zweite getestete Mutante, *abi2-1*, reagierte ähnlich wie *abi1-1*, wobei sie in Epidermisstreifen zumindest noch eine schwache Reaktion auf ABA aufwies. Damit konnten auch die Ergebnisse einer anderen Studie (Pantin et al., 2013) bestätigt werden, laut der ABA nicht nur auf die Schließzellen selbst, sondern auch durch das umgebende Gewebe indirekt einen Stomaschluss einleiten.

### 3.2.4 Verlustmutanten der Signalwegskomponenten sind MeJA-insensitiv

Als nächstes wurde die Reaktion von Schließzellen in Verlustmutanten der Gene, die in *Xenopus* Oozyten an der GORK Regulation beteiligt sind (s. Abschn. 3.1), untersucht. Eine frühere Studie ergab, dass die Mutante *ost1-2* nicht mehr mit einem Schließen der Stomata auf ABA, aber noch vermindert auf MeJA reagierte (Suhita et al., 2004). Eine Verlustmutante von GORK wurde ebenfalls bereits untersucht: Schließzellen von *gork1-1* waren sensitiv auf ABA, aber insensitiv auf MeJA (Suhita et al., 2004). Die Mutante *abi2-2* reagierte wie der Wildtyp auf ABA, die Reaktion dieser Mutante auf MeJA wurde jedoch noch nicht beschrieben (Rubio et al., 2009).

Daher wurde im folgenden Experiment der Stomaschluss in den Verlustmutanten *gork1-2*, *cbl1/cbl9*, *cipk5-2*, *cipk23-3*, *ost1-2* und *abi2-2* sowie die korrespondierenden Wildtypen Col-0 (Abb. 3.11A) und Ler (Abb. 3.11F) untersucht. Für *gork1-2* (Abb. 3.11B) konnten die bereits publizierten Ergebnisse bestätigt werden (Suhita et al., 2004). Während MeJA keinen Stomaschluss mehr auslöste (Kontrolle:  $0,41 \pm 0,01$ ; MeJA:  $0,42 \pm 0,01$ ), führte ABA nur zu einer partiellen Verringerung der Stomaweite ( $0,31 \pm 0,01$ ). Sowohl *cbl1/cbl9* (Abb. 3.11C) als auch *cipk5-2* (Abb. 3.11D) reagierten wildtypähnlich auf die Kontroll- und die ABA-Behandlung ( $0,37 \pm 0,01$  und  $0,41 \pm 0,01$ ; ABA:  $0,20 \pm 0,01$  und  $0,22 \pm 0,01$ ), aber nicht mehr auf MeJA ( $0,40 \pm 0,01$  und  $0,40 \pm 0,01$ ). Für *cipk23-3* (Abb. 3.11E) dagegen konnte kein eindeutiger Stomaschluss-Phänotyp festgestellt werden. Die Schließzellen dieser Mutante verhielten sich unter Kontroll- und ABA-Gabe wie Wildtyp-Zellen (Kontrolle:  $0,40 \pm 0,01$ ; ABA:  $0,22 \pm 0,01$ ), bei MeJA zeigten sie nur einen geringen Unterschied gegenüber der Wildtyp-Reaktion ( $0,28 \pm 0,01$ ). Dagegen war *ost1-2* (Abb. 3.11G) sowohl ABA- als auch MeJA-insensitiv ( $0,39 \pm 0,01$  bzw.  $0,45 \pm 0,01$ ). Die ABA-hypersensitive Mutante *abi2-2* (Abb. 3.11H), welche schon unter Kontrollbedingungen weniger weit geöffnete Poren besaß als der korrespondierende Wildtyp (*abi2-2*:  $0,35 \pm 0,01$ ; Ler:  $0,41 \pm 0,01$ ), reagierte stark auf ABA ( $0,18 \pm 0,01$ ) und deutlich schwächer auf MeJA ( $0,28 \pm 0,01$ ). Somit ist für alle getesteten Mutanten mit Ausnahme von *ost1-2* festzuhalten, dass sie auf ABA reagierten, wenn auch im Falle von *gork1-2* etwas schwächer als der Wildtyp (Abb. 3.11A). *Gork-2*, *cipk5-2*, *cbl1/cbl9* und auch *ost1-2* erschienen MeJA insensitiv, während Poren von *abi2-2* nur teilweise schlossen. Dagegen verhielten sich die Stomata von *cipk23-3* weitgehend wie die der Wildtyp-Pflanzen.



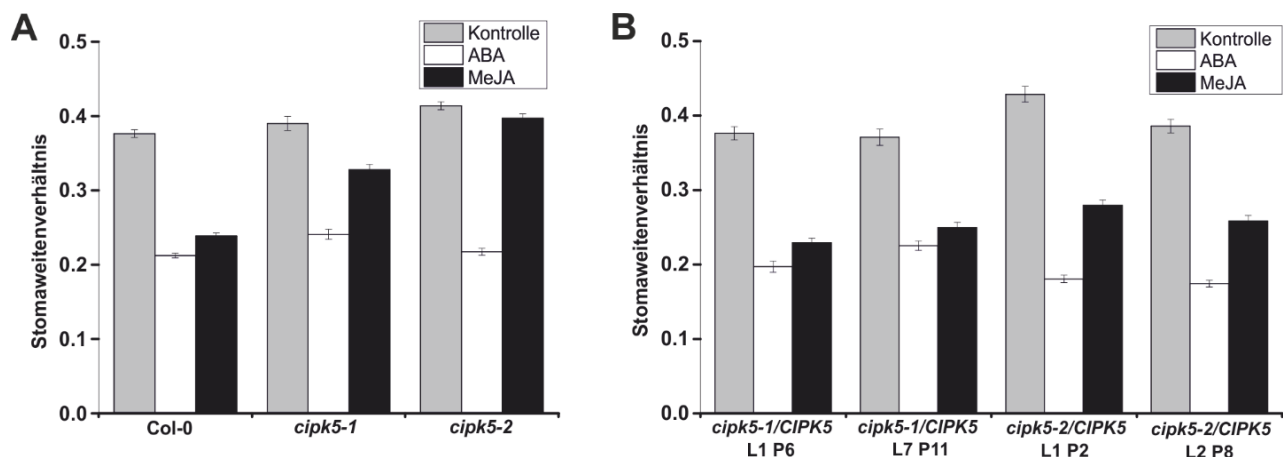


**Abb. 3.11. Viele Verlustmutanten des GORK-Signalknotens sind MeJA-insensitiv.**

Die Poren von *gork-2*, *cb1/cbl9*, *cipk5-2* und *ost1-2* schließen nicht auf MeJA, aber mit Ausnahme von *ost1-2* bei ABA-Behandlung. Der Stomaschluss von *abi2-2* auf MeJA ist verringert gegenüber dem Wildtyp (*Ler*). Die Stomaöffnungsweiten von vorgeöffneten Schließzellen aus ganzen Blättern wurden nach einstündiger Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  ABA, 10  $\mu\text{M}$  MeJA oder einer Kontrollbehandlung gemessen. Gemessen wurden mindestens 80 Poren ( $\pm$  Standardfehler) an vier Blättern von A) Col-0, B) *gork-2*, C) *cb1/cbl9*, D) *cipk5-2*, E) *cipk23-3* F) *Ler*, G) *ost1-2* und H) *abi2-2*. Balken stellen Mittelwerte aus zwei oder mehr unabhängigen Experimenten dar. Das Stomaweitenverhältnis wurde als Ratio aus Weite durch Länge bestimmt. B, C und G wurden von Eva Kopic gemessen, und D und H gemeinsam mit Eva Kopic (Bachelor Thesis, Botanik I, Universität Würzburg).

Zur Überprüfung, ob in der *cipk5-2*-Mutante tatsächlich der Verlust von CIPK5 für die MeJA-Insensitivität verantwortlich ist, wurden die Stomata von Komplementationslinien analysiert, in denen CIPK5 mit seinem Promoter in *cipk5-1* und *cipk5-2* stabil transformiert worden war. Die Verlustmutante *cipk5-1* reagierte, im Gegensatz zur Mutante *cipk5-2*, noch mit einem partiellen Schließen der Stomata auf die Inkubation mit MeJA (*cipk5-1*:  $0,33 \pm 0,01$ ; *cipk5-2*:  $0,40 \pm 0,01$ ; Abb. 3.12A). Bei Inkubation mit ABA schlossen die Poren beider Linien (*cipk5-1*:  $0,24 \pm 0,01$ ; *cipk5-2*:  $0,22 \pm 0,01$ ). In den getesteten Komplementationslinien wurde der MeJA-insensitive Phänotyp durch die Expression von CIPK5 aufgehoben oder zumindest stark abgeschwächt (Abb. 3.12B). Sowohl *cipk5-1/CIPK5* L1P6 als auch L7P11 schlossen auf MeJA ( $0,23 \pm 0,01$  bzw.  $0,25 \pm 0,01$ ). Die Stomata der *cipk5-2/CIPK5* Linien, L1P2 und L2P8, zeigten eine stärkere Reaktion auf MeJA als *cipk5-2* und reagierten mit einem partiellen Schluss ( $0,28 \pm 0,01$  bzw.  $0,26 \pm 0,01$ ).

Da die MeJA-Insensitivität der *cipk5*-Mutanten durch Komplementation mit CIPK5 entweder komplett oder partiell aufgehoben werden konnte, schien in der Tat der Verlust des CIPK5-Gens für den Phänotyp verantwortlich zu sein.



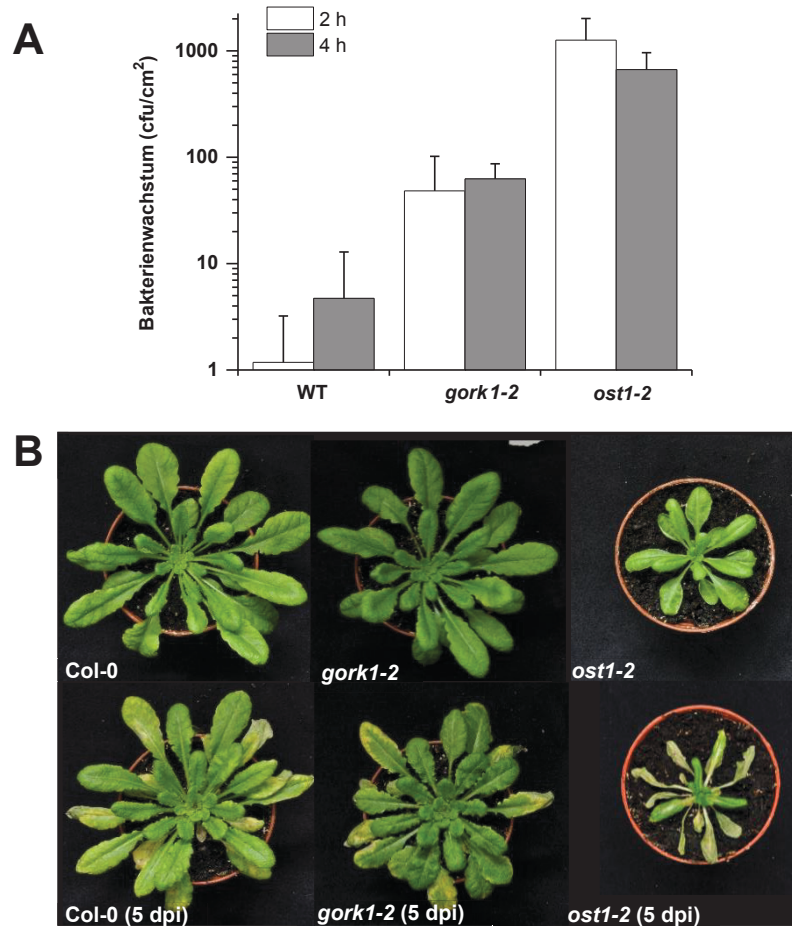
**Abb. 3.12. Komplementation von *cipk5*-Mutanten stellt die MeJA-Sensitivität wieder her.**

Die Stomaöffnungsweiten von vorgeöffneten Schließzellen aus ganzen Blättern wurden nach einstündiger Inkubation mit 20  $\mu$ M ABA, 10  $\mu$ M MeJA oder einer Kontrollbehandlung gemessen. A) Verlustmutanten *cipk5-1* und *cipk5-2* im Vergleich zu Col-0. B) Diese Mutanten wurden mit CIPK5 komplementiert und Stomata von jeweils zwei Linien davon wurden gemessen. Mindestens 80 Poren ( $\pm$  Standardfehler) an vier Blättern wurden untersucht. Angegeben ist das Stomaweitenverhältnis als Ratio aus Weite durch Länge. A) wurde gemeinsam mit Eva Kopic (Bachelor Thesis, Botanik I, Universität Würzburg) gemessen.

### 3.2.5 Die Rolle von GORK in der stomatären Verteidigung

Anhand der vorausgegangenen Experimente konnte gezeigt werden, dass der Kaliumkanal GORK durch ein antagonistisch wirkendes Phosphatase/Kinase-Paar  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig reguliert wird (Abschn. 3.1.3), und ein Verlust dieser Regulation wirkt sich negativ auf die Fähigkeit der Schließzellen aus, auf ein Jasmonatsignal hin zu schließen (Abschn. 3.2.4). Das Verschließen der Pore ist nicht nur ein wichtiger Aspekt im pflanzlichen Wasserhaushalt, sondern darüber hinaus auch ein wichtiger Abwehrmechanismus gegen Pathogene (Sawinski et al., 2013). Pseudomonaden setzen ein molekulares Mimikry zu JA-Ile, Coronatin, ein, um das pflanzliche Immunsystem zu schwächen. Coronatin bindet an den Rezeptor COI1 und führt auf einem noch unbekanntem Signalweg einem „Wiederöffnen“ der Stomata, welche zuvor im Zuge der PAMP-Erkennung (siehe flg22, Abb. 3.9A) geschlossen wurden (Melotto et al., 2006; Yan et al., 2009). Da die *gork*- Verlustmutante nicht auf MeJA reagierte (Abb. 3.11B), lag es nahe, ihre Reaktion auf eine Infektion mit *Pseudomonas* zu überprüfen. Anders als in anderen Infektionsstudien (Katagiri et al., 2002), in denen das Wachstum der Bakterienpopulation nach mehreren Tagen betrachtet wurde, wurde im folgenden Experiment besonderer Wert auf frühe Zeitpunkte direkt nach der Sprühbehandlung gelegt, da der Kaliumkanal vermutlich an der Verhinderung einer Infektion durch einen Schluss der Poren beteiligt ist. Neben *gork-2* und dem korrespondierenden Wildtyp (Col-0) wurde auch *ost1-2* (*Ler*) mit ihrem „offenen Stomaphänotyp“ als Kontrolle getestet.

Bereits zwei Stunden nach der Inokulation hatten die Bakterien unterschiedliche Invasionserfolge in den verschiedenen Ökotypen/Mutanten (Abb. 3.13A). Die Anzahl an koloniebildenden Bakterien lag sowohl bei *gork-2* als auch bei *ost1-2* bereits nach zwei Stunden deutlich über Col-0. Während jedoch bei Col-0 die Bakterienanzahl im Blattgewebe nach vier Stunden gestiegen war, blieb sie bei *gork-2* und *ost1-2* etwa auf dem gleichen Niveau. Nach vier Stunden stieg die Bakterienzahl in beiden Mutanten leicht an. Nach einem Tag näherten sich die Wachstumsraten der Kolonien von *gork-2* und Col-0 an und lagen beide bereits deutlich über den vorherigen Werten. Einen Tag später verhielten sie sich ähnlich und wiesen eine ähnlich starke Zunahme an Bakterien auf. Bei *ost1-2* dagegen wurde bereits nach zwei und vier Stunden eine deutlich höhere Zahl an Kolonien gemessen. Am fünften Tag nach der Infektion hatten sowohl *gork-2* als auch Col-0 leichte, aber dennoch deutliche Symptome.



**Abb. 3.13. Verlust von GORK erhöht den Infektionserfolg von Pst DC3000.**

A), Vergleich des Bakterienwachstums (cfu/cm<sup>2</sup>) nach zwei und vier Stunden. Bereits nach zwei Stunden befindet sich eine deutlich höhere Anzahl von Bakterien in sowohl *gork-2* als auch in *ost1-2*, die nach weiteren zwei Stunden noch nicht weiter angestiegen ist. B), Nach fünf Tagen zeigt *ost1-2* deutliche Krankheitssymptome, wohingegen *gork-2* und Col-0 nur wenig beschädigt sind. Repräsentative Bilder von Kontroll- (links) und infizierten Pflanzen. Von oben nach unten: Col-0, *gork1-2*, *ost1-2*. Auf steriler Erde angezogene Pflanzen Wildtyp (Col-0), *gork-2* und *ost1-2* (*Ler*) wurden mit  $1 \times 10^8$  cfu/ml *Pseudomonas*-Bakterien besprüht. Die in den Blättern vorhandenen kolonieformenden Einheiten (cfu) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten auf KB-Agarplatten überführt und gezählt (n=3,  $\pm$  Standardabweichung). Die gezeigten Abbildungen stellen die repräsentativen Ergebnisse aus einem von drei unabhängigen Messungen dar.

*Ost1-2* dagegen zeigte an allen älteren Blättern schwere Nekrosen (Abb. 3.13C). Zwischen *gork1-2* und Col-0 gibt es keine deutlichen Unterschiede. An beiden Pflanzen treten einige gelbe chlorotische Verfärbungen bis hin zu wenigen Stellen mit nekrotischem Gewebe auf. Während sowohl *gork1-2* als auch Col-0 neben den geschädigten Gewebestellen noch viele gesunde Blätter besitzen, sind bei *ost1-2* nur noch wenige gesunde junge Blätter in der Mitte

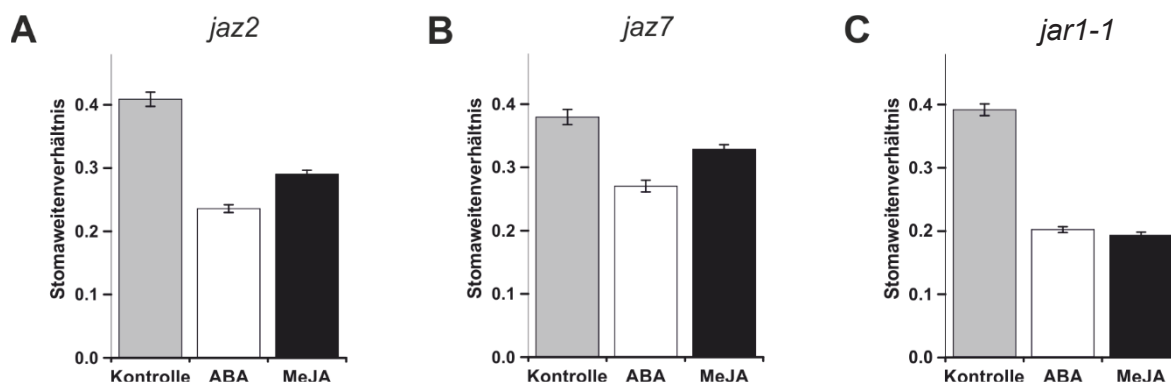
der Rosette vorhanden. Abschließend lässt sich also festhalten, dass *gork1-2* gegenüber dem Wildtyp auf längere Sicht gesehen keinen Phänotyp besitzt, obwohl *P. syringae* Pst DC3000 zunächst leichter die Blätter von *gork* zu besiedeln scheint als bei Col-0. Die Mutante *ost1-2* weist dagegen einen schweren Immunitätsphänotyp auf, der auch schon in einer anderen Studie beobachtet wurde (Melotto et al., 2006). Auch diese Mutante ist bereits nach wenigen Stunden stark mit Bakterien besiedelt, doch anders als *gork1-2* scheint sie sich danach nicht gegen die Pathogene wehren zu können und ist nach mehreren Tagen stark geschädigt. Die Beobachtung, dass *gork1-2* trotz stärkerer anfänglicher Besiedelung als Col-0 danach keinen Phänotyp aufweist, deutet darauf hin, dass GORK bzw. dessen Regulation möglicherweise eine Rolle bei der stomatären Abwehr von Pathogenen spielt, aber nicht in der späteren Immunität.

### 3.3 Crosstalk zwischen MeJA, ABA und Coronatin in der Stomaregulation

Aus den vorangegangenen Versuchen (Abschn. 3.2.4) sowie bereits veröffentlichten Studien wurde deutlich, dass es gemeinsame Komponenten des ABA- und Jasmonat (JA)-ausgelösten Stomaschluss-Signalwegs geben muss (Hossain et al., 2011; Munemasa et al., 2011b). In Abschn. 3.2.2 wurde gezeigt, dass sowohl MeJA und das Phytotoxin Coronatin zunächst das Schließen der Stomata auslösten, der Effekt von Coronatin jedoch nur vorübergehend war und die Poren nach einigen Stunden wieder öffneten (Abb. 3.10B). Dadurch ermöglicht Coronatin *Pseudomonas spec.*, die Poren als Eintrittspforten zur Invasion des Blattgewebes zu verwenden. Daher wurden zunächst weitere, bereits bekannte Verlustmutanten mittels Stomaassays gemessen, die nachweislich in den jeweiligen Signalwegen involviert sind. Da mit Coronatin behandelte Zellen anders reagierten als MeJA-behandelte Stomata, wurde dies in den folgenden Experimenten näher untersucht.

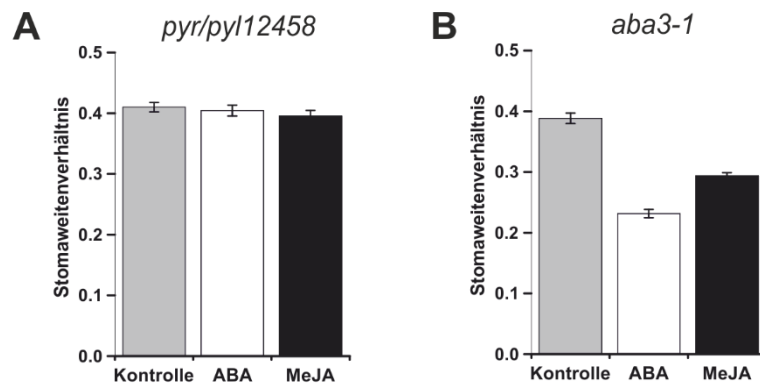
### 3.3.1 Perzeption und Synthese von ABA und Jasmonaten

JAZ-Proteine sind Repressoren im JA-Signalweg, während JAR1 den letzten Schritt in der JA-Ile-Synthese, die Konjugation von JA-Ile, katalysiert (Staswick und Tiryaki, 2004; Yan et al., 2009). Sowohl *jar1-1* als auch *coi1*-Verlustmutanten wurden bereits in Studien getestet und als notwendig für den Jasmonat-induzierten Stomaschluss beschrieben (Suhita et al., 2004; Munemasa et al., 2007; Montillet et al., 2013). Zur Überprüfung der Bedeutung der Jasmonat-Signalkette im JA- und ABA-vermittelten Stomaschluss wurden die Schließzell-Öffnungsweiten der Mutanten *jaz2*, *jaz7* und *jar1-1* gemessen (Abb. 3.14). Wenn Schließzellen von *jaz2* mit ABA oder MeJA inkubiert wurden, reagierten diese ähnlich wie Wildtypzellen (Abb. 3.9C) mit einem Schließen der Stomata (ABA:  $0,24 \pm 0,01$  bzw. MeJA:  $0,29 \pm 0,01$ ; Abb. 3.14A). *Jaz7* (Abb. 3.14B) dagegen reagierte etwas schwächer sowohl auf ABA ( $0,27 \pm 0,01$ ) als auch auf MeJA ( $0,33 \pm 0,01$ ). Anders als in der Literatur beschrieben (Suhita et al., 2004), schloss *jar1-1* (Abb. 3.14C) nach Behandlung mit MeJA wie mit ABA (MeJA:  $0,19 \pm 0,01$  bzw. ABA:  $0,20 \pm 0,01$ ). Während *jaz7* also einen verminderten Stomaschluss auf ABA und MeJA aufwies, waren keine Besonderheiten für *jaz2* und *jar1-1* festzustellen.



**Abb. 3.14.** Frühe Komponenten des Jasmonatsignalwegs sowie der -Synthese reagieren auf MeJA.

Verlustmutanten im Jasmonatsignalweg und der -synthese zeigen keinen eindeutigen Phänotyp auf MeJA-Gabe. Die Stomaöffnungsweiten von vorgeöffneten Schließzellen aus ganzen Blättern wurden nach einstündiger Inkubation mit 20  $\mu$ M ABA, 10  $\mu$ M MeJA oder einer Kontrollbehandlung gemessen. Gemessen wurden mindestens 80 Poren ( $\pm$  Standardfehler) an vier Blättern von *jaz2* (A), *jaz7* (B) und *jar1-1* (C). Balken stellen Mittelwerte aus zwei oder mehr unabhängigen Experimenten dar. Das Stomaweitenverhältnis wurde als Ratio aus Weite durch Länge bestimmt.



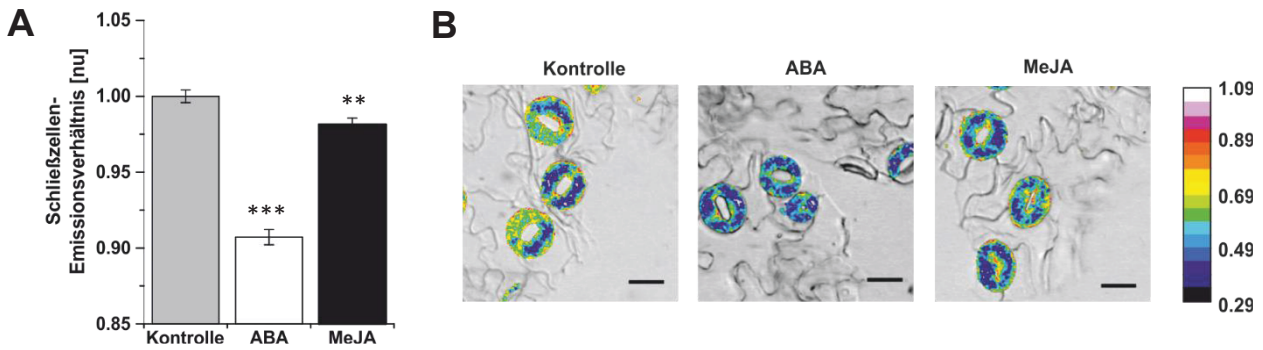
**Abb. 3.15. Perzeption, aber nicht die Synthese von ABA wird für den MeJA-induzierten Stomaschluss benötigt.**

Die ABA-Rezeptormutante *pyr/pyl12458* (A), aber nicht die ABA-Synthesemutante *aba3-1* (B) ist MeJA- und ABA-insensitiv. Die Stomaöffnungsweiten von vorgeöffneten Schließzellen aus ganzen Blättern wurden nach einstündiger Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  ( $\pm$ )- ABA, 10  $\mu\text{M}$  MeJA oder einer Kontrollbehandlung gemessen. Gemessen wurden mindestens 80 Poren ( $\pm$  Standardfehler) an vier Blättern. Balken stellen Mittelwerte aus zwei oder mehr unabhängigen Experimenten dar. Das Stomataweitenverhältnis wurde als Ratio aus Weite durch Länge bestimmt.

Auch Komponenten des ABA-Signalwegs und der -Synthese wurden untersucht (Abb. 3.15). Die Pentapetil-Rezeptor-Mutante *pyr/pyl12458* reagiert bei vielen durch ABA vermittelten Prozessen schlecht oder gar nicht (Gonzalez-Guzman et al., 2012). Dementsprechend schlossen die Schließzellen von *pyr/pyl12458* (Abb. 3.15A) weder auf eine Behandlung mit ABA noch auf MeJA ( $0,40 \pm 0,01$  bzw.  $0,40 \pm 0,01$ ; Kontrolle:  $0,41 \pm 0,01$ ). Die Mutante *aba3-1* (Abb. 3.15B) ist in der ABA-Synthese gestört und besitzt nur basale ABA-Level, die sie unter Stressbedingungen nicht erhöhen kann (Xiong et al., 2001). Sie reagierte normal auf ABA, aber etwas schwächer auch auf MeJA ( $0,23 \pm 0,01$  bzw.  $0,29 \pm 0,01$ ; Kontrolle:  $0,39 \pm 0,01$ ). Andere Publikationen konnten jedoch zeigen, dass die *de novo*-Synthese von ABA für den MeJA-induzierten Stomaschluss benötigt wird (Munemasa et al., 2011b; Ye et al., 2013). Da die Mutante *aba3-1* noch ein gewisses Grundniveau an ABA besitzt, könnte dies bereits ausreichen, um den Stomaschluss durch JA zu vermitteln. Daher wurde der Anstieg der ABA-Konzentration nach MeJA-Behandlung mit Hilfe des ABA-Biosensors ABALeon untersucht (Waadt et al., 2014). Die Messungen wurden gemeinsam mit Dr. Rainer Waadt (Centre for Organismal Studies, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) durchgeführt.

Die Fluoreszenz-Intensitäten von Stomata von ABALeon2.1-exprimierenden Pflanzen wurden analog zu den Bedingungen in Stoma-Assays nach MeJA- oder ABA-Gabe gemessen (Abb. 3.16). Während das dem Medium zugefügte ABA direkt an den Biosensor binden und dadurch





**Abb. 3.16. MeJA führt nur zu einer geringen ABA-Synthese.**

A) Durch MeJA wird in geringem Maße die Synthese von ABA stimuliert. Änderungen der ABA-Konzentration nach Behandlung mit 0,1% Methanol (Kontrolle), 10  $\mu$ M (+)-ABA oder 10  $\mu$ M MeJA wurden mittels des ABA-Biosensors ABAleon visualisiert. Ein Anstieg der ABA-Konzentration wird durch eine Abnahme des Emissionsverhältnisses wiedergegeben. Zugegebenes ABA band direkt an den Biosensor, wohingegen Zugabe von MeJA nur zu einem geringen Anstieg des ABA-Gehalts führte. Balken stellen normalisierte Mittelwerte ( $n \geq 214$ ,  $\pm$  Standardfehler) dar. Sterne bilden das Signifikanzniveau b (Mann-Whitney U-Test). B) repräsentative Bilder von Schließzellen in Falschfarben unter Kontrollbedingungen oder nach ABA- oder MeJA-Behandlung. Die Farbskala spiegelt die FRET-Emission wider; je höher der Blauanteil, desto mehr ABA ist an den Rezeptor gebunden. Der schwarze Balken stellt eine Größenskala von 10  $\mu$ m dar.

eine Verschiebung des FRET-Signals auslösen konnte ( $90,7 \pm 0,01\%$  der Kontrolle), ist die Abnahme des Emissionsverhältnisses bei der Behandlung mit MeJA als eine Zunahme des intrazellulären ABA-Spiegels zu deuten ( $98,1 \pm 0,01\%$  der Kontrolle). Dieser Anstieg der ABA-Konzentration ist, im Vergleich zur Positivkontrolle (ABA-Zugabe;  $p < 0,001$ ) deutlich geringer, aber dennoch signifikant ( $p < 0,01$ ) gegenüber der Kontrolle. Somit scheint die ABA-Neusynthese keine entscheidende Rolle für den Jasmonat-vermittelten Stomaschluss zu spielen, obwohl der Verlust der ABA-Perzeption zu einer völligen Insensitivität der Schließzellen gegenüber MeJA führte.

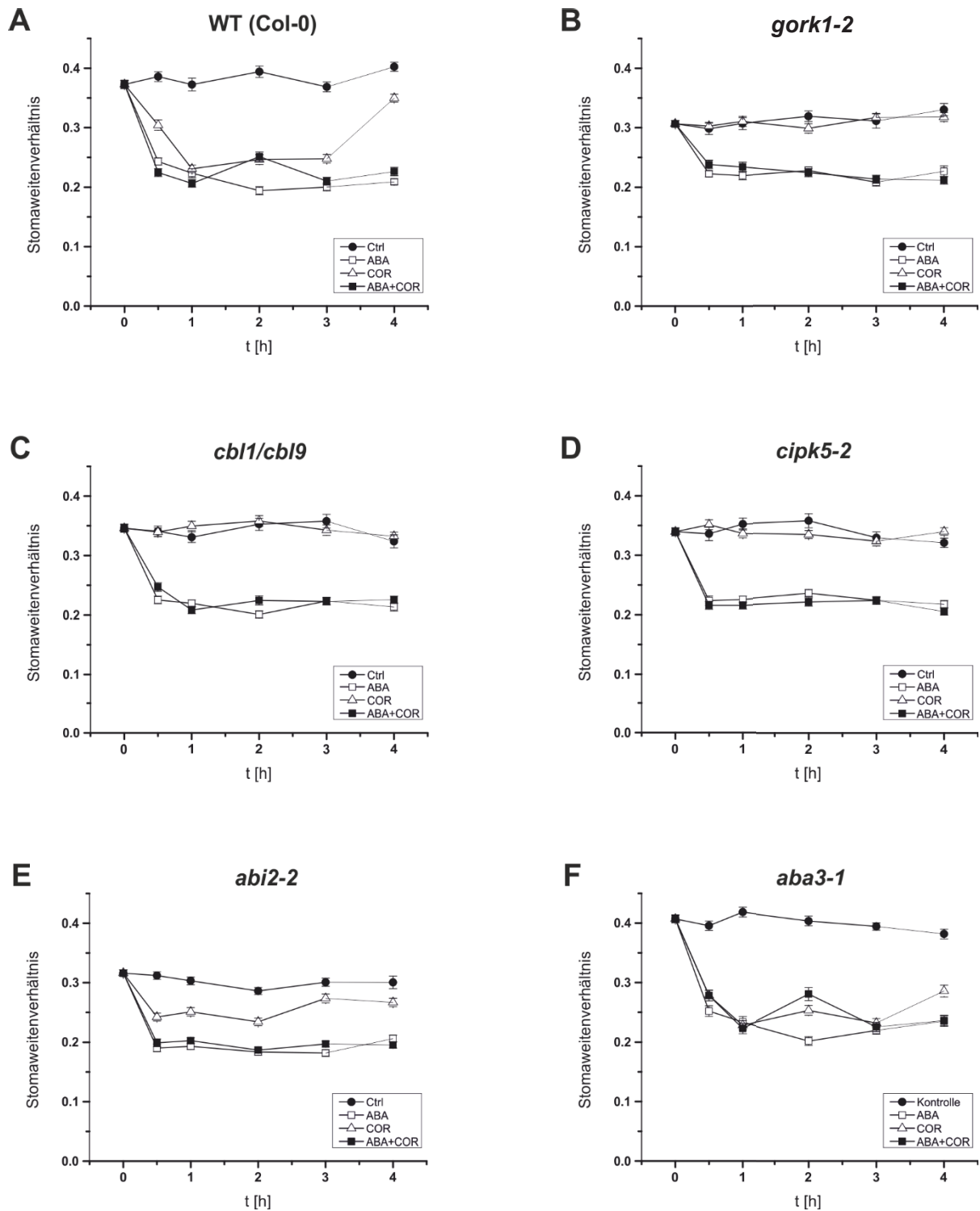


### 3.3.2 Einfluss von ABA auf die Kinetik der Stoma-Wiederöffnung durch Coronatin

Während Coronatin allein zu einer Wiederöffnung der Poren führte (Abschn. 3.2.2; Abb. 3.9B), soll eine halbstündige Vorinkubation mit dem Phytotoxin dazu führen, dass Schließzellen nicht mehr auf ABA reagieren (Melotto et al., 2006). In dem folgenden Versuch sollte zunächst bestimmt werden, ob ABA die Öffnung durch Coronatin bei gleichzeitiger Inkubation verhindern kann, und schließlich, ob eine längere Inkubationszeit einen anderen Effekt, wie beispielsweise einen verzögerten Stomaschluss, auf die in Abschn. 3.5.2 beschriebenen Mutanten des GORK-Signalknotens (Abb. 3.11) sowie auf die ABA-Synthese (Abschn. 3.3.1; Abb. 3.15B) hat. Daher wurden die Stomata der Mutanten *gork-2*, *cipk5-2*, *abi2-2*, *cbl1/cbl9* sowie *aba3-1* analog zu Wildtyp-Pflanzen behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen.

Wie bereits in Abschn. 3.2.2 beschrieben, führte ABA bereits nach 30 min zu einem dauerhaften Verschluss der Pore, wohingegen das Schließen durch Coronatin nur temporär war, sodass die Stomata nach vier Stunden wieder geöffnet waren. Die Inkubation mit Coronatin/ABA (Abb. 3.17A) führte hingegen zu einem dauerhaftem Schluss: zwar blieben die Zellen auch nach vier Stunden noch geschlossen ( $0,23 \pm 0,01$ ; geschlossene Quadrate), jedoch wiesen sie einen kleinen Anstieg nach zwei Stunden auf ( $0,25 \pm 0,01$ ), zu einem Zeitpunkt, an dem ABA allein den niedrigsten Wert ( $0,19 \pm 0,01$ ) der Serie erreicht hatte. Somit verhielten sich Schließzellen bei anhaltender Behandlung mit ABA, Coronatin oder beidem gleichzeitig unterschiedlich. Bei gleichzeitiger Behandlung mit beiden Stimuli dominierte die ABA-Wirkung über den Coronatin-Effekt.

Als Nächstes wurden die in Abschn. 3.2.4 identifizierten Komponenten des GORK-Regulationskomplexes sowie die ABA-Synthese-Mutante *aba3-1* (Abschn. 3.3.1) auf die gleiche Weise untersucht. Bei Untersuchung von Stomata der *gork-2*-Verlustmutante (Abb. 3.17B) zeigte sich, dass Coronatinbehandelte Poren über den gesamten Messzeitraum nicht mit einem Stomaschluss reagierten ( $0,30 \pm 0,01 - 0,32 \pm 0,01$ ; offene Dreiecke). Bei Inkubation der Zellen mit ABA sowie Coronatin/ABA schlossen diese innerhalb von 30 Minuten und behielten dieses Verhalten über den Messzeitraum aufrecht ( $0,21 \pm 0,01 - 0,23 \pm 0,01$ ; offene bzw.  $0,21 \pm 0,01 - 0,24 \pm 0,01$ ; geschlossene Quadrate).



**Abb. 3.17:** Die Stoma-Öffnungskinetik von Coronatin kann durch ABA unterdrückt werden.

In Wildtypschließzellen verhinderte ABA die Öffnung durch Coronatin bei gleichzeitiger Gabe. Die Stomaöffnungsweiten von vorgeöffneten Schließzellen aus ganzen Blättern wurden nach Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  ABA, und/oder 10  $\mu\text{M}$  Coronatin oder einer Kontrollbehandlung gemessen. Gemessen wurden mindestens 80 Poren ( $\pm$  Standardfehler) an vier Blättern von (A) WT (Col-0), (B) *gork-2*, (C) *cb11/cbl9*, (D) *cipk5-2*, (E) *abi2-2* und (F) *aba3-1*. Balken stellen Mittelwerte aus zwei oder mehr unabhängigen Experimenten dar. Das Stomaweitenverhältnis wurde als Ratio aus Weite durch Länge bestimmt.

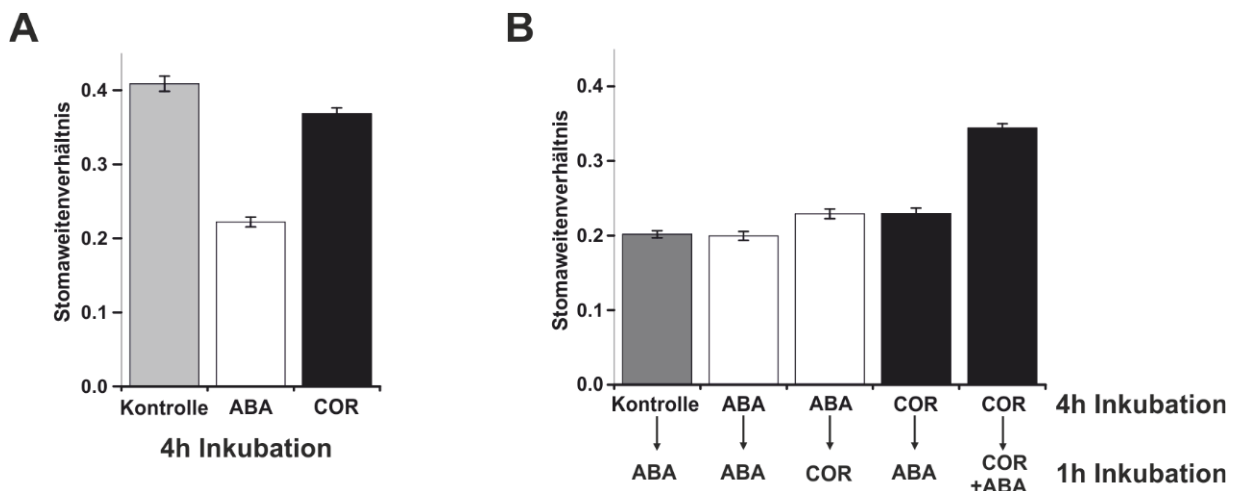
Für die beiden Mutanten *cbl1/cbl9* und *cipk5-2* zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 3.17C und D). Beide Mutanten reagierten über den Messzeitraum nicht mehr auf Coronatin ( $0,33 \pm 0,01$  -  $0,36 \pm 0,01$ ;  $0,32 \pm 0,01$  -  $0,35 \pm 0,01$ ; offene Dreiecke), schlossen aber auf ABA ( $0,20 \pm 0,01$  -  $0,23 \pm 0,01$ ;  $0,22 \pm 0,01$  -  $0,24 \pm 0,01$ ; offene Quadrate) und Coronatin/ABA ( $0,21 \pm 0,01$  -  $0,25 \pm 0,01$ ;  $0,20 \pm 0,01$  -  $0,22 \pm 0,01$ ; geschlossene Quadrate). Die ABA-hypersensitive Mutante *abi2-2* (Abb. 3.17E) verhielt sich über einen längeren Zeitraum hinweg ähnlich wie in Abschn. 3.5.2 beschrieben (vgl. Abb. 3.11H). Coronatin führte nur zu einem schwachen Stomaschluss ( $0,24 \pm 0,01$  -  $0,27 \pm 0,01$ , offene Dreiecke). Bei Inkubation mit Coronatin/ ABA reagierten die Zellen wie bei alleiniger ABA-Gabe mit einem konstanten Stomaschluss ( $0,19 \pm 0,01$  -  $0,20 \pm 0,01$ ; offene Quadrate). Die ABA-Synthesemutante *aba3-1* besaß dagegen einen ähnlichen Phänotyp wie der Wildtyp (Abb. 3.17F). Auch hier waren ABA-behandelte Schließzellen durchgehend geschlossen ( $0,20 \pm 0,01$  -  $0,24 \pm 0,01$ ; geschlossene Quadrate), wohingegen Coronatin zu einem transienten Stomaschluss führte (1h-3h:  $0,23 \pm 0,01$  -  $0,25 \pm 0,01$ ; offene Dreiecke) und nach etwa vier Stunden die Poren leicht zu öffnen begann ( $0,29 \pm 0,01$ ). Coronatinbehandelte Zellen reagierten genauso schnell wie ABA-behandelte Zellen und wiesen kein verzögertes Schließverhalten auf (30 min:  $0,28 \pm 0,01$  bei COR bzw.  $0,25 \pm 0,01$  bei ABA). Bei Coronatin/ ABA-Inkubation blieben die Schließzellen geschlossen, zeigten jedoch ähnlich wie Wildtypzellen einen leichten Anstieg bei zwei Stunden ( $0,28 \pm 0,01$ , offene Quadrate), das auch für Coronatin allein in schwächerer Form zu beobachten war ( $0,25 \pm 0,01$ ). Diese Besonderheit im Schließverhalten nach zwei Stunden Inkubation konnte nur für Schließzellen von Wildtyp und *aba3-1* beobachtet werden. Dagegen führte die Coronatin-Behandlung von *abi2-2* bei zwei Stunden zu einem Minimum ( $0,23 \pm 0,01$ ), um dann eine Stunde später bereits seine maximale Öffnungsweite von  $0,27 \pm 0,01$  zu erreichen.

Abschließend lässt sich über diesen Versuch Folgendes zusammenfassen: Bei gleichzeitiger Behandlung mit ABA und Coronatin unterdrückt ABA die Coronatin-induzierte Öffnung der Poren. Die Mutanten *gork-2*, *cbl1/cbl9* und *cipk5-2* reagierten über die gesamte Messreihe nicht auf Coronatin. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel (3.2.4) beschrieben, besaß *abi2-2* auch über einen längeren Zeitpunkt hinweg einen völlig eigenen Phänotyp, bei dem Coronatin nur teilweise zum Stomaschluss führte. Mit *aba3-1* konnte gezeigt werden, dass dieses Verhalten unabhängig von einer *de novo*-Synthese von ABA war.

### 3.3.3 Transiente ABA-Insensitivität durch Coronatin

Die vorherigen Kapitel (3.3.1 und 3.3.2) konnten die in der Literatur beschriebene Hypothese, dass der Jasmonat-Signalweg teilweise über Komponenten der ABA-Signalkette wirkt, untermauern. Unklar ist jedoch, auf welche Weise der ABA Signalweg durch JA adressiert wird. Wie bereits in den Kapiteln 3.2.2 und 3.3.2 gezeigt, öffneten Schließzellen nach vierstündiger Inkubation mit Coronatin; wenn gleichzeitig mit Coronatin und ABA inkubiert wurde, überwog der ABA-Effekt und die Stomata blieben geschlossen. Ein gegensätzlicher Effekt wurde jedoch für eine halbstündige Vorinkubation mit Coronatin beschrieben, nach der die Zellen nicht mehr auf gleichzeitige Gabe von Coronatin und ABA mit einem Schließen der Poren reagierten (Melotto et al., 2006). Deshalb wurde nun untersucht, auf welche Weise Wildtyp-Schließzellen nach vier Stunden Vorinkubation auf eine weitere Behandlung reagierten.

Zunächst wurden abgeschnittene Blätter für vier Stunden mit ABA oder Coronatin vorbehandelt (Abb. 3.18A). ABA-behandelte Schließzellen reagierten mit einem Schluss der



**Abb. 3.18. Schließzellen sind nur in Anwesenheit von Coronatin ABA-insensitiv.**

A) Die Stomaöffnungsweiten von vorgeöffneten Schließzellen aus ganzen Blättern (Col-0) wurden nach vier Stunden Inkubation mit 20  $\mu$ M ABA, 10  $\mu$ M COR oder einer Kontrollbehandlung gemessen. B) für vier Stunden vorbehandelte Blätter wurden für eine weitere Stunde mit einem zusätzlichen Reiz inkubiert; die Legende über den Balken gibt die Stimuli der Vorinkubation an, während die Balkenbeschriftung den Inkubationszustand nach 5h beschreibt. Gemessen wurden mindestens 80 Poren ( $\pm$  Standardfehler) an vier Blättern. Balken stellen Mittelwerte aus zwei oder mehr unabhängigen Experimenten dar. Das Stomaweitenverhältnis wurde als Ratio aus Weite durch Länge bestimmt.

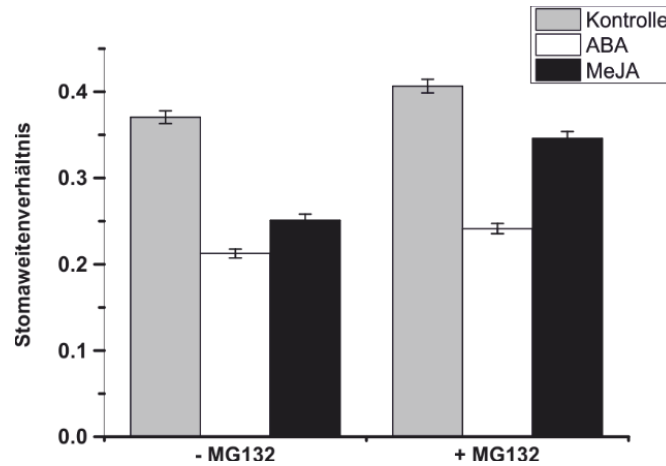
Pore ( $0,22 \pm 0,01$ ), wohingegen Coronatin-behandelte Poren wieder geöffnet waren ( $0,37 \pm 0,01$ ) und beinahe das Niveau der Kontrolle erreichten ( $0,41 \pm 0,01$ ). Wurden die Kontroll- und ABA-vorinkubierten Schließzellen nun für eine weitere Stunde mit ABA inkubiert, verhielten sie sich in beiden Ansätzen so, als wären sie erst frisch mit dem Phytohormon in Kontakt gekommen und schlossen die Pore, bzw. hielten sie weiterhin geschlossen (Abb. 3.18B, erster und zweiter Balken;  $0,20 \pm 0,01$  und  $0,20 \pm 0,01$ ). Auch nach Vorinkubation mit ABA schlossen die Stomata wieder, wenn sie anschließend für eine Stunde mit Coronatin behandelt wurden (dritter Balken;  $0,23 \pm 0,01$ ). Bei einem Wechsel von Coronatin- zu ABA-Inkubation reagierten die Schließzellen auf dieselbe Weise (vierter Balken;  $0,23 \pm 0,01$ ). Anders dagegen reagierten Schließzellen nach Coronatin-Vorinkubation auf eine gleichzeitige Behandlung mit Coronatin und ABA: sie blieben überwiegend geöffnet (fünfter Balken;  $0,34 \pm 0,01$ ).

Demnach hielt der inhibitorische Effekt von Coronatin auf den ABA-induzierten Stomaschluss nur solange an, wie Coronatin gegenwärtig war. Der zeitliche Ablauf der Behandlung (Vorinkubation oder gleichzeitige Applikation) war daher von maßgeblicher Bedeutung für die Reaktion der Pflanze/Schließzellen.

### 3.3.4 Der MeJA-vermittelte Stomaschluss involviert Proteindegradation

Der einzige bisher beschriebene Rezeptor für JA, COI1, ist eine Ubiquitinligase. Die Genexpression von jasmonatinduzierten Genen hängt davon ab, dass die JAZ-Repressoren durch COI1 ubiquitinyliert und abgebaut werden. Auch der ABA-induzierte Stomaschluss scheint Proteinabbau zu beinhalten, der allerdings die Ubiquitinligase COP1 benötigt (Khanna et al., 2014). Deshalb wurde im folgenden Experiment untersucht, ob ein Abbau von Proteinen nötig ist für ein MeJA-induziertes Schließen der Stomata. Hierfür wurden abgeschnittene Blätter für eine Stunde mit dem Proteaseinhibitor MG132 behandelt, bevor sie für eine weitere Stunde mit ABA oder MeJA inkubiert wurden.

Der Protease-Inhibitor führte unter Kontrollbedingungen zu weiter geöffneten Poren (ohne MG132:  $0,37 \pm 0,01$ ; mit MG132:  $0,41 \pm 0,01$ ; Abb. 3.19). Die Stomata schlossen trotz MG132



**Abb. 3.19. Inkubation mit dem Protease-Inhibitor MG132 beeinträchtigt den MeJA-vermittelten Stomaschluss.**

Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System wird für den jasmonatinduzierten Stomaschluss benötigt. Durch Licht vorgeöffnete Schließzellen an ganzen Blättern (Col-0) wurden für eine Stunde mit 50  $\mu\text{M}$  des Protease-Inhibitors MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) bzw. 0,1% DMSO behandelt. Im Anschluss wurden sie für eine weitere Stunde mit entweder 20  $\mu\text{M}$  ABA, 10  $\mu\text{M}$  MeJA oder einer Kontrollbehandlung inkubiert, bevor ihre Öffnungsweiten gemessen wurden. Balken stellen Mittelwerte ( $n \geq 80$ ,  $\pm$  Standardfehler) aus zwei oder mehr unabhängigen Experimenten dar. Das Stomaweitenverhältnis wurde als Ratio aus Weite durch Länge bestimmt.

auf ABA-Gabe ( $0,24 \pm 0,01$ ), wenn auch leicht schwächer als in Abwesenheit des Inhibitors ( $0,21 \pm 0,01$ ). Der Inhibitor hatte eine stärkere Wirkung auf die MeJA-Sensitivität der Zellen. Während unbehandelte Stomata normal schlossen ( $0,25 \pm 0,01$ ), reagierten MG132-behandelte Zellen nur noch partiell auf MeJA ( $0,35 \pm 0,01$ ). Der Proteaseinhibitor MG132 verringerte somit die Fähigkeit der Stomata, auf MeJA mit einem Verschluss der Pore zu reagieren.

## IV. Diskussion

Die rasche, feinabgestimmte Regulation der Öffnungsweite von Stomata ist für das Überleben von Landpflanzen von essentieller Bedeutung, sowohl in der Verteidigung gegen Pathogene als auch in der Anpassung an Wassermangel (Daszkowska-Golec und Szarejko, 2013; McLachlan et al., 2014). Die Bewegungen der Schließzellen sind, wie viele andere Nastien, hydraulisch getrieben (Kanzawa et al., 2006; Volkov et al., 2008; Zhou et al., 2012). Die Änderung des Turgors wird durch die massive Translokation von Ionen verursacht, die den Nachstrom von Wasser auslöst. Diese Ionenflüsse werden durch zahlreiche Kanäle und Transporter in der Plasma- und Tonoplastenmembran vermittelt, die in einer konzertierten Aktion sowohl Anionen wie Chlorid, Nitrat und Malat als auch  $K^+$  aus der Schließzelle hinaus oder hinein transportieren (Roelfsema und Hedrich, 2005).  $K^+$  als einziges positiv geladenes Hauptosmotikum balanciert das Ladungsverhältnis der Anionen während der Stomabewegungen. Jedoch lag der Fokus der Forschung bisher auf der schnellen Kontrolle der Anionenkanäle sowie des Einwärtsgleichrichters KAT1 ( $K^+$ -CHANNEL *ARABIDOPSIS THALIANA*; Hedrich, 2012; Kollist et al., 2014). GORK (GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING  $K^+$ -CHANNEL) vermittelt den Export von  $K^+$  aus Schließzellen, wenn diese das Signal erhalten zu schließen. Nach bisherigen Erkenntnissen wird die Aktivierung von GORK hauptsächlich durch Depolarisation der Plasmamembran ausgelöst, die durch den Ausstrom von Anionen über die langsamen und schnellen Anionenkanäle verursacht wird (Hedrich, 2012). Hinweise auf komplexere Regulationsmechanismen von GORK häuften sich jedoch in den letzten Jahren (Tran et al., 2013; Eisenach et al., 2014; Planes et al., 2015).

## 4.1 Regulation von GORK in Stomata

Ein wichtiges Regulationsprinzip ist die reversible Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen und Phosphatasen. Dadurch kann innerhalb kürzester Zeit die Aktivität der Zielproteine beeinflusst werden, wie etwa in der Immunabwehr oder der Toleranz von abiotischem Stress (Boudsocq und Sheen, 2013; Gollack et al., 2014; Macho und Zipfel, 2014). Pflanzen besitzen eine deutlich höhere Anzahl an Kinasen als alle anderen Lebewesen. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* codiert für ungefähr doppelt so viele Proteinkinasen (>1000) wie das menschliche Genom (518), aber nur 112 Proteinphosphatasen (Schweighofer et al., 2004). Davon gehören 76 zur Familie der PP2C-Phosphatasen, die in 10 Gruppen (A-J) unterteilt werden. Zu Gruppe A gehören die PP2Cs, die mit dem ABA-Signalweg und damit teilweise auch der Stomaregulation assoziiert sind, wie ABI1, ABI2, HAB1, HAB2, PP2CA und HAI1 (Schweighofer et al., 2004; Ma et al., 2009; Santiago et al., 2009). Die wichtigsten Kinasefamilien, die am Stomaschluss beteiligt sind, sind MAP-Kinasen, die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen CPKs und CIPKs sowie SnRK2.6/ OST1 (Kollist et al., 2014; Zhang et al., 2014). Aufgrund der hohen Anzahl an Kinasen im Vergleich zu Phosphatasen im ABA-Signalweg, die als weitgehend redundant in ihrer Funktion gelten (Saez et al., 2006; Rubio et al., 2009), könnte man annehmen, dass eine differentielle Regulation in Schließzellen hauptsächlich durch die Kinasen vermittelt wird. In dieser Arbeit wird ein Beispiel für die gezielte Regulation eines Kanals durch ABI2, nicht aber durch ABI1 oder HAB2 vorgestellt.

### 4.1.1 ABI2 verbindet GORK mit dem ABA-Signalweg

Das gezielte Anbringen und Entfernen von Phosphaten an Schlüsselstellen von Proteinen, um deren Enzymeigenschaften oder -aktivität zu beeinflussen, ermöglicht Organismen, differenziert auf externe wie intrazelluläre Signale zu reagieren. Für einige der Kanäle und Transporter, die an den Stomabewegungen beteiligt sind, konnten bereits Proteinkinasen und -phosphatasen identifiziert werden, welche die Aktivität der Kanäle verändern (Hua et al., 2012; Kollist et al., 2014; Maierhofer et al., 2014). Sowohl in Y2H- (Dr. Uta Anschütz, Lehrstuhl



für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg) als auch in BiFC-Experimenten (Abschn. 3.1.1) konnten potentielle Regulatoren von GORK gefunden werden, die durch elektrophysiologische Messungen (DEVC) weiter untersucht und teilweise bestätigt werden konnten.

In dieser Arbeit gelang es zunächst, mit ABI2 einen Negativregulator von GORK zu identifizieren (Abschn. 3.1.1, 3.1.2). Die Phosphatase interagiert in BiFC-Analysen mit dem K<sup>+</sup>-Kanal und reduzierte dessen Stromantwort in Oozyten. Die Inhibierung von GORK durch ABI2 stellt eine erste Verbindung zum ABA-Signalweg dar, da diese Phosphatase ein wichtiger Regulator des ABA-Signalwegs ist (Rodriguez et al., 1998). Die Phosphatase ABI1 reguliert dagegen trotz hoher Sequenzähnlichkeit (80 % auf Aminosäure-Basis) mit ABI2 nicht den Kanal (Abschn. 3.1.1, 3.1.2). Bei Koexpression von GORK mit ABI1 konnte zwar ein positives Signal in BiFC-Experimenten detektiert werden, doch ein Einfluss der Phosphatase auf die Kanalaktivität konnte in den anschließenden DEVC-Messungen nicht bestätigt werden. Die Phosphatase HAB1 zeigte dagegen keine Interaktion in BiFC-Experimenten und wurde daher als direkter Interaktionspartner von GORK ausgeschlossen. Somit ist die GORK-Regulation durch ABI2 spezifisch, anders als beispielsweise bei SLAC1, der durch sowohl ABI1 als auch ABI2 inhibiert wird (Geiger et al., 2009b).

Die drei Phosphatasen ABI1, ABI2 und HAB1 gelten als redundant in ihrer Funktion, und erst eine Kombination der drei entsprechenden Verlustmutanten führt zu einem deutlichen ABA-hypersensitiven Phänotyp (Rubio et al., 2009). Für die drei Phosphatasen konnte kürzlich auch ein negativer Regulationsmechanismus durch ROS gezeigt werden (Sridharamurthy et al., 2014). HAB1 und ABI2 besitzen zwei kritische Cysteinreste, die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert werden, von denen einer in ABI1 fehlt (C186 in HAB1). ABI2 und HAB1 besitzen deshalb eine höhere Affinität zu ABI1, sodass physiologische ROS-Konzentrationen die Phosphatasen durch eine Dimerisierung inhibieren könnten. Durch eine ROS-Inaktivierung von ABI2 würde GORK nicht länger durch die Phosphatase inhibiert werden. Trotz eines an sich redundanten Phänotyps der drei Phosphatasen könnte also eine Spezifität auf molekularer Ebene vorliegen, der in der ABA-Signalgebung durch die Redundanz parallel geschalteter Signalwege überlagert wird (Rubio et al., 2009).

#### 4.1.2 Kinasen aktivieren GORK

Kinasen und Phosphatasen wirken antagonistisch, da Phosphatasen die Phosphatgruppen entfernen, welche durch Kinasen auf Serin-, Threonin- oder auch Tyrosin-Phosphorylierungsstellen übertragen wurden. Da ABI2 GORK durch eine Dephosphorylierung negativ reguliert (Abschn. 3.1.2), musste der Kanal zuvor bereits phosphoryliert worden sein. GORK ist im Grundzustand in Oozyten bereits aktiv, ähnlich wie der Shakerkanal KAT1, aber im Gegensatz zu AKT1 (Schachtman et al., 1992; Lee et al., 2007). Während AKT1 jedoch durch Phosphorylierungen aktiviert wird, wurde für KAT1 das Gegenteil festgestellt (Sato et al., 2009; Ronzier et al., 2014). In *Xenopus*-Oozyten wird KAT1 durch die endogene Proteinkinase C (PKC) deaktiviert, anders als möglicherweise der im Grundzustand inaktive Kanal AKT1 (Sato et al., 2010). Vielleicht wird daher GORK, wie KAT1, durch eine endogene Kinase wie PKC phosphoryliert. Dies würde bedeuten, dass bei Koexpression des Kanals mit einer *Arabidopsis*-Kinase keine zusätzliche Aktivitätssteigerung mehr stattfinden könnte, wie es mit OST1 oder CBL1-CIPK5 beobachtet wurde (Abschn. 3.1.2). Um in DEVC-Messungen einen Effekt der Kinasen auf den Kanal feststellen zu können, wurde ABI2 koexprimiert, um dann mit Hilfe der Kinasen die Inhibierung durch die Phosphatase teilweise wieder aufzuheben (Abschn. 3.1.3).

Mehrere sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige als auch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen konnten in früheren Arbeiten identifiziert werden, die an der Kanalregulation in den Stomabewegungen beteiligt sind (Sato et al., 2009; Geiger et al., 2010; Imes et al., 2013; Maierhofer et al., 2014). Die Regulation der Schließzellkanäle KAT1 und SLAC1 durch Phosphorylierung gehört zu den bestcharakterisiertesten Kanalregulationen in Pflanzen, während OST1 eine der bestuntersuchtsten Kinasen darstellt (Hedrich, 2012; Acharya et al., 2013). Die einwärts gerichteten Shakerkanäle KAT1 und KAT2, die den  $\text{K}^+$ -Einstrom während der Stomaöffnung vermitteln, werden durch Phosphorylierung durch OST1 und CPK13 inaktiviert (Sato et al., 2009; Ronzier et al., 2014). Die Expression von CPK13, die zu der Untergruppe der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen CPKs gehört, wird nicht nach ABA-Applikation, dafür aber nach Kälte und oxidativem Stress hochreguliert (Boudsocq et al., 2012; Ronzier et al., 2014). Damit wird KAT1 vermutlich sowohl durch einen ABA-abhängigen und -unabhängigen Signalweg inhibiert, die möglicherweise beide keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen involvieren. SLAC1 dagegen wird durch Phosphorylierung aktiviert. OST1, aber auch mehrere CPKs mit unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten sowie CBL1-CIPK23 führen zu einer Aktivierung des Kanals (Geiger et al., 2009b;

Geiger et al., 2010; Brandt et al., 2012; Maierhofer et al., 2014). Das SLAC1-Homolog SLAH3 wird in Schließzellen ebenfalls durch CPKs und CBL1-CIPK23 aktiviert, aber nicht durch OST1 (Geiger et al., 2011; Scherzer et al., 2012; Maierhofer et al., 2014). OST1 phosphoryliert auch den Malatkanal QUAC1 sowie den K<sup>+</sup>-Transporter KUP6, der zum K<sup>+</sup>-Ausstrom während des ABA-vermittelten Stomaschlusses beiträgt (Imes et al., 2013; Osakabe et al., 2013a).

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels DEVC-Messungen an *Xenopus*-Oozyten gezeigt werden, dass OST1 auch mit GORK den einzigen auswärtsgleichrichtenden Shakerkanal in Schließzellen aktiviert (Abschn. 3.1.3). Damit koordiniert OST1 den Ausstrom der Ionen, die in den Stomabewegungen beteiligt sind, durch Aktivierung der Effluxkanäle und Transporter und Inhibierung des K<sup>+</sup>-Einstroms durch KAT1 und KAT2 (Geiger et al., 2009b; Sato et al., 2009; Imes et al., 2013). Die Kinase OST1 gilt als Hauptregulator des ABA-Signalwegs und stellt somit eine zweite, Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Verbindung von GORK mit dem ABA-Signalweg dar (Arnaud und Hwang, 2015). Einige CBL-CIPK-Pärchen konnten bereits als Positivregulatoren von Shakerkanälen identifiziert werden, wie CBL4-CIPK6 und AKT2 sowie CBL1/9-CIPK23, das AKT1 aktiviert (Lee et al., 2007; Held et al., 2011). Mit Hilfe von Interaktionsstudien wie einer BiFC-Analyse sowie Genexpressionsdaten konnte eine Vorauswahl von CIPKs getroffen werden, die dann experimentell in DEVC-Messungen auf eine GORK-Aktivierung untersucht wurden (Abschn. 3.1.1, 3.1.3). Auf diesem Weg konnten CIPK5 und CIPK23 in Verbindung mit CBL1 oder CBL9 als Kanalaktivatoren bestätigt werden. CIPK15 dagegen konnte in Verbindung mit CBL1 und CBL9 als Negativregulator des ABA-Signalwegs und als Interaktionspartner von ABI1 und ABI2 identifiziert werden (Guo et al., 2002). GORK, der im Zuge der ABA-Signaltransduktion von Positivregulatoren wie OST1 aktiviert wird, zeigte keine Interaktion mit CIPK15 (Abschn. 3.1.1, 3.1.3). Die Aktivität GORK wird folglich von mehr als einer Kinase auf sowohl Ca<sup>2+</sup>-abhängige wie Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Weise positivreguliert. Anhand der multiplen Regulation von Kanälen durch verschiedene Kinasen wird somit deutlich, auf welche Weise die Kanalaktivierung das Ende von komplizierten, fein abgestimmten Signal-Netzwerken darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass GORK, ähnlich wie die oben beschriebenen Beispiele KAT1, SLAC1, SLAH3 und QUAC1 durch mehrere verschiedene Kinasen reguliert. In KAT1 und SLAC konnten jeweils mehrere Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die durch die unterschiedlichen Kinasen phosphoryliert werden (Sato et al., 2009; Sato et al., 2010; Dreyer et al., 2012; Ronzier et al., 2014). In weiterführenden Arbeiten könnten daher putative Phosphorylierungsstellen von

GORK untersucht werden, um die Regulation des Kanals weiter aufzuklären, insbesondere hinsichtlich der Spezifität der Kinasen gegenüber den Phosphorylierungsstellen des Kanals und deren Relevanz in Signalwegen.

#### 4.1.3 Interaktionen zwischen GORK, PP2Cs und Kinasen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit die PP2C-Phosphatase ABI2 als Inhibitor und die Kinasen OST1, CIPK5 und CIPK23 zusammen mit ihren CBL-Partnern als Aktivatoren des K<sup>+</sup>-Kanals GORK identifiziert werden (Abschn. 3.1). Allerdings waren die Kinasen nicht in der Lage, die Hemmung des Kanals durch ABI2 vollständig wieder aufzuheben, sondern nur um etwa 55-60% des Ausgangstroms. Möglich wäre, dass ABI2 nicht nur GORK dephosphoryliert, sondern auch die Kinasen OST1, CIPK5 sowie CIPK23 zu den Zielproteinen der Phosphatase gehören. Dies würde erklären, weshalb die Kinasen den Ausgangstrom von GORK nur teilweise wiederherstellen konnten (Abschn. 3.1.3). Die Inhibierung von OST1 durch die PP2Cs ABI, ABI2 und HAB1 wurde bereits nachgewiesen (Vlad et al., 2009). Auch die Inhibierung von CPKs durch ABI1 zur Kanalregulation wurde in der Vergangenheit bereits festgestellt, jedoch noch keine direkte Interaktion zwischen SLAC1 bzw. SLAH3 und ABI1 (Geiger et al., 2009b; Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011). PP2Cs können direkt mit CIPKs und CBLs interagieren, wie ABI2 und CIPK24, CIPK23 und CBL1 (Ohta et al., 2003; Leran et al., 2015). Für letztere zwei CIPK23 und CBL1- wurde sogar gezeigt, dass diese durch ABI2 dephosphoryliert werden. Dies würde bedeuten, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Kinasen zwar GORK phosphorylieren- und damit aktivieren-, jedoch ABI2 die Kanalaktivität auf sowohl direkte als auch indirekte Weise verringern könnte. Eine mögliche Inhibierung der CBLs durch ABI2 wurde dabei noch gar nicht berücksichtigt, trägt aber sicherlich zum Kinase- Phosphatase-Antagonismus bei.

Hinweise auf eine Protein-Protein-Interaktion der Kinasen OST1, CIPK5 und CIPK23 mit jeweils den Phosphatasen ABI1, ABI2 sowie GORK konnten in dieser Arbeit mit Hilfe der BiFC-Methode *in planta* festgestellt werden (Abschn. 3.1.4). In allen Fällen trat eine Fluoreszenz-Komplementation auf, welche die beschriebene Hypothese stützt. Aufgrund der Interaktion zwischen ABI1 und HAB1 mit OST1, CIPK5 und CIPK23 (Abb.3.6 bzw. Vlad et al., 2009) wäre

deshalb auch denkbar, dass die Phosphatasen indirekt zu einer Deaktivierung von GORK führen, indem sie die Kinasen hemmen. Aufgrund der Tatsache, dass GORK in *Xenopus*-Oozyten bereits ohne koexprimierte Kinase aktiv ist, konnte zum ersten Mal eindeutig belegt werden, dass eine PP2C direkt mit einem Kanal interagiert und ihn dadurch inhibiert (Abschn. 3.1.2). Auch für SLAC1 konnte bislang nur die Aktivierung des Kanals durch eine Kinase, nicht aber die Kanal- Inaktivierung durch eine Phosphatase gezeigt werden, obwohl dies vermutet wird (Geiger et al., 2009b; Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011; Maierhofer et al., 2014). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass möglicherweise nicht nur GORK, sondern auch SLAC1 ebenfalls direkt durch die Phosphatase inhibiert werden könnten.

Kürzlich wurde ein weiteres Signalwegselement bestehend aus SLAC1, ABI2 und der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-aktivierten Kinase GHR1 (GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE-RESISTANT 1) beschrieben (Hua et al., 2012). GHR1 aktiviert SLAC1 und wird durch ABI2 gehemmt, die wiederum vermutlich durch ROS inaktiviert wird, sodass hiermit ein direkter, ROS-vermittelter Mechanismus zum Stomaschluss vorliegen würde (Meinhard et al., 2002). Eine Aktivierung von GORK durch den ROS-Sensor GHR1 wurde bislang noch nicht beschrieben.

#### 4.1.4 Details der CBL1-CIPK5 Aktivierung von GORK

Die Aktivierung des Kanals durch OST1 steht stellvertretend für einen Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen Signalweg im Stomaschluss, während der Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalweg vermutlich durch CPKs und das CIPK/ CBL- Netzwerk vermittelt wird. In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass CPKs unterschiedliche Ca<sup>2+</sup>-Affinitäten und -Anforderungen für ihre Aktivierung haben (Boudsocq et al., 2012). Während die Aktivität einiger Kinasen völlig Ca<sup>2+</sup>-unabhängig ist, besitzen andere eine Grundaktivität, die durch Ca<sup>2+</sup> erhöht wird. Wieder andere dagegen sind auf eine Bindung von Ca<sup>2+</sup> angewiesen. Der Verlust der Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit scheint dabei mit einer Degeneration der EF-Hände zu korrelieren (Liese und Romeis, 2013). Über Unterschiede in der Ca<sup>2+</sup>-Affinität der CBLs noch deren jeweiligen EF-Hände ist bisher allerdings noch nichts bekannt, jedoch könnten dies zur Spezifität des CBL-CIPK-Netzwerks beitragen (Batistic und Kudla, 2009). Oszillierende Ca<sup>2+</sup>-Signale werden in der Signalweiterleitung verschiedenster Reize ausgelöst, die spezifisch CBLs mit unterschiedlicher Affinität zu Ca<sup>2+</sup> aktivieren könnten

(McAinsh und Pittman, 2009). CBLs besitzen vier EF-Hände zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ . Diese befinden sich bei allen zehn CBLs in *A. thaliana* im exakt gleichen Abstand zueinander (22, 25 bzw. 32 Aminosäuren zwischen den jeweiligen EF-Händen), weisen aber kleinere Sequenzvariationen auf, die sich auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität des CBLs auswirken könnten (Kolukisaoglu et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei mutierte Versionen von CBL1 mit CIPK5, GORK und ABI2 in DEVC-Messungen an *Xenopus*-Oozyten gemessen, bei der entweder die Struktur aller vier EF-Hände ( $\Delta\text{EF1-4}$ ) oder nur die vierte EF-Hand (E172Q) mutiert wurde (Abschn. 3.1.5). Während bei ersterer Mutante keine Aufhebung des ABI2-Blocks beobachtet werden konnte, wies CBL1 E172Q noch eine geringe Restaktivität auf, die zu einem leicht höheren Strom führte als bei CBL1  $\Delta\text{EF1-4}$ . Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die ersten drei EF-Hände scheint demnach nicht für eine Aktivierung der Kinase auszureichen, was auf eine besondere Bedeutung der vierten EF-Hand für die Funktion der CBL hinweist. Damit konnte auch bestätigt werden, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung essentiell für die Aktivität der CBL1 ist. Dies steht im Kontrast zum Verhalten der CPKs, bei denen die Kinasen durch eine Störung der EF-Hände hyperaktiv werden (Geiger et al., 2011).

Anhand der Struktur des N-Terminus können die CBLs weiter unterteilt werden (Batistic und Kudla, 2009). Einige CBLs, wie CBL1, besitzen N-terminale Bindestellen für Lipidmodifikationen, durch die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren an der Plasmamembran verankert werden können, während andere, wie beispielsweise CBL3, am Tonoplast gebunden sind (Batistic et al., 2008; Schlücking et al., 2013). Das Fehlen des Lipidankers (CBL1 G2A) verhindert, dass CBL1 an der Plasmamembran lokalisiert. CIPK5 allein befindet sich normalerweise im Cytoplasma und wird durch Interaktion mit CBL3 an den Tonoplasten relokalisiert (Schlücking et al., 2013). Daher ist im Gegenzug CBL1 oder CBL9 dafür verantwortlich, dass CIPK5 an die Plasmamembran gelangt, um dort mit GORK interagieren zu können. Die Interaktion zwischen CIPK5 und den CBLs 1 und CBL9 wurde in einer früheren Arbeit als vergleichsweise schwach beschrieben (Kolukisaoglu et al., 2004). Fehlt jedoch der CBL-Partner, oder kann der CBL1-CIPK5-Komplex nicht an der Zielmembran lokalisieren, wird auch die Phosphorylierung der Zielproteine gestört. Aus diesem Grund wurde bei Koexpression in *Xenopus*-Oozyten von CBL1 G2A-CIPK5 eine deutlich verringerte Aktivierung von GORK gemessen als bei CBL1-CIPK5 (Abschn. 3.1.5). Durch die Lokalisierung nahe an den Zielproteinen kann das CBL-CIPK-Netzwerk rasch und spezifisch auf auftretende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaturen reagieren. Durch die hohe

Kombinierbarkeit aus 10 CBLs und 25 CIPKs wird die Möglichkeit zur Feinabstimmung dieses Systems noch weiter erhöht.

Auch die Kinase-Eigenschaften CIPK5 wurden mit DEVC-Messungen näher untersucht (Abschn. 3.1.5). Analog zu einer CIPK23-Mutante wurde eine entsprechende CIPK5-Variante getestet (Maierhofer et al., 2014). Die Mutation in CIPK23 unterbricht vermutlich die ATP-Bindedomäne, sodass CIPK23 K60N nicht mehr in der Lage ist, SLAC1 oder SLAH3 zu phosphorylieren. Auch CIPK5 K41N weist eine deutlich verringerte Aktivität gegenüber dem Wildtyp auf, wenn sie mit GORK, ABI2 und CBL1 koexprimiert wurde. Der Austausch von Aspartat zu Asparagin (D153N) in CIPK5 soll die postulierte Konformationsänderung der Kinase im Aktivierungsloop verhindern, und damit die Kinaseaktivität stören (Guo et al., 2001; Gong et al., 2002). Diese Domäne in der N-terminalen Hälfte der Kinase wird vermutlich dazu benötigt, nach der Konformationsänderung des CBL-Partners ebenfalls ihre Quartärstruktur zu ändern, wodurch die Kinase zu aktiviert wird. Mutation von D153 führt zu einem Verlust der Enzymaktivität, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die postulierte Konformationsänderung zur Aktivität des Proteins beiträgt (Abschn. 3.1.5). Die Kinaseaktivität von CIPK5 scheint also entscheidend zu sein für die Aktivierung des Kanals, sodass tatsächlich die Phosphorylierung des Kanals für seine Aktivierung verantwortlich sein könnte.

## 4.2 Der GORK-Signalknoten ist essentiell für den MeJA-vermittelten Stomaschluss

Da in heterologen Expressionssystemen nur ein isolierter Teil eines Signalwegs betrachtet wird, können essentielle Komponenten wie weitere interagierende Proteine oder Cofaktoren fehlen, welche die Eigenschaften der untersuchten Interaktionen verändern können. Auch das Mengenverhältnis der Interaktoren kann durch die Überexpression so verändert sein, dass dadurch die Ergebnisse verfälscht werden. Dies ist beispielsweise ein Problem bei BiFC-Experimenten, bei denen falsch-positive Fluoreszenzkomplementationen auftreten können (Kerppola, 2008). Deshalb ist eine Analyse potentieller Signalwegskomponenten *in planta* unerlässlich. Dies wird allerdings durch mögliche Redundanzen von Netzwerken stark erschwert und führt. z.B. in Schließzellen zur Maskierung von Phänotypen (Rubio et al., 2009).

### 4.2.1 Expression der GORK-Regulatoren in Wurzeln und Schließzellen

Die Identifizierung des unmittelbaren Signalmoduls von GORK- die reversible Phosphorylierung durch die Kinasen OST1, CIPK5 und CIPK23 mit ihren Ca<sup>2+</sup>-Sensoren CBL1 und CBL9, sowie der Phosphatase ABI2- wurde in einem heterologen Expressionssystem durchgeführt (Abschn. 3.1). Die Untersuchung der gewebsspezifischen Expression der Regulatoren und des Kanals *in planta* lässt bereits einige interessante Rückschlüsse auf deren Funktionen in der Physiologie der Pflanze zu.

Die Phosphatase ABI2 konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl in Schließzellen, als auch in den Wurzeln von Keimlingen gefunden werden (Abschn. 3.2.1). In Schließzellen kann ein Verlust von ABI2 durch andere PP2Cs wie ABI1 und HAB1 kompensiert werden, doch in Wurzeln scheint ABI2 eine spezielle Rolle im Wurzelwachstum zu spielen (Rubio et al., 2009; Thole et al., 2014). Neben ABI2 wurde GORK ebenfalls als Ziel der ABA-Signaltransduktion in Wurzeln beschrieben, sodass ABI2 hier als Negativregulator des Kanals fungieren könnte (Planes et al., 2015). Auch ROS führen in Wurzeln zum K<sup>+</sup>- Ausstrom, der vielleicht durch GORK vermittelt wird, nachdem ABI2 durch ROS inhibiert wurde (Meinhard et al., 2002; Demidchik et al., 2010). Dies wäre ein weiterer Hinweis auf eine ROS-abhängige Regulation von GORK durch ABI2.



Darüber hinaus stimuliert ABI2 in Wurzeln die Aufnahme von Nitrat, als direkter Antagonist zu CBL1-CIPK23 (Leran et al., 2015). Weder OST1 noch CIPK5 werden in Wurzeln exprimiert, sodass CIPK23 hier für die Regulation von GORK verantwortlich sein könnte (Zheng et al., 2010). Die Kinase, die sowohl in Schließzellen als auch Wurzeln exprimiert wird, könnte möglicherweise auch wichtig für die GORK- Regulation in Wurzeln sein. CBL1/9-CIPK23 reguliert den K<sup>+</sup>-Kanal AKT1 in Wurzeln und trägt so zur K<sup>+</sup>- Aufnahme bei (Dennison et al., 2001; Lee et al., 2007; Leran et al., 2015). AKT1 und GORK könnten also je nach Kaliumbedarf durch CBL1/9-CIPK23 aktiviert werden, wenn die Inhibierung der Kanäle durch ihre entsprechenden Phosphatasen aufgehoben wird (Lee et al., 2007; Lan et al., 2011). Während CIPK23 die Kaliumversorgung der Pflanze positiv reguliert, unterdrückt die Kinase jedoch die Nitrataufnahme, indem sie den Nitrattransporter NRT1.1 phosphoryliert (Leran et al., 2015).

Eine Expression von GORK wurde in der Vergangenheit nicht nur Schließzellen, sondern auch in Blüten, Phloem, Wurzelepidermis und -haaren festgestellt (Gaymard et al., 1998; Ache et al., 2000). Der Kaliumkanal GORK jedoch ist nicht in Blattgewebe lokalisiert, sondern ausschließlich in Wurzeln und Schließzellen (Abschn. 3.2.1). OST1 ist nach seiner prominenten Funktion in Stomabewegungen benannt, und CIPK23 konnte, ebenso wie CBL1 und CBL9, als schließzellexprimiert gezeigt werden (Cheong et al., 2007). CIPK5 war in Schließzellen und dem Blattgewebe, allerdings nicht in den Keimlingswurzeln zu finden (Abschn. 3.2.1). Die Tatsache, dass Transkripte von CIPK5 und CIPK23 auch im Blattgewebe gefunden wurden, weist darauf hin, dass diese Proteine im Mesophyll bislang noch nicht beschriebene Prozesse regulieren dürften. Auch ABI2 und OST1 sind im Blattgewebe exprimiert. ABI2 als Regulator des ABA-Signalwegs trägt auch im Mesophyll zur Trockenstresstoleranz bei (Rubio et al., 2009; Pantin et al., 2013). OST1 fungiert in der Kältetoleranz als Positivregulator und spielt vermutlich auch in der Pathogenabwehr eine wichtige Rolle, da die Verlustmutante *ost1-2* hypersensitiv auf Pathogene ist (Absch. 3.2.5; Melotto et al., 2006; Ding et al., 2015). Insgesamt waren alle der mit der qrtPCR-Methode untersuchten Gene in Schließzellen exprimiert. Dies weist darauf hin, dass das in Abschn. 3.1 entdeckte Signalwegsmodule vollständig in Schließzellen vorliegen könnte. Obwohl sich alle weiteren Untersuchungen dieser Arbeit auf die Entschlüsselung der Vorgänge in Schließzellen konzentrierten, lieferte diese Arbeit auch wichtige Hinweise auf die Regulation von GORK in Wurzeln durch ABI2 und CBL1/9-CIPK23.

#### 4.2.2 MeJA-, aber nicht ABA-Insensitivität von Schließzellen der Verlustmutanten

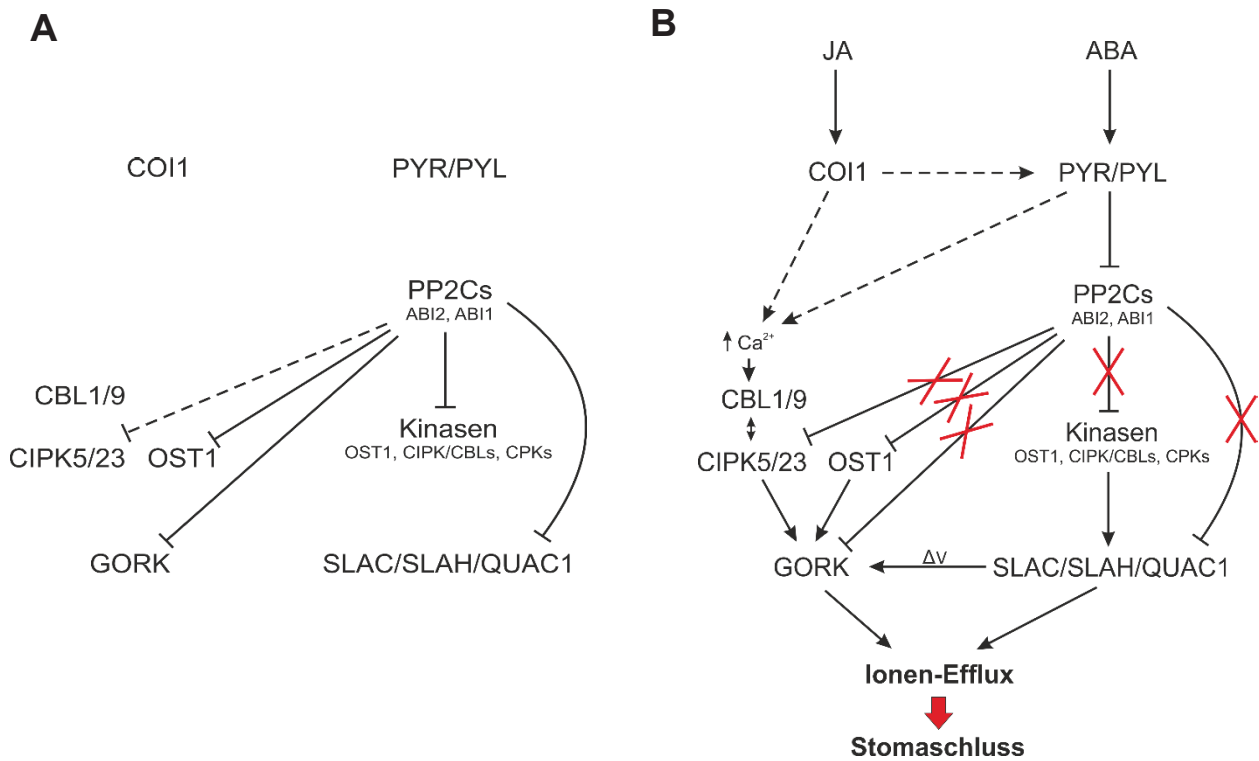
Schon seit längerem ist bekannt, dass ein Verlust von GORK dazu führt, dass Schließzellen vermindert auf ABA, aber nicht mehr auf MeJA reagieren können (Suhita et al., 2004). In Patch Clamp-Experimenten verstärkte MeJA den Netto-Ausstrom von  $K^+$ , der möglicherweise durch GORK vermittelt wird (Evans, 2003). Die kürzlich in ihrer Funktion im ABA-vermittelten Stomaschluss beschriebenen KUPs sind vermutlich dafür verantwortlich, dass Stomata der Verlustmutante *gork1-2* bei ABA-Behandlung noch mit einem Schluss reagieren (Absch. 3.2.4; Osakabe et al., 2013a). Möglicherweise werden die KUP-Transporter allerdings nur durch den ABA-Signalweg, jedoch nicht durch Jasmonate (JA) aktiviert. Damit wäre GORK nach JA-Perzeption alleine für den  $K^+$ -Efflux aus den Schließzellen verantwortlich, was zu dem MeJA-insensitiven Phänotyp von *gork1-2* führt. Ob die KUP-Transporter tatsächlich nicht am JA-vermittelten Stomaschluss beteiligt sind, wurde bislang noch nicht experimentell bestätigt.

Die elektrophysiologische Charakterisierung der GORK-ABI2-Interaktion zeigte eine Inhibierung des Kanals durch die Phosphatase (Abschn. 3.1.2). Davon ausgehend wäre zu erwarten, dass die Verlustmutante *abi2-2* einen hypersensitiven Phänotyp bei MeJA-Inkubation besitzt, anstatt vermindert auf MeJA zu reagieren (Abschn. 3.2.4). Ist bei ABI2 dagegen ein Glycin an der Position 168 zu Aspartat mutiert (G168D), kann ABI2 nicht mehr durch die Interaktion mit den PYR/PYL-Rezeptoren inhibiert werden. Dies verursacht in der entsprechenden *Arabidopsis*-Mutante *abi2-1* einen dominanten ABA-insensitiven Phänotyp (Park et al., 2009). Schließzellen von *abi2-1* wurden als ABA- und MeJA-insensitiv beschrieben (Murata et al., 2001; Munemasa et al., 2007). Die Messungen dieser Arbeit bestätigten dies (Abschn. 3.2.3). Weshalb *abi2-2* allerdings diesen Phänotyp zeigt, ist unklar. Möglicherweise dephosphoryliert ABI2 in Schließzellen weitere Ziele wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren oder -Repressoren, die Auswirkungen auf den Stomaschluss-Mechanismus haben. Kürzlich konnte eine neue Rolle für die eng verwandte Kinase ABI1 vorgeschlagen. ABI1 scheint dafür verantwortlich zu sein, dass einige Proteine wie Kinasen und Transkriptionsfaktoren für den Abbau durch das Ubiquitin-26S-Proteasom-System markiert werden (Ludwikow, 2015). ABI1 ist im Nucleus lokalisiert und kontrolliert die ABA-abhängige Genexpression (Moes et al., 2008). ABI2 könnte ebenfalls Proteinabbau und Genexpression von wichtigen Regulatoren beeinflussen, sodass ein Verlust von ABI2 (*abi2-2*) oder eine ABA-

Insensitivität (*abi2-1*) weitreichende Folgen für die Regulation der Stomaöffnung haben könnte.

Als ein zentraler Knotenpunkt des Stomaschlusses kristallisierte sich die SnRK2-Kinase OST1 heraus, die durch ABA aktiviert wird und den Ionen-Efflux aus den Schließzellen koordiniert (Osakabe et al., 2013b). Frühere Arbeiten zeigten auch, dass Stomata von *ost1-2* insensitiv auf ABA sind, aber noch auf MeJA reagieren (Mustilli et al., 2002; Suhita et al., 2004). In den Messungen dieser Arbeit jedoch konnte eine leichte Abnahme der Öffnungsweite nach ABA-Behandlung und keinerlei Effekt von MeJA beobachtet werden (Abschn. 3.2.4). Ersteres könnte auf einen hydraulischen Effekt oder Langstreckensignale durch die Verwendung von ganzen Blättern zurückzuführen sein, während es sich bei der beobachteten Abweichung nach MeJA-Gabe um einen zeitlichen Effekt handeln könnte (Abschn. 3.2.3; Pantin et al., 2013). Suhita und Kollegen (2004) inkubierten eine Stunde länger als in der vorliegenden Arbeit, sodass Stomata von *ost1-2* vielleicht stark verzögerte Schlusskinetiken aufweisen. Diese Überlegung müsste jedoch experimentell überprüft werden.

Obwohl die Schließzellen- Anionenkanäle auch durch CPKs und CIPK23/CBL1, 9 phosphoryliert werden können, ist OST1 absolut notwendig für die Aktivierung der Anionenkanäle (Scherzer et al., 2012; Acharya et al., 2013; Maierhofer et al., 2014). Die molekularen Hintergründe dessen sind jedoch noch nicht abschließend geklärt. Die Mutanten *cbl1/cbl9* und *cipk5-2* schlossen ihre Stomata nach ABA-Inkubation, nicht jedoch nach Behandlung mit MeJA (Abschn. 3.2.4). Die Mutante *cipk23-3* dagegen reagierte wildtyp-ähnlich auf beide Phytohormone. Eine kürzlich erschienene Studie zeigte, dass ein Verlust von CIPK23 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Trockenheit im Vergleich zum Wildtyp führt (Cheong et al., 2007). Dies steht in direktem Widerspruch zu einer kürzlich veröffentlichten Publikation, in der CBL1/9-CIPK23 als Positivregulator von SLAC1 und SLAH3 bei Expression in *Xenopus*-Oozyten nachgewiesen werden konnte (Maierhofer et al., 2014). Maierhofer und Kollegen stellten zudem fest, dass die Genexpression verschiedener Kinasen in Abwesenheit von CIPK23 hochreguliert ist. Es wäre also denkbar, dass diese den Verlust von CIPK23 so stark kompensieren, dass die Verlustmutante unter Trockenstressbedingungen im Vorteil gegenüber Wildtyppflanzen ist. Übertragen auf den Jasmonat-vermittelten Stomaschluss könnte dies bedeuten, dass Kinasen wie OST1, CIPK5 und CPKs zur Aktivierung von SLAC1, SLAH3 und GORK in *cipk23-3* dank einer verstärkten Genexpression ausreichen.



**Abb. 4.1: vereinfachtes Modell des Stomaschlusses nach JA- oder ABA-Perzeption**

A) Bei basalem ABA- und Jasmonatgehalt verhindern Phosphatasen der PP2C-Klasse den Efflux von Ionen durch die Inhibierung von Kanälen und den Kinasen, durch die die Kanäle aktiviert werden.

B) Der Signalweg wird aktiviert, indem JA-Ile an COI1 bindet und auf noch ungeklärte Weise seinerseits die Signalgebung durch ABA auslöst. ABA bindet an die Rezeptoren der PYR/PYL-Familie, durch die es zu Oszillationen des cytosolischen Calciumgehalts kommt. Ob JA dies ebenfalls, auf ABA-unabhängige Weise, verursacht, ist noch nicht bekannt. Rezeptorbindung von ABA inhibiert auch die PP2C-Phosphatasen, sodass diese nicht länger in der Lage sind, die aktivierenden Kinasen wie OST1 sowie Kanäle wie GORK oder SLAC zu inhibieren. Durch die Aktivierung der Kinasen, die teilweise  $Ca^{2+}$ -unabhängig sind, teilweise aber zusätzlich durch  $Ca^{2+}$ -Bindung aktiviert werden, kommt es zu einer Phosphorylierung und damit Öffnung der Kanäle, die den massiven Ionen-Ausstrom vermitteln der für den Schluss der Stomata notwendig ist. Gestrichelte Linien weisen auf noch unbekannte Verbindungen hin. Pfeile deuten Aktivierungen an, Querstriche am Ende der Linien eine Inhibierung.  $\Delta V$  steht für eine spannungsabhängige Aktivierung von GORK durch den Anionenefflux.

Generell stellt sich allerdings auch die Frage, ob überexprimierte Proteine in heterologen Expressionssystemen auf die gleiche Weise miteinander interagieren wie *in planta*. Eine Überprüfung, beispielsweise durch Patch Clamp-Experimente an Schließzellprotoplasten, könnte jedoch durch die hohe Redundanz an aktivierenden Kinasen erschwert werden (Geiger et al., 2009b; Geiger et al., 2010; Scherzer et al., 2012). Aus diesem Grund ist unklar, durch welche der Kinase(n) die Regulation von GORK bei einer Behandlung mit ABA erfolgt (vgl. Abb.

4.1). Ein Verlust von CIPK23 etwa könnte durch CIPK5 und OST1 vollständig kompensiert werden, da die Expression von verschiedenen Kinasen in *cipk23-3* im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert ist (Maierhofer et al., 2014). Ob *cipk5-2*, ähnlich wie *cipk23-3*, eine veränderte Expression von am Stomaschluss beteiligten Kinasen aufweist, wurde bisher noch nicht untersucht. Aufgrund dessen ist die Beteiligung von CIPK23 an der GORK-Regulation in Schließzellen schwierig zu beurteilen. Möglicherweise ließe sich dies leichter in Wurzeln untersuchen, da hier OST1 und CIPK5 nicht exprimiert sind (Abschn. 3.2.1; Zheng et al., 2010), etwa mittels der nicht-invasiven Technik der Mikroelektroden-Ionenfluss-Schätzung (engl. Microelectrode Ion Flux Estimation, MIFE; Jayakannan et al., 2013). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das bisherige Kernmodell des ABA-vermittelten Stomaschlusses erweitert (Abb.4.1; Geiger et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit gelang es somit zum ersten Mal, eine Beteiligung des CIPK-CBL-Netzwerks im Jasmonat-Signalweg zu identifizieren. Der Komplex aus CIPK5-CBL1 scheint essentiell zu sein für die Aktivierung von GORK und damit für die Kontrolle des JA-vermittelten  $K^+$ -Effluxes im Stomaschluss. Gleichzeitig stellt die Regulation durch OST1 und ABI2 eine Verbindung zum ABA-Signalweg und auch einen  $Ca^{2+}$ -unabhängigen Regulationsmechanismus dar.

#### 4.2.3 *P. syringae* öffnet die Stomata mit Coronatin

Während der Infektion einer Pflanze können Phytopathogene wie *Pseudomonaden* oder Rostpilze eine ganze Reihe Effektoren sekretieren, die die Immunantwort der Pflanze unterdrücken können (Dou und Zhou, 2012). Ein Effektor, Coronatin, ist ein Strukturanalogon zu JA-Ile und führt unter anderem in Abhängigkeit von COI1 zur Aktivierung der Plasmamembranstämmigen  $H^+$ -ATPasen, sodass die Porenöffnung eingeleitet wird (Liu et al., 2009). In Studien mit Coronatin-defizienten *Pseudomonas*-Stämmen wurde deren verminderte Pathogenität beschrieben, bedingt unter anderem durch den Verlust der Fähigkeit, die Stomata der Pflanzen zu öffnen (Brooks et al., 2004; Melotto et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand eines Infektionsassays von *Arabidopsis* mit *P. syringae* var. *tomato* DC3000 gezeigt werden, dass ein Schließen der Stomata tatsächlich eine Invasion durch Pathogene verhindern oder zumindest verzögern kann (Abschn. 3.2.5). Dass der Wildtyp

im späteren Verlauf dennoch erfolgreich infiziert werden konnte, ist vermutlich auf den Einsatz von Effektoren wie Coronatin zurückzuführen, welches die Stomata auch in Stoma-Assays öffnete. Erst in späteren Phasen, wenn die Pathogene die pflanzliche Immunabwehr dank ihrer Effektoren ausgeschaltet haben, verläuft die Infektion bei *gork1-2* und Col-0 Wildtyp-Pflanzen ähnlich. Dies unterstreicht die Bedeutung des Stomaschlusses in der Abwehr von Pathogenen, der eine wichtige erste Barriere für Bakterien und Pilze darstellt. Im Gegensatz zu *gork1-2*, die im weiteren Infektionsverlauf ähnlich wie der Wildtyp nur geringe Schädigungen aufwies, entwickelten sich in *ost1-2* (*Ler*) deutliche Nekrosen. Aufgrund des unterschiedlichen Hintergrunds ist ein direkter Vergleich mit Col-0 nicht möglich, doch frühere Studien zeigten bereits die Bedeutung von OST1 nicht nur im Stomaschluss bei abiotischem Stress, sondern auch in der stomatären Verteidigung gegen Pathogene (Melotto et al., 2006; Acharya et al., 2013). OST1 phosphoryliert die NADPH-Oxidasen RBOHD und RBOHF, die für die ROS-Produktion im Stomaschluss verantwortlich sind (Sirichandra et al., 2009). ROS und  $Ca^{2+}$ -Signale bilden eine positive Rückkopplungsschleife und verstärken sich gegenseitig (Pei et al., 2000; Drerup et al., 2013). Gleichzeitig könnten ROS auch zu einer Inaktivierung der negativ regulierenden PP2Cs wie ABI2 und HAB1 führen und dadurch den Stomaschluss einleiten (Meinhard et al., 2002; Sridharamurthy et al., 2014). Die Bildung von ROS durch NADPH-Oxidasen scheint jedoch nur im ABA- und MeJA-vermittelten Stomaschluss stattzufinden, während Salicylsäure (SA) zur ROS-Bildung durch Zellwand-Peroxidasen führt (Murata et al., 2015). Der Mechanismus des Crosstalks zwischen ABA und SA in der Immunabwehr ist noch nicht ganz verstanden, doch im gegenwärtigen Modell des MAMP-ausgelösten Stomaschlusses führen beide Hormone gemeinsam zu einem Verschluss der Pore (Melotto et al., 2008). In diesem Modell kommt Coronatin die Rolle des Antagonisten zu, das aktiv eine Öffnung der Poren verursacht.

#### 4.2.4 Stomatäre Verteidigung gegen biotrophe und nekrotrophe Pathogene

Untersuchungen zur Pathogenabwehr in vollständigen Organismen zeigten, dass diese passgenau abgestimmt wird auf viele verschiedene Faktoren. Dazu gehören beispielsweise die Lebensweise der Pathogene (biotroph, hemi-biotroph oder nekrotroph), abiotische Stressfaktoren, Koinfektionen mehrerer Pathogene, aber auch der Tagesrhythmus der Pflanze (Pieterse et al., 2009; Zhang et al., 2013). Das in Abschn. 4.2.3 beschriebene Modell der stomatären Verteidigung stützt sich allerdings hauptsächlich auf Untersuchungen mit *Pseudomonas syringae* bzw. flg22 (Melotto et al., 2008; Sawinski et al., 2013; McLachlan et al., 2014). Untersuchungen mit Mehltau und dessen PAMP Chitosan zeigten zwar, dass es diese den Stomaschluss durch die Aktivierung von Anionenkanälen auslösen, doch die Elemente der Signalkette zwischen Rezeptor und der Aktivierung wurden noch nicht näher untersucht (Koers et al., 2011). Da es sich beim Mehltau um einen biotroph lebenden Pilz handelt, wird er vermutlich durch SA-vermittelte Abwehrmechanismen bekämpft. Der SA-Signalweg wird hauptsächlich durch biotrophe und hemi-biotrophe Erreger ausgelöst, während die Jasmonat-vermittelte Pathogenabwehr nekrotrophe Pathogene sowie kauend-beißende Insekten betrifft (Robert-Seilantantz et al., 2011; Erb et al., 2012). SA und JA wirken dabei antagonistisch zueinander. Beispielsweise führt die Aktivierung des SA-Signalwegs in Pflanzen, die mit dem biotroph lebenden Falschen Mehltau *Hyaloperonospora arabidopsidis* infiziert sind, zu einer verminderten Abwehr gegen den Kohlweißling *Pieris rapae*, weil SA den JA-Signalweg hemmt (Koornneef et al., 2008). Interessanterweise sind dieselben Transkriptionsfaktoren, welche den JA-Signalweg bei Infektion mit *H. arabidopsidis* unterdrücken, in der Verteidigung gegen den nekrotrophen Grauschimmel *Botrytis cinerea* notwendig (Murmu et al., 2014). Die induzierte Resistenz gegen *B. cinerea* wiederum wird durch JA vermittelt (Aubert et al., 2015). Die Abwehr des hemi-biotrophen Bakteriums *P. syringae* wird dagegen durch SA verstärkt und durch JA bzw. COR geschwächt (Brooks et al., 2005). Bei *P. syringae*, *H. arabidopsidis* und *B. cinerea* handelt es sich um drei unterschiedliche Pathogene, die nach der Invasion der Pflanze durch jeweils passende Strategien von der Pflanze abgewehrt werden. Im Gegensatz zu Pilzen, die direkt die Epidermis penetrieren und die Pflanze infizieren können, sind nekrotrophe Bakterien wie *Pectobacterium carotovorum* jedoch auf Öffnungen wie Stomata angewiesen (Laluk und Mengiste, 2010; Mansfield et al., 2012). Bislang gibt es jedoch kaum Studien zur stomatären Abwehr von Pathogenen wie *H.*



*arabidopsidis* und *P. carotovorum* (Piisilä et al., 2015). Da im späteren Verlauf einer Infektion spezifische Abwehrmechanismen gegen verschiedene Pathogene ergriffen werden, wäre es möglich, dass diese Spezifität bereits auf der Ebene der stomatären Verteidigung stattfindet. Vielleicht beginnt also schon in Schließzellen der SA-JA-Crosstalk, wie er typischerweise in der Pathogenabwehr stattfindet (Robert-Seilaniantz et al., 2011). SA und JA wären hier ebenfalls bereits spezifisch für die Abwehr derjenigen Pathogene zuständig sind, auf welche sie spezialisiert sind. Vergleichende Studien, welche sich auf die Feinheiten des Stomaschlusses bei biotrophen oder nekrotrophen Bakterien konzentrieren, sind jedoch bislang noch nicht veröffentlicht worden. Deshalb kann noch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob die stomatäre Verteidigung gegen biotrophe und nekrotrophe Pathogene gleich verläuft.

#### 4.3 Crosstalk der Signalwege zwischen ABA, JA und Coronatin

Die Tatsache, dass *Pseudomonas* Coronatin einsetzen, um die pflanzliche Abwehr zu schwächen, liegt möglicherweise am Crosstalk zwischen dem JA- und dem SA-Signalweg, der das Rückgrat der Immunabwehr bildet (Robert-Seilaniantz et al., 2011; Pieterse et al., 2012). Der Antagonismus zwischen dem JA- und dem SA-Signalweg ist die am besten beschriebene Hormoninteraktion der Pathogenabwehr. Es wird allerdings immer deutlicher, dass das pflanzliche Immunsystem ein dichtes Netzwerk aus verschiedenen antagonistischen und synergistischen Signalwegen ist (Pieterse et al., 2009). Dadurch kann eine spezifische Reaktion auf die jeweiligen angreifenden Pathogene und/oder Herbivoren erfolgen, die durch zahlreiche weitere Faktoren moduliert werden kann, wie Tageszeit, zeitlicher Ablauf der Infektion(en) und abiotischer Stress (Goel et al., 2008; Pieterse et al., 2009; Goodspeed et al., 2012; Zhang et al., 2013).



#### 4.3.1 Antagonismus der ABA- und der COR-vermittelten Stomabewegung

Nach der Perzeption verschiedener abiotischer und biotischer Reize wie Temperatur, Licht, Wasser- und CO<sub>2</sub>-Status sowie Pathogene laufen die Signalwege in Schließzellen auf den zentralen Komponenten des Netzwerks zusammen, bestehend aus den Kanälen OST1, PP2Cs und PYR/PYL. Die Beteiligung von ABA an der jeweiligen Reizverarbeitung ist noch nicht geklärt, allerdings scheint es auch einige ABA-unabhängige Mechanismen zu geben (Xie et al., 2006; Marten et al., 2007; Montillet et al., 2013; McLachlan et al., 2014). Daraus folgt, dass die einzelnen Signalwege gemeinsame, aber auch spezifische Komponenten besitzen dürften. Zu den gemeinsamen Komponenten gehören zahlreiche sekundäre Botenstoffe wie Ca<sup>2+</sup>, ROS, NO sowie eine Alkalisierung des Cytoplasmas, die mit der ABA-Signaltransduktion assoziiert sind, aber auch im JA-Signalweg eine wichtige Rolle spielen, um den Stomaschluss einzuleiten (Suhita et al., 2004; Islam et al., 2010). Neben den sekundären Botenstoffen teilen sich die Signalwege der beiden Phytohormone auch einige Proteine, wie beispielsweise CPK6, Anionenkanäle, die NADPH-Oxidasen RBOHD und F, OST1 sowie ABA-Rezeptoren (Abschn. 3.2.4 und 3.3.1; Suhita et al., 2004; Mori et al., 2006; Munemasa et al., 2011a).

Zu Beginn der Inkubation führten ABA, MeJA und Coronatin jeweils gleich schnell zum Stomaschluss, sodass die Poren nach etwa einer halben Stunde überwiegend geschlossen waren (Abschn. 3.2.2). Während ABA und MeJA jedoch über vier Stunden hinweg die Stomata geschlossen hielten, zeigte eine Untersuchung der Kinetik, dass bei einer Behandlung mit Coronatin die Inkubationsdauer entscheidend ist für die Öffnungsweite der Stomata. Coronatin führt demnach im Gegensatz zu MeJA nach einem vorübergehenden Schließen zu einer Öffnung der Stomata. Dieser Unterschied könnte auf den Katabolismus der Moleküle durch die Pflanze zurückzuführen sein. Der Katabolismus von Coronatin in der Pflanze wurde bisher noch nicht beschrieben, doch JA können rasch ineinander umgewandelt werden (Wasternack und Hause, 2013). Möglicherweise gibt es also neben JA-Ile und JA-Trp weitere bioaktive JA, die den Stomaschluss aufrecht halten könnten. Auch werden weitere Jasmonatrezeptoren neben COI1 vermutet, da Coronatin auch in *coi1*-Mutanten noch den SA-Signalweg unterdrückt (Geng et al., 2012). Auf welche Weise dies jedoch mit diesem gegensätzlichen Effekt von MeJA und Coronatin auf Stomata bei längeren Behandlungen zusammenhängt, ist noch nicht klar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Interessante Rückschlüsse lassen auch die Untersuchungen des ABA- und Coronatin-Crosstalks zu. Eine 30-minütige Vorinkubation mit Coronatin führte zu Insensitivität gegenüber ABA (Melotto et al., 2006). Dagegen führte eine gleichzeitige Inkubation zu einem Schluss, bei der ABA die Öffnung durch Coronatin entweder stark verzögert oder vollständig unterdrückt (Abschn. 3.3.2). Die Coronatin-induzierte ABA-Insensitivität war jedoch nicht von Dauer, da eine Stunde nach Entfernen des Coronatins die Poren wieder normal auf ABA reagierte (Abschn. 3.3.3). Die erzwungene Öffnung der Stomata durch Effektoren wie Coronatin ist dabei nicht auf eine mechanische Blockierung des Stomaschlusses zurückzuführen, da sie reversibel ist (Allegre et al., 2007). Es wäre möglich, dass das Phytotoxin den Abbau von noch unbekanntem Regulatoren des Stomaschlusses bewirken könnte, da Coronatin bekanntlich an COI1 bindet (Yan et al., 2009). Auf einem noch nicht entschlüsselten Weg führt Coronatin beispielsweise zur Aktivierung von H<sup>+</sup>-ATPasen in der Plasmamembran, wodurch die Öffnung der Poren eingeleitet wird (Liu et al., 2009). *Pseudomonas* öffnen jedoch nicht einfach nur die Poren, sondern sie übernehmen die Kontrolle über die Schließzellregulation, um ihre Umgebung ihren Bedürfnissen anzupassen. Neben Coronatin besitzt *Pseudomonas* noch weitere Effektoren, sodass möglicherweise erst die Kombination mit anderen Effektoren für eine erfolgreiche Infektion verantwortlich ist (Chang et al., 2005). So scheint *Pseudomonas* während seines Infektionszyklus' zunächst die ABA-Signalgebung zu unterdrücken, um sie im späteren Verlauf wieder zu aktivieren. Dies könnte eine Austrocknung der Pflanze nach der Invasion verhindern, die wiederum auch für die Bakterien ungünstig wäre (de Torres-Zabala et al., 2007).

#### 4.3.2 ABA-Beteiligung an der Jasmonat-Signaltransduktion

Eng mit der Signalwirkung von Phytohormonen ist deren Synthese verbunden, die durch andere Phytohormone gehemmt oder stimuliert werden kann. Der Einfluss von JA auf die ABA-Synthese und deren Voraussetzung für den JA-vermittelten Stomaschluss wurde hier wie auch in anderen Studien untersucht. Zwar ist ABA-Synthesemutante *aba2* in Stoma-Assays MeJA-insensitiv, reagierte aber in Anwesenheit von 0,5  $\mu$ M wieder auf ABA (Ye et al., 2013). Allerdings reagierte die ABA-Synthesemutante *aba3-1* in den Messungen dieser Arbeit auf MeJA, und wies auch keine verlangsamte Kinetik auf (Abschn. 3.3.1; 3.3.2). ABA3 wird für die Bildung eines wichtigen Cofaktors der ABA-Synthese benötigt. Die Verlustmutante *aba3-1* besitzt trotzdem einen normalen ABA-Spiegel, der, anders als beim Wildtyp, unter Stress nicht ansteigen kann (Xiong et al., 2001). Daher könnten basale ABA-Level bereits ausreichen, wenn beispielsweise JA die Sensitivität gegenüber ABA auf einen noch unbekanntem Mechanismus erhöhen würde. Eine Behandlung mit MeJA löste dennoch eine geringe, aber signifikante Synthese von ABA in Schließzellen aus (Abschn. 3.3.1). Da dies gemessen wurde als die Stomata bereits geschlossen hatten, ist nicht ganz klar, ob die *de novo* Synthese von ABA tatsächlich zum Stomaschluss beiträgt, oder ob sie vielleicht für der Aufrechterhaltung des Stomaschlusses dient. Umgekehrt führt ABA in Keimlingen zu einer geringen Jasmonatsynthese (Larrieu et al., 2015). Ob dies in Schließzellen ebenso ist, müsste allerdings experimentell überprüft werden, beispielsweise mit dem von Larrieu und Kollegen (2015) beschriebenen Jasmonat-Biosensor. MeJA wirkt dennoch nicht völlig unabhängig vom ABA-Signalweg in Schließzellen. Die ABA-Rezeptormutante *pyr/pyl12458* ist insensitiv gegenüber MeJA und ABA (Abschn. 3.3.1). PYL8 konnte kürzlich mit der Pathogenabwehr bei Infektion mit *P. syringae* in Verbindung gebracht werden. Der ABA-Rezeptor scheint die Einleitung des Stomaschlusses zu vermitteln, jedoch im späteren Infektionsverlauf pflanzliche Abwehrmechanismen zu unterdrücken (Lim et al., 2014). Man könnte annehmen, dass bei nach einer JA-eingeleiteten ABA-Bindung an die PYR/PYL-Rezeptoren der übliche ABA-Signalweg aktiviert wird. Obwohl sich die beiden Signalwege gemeinsame Komponenten teilen, scheint JA allerdings einen eigenständigen, weniger redundanten Stomaschluss-Signalweg als ABA zu besitzen. Bislang ist noch unklar weshalb der ABA-, aber nicht der JA-vermittelte Stomaschluss so ein robustes Netzwerk bildet (Murata et al., 2015). Die ABA-Signaltransduktion ist geprägt von einer hohen Redundanz der Komponenten, sodass die

Analyse und Bewertung von Einzelmutanten nicht immer eindeutig ist. Beispiele hierfür sind die PYR/PYL-Rezeptoren, die PP2Cs, aber auch die kürzlich entdeckten KUP- K<sup>+</sup>-Transporter (Rubio et al., 2009; Gonzalez-Guzman et al., 2012; Osakabe et al., 2013a).

#### 4.3.3 Die Bedeutung der JAZ-Proteine und der JA-Ile-Synthese für den Stomaschluss

Während der Signalweg des JA-vermittelten Stomaschlusses an sich zwar nicht durch Redundanzen gekennzeichnet ist, wurde dies jedoch für die JAZ-Proteine in der JA-abhängigen Genexpression beschrieben (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Yan et al., 2007). JAZ-Repressoren koordinieren den Crosstalk von JA mit anderen Phytohormonen, indem sie mit Transkriptionsfaktoren und Corepressoren wie TOPLESS interagieren (Kazan und Manners, 2012). Beispielsweise wurde MYC2 zunächst als Transkriptionsfaktor im ABA-Signalweg beschrieben, bevor dessen Interaktion mit den JAZ-Repressoren entdeckt wurde (Abe et al., 2003; Fernandez-Calvo et al., 2011). TOPLESS dagegen verbindet den JA-Signalweg mit der Auxin- und der Brassinosteroid-Signaltransduktion (Szemenyei et al., 2008; Pauwels et al., 2010; Oh et al., 2014). Bislang ist allerdings noch nicht geklärt, ob der Stomaschluss tatsächlich durch JAZ-Proteine vermittelt wird, oder ob COI1 nicht mit weiteren, noch unbekanntem Interaktionspartnern interagiert. Ob JAZ2, JAZ7 oder andere JAZ-Proteine an der Regulation der Stomabewegungen beteiligt sind, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, da mögliche Redundanzen mit anderen JAZ-Proteinen einen MeJA-insensitiven Phänotyp verschleiern könnten (Abschn. 3.3.1). Hier könnte die Untersuchung von Mehrfach-Verlustmutanten vielversprechend sein, ähnlich wie bei den PYR/PYLs oder den PP2C-Phosphatasen (Rubio et al., 2009; Gonzalez-Guzman et al., 2012). Erst kürzlich wurde ein neues Mitglied der JAZ-Familie beschrieben, das putative Phosphorylierungsstellen besitzt (Thireault et al., 2015). Ob die Aktivität von JAZ13 tatsächlich durch Phosphorylierung reguliert wird- und falls ja, durch welche Kinasen und Phosphatasen- wurde noch nicht geklärt. Neben dem gezielten Abbau durch COI1 nach JA-Ile-Bindung würde dies ein interessanter zweiter Regulationsmechanismus der JAZ-Proteine darstellen.

Als bislang einziger bekannter Jasmonatrezeptor bindet COI1 selektiv JA-Ile, aber nicht MeJA oder andere Aminosäurekonjugate (Fonseca et al., 2009). Obwohl es zwar weitere Enzyme der

GH3-Familie gibt, die Aminosäuren mit Jasmonat verknüpfen, wurde bislang nur JAR1 identifiziert, das JA-Ile synthetisiert (Wasternack und Hause, 2013). Die Verlustmutante *jar1* reagierte in einer früheren Studie nur schwach auf MeJA, wenn Stomata von Epidermisstreifen damit behandelt wurden (Suhita et al., 2004). Dies konnte in den Messungen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Hier reagierten die Stomata von *jar1* ähnlich gut auf MeJA wie auf ABA (Abschn. 3.3.1). Möglicherweise ist es auf Unterschiede im experimentellen Aufbau und/oder des verwendeten Pflanzenmaterials zurückzuführen, dass *jar1* je nach Studienbedingungen trotzdem noch JA-Ile zu produzieren scheint. Möglich wäre beispielsweise, dass unter bestimmten Bedingungen andere GH3-Proteine im Blatt JA-Ile herstellen. Dies müsste allerdings experimentell überprüft werden, beispielsweise durch Messung der JA-Ile-Konzentration.

#### 4.3.4 Gezielter Proteinabbau im Stomaschluss

Bereits vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass COI1 für den JA-vermittelten Stomaschluss essentiell ist, nicht jedoch für den ABA-induzierten (Munemasa et al., 2007). Durch Stoma-Assays mit dem Proteaseinhibitors MG132 konnte im Rahmen dieser Arbeit sowie einer weiteren Studien gezeigt werden, dass der gezielte Abbau von Proteinen sowohl im ABA-, als auch im MeJA-induzierten Stomaschluss benötigt wird (Abschn. 3.3.4; Khanna et al., 2014). Die Ubiquitin-E3-Ligase COP1 (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1) führt im ABA-vermittelten Stomaschluss zum Abbau der Mikrotubuli und somit zur Reorganisation des Cytoskeletts, sowie zur Aktivierung von S-Typ-Anionenkanälen (Khanna et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Ergebnis jedoch nicht für ABA wiederholt werden (Abschn. 3.3.4). Dies könnte möglicherweise auf Unterschiede im verwendeten Pflanzenmaterial, wie Anzuchtbedingungen oder Alter, sowie den experimentellen Bedingungen zurückzuführen sein. Die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration führte lediglich zu einer MeJA-Insensitivität von MG132-vorbehandelten Blättern (Abschn. 3.3.4). Die Proteindegradation wird demnach für den Jasmonat-induzierten Stomaschluss benötigt. Möglich wäre, dass ABA über COP1 zum Abbau von Schlüsselregulatoren führt, während die JA-induzierte Degradation durch COI1 und die JAZ-Repressoren vermittelt wird (Khanna et al., 2014). Eine

Konzentrationsreihe mit MG132 könnte darüber Aufschluss geben, ob die Poren vielleicht erst bei höheren Konzentrationen des Inhibitors insensitiv auf ABA werden.

Welche Proteine von COI1 nach Bindung von JA-Ile in Schließzellen ubiquitinyliert werden, ist noch nicht bekannt. Mögliche Ziele in der Stomaregulation könnten beispielsweise Negativregulatoren des Stomaschlusses wie ABI1 oder ABI2 sein. Durch das Entfernen eines Negativregulators könnte das Gleichgewicht zwischen der Inhibierung der Kinasen durch die Phosphatasen auf der einen Seite und der Inhibierung der Phosphatasen durch PYR/PYLs auf der anderen Seite zu den Rezeptoren hin verschoben werden. Dadurch würden die Kinasen in geringerem Maße inhibiert werden, sodass diese ihre Zielproteine phosphorylieren und damit aktivieren könnten. Zwar wird ABI1 nicht durch das Ubiquitin/26S-Proteasom-System abgebaut, doch eine Regulation der ebenfalls kernlokalisierten ABI2 durch Proteindegradation wurde noch nicht untersucht (Moes et al., 2008). Möglich wäre also, dass JA den Abbau von Repressoren des ABA-Signalwegs wie ABI2 verursachen, und dadurch den Stomaschluss einleiten. Neben dem Abbau der Phosphatase selbst wäre auch ein weiterer Regulationsmechanismus denkbar, in dem durch die Phosphatase Proteine zum Abbau markiert werden. Wie bereits in Abschn. 4.2.2 erwähnt, wurde ABI1 als potentieller Regulator im gezielten Proteinabbau von Kinasen sowie einigen Transkriptionsfaktoren wie ABI5 (ABA INSENSITIVE 5) vorgeschlagen (Ludwikow, 2015). ABI5 ist an vielen ABA-regulierten Prozessen beteiligt wie dem Stomaschluss, aber auch an Samenruhe und Keimung sowie der Blühinduktion (Rushton et al., 2012; Yu et al., 2015). Die Menge von ABI5 wird durch die E3-Ligase KEG (KEEP ON GOING) reguliert, deren Abbau wiederum durch ABA ausgelöst wird (Liu und Stone, 2010). Dies könnte vielleicht durch die kernlokalisierten Phosphatasen ABI1 oder auch ABI2 vermittelt werden. Interessanterweise wird ABI5 selbst durch Kinasen der CIPK- und der SnRK2-Familie wie OST1 phosphoryliert sowie durch zwei Phosphatasen dephosphoryliert, was Auswirkungen auf die Proteinstabilität und -aktivität von ABI5 hat (Yu et al., 2015).

#### 4.3.5 physiologische Rolle des JA-induzierten Stomaschlusses

Während die physiologische Relevanz des ABA-vermittelten Stomaschlusses- Schutz der Pflanze vor Austrocknung bei Wassermangel (Schroeder et al., 2001)- wohlbekannt ist, kann über die Rolle von Jasmonat in der Stomaregulation kann bislang nur spekuliert werden. Wie bereits in Abschn. 4.2.4 erläutert, könnte JA den Stomaschluss gegen nekrotrophe Pathogene wie *P. carotovorum* vermitteln, wohingegen SA in Stomata für die Abwehr von biotrophen Pathogenen wie *P. syringae* verantwortlich wäre. Proteinabbau durch das Ubiquitin/26S-Proteasom-System scheint auch für den pathogen-induzierten Stomaschluss wichtig zu sein. *P. syringae* setzt den Protease-Inhibitor Syringolin A ein, um die Poren zu öffnen (Schellenberg et al., 2010). Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass der JA-Signalweg von *P. syringae* zu dessen Gunsten ausgenutzt wird. Während die Rolle von JA im pathogeninduzierten Stomaschluss möglicherweise eng mit der Art des angreifenden Pathogens zusammenhängt, könnte JA auch bei der Toleranz von abiotischem Stress von Bedeutung sein. JA fördern die Toleranz gegen Faktoren wie Kälte, Salz und Trockenheit (Kazan, 2015). Eine Verlustmutante von COI1 scheint wider Erwarten keine erhöhte Sensitivität gegenüber Trockenstress aufzuweisen (Murata et al., 2015). In Wurzeln jedenfalls scheint JA für die ABA-Anreicherung bei Trockenstress benötigt zu werden und die Leitfähigkeit der Wurzeln zu erhöhen (Sanchez-Romera et al., 2014; de Ollas et al., 2015).

JA spielen auch eine Rolle in der Hemmung des Pflanzenwachstums. JA unterdrückt das Wachstum von Blättern und Wurzeln, um die Verteidigung gegen Pathogene und Herbivore priorisieren (Staswick et al., 1992; Yang et al., 2012; Noir et al., 2013). Des Weiteren wird durch biotischen Stress auch die Photosyntheserate gesenkt (Berger et al., 2007; Bilgin et al., 2010). Durch ein Verschließen der Stomata könnte das für die Photosynthese verfügbare CO<sub>2</sub> limitiert werden, um die Photosyntheserate weiter zu verringern. Obwohl die Hemmung der Photosynthese bei biotischem Stress bei vielen Pflanzen beobachtet werden kann, ist die physiologische Bedeutung dessen noch kaum verstanden (Reymond et al., 2004; Zou et al., 2005; Giri et al., 2006; Attaran et al., 2014). Es wäre interessant zu sehen, ob ein Herbivorenbefall tatsächlich einen Schluss der Stomata auslösen kann.

#### 4.4 Ausblick

Mehrere unterschiedliche Aspekte der jasmonat-vermittelten Schließzellbewegungen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Zunächst wurde die Regulation des Kaliumkanals GORK untersucht, der durch OST1, CBL1/9-CIPK5 und CBL1-CIPK23 phosphoryliert wird. ABI2, nicht aber ABI1 dephosphoryliert und inhibiert den Kanal. Trotz hoher Sequenzhomologie mit ABI1 scheint ABI2 als Negativregulator von GORK und damit der JA-kontrollierten Stomabewegungen eine eigene Rolle zu besitzen. Die Ergebnisse der Stoma-Assays von *abi2-1* und *abi2-2* implizieren (Abschn. 3.2.3, 3.2.4), dass ABI2 weitere, noch unbekannt Funktionen in der Stomaregulation hat. Wie in Abschn. 4.2.2 und 4.3.4 erläutert, könnte ABI2 im gezielten Abbau von Regulatoren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren der ABA-regulierten Genexpression, involviert sein. Eng mit der Degradation von Proteinen sind E3-Ligasen wie COI1 verknüpft. Welche Ziele von COI1 im JA-induzierten Stomaschluss zum Abbau markiert werden, ist jedoch noch nicht bekannt. Eine Untersuchung, ob und auf welche Weise COI1 oder andere E3-Ligasen und ABI2 miteinander in Verbindung stehen, könnte wichtige Hinweise auf die frühen Ereignisse nach Initiation des Stomaschlusses geben, insbesondere auf den Crosstalk zwischen JA und ABA. Dies könnte auch das Wissen über die komplexen Wechselwirkungen zwischen Genexpression, Proteinabbau und reversiblen Modifizierungen wie Phosphorylierung vertiefen.

Auf physiologischer Ebene konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Komponenten der in Abschn. 3.1 untersuchten GORK-Regulation mehrheitlich essentiell sind für den JA-vermittelten Stomaschluss (Abschn. 3.2). GORK wird jedoch auch in Wurzelhaaren sowie der -epidermis exprimiert. Hier scheint der Kanal antagonistisch zum einwärtsgerichtenden Shaker AKT1 den Kaliumgehalt der Pflanze an deren physiologischen Bedürfnisse anzupassen. Beide Kanäle werden in heterologen Expressionssystemen durch CBL1/9-CIPK23 phosphoryliert, aber durch unterschiedliche Phosphatasen inhibiert (Abschn. 3.1; Lee et al., 2007). Daher könnte die Regulation des K<sup>+</sup>-Effluxes in Wurzeln untersucht werden, da GORK hier durch ABI2 und CBL1/9-CIPK23 sowie durch ROS reguliert werden könnte. Es wäre interessant zu sehen, ob in den entsprechenden Verlustmutanten von ABI2 und CBL1/9-CIPK23 mit nichtinvasiven Methoden wie MIFE noch ein K<sup>+</sup>-Ausstrom durch GORK gemessen werden kann. SA verringert den K<sup>+</sup>-Ausstrom durch GORK in Wurzeln, sodass JA als SA-Antagonist hier die GORK-Regulation positiv beeinflussen könnte (Jayakannan et al., 2013).



Die Untersuchung des JA-SA-Crosstalks in Wurzeln könnte einige hochinteressante Erkenntnisse bieten, da beide Phytohormone die Toleranz der Pflanze gegenüber Salzstress verbessern (Okuma et al., 2014; Kazan, 2015). Das klassisch mit Salzstress assoziierte Hormon ist jedoch ABA, sodass hier die Feinabstimmung des Crosstalks zwischen gleich drei Phytohormonen untersucht werden könnte (Golldack et al., 2014).

In den letzten Jahren kristallisierte sich immer mehr heraus, dass die pflanzliche Signalgebung nicht aus unabhängigen und parallel geschalteten Signalwegen besteht, sondern ein dichtes Netzwerk aus zahlreichen Knotenpunkten und Wechselwirkungen auf zellulärer Ebene bildet (Pieterse et al., 2009; Santner und Estelle, 2009; Golldack et al., 2014). Das Verständnis der drei wichtigsten Mechanismen zur pflanzlichen Feinabstimmung dieses Netzwerks-Proteinabbau durch das Ubiquitin/26S-Proteasom-System, Phosphorylierung und Transkription- wächst stetig, insbesondere auch ihre komplexen Interaktionen miteinander (Vierstra, 2009). Groß angelegte transkriptomische, proteomische, aber auch bioinformatische Analysen werden in den kommenden Jahren von großer Bedeutung für die Entschlüsselung des pflanzlichen Signalnetzwerks sein.





## V. Zusammenfassung

Stomata sind mikroskopisch kleine Poren in der Blattoberfläche der Landpflanzen, über die das Blattgewebe mit CO<sub>2</sub> versorgt wird. Als Schutz vor Austrocknung oder einer Infektion durch Pathogene entwickelte sich ein Mechanismus, um die Porenweite durch Bewegung der sie umgebenden Schließzellen an die Bedürfnisse der Pflanze anzupassen. Ein eng geknüpftes Signalnetzwerk kontrolliert diese Bewegungen und ist in der Lage, externe wie interne Stimuli zu verarbeiten. Der Schließvorgang wird osmotisch durch den Turgorverlust in den Schließzellen angetrieben, der durch den Efflux von Ionen wie K<sup>+</sup> ausgelöst wird. In dieser Arbeit wurde die Regulation durch Phosphorylierung des wichtigsten K<sup>+</sup>-Effluxkanals für den Stomaschluss, GORK, untersucht. Folgende Erkenntnisse wurden durch elektrophysiologische Untersuchungen mit der DEVC-Methode gewonnen: GORK wird durch OST1 auf Ca<sup>2+</sup>-unabhängige und durch CBL1/9-CIPK5 und CBL1-CIPK23 auf Ca<sup>2+</sup>-abhängige Weise phosphoryliert und damit aktiviert. CBL1 muss CIPK5 an der Plasmamembran verankern und Ca<sup>2+</sup> binden. CIPK5 benötigt ATP und eine Konformationsänderung, um GORK zu phosphorylieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch zum ersten Mal gezeigt, dass die PP2C-Phosphatase ABI2 direkt mit einem Kanal interagiert und dessen Aktivität hemmt. ABI2 interagiert auch mit den Kinasen OST1, CIPK5 und CIPK23, sodass die Kontrolle der Kanalaktivität auf multiple Weise stattfinden kann. OST1 und ABI2 verbinden die GORK-Regulation mit dem ABA-Signalweg. Schließzellen von *gork1-2*, *cbl1/cbl9* und *cipk5-2* sind insensitiv auf MeJA, nicht aber auf ABA. Dies stellt eine direkte Verbindung zwischen dem Jasmonatsignalweg und der Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Hinweise für das komplexe Zusammenspiel der Phytohormone ABA, JA und des *Pseudomonas*-Effektors Coronatin gefunden werden. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Schließzellen je nach Inkubationszeit unterschiedlich auf MeJA und das Phytotoxin Coronatin reagieren. ABA und Coronatin verhalten sich dabei antagonistisch zueinander, wobei der Effekt der Stimuli auf die Stomaweite von der zeitlichen Abfolge der Perzeption abhängt. Der Jasmonat-Signalweg in Schließzellen löst eine geringe ABA-Synthese sowie den Proteinabbau durch das Ubiquitin/26S-Proteasom-System aus und benötigt ABA-Rezeptoren (PYR/PYLs), um einen Stomaschluss einzuleiten. Durch diese Arbeit konnte somit die JA-gesteuerte Regulation des Kaliumefflux-Kanals GORK entschlüsselt sowie einige Unterschiede zwischen den ABA, JA und Coronatin-vermittelten Schließzellbewegungen aufgedeckt werden.



## VI. Summary

Stomata are microscopically small pores in the leaf surface of land plants, through which the leaf tissue is supplied with CO<sub>2</sub>. To protect the plant from both desiccation and infection by pathogens, a mechanism evolved to adjust the pore width to the plant's needs by movement of the surrounding guard cells. A dense signaling network controls these movements and is able to integrate external as well as internal stimuli. Stomatal closure is osmotically driven by the loss of turgor in guard cells caused by efflux of ions such as K<sup>+</sup>.

In this work, we investigated the regulation by phosphorylation of the main K<sup>+</sup> efflux channel for stomatal closure, GORK. The following results were obtained with electrophysiological measurements via the DEVC- technique: GORK is phosphorylated by OST1 in a Ca<sup>2+</sup>-independent and by CBL1/9-CIPK5 as well as CBL1-CIPK23 in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. CBL1 anchors CIPK5 at the plasma membrane and must bind Ca<sup>2+</sup> for activation of CIPK5. CIPK5 requires both ATP binding and a conformational change for phosphorylation of GORK. For the first time it was shown that the PP2C phosphatase ABI2 interacts directly with an ion channel and inhibits its activity. ABI2 also interacts with the kinases OST1, CIPK5 and CIPK23, implying a control by ABI2 over channel activity in multiple ways. OST1 and ABI2 link GORK regulation with the ABA signaling pathway. Guard cells of *gork1-2*, *cbl1/cbl9* and *cipk5-2* are insensitive to MeJA, but not to ABA. This represents a direct connection between JA signal transduction and Ca<sup>2+</sup> signaling. In this work, further hints could be found for the complex interplay of the phytohormones ABA, JA and the effector Coronatine of *Pseudomonas*. Here it was shown for the first time that guard cells respond differently to MeJA and the phytotoxin Coronatine, based on incubation time. Depending on the temporal sequence of perception, ABA and Coronatine act antagonistically on the pore width. Jasmonate signal transduction in guard cells leads to a minor synthesis of ABA as well as protein degradation via the ubiquitin/ 26S proteasome system and initiates stomatal closure requiring ABA receptors (PYR/PYLs). This work describes the JA-controlled regulation of the potassium efflux channel GORK as well as some differential aspects of ABA, JA and Coronatine triggered stomatal movements.



## VII. Anhang

### 7.1 Referenzen

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant cell* 15:63-78.
- Acharya, B.R., Jeon, B.W., Zhang, W. und Assmann, S.M. (2013). Open Stomata 1 (OST1) is limiting in abscisic acid responses of Arabidopsis guard cells. *The New phytologist*.
- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R. und Hedrich, R. (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of Arabidopsis thaliana, is a K(+)-selective, K(+)-sensing ion channel. *FEBS letters* 486:93-98.
- Acosta, I.F. und Farmer, E.E. (2010). Jasmonates. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 8:e0129.
- Adie, B.A., Perez-Perez, J., Perez-Perez, M.M., Godoy, M., Sanchez-Serrano, J.J., Schmelz, E.A. und Solano, R. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *The Plant cell* 19:1665-1681.
- Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, U., Bock, R., Schulz, B., Harter, K. und Kudla, J. (2003). The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 36:457-470.
- Allegre, M., Daire, X., Heloir, M.C., Trouvelot, S., Mercier, L., Adrian, M. und Pugin, A. (2007). Stomatal deregulation in Plasmopara viticola-infected grapevine leaves. *The New phytologist* 173:832-840.
- Allen, R.L., Meitz, J.C., Baumber, R.E., Hall, S.A., Lee, S.C., Rose, L.E. und Beynon, J.L. (2008). Natural variation reveals key amino acids in a downy mildew effector that alters recognition specificity by an Arabidopsis resistance gene. *Molecular plant pathology* 9:511-523.
- Amodeo, G., Srivastava, A. und Zeiger, E. (1992). Vanadate inhibits blue light-stimulated swelling of vicia guard cell protoplasts. *Plant physiology* 100:1567-1570.
- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L. und Marion-Poll, A. (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in plant science* 4:63.
- Arnaud, D. und Hwang, I. (2014). A Sophisticated Network of Signaling Pathways Regulates Stomatal Defenses to Bacterial Pathogens. *Molecular plant*.
- Arnaud, D. und Hwang, I. (2015). A Sophisticated Network of Signaling Pathways Regulates Stomatal Defenses to Bacterial Pathogens. *Molecular plant* 8:566-581.
- Attaran, E., Major, I.T., Cruz, J.A., Rosa, B.A., Koo, A.J., Chen, J., Kramer, D.M., He, S.Y. und Howe, G.A. (2014). Temporal Dynamics of Growth and Photosynthesis Suppression in Response to Jasmonate Signaling. *Plant physiology* 165:1302-1314.
- Aubert, Y., Widemann, E., Miesch, L., Pinot, F. und Heitz, T. (2015). CYP94-mediated jasmonoyl-isoleucine hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defence responses to Botrytis cinerea infection. *Journal of experimental botany*.
- Bak, G., Lee, E.J., Lee, Y., Kato, M., Segami, S., Sze, H., Maeshima, M., Hwang, J.U. und Lee, Y. (2013). Rapid structural changes and acidification of guard cell vacuoles during stomatal closure require phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate. *The Plant cell* 25:2202-2216.
- Barrero, J.M., Piqueras, P., Gonzalez-Guzman, M., Serrano, R., Rodriguez, P.L., Ponce, M.R. und Micol, J.L. (2005). A mutational analysis of the ABA1 gene of Arabidopsis thaliana highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of experimental botany* 56:2071-2083.
- Batistic, O. und Kudla, J. (2009). Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et biophysica acta* 1793:985-992.
- Batistic, O., Sorek, N., Schultke, S., Yalovsky, S. und Kudla, J. (2008). Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca<sup>2+</sup> signaling complexes in Arabidopsis. *The Plant cell* 20:1346-1362.
- Batistic, O., Waadt, R., Steinhorst, L., Held, K. und Kudla, J. (2010). CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 61:211-222.
- Bauer, H., Ache, P., Lautner, S., Fromm, J., Hartung, W., Al-Rasheid, K.A., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kneitz, S., Lachmann, N., et al. (2013). The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Current biology : CB* 23:53-57.
- Baunsgaard, L., Fuglsang, A.T., Jahn, T., Korthout, H.A., de Boer, A.H. und Palmgren, M.G. (1998). The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane H(+)-ATPase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin responsive system. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 13:661-671.
- Becker, D., Hoth, S., Ache, P., Wenkel, S., Roelfsema, M.R., Meyerhoff, O., Hartung, W. und Hedrich, R. (2003). Regulation of the ABA-sensitive Arabidopsis potassium channel gene GORK in response to water stress. *FEBS letters* 554:119-126.



- Belin, C., de Franco, P.O., Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J.M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H. und Thomine, S. (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant physiology* 141:1316-1327.
- Berger, S., Benediktyova, Z., Matous, K., Bonfig, K., Mueller, M.J., Nedbal, L. und Roitsch, T. (2007). Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of experimental botany* 58:797-806.
- Bilgin, D.D., Zavala, J.A., Zhu, J., Clough, S.J., Ort, D.R. und DeLucia, E.H. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, cell & environment* 33:1597-1613.
- Blatt, M.R. und Gradmann, D. (1997). K(+)-sensitive gating of the K+ outward rectifier in *Vicia* guard cells. *The Journal of membrane biology* 158:241-256.
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H. und Lauriere, C. (2004). Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* 279:41758-41766.
- Boudsocq, M., Droillard, M.J., Regad, L. und Lauriere, C. (2012). Characterization of *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium? *The Biochemical journal* 447:291-299.
- Boudsocq, M. und Sheen, J. (2013). CDPKs in immune and stress signaling. *Trends in plant science* 18:30-40.
- Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjarvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A.B., Hu, H. und Schroeder, J.I. (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:10593-10598.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. und Neill, S.J. (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 45:113-122.
- Brooks, D.M., Bender, C.L. und Kunkel, B.N. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant pathology* 6:629-639.
- Brooks, D.M., Hernandez-Guzman, G., Kloek, A.P., Alarcon-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., Penaloza-Vazquez, A., Bender, C.L. und Kunkel, B.N. (2004). Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 17:162-174.
- Browse, J. (2009). The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. *Phytochemistry* 70:1539-1546.
- Bruessow, F., Gouhier-Darimont, C., Buchala, A., Metraux, J.P. und Reymond, P. (2010). Insect eggs suppress plant defence against chewing herbivores. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62:876-885.
- Chang, J.H., Urbach, J.M., Law, T.F., Arnold, L.W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S.R., Ausubel, F.M. und Dangl, J.L. (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:2549-2554.
- Chen, L., Wang, Q.Q., Zhou, L., Ren, F., Li, D.D. und Li, X.B. (2013). *Arabidopsis* CBL-interacting protein kinase (CIPK6) is involved in plant response to salt/osmotic stress and ABA. *Molecular biology reports* 40:4759-4767.
- Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C. und Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant physiology* 129:469-485.
- Cheong, Y.H., Kim, K.N., Pandey, G.K., Gupta, R., Grant, J.J. und Luan, S. (2003). CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 15:1833-1845.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J. und Luan, S. (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 52:223-239.
- Chico, J.M., Chini, A., Fonseca, S. und Solano, R. (2008). JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Current opinion in plant biology* 11:486-494.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. und Felix, G. (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant cell* 18:465-476.
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J.M., Fernandez-Calvo, P. und Solano, R. (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 59:77-87.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., et al. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448:666-671.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T. und Muller-Rober, B. (1997). New structure and function in plant K+ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca<sup>2+</sup> dependency. *The EMBO journal* 16:2565-2575.
- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J. und Hirt, H. (2013). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology advances*.
- Darwin, F. (1898). Observations on Stomata. *Philos Trans R Soc Lond B* 190:531-621.
- Das, R. und Pandey, G.K. (2010). Expressional analysis and role of calcium regulated kinases in abiotic stress signaling. *Current genomics* 11:2-13.
- Daszkowska-Golec, A. und Szarejko, I. (2013). Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in plant science* 4:138.

- De Geyter, N., Gholami, A., Goormachtig, S. und Goossens, A. (2012). Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in plant science* 17:349-359.
- de Ollas, C., Arbona, V. und Gomez-Cadenas, A. (2015). Jasmonoyl isoleucine accumulation is needed for abscisic acid build-up in roots of *Arabidopsis* under water stress conditions. *Plant, cell & environment*.
- De Smet, I., Zhang, H., Inze, D. und Beeckman, T. (2006). A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in plant science* 11:434-439.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Rodriguez Egea, P., Bogre, L. und Grant, M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO journal* 26:1434-1443.
- Demidchik, V., Cuin, T.A., Svistunenko, D., Smith, S.J., Miller, A.J., Shabala, S., Sokolik, A. und Yurin, V. (2010). *Arabidopsis* root K<sup>+</sup>-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of cell science* 123:1468-1479.
- Dennison, K.L., Robertson, W.R., Lewis, B.D., Hirsch, R.E., Sussman, M.R. und Spalding, E.P. (2001). Functions of AKT1 and AKT2 potassium channels determined by studies of single and double mutants of *Arabidopsis*. *Plant physiology* 127:1012-1019.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T. und Neill, S.J. (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of experimental botany* 55:205-212.
- Desikan, R., Last, K., Harrett-Williams, R., Tagliavia, C., Harter, K., Hooley, R., Hancock, J.T. und Neill, S.J. (2006). Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 47:907-916.
- Ding, Y., Li, H., Zhang, X., Xie, Q., Gong, Z. und Yang, S. (2015). OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis*. *Developmental cell* 32:278-289.
- Dodd, A.N., Kudla, J. und Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annual review of plant biology* 61:593-620.
- Dou, D. und Zhou, J.M. (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell host & microbe* 12:484-495.
- Drerup, M.M., Schlucking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K. und Kudla, J. (2013). The Calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF. *Molecular plant* 6:559-569.
- Dreyer, I. und Blatt, M.R. (2009). What makes a gate? The ins and outs of Kv-like K<sup>+</sup> channels in plants. *Trends in plant science* 14:383-390.
- Dreyer, I., Gomez-Porrás, J.L., Riano-Pachon, D.M., Hedrich, R. und Geiger, D. (2012). Molecular Evolution of Slow and Quick Anion Channels (SLACs and QUACs/ALMTs). *Frontiers in plant science* 3:263.
- Dreyer, I., Poree, F., Schneider, A., Mittelstadt, J., Bertl, A., Sentenac, H., Thibaud, J.B. und Mueller-Roeber, B. (2004). Assembly of plant Shaker-like K(out) channels requires two distinct sites of the channel alpha-subunit. *Biophysical journal* 87:858-872.
- Du, S.Y., Zhang, X.F., Lu, Z., Xin, Q., Wu, Z., Jiang, T., Lu, Y., Wang, X.F. und Zhang, D.P. (2012). Roles of the different components of magnesium chelatase in abscisic acid signal transduction. *Plant molecular biology* 80:519-537.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C.P., Schulze, W.X. und Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:8744-8749.
- Eisenach, C., Papanatsiou, M., Hillert, E.K. und Blatt, M.R. (2014). Clustering of the K channel GORK of *Arabidopsis* parallels its gating by extracellular K. *The Plant journal : for cell and molecular biology*.
- Eisinger, W., Ehrhardt, D. und Briggs, W. (2012). Microtubules are essential for guard-cell function in *Vicia* and *Arabidopsis*. *Molecular plant* 5:601-610.
- Emi, T., Kinoshita, T. und Shimazaki, K. (2001). Specific binding of vfl4-3-3a isoform to the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in response to blue light and fusicoccin in guard cells of broad bean. *Plant physiology* 125:1115-1125.
- Erb, M., Meldau, S. und Howe, G.A. (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in plant science* 17:250-259.
- Escalante-Perez, M., Jaborsky, M., Lautner, S., Fromm, J., Muller, T., Dittrich, M., Kunert, M., Boland, W., Hedrich, R. und Ache, P. (2012). Poplar extrafloral nectaries: two types, two strategies of indirect defenses against herbivores. *Plant physiology* 159:1176-1191.
- Evans, N.H. (2003). Modulation of guard cell plasma membrane potassium currents by methyl jasmonate. *Plant physiology* 131:8-11.
- Fernandez-Calvo, P., Chini, A., Fernandez-Barbero, G., Chico, J.M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., et al. (2011). The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant cell* 23:701-715.
- Feussner, I. und Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual review of plant biology* 53:275-297.
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid synthesis and response. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 11:e0166.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T. und Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual review of plant biology* 59:387-415.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C. und Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature chemical biology* 5:344-350.

- Freeman, B.C. und Beattie, G.A. (2009). Bacterial growth restriction during host resistance to *Pseudomonas syringae* is associated with leaf water loss and localized cessation of vascular activity in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 22:857-867.
- Fujii, H., Verslues, P.E. und Zhu, J.K. (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 19:485-494.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:1988-1993.
- Gambale, F. und Uozumi, N. (2006). Properties of shaker-type potassium channels in higher plants. *The Journal of membrane biology* 210:1-19.
- Garcia-Mata, C. und Lamattina, L. (2013). Gasotransmitters are emerging as new guard cell signaling molecules and regulators of leaf gas exchange. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 201-202:66-73.
- Gayatri, G., Agurla, S. und Raghavendra, A.S. (2013). Nitric oxide in guard cells as an important secondary messenger during stomatal closure. *Frontiers in plant science* 4:425.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferriere, N., Thibaud, J.B. und Sentenac, H. (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* 94:647-655.
- Geiger, D., Becker, D., Vosloh, D., Gambale, F., Palme, K., Rehers, M., Anschuetz, U., Dreyer, I., Kudla, J. und Hedrich, R. (2009a). Heteromeric AtKC1\*AKT1 channels in *Arabidopsis* roots facilitate growth under K<sup>+</sup>-limiting conditions. *The Journal of biological chemistry* 284:21288-21295.
- Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., et al. (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Science signaling* 4:ra32.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., et al. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:8023-8028.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A., et al. (2009b). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:21425-21430.
- Geng, X., Cheng, J., Gangadharan, A. und Mackey, D. (2012). The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of *Arabidopsis* defense. *The Plant cell* 24:4763-4774.
- Gerhardt, L.B.A., Sachetto-Martins, G., Contarini, M.G., Sandroni, M., de, P.F.R., de Lima, V.M., Cordeiro, M.C., de Oliveira, D.E. und Margis-Pinheiro, M. (1997). *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. *FEBS letters* 419:69-75.
- Giri, A.P., Wunsche, H., Mitra, S., Zavala, J.A., Muck, A., Svatos, A. und Baldwin, I.T. (2006). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VII. Changes in the plant's proteome. *Plant physiology* 142:1621-1641.
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E.E. und Wolfender, J.L. (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *The Journal of biological chemistry* 283:16400-16407.
- Goel, A.K., Lundberg, D., Torres, M.A., Matthews, R., Akimoto-Tomiyama, C., Farmer, L., Dangl, J.L. und Grant, S.R. (2008). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 21:361-370.
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H. und Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in plant science* 5.
- Gong, D., Guo, Y., Jagendorf, A.T. und Zhu, J.K. (2002). Biochemical characterization of the *Arabidopsis* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant physiology* 130:256-264.
- Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G.A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G.W., Fernandez, M.A., Holdsworth, M.J., Perez-Amador, M.A., Kollist, H., et al. (2012). *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *The Plant cell* 24:2483-2496.
- Goodspeed, D., Chehab, E.W., Min-Venditti, A., Braam, J. und Covington, M.F. (2012). *Arabidopsis* synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:4674-4677.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M. und Zhu, J.K. (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *The Plant cell* 13:1383-1400.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C.P., Gong, D., Halfter, U. und Zhu, J.K. (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Developmental cell* 3:233-244.
- Halfter, U., Ishitani, M. und Zhu, J.K. (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:3735-3740.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166:557-580.
- Hartung, W., Weiler, E.W. und Volk, O.H. (1987). Immunochemical Evidence That Abscisic-Acid Is Produced by Several Species of Anthocerotae and Marchantiales. *Bryologist* 90:393-400.
- Hashimoto, K., Eckert, C., Anschutz, U., Scholz, M., Held, K., Waadt, R., Reyer, A., Hippler, M., Becker, D. und Kudla, J. (2012). Phosphorylation of calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting protein kinases (CIPKs)

- is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins. *The Journal of biological chemistry* 287:7956-7968.
- Hauser, F., Waadt, R. und Schroeder, J.I. (2011). Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Current biology* : CB 21:R346-355.
- Hayashi, M., Inoue, S., Takahashi, K. und Kinoshita, T. (2011). Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in stomatal guard cells. *Plant & cell physiology* 52:1238-1248.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nurnberger, T. und Sheen, J. (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. *Cell* 125:563-575.
- Hedrich, R. (2012). Ion channels in plants. *Physiological reviews* 92:1777-1811.
- Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratge-Faillie, C., Offenborn, J.N., Lacombe, B., Dreyer, I., Thibaud, J.B., et al. (2011). Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell research* 21:1116-1130.
- Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C. und Tsay, Y.F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138:1184-1194.
- Hossain, M.A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., Mori, I.C. und Murata, Y. (2011). Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant physiology* 156:430-438.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., et al. (2003). The Arabidopsis outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5549-5554.
- Hu, H., Boisson-Dernier, A., Israelsson-Nordstrom, M., Bohmer, M., Xue, S., Ries, A., Godoski, J., Kuhn, J.M. und Schroeder, J.I. (2010). Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO<sub>2</sub>-controlled stomatal movements in guard cells. *Nature cell biology* 12:87-93; sup pp 81-18.
- Hu, Y., Jiang, L., Wang, F. und Yu, D. (2013). Jasmonate regulates the inducer of cbf expression-C-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in Arabidopsis. *The Plant cell* 25:2907-2924.
- Hua, D., Wang, C., He, J., Liao, H., Duan, Y., Zhu, Z., Guo, Y., Chen, Z. und Gong, Z. (2012). A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in Arabidopsis. *The Plant cell* 24:2546-2561.
- Humphrey, P.T., Nguyen, T.T., Villalobos, M.M. und Whiteman, N.K. (2014). Diversity and abundance of phyllosphere bacteria are linked to insect herbivory. *Molecular ecology* 23:1497-1515.
- Imes, D., Mumm, P., Bohm, J., Al-Rasheid, K.A., Marten, I., Geiger, D. und Hedrich, R. (2013). Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 74:372-382.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.
- Islam, M.M., Hossain, M.A., Jannat, R., Munemasa, S., Nakamura, Y., Mori, I.C. und Murata, Y. (2010). Cytosolic alkalization and cytosolic calcium oscillation in Arabidopsis guard cells response to ABA and MeJA. *Plant & cell physiology* 51:1721-1730.
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H.H. und Hedrich, R. (2001). K<sup>(+)</sup> channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs. *FEBS letters* 508:463-469.
- Jaffe, F.W., Freschet, G.E., Valdes, B.M., Runions, J., Terry, M.J. und Williams, L.E. (2012). G protein-coupled receptor-type G proteins are required for light-dependent seedling growth and fertility in Arabidopsis. *The Plant cell* 24:3649-3668.
- Jayakannan, M., Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z. und Shabala, S. (2013). Salicylic acid improves salinity tolerance in Arabidopsis by restoring membrane potential and preventing salt-induced K<sup>+</sup> loss via a GORK channel. *Journal of experimental botany* 64:2255-2268.
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J.T., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R. und Becker, D. (2010). Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62:367-378.
- Jiang, Y., Liang, G., Yang, S. und Yu, D. (2014a). Arabidopsis WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid- and auxin-mediated signaling in jasmonic acid-induced leaf senescence. *The Plant cell* 26:230-245.
- Jiang, Y., Wu, K., Lin, F., Qu, Y., Liu, X. und Zhang, Q. (2014b). Phosphatidic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Planta* 239:565-575.
- Jones, J.D. und Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kanzawa, N., Hoshino, Y., Chiba, M., Hoshino, D., Kobayashi, H., Kamasawa, N., Kishi, Y., Osumi, M., Sameshima, M. und Tsuchiya, T. (2006). Change in the actin cytoskeleton during seismonastic movement of *Mimosa pudica*. *Plant & cell physiology* 47:531-539.
- Katagiri, F., Thilmony, R. und He, S.Y. (2002). The Arabidopsis thaliana-pseudomonas syringae interaction. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 1:e0039.
- Kazan, K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in plant science* 20:219-229.
- Kazan, K. und Manners, J.M. (2012). JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in plant science* 17:22-31.
- Kerppola, T.K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 37:465-487.
- Khanna, R., Li, J., Tseng, T.S., Schroeder, J.I., Ehrhardt, D.W. und Briggs, W.R. (2014). COP1 jointly modulates cytoskeletal processes and electrophysiological responses required for stomatal closure. *Molecular plant* 7:1441-1454.



- Kharenko, O.A., Choudhary, P. und Loewen, M.C. (2013). Abscisic acid binds to recombinant *Arabidopsis thaliana* G-protein coupled receptor-type G-protein 1 in *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 68:32-36.
- Kiefer, B., Riemann, M., Buche, C., Kassemeyer, H.H. und Nick, P. (2002). The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta* 215:387-393.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M. und Shimazaki, K. (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414:656-660.
- Koers, S., Guzel-Deger, A., Marten, I. und Roelfsema, M.R. (2011). Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 68:670-680.
- Kollist, H., Nuhkat, M. und Roelfsema, M.R. (2014). Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *The New phytologist* 203:44-62.
- Kolukisaoglu, U., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O. und Kudla, J. (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant physiology* 134:43-58.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F.C., Van Loon, L.C. und Pieterse, C.M. (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant physiology* 147:1358-1368.
- Koornneef, M., Reuling, G. und Karssen, C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum* 61:377-383.
- Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D. und Sela, S. (2009). Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and environmental microbiology* 75:6076-6086.
- Kwak, J.M., Maser, P. und Schroeder, J.I. (2008). The Clickable Guard Cell, Version II: Interactive Model of Guard Cell Signal Transduction Mechanisms and Pathways. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 6:e0114.
- Lackman, P., Gonzalez-Guzman, M., Tilleman, S., Carqueijeiro, I., Perez, A.C., Moses, T., Seo, M., Kanno, Y., Hakkinen, S.T., Van Montagu, M.C., et al. (2011). Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:5891-5896.
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H. und Thibaud, J.B. (2000). A shaker-like K(+) channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. *The Plant cell* 12:837-851.
- Laluk, K. und Mengiste, T. (2010). Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 8:e0136.
- Laluk, K. und Mengiste, T. (2011). The *Arabidopsis* extracellular UNUSUAL SERINE PROTEASE INHIBITOR functions in resistance to necrotrophic fungi and insect herbivory. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 68:480-494.
- Lan, W.Z., Lee, S.C., Che, Y.F., Jiang, Y.Q. und Luan, S. (2011). Mechanistic analysis of AKT1 regulation by the CBL-CIPK-PP2CA interactions. *Molecular plant* 4:527-536.
- Larrieu, A., Champion, A., Legrand, J., Lavenus, J., Mast, D., Brunoud, G., Oh, J., Guyomarc'h, S., Pizot, M., Farmer, E.E., et al. (2015). A fluorescent hormone biosensor reveals the dynamics of jasmonate signalling in plants. *Nature communications* 6:6043.
- Lee, S.C., Lan, W.Z., Kim, B.G., Li, L., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Lu, G., Buchanan, B.B. und Luan, S. (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:15959-15964.
- Leran, S., Edel, K.H., Pervent, M., Hashimoto, K., Corratge-Faillie, C., Offenborn, J.N., Tillard, P., Gojon, A., Kudla, J. und Lacombe, B. (2015). Nitrate sensing and uptake in *Arabidopsis* are enhanced by ABI2, a phosphatase inactivated by the stress hormone abscisic acid. *Science signaling* 8:ra43.
- Levchenko, V., Konrad, K.R., Dietrich, P., Roelfsema, M.R. und Hedrich, R. (2005). Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca<sup>2+</sup> signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4203-4208.
- Li, J., Lee, Y.R. und Assmann, S.M. (1998). Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant physiology* 116:785-795.
- Li, L., Kim, B.G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K. und Luan, S. (2006). A Ca<sup>2+</sup> signaling pathway regulates a K(+) channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12625-12630.
- Liese, A. und Romeis, T. (2013). Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). *Biochimica et biophysica acta* 1833:1582-1589.
- Lim, C.W., Luan, S. und Lee, S.C. (2014). A Prominent Role for RCAR3-Mediated ABA Signaling in Response to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Infection in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology*.
- Lin, Y.M., Shih, S.L., Lin, W.C., Wu, J.W., Chen, Y.T., Hsieh, C.Y., Guan, L.C., Lin, L. und Cheng, C.P. (2014). Phytoalexin biosynthesis genes are regulated and involved in plant response to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 224:86-94.
- Liu, H. und Stone, S.L. (2010). Abscisic acid increases *Arabidopsis* ABI5 transcription factor levels by promoting KEG E3 ligase self-ubiquitination and proteasomal degradation. *The Plant cell* 22:2630-2641.
- Liu, J., Elmore, J.M., Fuglsang, A.T., Palmgren, M.G., Staskawicz, B.J. und Coaker, G. (2009). RIN4 functions with plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS biology* 7:e1000139.

- Ludwikow, A. (2015). Targeting proteins for proteasomal degradation—a new function of Arabidopsis ABI1 protein phosphatase 2C. *Frontiers in plant science* 6:310.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. und Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324:1064-1068.
- Macho, A.P. und Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular cell* 54:263-272.
- Mahs, A., Steinhorst, L., Han, J.P., Shen, L.K., Wang, Y. und Kudla, J. (2013). The calcineurin B-like Ca<sup>2+</sup> sensors CBL1 and CBL9 function in pollen germination and pollen tube growth in Arabidopsis. *Molecular plant* 6:1149-1162.
- Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, J.N., Lind, C., Bauer, H., Hashimoto, K., KA, S.A.-R., Luan, S., Kudla, J., Geiger, D., et al. (2014). Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Science signaling* 7:ra86.
- Mammarella, N.D., Cheng, Z., Fu, Z.Q., Daudi, A., Bolwell, G.P., Dong, X. und Ausubel, F.M. (2014). Apoplastic peroxidases are required for salicylic acid-mediated defense against *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry*.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., et al. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 13:614-629.
- Mansfield, T.A., Hetherington, A.M. und Atkinson, C.J. (1990). Some Current Aspects of Stomatal Physiology. *Annu Rev Plant Phys* 41:55-75.
- Marten, H., Konrad, K.R., Dietrich, P., Roelfsema, M.R. und Hedrich, R. (2007). Ca<sup>2+</sup>-dependent and -independent abscisic acid activation of plasma membrane anion channels in guard cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant physiology* 143:28-37.
- Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K.A., Hoshi, T. und Hedrich, R. (1999). AKT3, a phloem-localized K<sup>+</sup> channel, is blocked by protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7581-7586.
- Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J., Sanders, D., et al. (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant physiology* 126:1646-1667.
- McAinsh, M.R. und Hetherington, A.M. (1998). Encoding specificity in Ca<sup>2+</sup> signalling systems. *Trends in plant science* 3:32-36.
- McAinsh, M.R. und Pittman, J.K. (2009). Shaping the calcium signature. *The New phytologist* 181:275-294.
- McCormack, E., Tsai, Y.C. und Braam, J. (2005). Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs. *Trends in plant science* 10:383-389.
- McLachlan, D.H., Kopischke, M. und Robatzek, S. (2014). Gate control: guard cell regulation by microbial stress. *The New phytologist* 203:1049-1063.
- Meinhard, M., Rodriguez, P.L. und Grill, E. (2002). The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* 214:775-782.
- Melotto, M., Underwood, W. und He, S.Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual review of phytopathology* 46:101-122.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. und He, S.Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126:969-980.
- Michal Johnson, J., Reichelt, M., Vadassery, J., Gershenzon, J. und Oelmüller, R. (2014). An Arabidopsis mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress. *BMC plant biology* 14:162.
- Moes, D., Himmelbach, A., Korte, A., Haberer, G. und Grill, E. (2008). Nuclear localization of the mutant protein phosphatase *abi1* is required for insensitivity towards ABA responses in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54:806-819.
- Montillet, J.L., Leonhardt, N., Mondy, S., Tranchimand, S., Rumeau, D., Boudsocq, M., Garcia, A.V., Douki, T., Bigeard, J., Lauriere, C., et al. (2013). An abscisic acid-independent oxylipin pathway controls stomatal closure and immune defense in Arabidopsis. *PLoS biology* 11:e1001513.
- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriach, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., et al. (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca<sup>2+</sup>-permeable channels and stomatal closure. *PLoS biology* 4:e327.
- Mortier, V., Holsters, M. und Goormachtig, S. (2012). Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, cell & environment* 35:245-258.
- Mott, K.A. (2009). Opinion: stomatal responses to light and CO<sub>2</sub> depend on the mesophyll. *Plant, cell & environment* 32:1479-1486.
- Mouline, K., Very, A.A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, J.B. und Sentenac, H. (2002). Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K(+) channel in Arabidopsis. *Genes & development* 16:339-350.
- Mukhtar, M.S., Carvunis, A.R., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M.T., et al. (2011). Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* 333:596-601.
- Munemasa, S., Hossain, M.A., Nakamura, Y., Mori, I.C. und Murata, Y. (2011a). The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. *Plant physiology* 155:553-561.
- Munemasa, S., Mori, I.C. und Murata, Y. (2011b). Methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid in guard cells. *Plant signaling & behavior* 6:939-941.

- Munemasa, S., Oda, K., Watanabe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. und Murata, Y. (2007). The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant physiology* 143:1398-1407.
- Murata, Y., Mori, I.C. und Munemasa, S. (2015). Diverse Stomatal Signaling and the Signal Integration Mechanism. Annual review of plant biology.
- Murata, Y., Pei, Z.M., Mori, I.C. und Schroeder, J. (2001). Abscisic acid activation of plasma membrane Ca(2+) channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *The Plant cell* 13:2513-2523.
- Murmu, J., Wilton, M., Allard, G., Pandeya, R., Desveaux, D., Singh, J. und Subramaniam, R. (2014). *Arabidopsis* GOLDEN2-LIKE (GLK) transcription factors activate jasmonic acid (JA)-dependent disease susceptibility to the biotrophic pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*, as well as JA-independent plant immunity against the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular plant pathology* 15:174-184.
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F. und Giraudat, J. (2002). *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant cell* 14:3089-3099.
- Nagpal, P., Ellis, C.M., Weber, H., Ploense, S.E., Barkawi, L.S., Guilfoyle, T.J., Hagen, G., Alonso, J.M., Cohen, J.D., Farmer, E.E., et al. (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132:4107-4118.
- Nardmann, J. und Werr, W. (2007). The evolution of plant regulatory networks: what *Arabidopsis* cannot say for itself. *Current opinion in plant biology* 10:653-659.
- Naznin, H.A., Kiyohara, D., Kimura, M., Miyazawa, M., Shimizu, M. und Hyakumachi, M. (2014). Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS one* 9:e86882.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A. und Hancock, J.T. (2002). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant physiology* 128:13-16.
- Noir, S., Bomer, M., Takahashi, N., Ishida, T., Tsui, T.L., Balbi, V., Shanahan, H., Sugimoto, K. und Devoto, A. (2013). Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. *Plant physiology* 161:1930-1951.
- Nour-Eldin, H.H., Hansen, B.G., Norholm, M.H., Jensen, J.K. und Halkier, B.A. (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic acids research* 34:e122.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews* 198:249-266.
- Oh, E., Zhu, J.Y., Ryu, H., Hwang, I. und Wang, Z.Y. (2014). TOPLESS mediates brassinosteroid-induced transcriptional repression through interaction with BZR1. *Nature communications* 5:4140.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U. und Zhu, J.K. (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:11771-11776.
- Oide, S., Bejai, S., Staal, J., Guan, N., Kaliff, M. und Dixelius, C. (2013). A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist*.
- Okuma, E., Nozawa, R., Murata, Y. und Miura, K. (2014). Accumulation of endogenous salicylic acid confers drought tolerance to *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior* 9:e28085.
- Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., Ohiraki, H., Yamada, K., Seo, S.U., Abo, M., et al. (2013a). Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 25:609-624.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. und Tran, L.S. (2013b). ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *The New phytologist*.
- Pandey, S., Nelson, D.C. und Assmann, S.M. (2009). Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell* 136:136-148.
- Pantin, F., Monnet, F., Jannaud, D., Costa, J.M., Renaud, J., Muller, B., Simonneau, T. und Genty, B. (2013). The dual effect of abscisic acid on stomata. *The New phytologist* 197:65-72.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., et al. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324:1068-1071.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Perez, A.C., Chico, J.M., Bossche, R.V., Sewell, J., Gil, E., et al. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* 464:788-791.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E. und Schroeder, J.I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406:731-734.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. und Van Wees, S.C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology* 5:308-316.
- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. und Van Wees, S.C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:489-521.
- Piisilä, M., Keceli, M.A., Brader, G., Jakobson, L., Joesaar, I., Sipari, N., Kollist, H., Palva, E.T. und Kariola, T. (2015). The F-box protein MAX2 contributes to resistance to bacterial phytopathogens in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology* 15:53.

- Planes, M.D., Ninoles, R., Rubio, L., Bissoli, G., Bueso, E., Garcia-Sanchez, M.J., Alejandro, S., Gonzalez-Guzman, M., Hedrich, R., Rodriguez, P.L., et al. (2015). A mechanism of growth inhibition by abscisic acid in germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* based on inhibition of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and decreased cytosolic pH, K<sup>+</sup>, and anions. *Journal of experimental botany* 66:813-825.
- Postel, S. und Kemmerling, B. (2009). Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Seminars in cell & developmental biology* 20:1025-1031.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J.M. und Guo, Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *The Plant cell* 19:1415-1431.
- Raven, J.A. (2002). Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist* 153:371-386.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R.M., Krishnamurthy, V., Dicke, M. und Farmer, E.E. (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *The Plant cell* 16:3132-3147.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. und Jones, J.D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology* 49:317-343.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R. und Jones, J.D. (2007). Pathological hormone imbalances. *Current opinion in plant biology* 10:372-379.
- Rodriguez, P.L., Benning, G. und Grill, E. (1998). ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS letters* 421:185-190.
- Roelfsema, M.R. und Hedrich, R. (2005). In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *The New phytologist* 167:665-691.
- Ronzier, E., Corratge-Faillie, C., Sanchez, F., Prado, K., Briere, C., Leonhardt, N., Thibaud, J.B. und Xiong, T.C. (2014). CPK13, a Noncanonical Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinase, Specifically Inhibits KAT2 and KAT1 Shaker K<sup>+</sup> Channels and Reduces Stomatal Opening. *Plant physiology* 166:314-326.
- Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M.B., Galle, A., Kim, T.H., Santiago, J., Flexas, J., Schroeder, J.I. und Rodriguez, P.L. (2009). Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant physiology* 150:1345-1355.
- Rushton, D.L., Tripathi, P., Rabara, R.C., Lin, J., Ringler, P., Boken, A.K., Langum, T.J., Smidt, L., Boomsma, D.D., Emme, N.J., et al. (2012). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnol J* 10:2-11.
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M.H., Schroeder, J.I., Serrano, R. und Rodriguez, P.L. (2006). Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant physiology* 141:1389-1399.
- Sanchez-Romera, B., Ruiz-Lozano, J.M., Li, G., Luu, D.T., Martinez-Ballesta Mdel, C., Carvajal, M., Zamarreno, A.M., Garcia-Mina, J.M., Maurel, C. und Aroca, R. (2014). Enhancement of root hydraulic conductivity by methyl jasmonate and the role of calcium and abscisic acid in this process. *Plant, cell & environment* 37:995-1008.
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.Y., Marquez, J.A., Cutler, S.R. und Rodriguez, P.L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 60:575-588.
- Santner, A. und Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459:1071-1078.
- Sato, A., Gambale, F., Dreyer, I. und Uozumi, N. (2010). Modulation of the *Arabidopsis* KAT1 channel by an activator of protein kinase C in *Xenopus laevis* oocytes. *The FEBS journal* 277:2318-2328.
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., et al. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *The Biochemical journal* 424:439-448.
- Savchenko, T., Kolla, V.A., Wang, C.Q., Nasafi, Z., Hicks, D.R., Phadungchob, B., Chehab, W.E., Brandizzi, F., Froehlich, J. und Dehesh, K. (2014). Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant physiology* 164:1151-1160.
- Sawinski, K., Mersmann, S., Robatzek, S. und Bohmer, M. (2013). Guarding the green: pathways to stomatal immunity. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 26:626-632.
- Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J., Anderson, J.A. und Gaber, R.F. (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science* 258:1654-1658.
- Schaller, F., Schaller, A. und Stintzi, A. (2004). Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J Plant Growth Regul* 23:179-199.
- Schellenberg, B., Ramel, C. und Dudler, R. (2010). *Pseudomonas syringae* virulence factor syringolin A counteracts stomatal immunity by proteasome inhibition. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 23:1287-1293.
- Scherzer, S., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A., Geiger, D. und Hedrich, R. (2012). Multiple calcium-dependent kinases modulate ABA-activated guard cell anion channels. *Molecular plant* 5:1409-1412.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9:676-682.
- Schlücking, K., Edel, K.H., Koster, P., Drerup, M.M., Eckert, C., Steinhorst, L., Waadt, R., Batistic, O. und Kudla, J. (2013). A new beta-estradiol-inducible vector set that facilitates easy construction and efficient expression of transgenes reveals CBL3-dependent cytoplasm to tonoplast translocation of CIPK5. *Molecular plant* 6:1814-1829.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M. und Allen, G.J. (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410:327-330.
- Schweighofer, A., Hirt, H. und Meskiene, I. (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in plant science* 9:236-243.



- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. und Shinozaki, K. (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current opinion in plant biology* 10:296-302.
- Seo, P.J. und Park, C.M. (2011). Cuticular wax biosynthesis as a way of inducing drought resistance. *Plant signaling & behavior* 6:1043-1045.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.F., Sharon, M., Browse, J., et al. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468:400-405.
- Shen, Y.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Du, S.Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.L., Peng, C.C., Yu, X.C., Zhu, S.Y., et al. (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443:823-826.
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S.M. und Kinoshita, T. (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annual review of plant biology* 58:219-247.
- Shope, J.C., DeWald, D.B. und Mott, K.A. (2003). Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization. *Plant physiology* 133:1314-1321.
- Shyu, C., Figueroa, P., Depew, C.L., Cooke, T.F., Sheard, L.B., Moreno, J.E., Katsir, L., Zheng, N., Browse, J. und Howe, G.A. (2012). JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in Arabidopsis. *The Plant cell* 24:536-550.
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H.C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S., et al. (2009). Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS letters* 583:2982-2986.
- Snedden, W.A. und Fromm, H. (2001). Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist* 151:35-66.
- Sokolovski, S., Hills, A., Gay, R., Garcia-Mata, C., Lamattina, L. und Blatt, M.R. (2005). Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca<sup>2+</sup> release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 43:520-529.
- Song, Y., Miao, Y. und Song, C.P. (2014). Behind the scenes: the roles of reactive oxygen species in guard cells. *The New phytologist* 201:1121-1140.
- Song, Y.Y., Ye, M., Li, C.Y., Wang, R.L., Wei, X.C., Luo, S.M. und Zeng, R.S. (2013). Priming of anti-herbivore defense in tomato by arbuscular mycorrhizal fungus and involvement of the jasmonate pathway. *Journal of chemical ecology* 39:1036-1044.
- Sridharamurthy, M., Kovach, A., Zhao, Y., Zhu, J.K., Xu, H.E., Swaminathan, K. und Melcher, K. (2014). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibits ABA-signaling protein phosphatase HAB1. *PLoS one* 9:e113643.
- Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A., Mehler, N., Vothknecht, U.C. und Teige, M. (2012). Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *Journal of experimental botany* 63:1525-1542.
- Staswick, P.E., Su, W. und Howell, S.H. (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:6837-6840.
- Staswick, P.E. und Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *The Plant cell* 16:2117-2127.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I. und Wasternack, C. (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of Arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology* 51:895-911.
- Stumpe, M., Gobel, C., Faltin, B., Beike, A.K., Hause, B., Himmelsbach, K., Bode, J., Kramell, R., Wasternack, C., Frank, W., et al. (2010). The moss *Physcomitrella patens* contains cyclopentenones but no jasmonates: mutations in allene oxide cyclase lead to reduced fertility and altered sporophyte morphology. *The New phytologist* 188:740-749.
- Suhita, D., Raghavendra, A.S., Kwak, J.M. und Vavasseur, A. (2004). Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant physiology* 134:1536-1545.
- Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular plant pathology* 13:204-216.
- Szemenyei, H., Hannon, M. und Long, J.A. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* 319:1384-1386.
- Takemiya, A., Kinoshita, T., Asanuma, M. und Shimazaki, K. (2006). Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:13549-13554.
- Team, R.C. (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Thaler, J.S., Humphrey, P.T. und Whiteman, N.K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in plant science* 17:260-270.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A. und Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* 448:661-665.
- Thireault, C., Shyu, C., Yoshida, Y., St Aubin, B., Campos, M.L. und Howe, G.A. (2015). Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*.
- Thole, J.M., Beisner, E.R., Liu, J., Venkova, S.V. und Strader, L.C. (2014). Abscisic acid regulates root elongation through the activities of auxin and ethylene in Arabidopsis thaliana. *G3* 4:1259-1274.
- Torres, M.A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia plantarum* 138:414-429.
- Tran, D., El-Maarouf-Bouteau, H., Rossi, M., Biligui, B., Briand, J., Kawano, T., Mancuso, S. und Bouteau, F. (2013). Post-transcriptional regulation of GORK channels by superoxide anion contributes to increases in outward-rectifying K(+) currents. *The New phytologist* 198:1039-1048.

- Troufflard, S., Mullen, W., Larson, T.R., Graham, I.A., Crozier, A., Amtmann, A. und Armengaud, P. (2010). Potassium deficiency induces the biosynthesis of oxylipins and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology* 10:172.
- Vahisalu, T., Puzorjova, I., Brosche, M., Valk, E., Lepiku, M., Moldau, H., Pechter, P., Wang, Y.S., Lindgren, O., Salojärvi, J., et al. (2010). Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62:442-453.
- van Kan, J.A. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in plant science* 11:247-253.
- Vavasseur, A. und Raghavendra, A.S. (2005). Guard cell metabolism and CO<sub>2</sub> sensing. *The New phytologist* 165:665-682.
- Vierstra, R.D. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10:385-397.
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P.L., Lauriere, C. und Merlot, S. (2009). Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 21:3170-3184.
- Voelker, C., Gomez-Porras, J.L., Becker, D., Hamamoto, S., Uozumi, N., Gambale, F., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K. und Dreyer, I. (2010). Roles of tandem-pore K<sup>+</sup> channels in plants - a puzzle still to be solved. *Plant biology* 12 Suppl 1:56-63.
- Volkov, A.G., Adesina, T., Markin, V.S. und Jovanov, E. (2008). Kinetics and mechanism of *Dionaea muscipula* trap closing. *Plant physiology* 146:694-702.
- Waadt, R., Hitomi, K., Nishimura, N., Hitomi, C., Adams, S.R., Getzoff, E.D. und Schroeder, J.I. (2014). FRET-based reporters for the direct visualization of abscisic acid concentration changes and distribution in *Arabidopsis*. *eLife* 3:e01739.
- Waadt, R., Schmidt, L.K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R. und Kudla, J. (2008). Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 56:505-516.
- Walters, D. und Heil, M. (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol Mol Plant P* 71:3-17.
- Wang, Y., Chen, Z.H., Zhang, B., Hills, A. und Blatt, M.R. (2013). PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors regulate K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels through reactive oxygen species-mediated activation of Ca<sup>2+</sup> channels at the plasma membrane of intact *Arabidopsis* guard cells. *Plant physiology* 163:566-577.
- Wasternack, C. und Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany* 111:1021-1058.
- Wasternack, C. und Kombrink, E. (2010). Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS chemical biology* 5:63-77.
- Wellman, C.H., Osterloff, P.L. und Mohiuddin, U. (2003). Fragments of the earliest land plants. *Nature* 425:282-285.
- Withers, J., Yao, J., Mecey, C., Howe, G.A., Melotto, M. und He, S.Y. (2012). Transcription factor-dependent nuclear localization of a transcriptional repressor in jasmonate hormone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:20148-20153.
- Xie, X., Wang, Y., Williamson, L., Holroyd, G.H., Tagliavia, C., Murchie, E., Theobald, J., Knight, M.R., Davies, W.J., Leyser, H.M., et al. (2006). The identification of genes involved in the stomatal response to reduced atmospheric relative humidity. *Current biology : CB* 16:882-887.
- Xie, Y., Mao, Y., Zhang, W., Lai, D., Wang, Q. und Shen, W. (2014). Reactive oxygen species-dependent nitric oxide production contributes to hydrogen-promoted stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant physiology*.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H. und Zhu, J.K. (2001). The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *The Plant cell* 13:2063-2083.
- Xue, S., Hu, H., Ries, A., Merilo, E., Kollist, H. und Schroeder, J.I. (2011). Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO<sub>2</sub> signal transduction in guard cell. *The EMBO journal* 30:1645-1658.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., et al. (2009). The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The Plant cell* 21:2220-2236.
- Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L. und Farmer, E.E. (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant cell* 19:2470-2483.
- Yang, C., Liu, J., Dong, X., Cai, Z., Tian, W. und Wang, X. (2014). Short-term and continuing stresses differentially interplay with multiple hormones to regulate plant survival and growth. *Molecular plant* 7:841-855.
- Yang, D.L., Yao, J., Mei, C.S., Tong, X.H., Zeng, L.J., Li, Q., Xiao, L.T., Sun, T.P., Li, J., Deng, X.W., et al. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:E1192-1200.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S., et al. (2008). Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 20:1678-1692.
- Ye, W., Hossain, M.A., Munemasa, S., Nakamura, Y., Mori, I.C. und Murata, Y. (2013). Endogenous abscisic acid is involved in methyl jasmonate-induced reactive oxygen species and nitric oxide production but not in cytosolic alkalization in *Arabidopsis* guard cells. *Journal of plant physiology* 170:1212-1215.
- Yin, Y., Adachi, Y., Ye, W., Hayashi, M., Nakamura, Y., Kinoshita, T., Mori, I.C. und Murata, Y. (2013). Difference in Abscisic Acid Perception Mechanisms between Closure Induction and Opening Inhibition of Stomata. *Plant physiology* 163:600-610.
- Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J. und Okada, K. (2009). Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. *Development* 136:1039-1048.

- Young, J.J., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E. und Schroeder, J.I. (2006). CO<sub>2</sub> signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca<sup>2+</sup>-independent phase, and CO<sub>2</sub> insensitivity of the *gca2* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:7506-7511.
- Yu, F., Wu, Y. und Xie, Q. (2015). Precise protein post-translational modifications modulate ABI5 activity. *Trends in plant science*.
- Zhang, C., Xie, Q., Anderson, R.G., Ng, G., Seitz, N.C., Peterson, T., McClung, C.R., McDowell, J.M., Kong, D., Kwak, J.M., et al. (2013). Crosstalk between the circadian clock and innate immunity in Arabidopsis. *PLoS pathogens* 9:e1003370.
- Zhang, T., Chen, S. und Harmon, A.C. (2014). Protein phosphorylation in stomatal movement. *Plant signaling & behavior* 9:e972845.
- Zheng, Z., Xu, X., Crosley, R.A., Greenwalt, S.A., Sun, Y., Blakeslee, B., Wang, L., Ni, W., Sopko, M.S., Yao, C., et al. (2010). The protein kinase SnRK2.6 mediates the regulation of sucrose metabolism and plant growth in Arabidopsis. *Plant physiology* 153:99-113.
- Zhou, C., Han, L., Fu, C., Chai, M., Zhang, W., Li, G., Tang, Y. und Wang, Z.Y. (2012). Identification and characterization of petiolule-like pulvinus mutants with abolished nyctinastic leaf movement in the model legume *Medicago truncatula*. *The New phytologist* 196:92-100.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology* 53:247-273.
- Zou, J., Rodriguez-Zas, S., Aldea, M., Li, M., Zhu, J., Gonzalez, D.O., Vodkin, L.O., DeLucia, E. und Clough, S.J. (2005). Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 18:1161-1174.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
A	Alanin; Ampere
ABA	<i>Abscisic Acid</i> , Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
Ala	Alanin
amp	Ampicillin
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i> , Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bzw.	beziehungsweise
c-	centi-
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
ca.	circa
cfu	<i>colony forming units</i> , Koloniebildende Einheiten
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
Col-0	Columbia-0
COR	Coronatin
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
CTP	Cytidintriphosphat
Ctrl	<i>Control</i> , Kontrolle
d-	desoxyribo-
D	Aspartat, Dalton
DEVC	<i>Double Electrode Voltage Clamp</i> , Doppелеlektroden-Spannungsklemme
dpi	<i>days post infection</i> , Tage nach Infektion
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
E	Glutamat
f-	femto-
flg22	22 Aminosäure-langes Fragment des bakteriellen Flagellins
fwd	<i>forward</i> , Vorwärts
G	Glycin
g	Gramm
Glu	Glutaminsäure, Glutamat
Gly	Glycin
GTP	Guanidintriphosphat
h	Stunde
Hz	Hertz
I	Strom
I <sub>ss</sub>	Steady-State Strom
Ile	Isoleucin
JA	Jasmonsäure, Jasmonate
JA-Ile	Jasmonatsäure-Isoleucin
K	Lysin
k-	kilo-
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion

l	Liter
<i>Ler</i>	<i>Landsberg erecta</i>
Lys	Lysin
MAMP	<i>microbe-associated molecular patterns</i> , Mikroben-assoziierte molekulare Muster
M	Mol
M-	Mega
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MeJA	Methyl-Jasmonat
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
m-	milli-
min	Minute
MW	Mittelwert
N	Asparagin
n	Anzahl Stichproben/ gemessene Werte
n-	nano-
norm.	normalisiert
NTPs	Nukleosidtriphosphate
nu	<i>normalised units</i> , normalisierte Einheiten
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
p	statistische Wahrscheinlichkeit
pH	lat. <i>potentia Hydrogenii</i> , Säuregrad der wässrigen Lösung
Phe	Phenylalanin
PP2C	Proteinphosphatase Klasse 2C
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
pv	Pathovar
Q	Glutamin
rev	<i>reverse</i> , Rückwärts
RT	Reverse Transkriptase; Raumtemperatur
s	Sekunde
spec.	<i>species</i> , Spezies
T	Temperatur
t	Zeit
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymintriphosphat
U	Spannung; <i>Units</i> , Einheiten
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Ws	Wassilewskija-0
Y2H	<i>Yeast Two Hybrid</i> , Hefe-Zwei-Hybrid
YFP	<i>Yellow Fluorescing Protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein
YFP <sup>C</sup>	C-terminale Hälfte von YFP
YFP <sup>N</sup>	N-terminale Hälfte von YFP
z.B.	zum Beispiel
$\Delta$	delta
$\lambda$	lambda; Wellenlänge
$\mu$	mikro-
$\Omega$	Ohm

### 5.3 Abbildungsverzeichnis

1.1	Modelle von CIPKs und CBLs	8
1.2	Syntheseweg von Abscisinsäure in <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
1.3	Syntheseweg von JA-Ile in <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
1.4	GORK ist ein auswärtsgerichteter Shakerkanal	25
2.1	Spannungsprotokoll für DEVC-Messungen mit GORK	50
3.1	GORK interagiert mit mehreren Phosphatasen und Kinasen in einer BiFC-Analyse	56
3.2	Die PP2C ABI2, aber nicht ABI1 ist ein Negativregulator von GORK.	58
3.3.	Koexpression von GORK mit CIPK5/CBL1 oder OST1 führt nicht zu einer Stromerhöhung	59
3.4	CIPK5/CBL1 kann die ABI2-Inhibierung des GORK-Stroms teilweise aufheben	60
3.5	Auch CIPK5/CBL9, CIPK23/CBL1 und OST1 können den ABI2-Effekt abschwächen, aber nicht CIPK5 allein oder CIPK15/CBLs	61
3.6	CIPK5, CIPK23 und OST1 interagieren sowohl mit PP2Cs als auch mit GORK in einer BiFC-Analyse	63
3.7	Gezielte Mutationen in CIPK5 und CBL1 verhindern eine Aktivierung von GORK	65
3.8	Alle der getesteten Signalwegskomponenten werden in Schließzellen exprimiert	68
3.9	Die Reaktionen von Stomata können bei verschiedenen Stimuli und Ökotypen gemessen werden	70
3.10	Verschiedene Experimentbedingungen können unterschiedliche Ergebnisse liefern	72
3.11	Viele Verlustmutanten des GORK-Signalknotens sind MeJA-insensitiv	74
3.12	Komplementation von <i>cipk5</i> -Mutanten stellt die MeJA-Sensitivität wieder her	75
3.13	Verlust von GORK erhöht den Infektionserfolg von <i>Pst</i> DC3000	77
3.14	Frühe Komponenten des Jasmonatsignalwegs sowie der -Synthese reagieren auf MeJA	79
3.15	Perzeption, aber nicht die Synthese von ABA wird für den MeJA-induzierten Stomaschluss benötigt	80
3.16	MeJA führt zu einer geringen ABA-Synthese	81
3.17	Die Stoma-Öffnungskinetik von Coronatin kann durch ABA unterdrückt werden.	83
3.18	Schließzellen sind nur in Anwesenheit von Coronatin ABA-insensitiv.	85
3.19	Inkubation mit einem Protease-Inhibitor beeinträchtigt den MeJA-vermittelten Stomaschluss.	87
4.1	vereinfachtes Modell des Stomaschlusses nach JA- oder ABA-Perzeption	101

## 5.4 Tabellenverzeichnis

2.1	Standardreaktionsansatz für den DNase I-Verdau	34
2.2	Standardfällungsansatz für Gesamt-RNA	34
2.3	Standardreaktionsansatz einer reversen Transkription	34
2.4	Mastermix einer IVT-Reaktion	35
2.5	Standard- IVT-Reaktionsansatz	35
2.6	1.5 % Agarosegel für RNA	37
2.7	Standard PCR-Ansatz	38
2.8	Standard-PCR-Programm	38
2.9	USER-Reaktionsansatz	40
2.10	Standardansatz für <i>DpnI</i> -Verdau	41
2.11	<i>PacI-Nt.BbvCI</i> Verdau eines USER-Vektors	41
2.12	Standardansatz für einen analytischen Verdau	42
2.13	Standardansatz einer qRT-PCR	43
2.14	Standardprogramm für eine qRT-PCR	43
5.1	qRT-PCR Primer	132
5.2	Übersicht <i>Arabidopsis</i> -Linien	133

## 5.5 Primerverzeichnis

Tabelle 5.1: qRT-PCR Primer

Gen	AGI Code	Seq fwd	Seq rev	Annealing T [ °C]	Fragment- länge [bp]
ABI2	AT5G57050	GGACTTAGAGGCTATTG	AGGATTAATCCATTAGTG	48-54	402
Actin2/8	-	GGT GAT GGT GTG TCT	ACT GAG CAC AAT GTT AC	52- 62	435
CBL1	AT4G17615	AAATTAGAGTGGAGTGAT	TGATTACACCGATTAGC	55-60	209
CBL9	AT5G47100	GATAAGACAGAATGGAGC	CCTACGACTTGGTCTCTA	55-60	179
CIPK5	AT5G10930	AATTTCCGCCGTGGTT	CGGCGATATCGGCTCT	58	236
CIPK23	AT1G30270	GGGACATTGTTTGAAAAACC	TTAATCGATTCAAGCCAAG	54-59	329
GORK	AT5G37500	GATACTCAGACCTACCG	CCAAGTGTAACCTTCG	x-60	342

## 5.6 Verwendete *Arabidopsis*- Mutanten

**Tabelle 5.2: Übersicht *Arabidopsis*-Linien**

Genlocus	Linie	Ökotyp	Beschreibung	Bezugsquelle
AT4G26080	<i>abi1-1</i>	<i>Ler</i>	Punktmutation	(Koornneef et al., 1984)
AT5G57050	<i>abi2-1</i>	<i>Ler</i>	Punktmutation	(Rodriguez et al., 1998)
AT5G57050	<i>abi2-2</i>	Col-0	tDNA-Insertion	(Rubio et al., 2009)
-	<i>cbl1/ cbl9</i>	Col-0	tDNA-Insertion	(Cheong et al., 2007)
AT5G10930	<i>cipk5-1</i>	Col-0	tDNA-Insertion	Prof. Dr. Jörg Kudla
AT5G10930	<i>cipk5-1/ CIPK5 L1 P6</i>	Col-0	Komplementation	Prof. Dr. Jörg Kudla
AT5G10930	<i>cipk5-1/ CIPK5 L7 P11</i>	Col-0	Komplementation	Prof. Dr. Jörg Kudla
AT5G10930	<i>cipk5-2</i>	Col-0	tDNA-Insertion	Prof. Dr. Jörg Kudla
AT5G10930	<i>cipk5-2/ CIPK5 L1 P2</i>	Col-0	Komplementation	Prof. Dr. Jörg Kudla
AT5G10930	<i>cipk5-2/ CIPK5 L2 P8</i>	Col-0	Komplementation	Prof. Dr. Jörg Kudla
AT1G30270	<i>cipk23-3</i>	Col-0	tDNA-Insertion	(Ho et al., 2009)
AT5G37500	<i>gork1-2</i>	Col-0	tDNA-Insertion	SALK 144737C
AT2G46370	<i>jar1-1</i>	Col-0	tDNA-Insertion	(Staswick et al., 1992)
AT1G74950	<i>jaz2</i>	Col-0	tDNA-Insertion	SALK 025279
AT2G34600	<i>jaz7</i>	Col-0	tDNA-Insertion	WISCDXSLOX7H11
AT4G33950	<i>ost1-2</i>	<i>Ler</i>	tDNA-Insertion	(Mustilli et al., 2002)
-	<i>pyr/ pyl12458</i>	Col-0	tDNA-Insertion	(Gonzalez-Guzman et al., 2012)

Falls nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Linien über das Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), Nottingham, Großbritannien bezogen. Die Mutanten *cipk5-1*, *cipk5-2* sowie deren Komplementationslinien wurden von Prof. Dr. Jörg Kudla (Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Westfälische Wilhelms- Universität Münster) zur Verfügung gestellt.





## Publikationen

**S. Foerster\***, **L. K. Schmidt\***, **U. Anschütz**, **K. Schlücking**, **E. Kopic**, **R. Waadt**, **O. Batistič**, **P. L. Rodriguez**, **E. Grill**, **J. Kudla**, **D. Becker (2015)** A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphorylation switch modulates GORK  $\text{K}^+$  channel activity to integrate JA-mediated pathogen and ABA-mediated drought stress responses in Arabidopsis guard cells. *Developmental Cell* **eingereicht**

\* gleichberechtigte Erstautoren

## Posterpräsentationen

Botanikertagung 2013, Tübingen, Deutschland: **S. Förster**, L. Schmidt, U. Anschütz, E. Kopic, K. Schlücking, E. Grill, P. Rodriguez, J. Kudla, and D. Becker “ $\text{Ca}^{2+}$ -signalling in guard cells:  $\text{K}^+$ -efflux channels as rate-limiting elements in JA-triggered stomatal closure”

Plant Calcium Signalling 2014, Münster, Deutschland: **S. Förster**, L. Schmidt, U. Anschütz, E. Kopic, K. Schlücking, E. Grill, P. Rodriguez, J. Kudla, and D. Becker “ $\text{Ca}^{2+}$ -signalling in guard cells:  $\text{K}^+$ -efflux channels as rate-limiting elements in JA-triggered stomatal closure”



## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich habe bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Lausanne, den 26.06.2015



.....  
Sabrina Förster



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, durch deren Unterstützung die Anfertigung dieser Dissertation überhaupt erst möglich wurde oder durch ihre Hilfe erleichtert haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei folgenden Personen:

**Prof. Dr. Dirk Becker** danke ich für sein Vertrauen sowie für die anregenden Diskussionen und den Freiraum, jederzeit meine eigenen Ideen einbringen und verwirklichen zu können.

Ich danke **PD Dr. Susanne Berger** (Lehrstuhl für Pharmabiologie, Universität Würzburg) für die Übernahme des Zweitgutachtens und die hilfreichen Ratschläge zur Durchführung der Infektionsassays.

Bei **Prof. Dr. Georg Nagel** möchte ich mich für eine lehrreiche Zeit in seiner Arbeitsgruppe sowie für seine Großzügigkeit, mir einen Messplatz in seinem Labor zur Verfügung zu stellen, bedanken.

**Dr. Rainer Waadt** (Centre of Organismal Studies, Universität Heidelberg) danke ich für seine Bereitschaft, sich mit mir zwei Wochenenden ins Labor zu setzen und die ABAleon-Messungen durchzuführen.

Dem **Frauenbüro Würzburg** danke ich für das einjährige Promotionsstipendium, ohne das ich meine Doktorarbeit niemals hätte beenden können.

Bei **Dr. Gabriele Blum-Oehler** möchte ich mich ganz herzlich für die Aufnahme in das Mentoring-Programm der GSLS bedanken, durch das ich viele wertvolle Erfahrungen sowie neue Freunde gewinnen konnte.

**Allen Mitarbeitern** der **AG Becker** danke ich für die tolle Atmosphäre und Unterstützung. Besonders bedanken möchte ich mich bei **Dr. Uta Anschütz, Eva Kopic** und **Sophia Guttenberger**.

Ich danke **allen Mitgliedern** der **Botanik I** für eine gute Zusammenarbeit und ein kollegiales Arbeitsklima. Besonderer Dank geht an Kerstin Neuwinger und Matthias Dziony, sowie an Dorothea Graus, die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

**Meiner Familie** und **meinen Freunden** danke ich für ihre Geduld und ihren immerwährenden Glauben daran, dass ich „das schon schaffe“. **Christian Remmele** danke ich dafür, dass er immer für mich da war, ist und hoffentlich auch immer sein wird, sowie für seine große Hilfe bei der Abgabe dieser Arbeit.