

Während der Evolution von Landpflanzen geriet der Anionenkanal SLAC1 unter die Kontrolle des ABA-Signalwegs



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

Vorgelegt von
Christof Martin Lind
aus Frankfurt am Main

Würzburg 2016

Eingereicht am: 17.11.2016

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich
2. Gutachter: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Tag des Promotionskolloquiums: 22.12.2016

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Die ersten Landpflanzen standen vor der Herausforderung sich mit der wechselnden Verfügbarkeit von Wasser an Land arrangieren zu müssen. Daraus ergab sich die Notwendigkeit den Wasserverlust zu minimieren und dennoch ausreichend CO₂ für die Photosynthese aufzunehmen (Raven, 2002). Im Laufe der Evolution der Pflanzen entstanden mehrere Anpassungen an diese neuen Gegebenheiten, die schließlich auch zur Entstehung von regulierbaren Öffnungen, den Stomata, in der Blattepidermis führte. Zwei Schließzellen umschließen das Stoma und regulieren über die Aufnahme oder Abgabe von osmotisch-aktiven Teilchen ihren Turgordruck und damit die Öffnungsweite des Stomas. Das Kation Kalium und die Anionen Chlorid und Nitrat repräsentieren die Hauptosmotika, die je nach Bedarf durch Transportproteine über die Plasmamembran der Schließzellen geschleust werden. In den Samenpflanzen wie zum Beispiel der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, ist der Signalweg in Schließzellen, der bei Trockenheit zu einem schnellen Schluss des Stomas führt bereits sehr gut untersucht. Bei Wassermangel synthetisiert die Pflanze das Trockenstresshormon ABA (Abscisinsäure). Das Hormon wird durch ABA-Rezeptoren erkannt und resultiert schließlich in der Aktivität der Proteinkinase OST1. Daraufhin reguliert diese Kinase zum einen die Transkription ABA-abhängiger Gene, die der Pflanze eine langfristige Adaptation an Trockenheit und Austrocknungstoleranz verleiht. Zum anderen, phosphoryliert OST1 den Anionenkanal SLAC1 und aktiviert ihn so. Die Aktivität des Kanals initiiert schließlich den Stomaschluss durch einen Ausstrom von Anionen aus den Schließzellen, der mit einer Depolarisation der Schließzellmembran einhergeht.

Der ABA-Signalweg, der zur transkriptionellen Regulation von Genen und der damit verbundenen Trockentoleranz führt ist ein sehr stark konservierter und evolutiv sehr alter Signalweg, der in allen Geweben von Pflanzen bei Trockenheit beschritten wird. Der schnelle ABA-Signalweg, der die Aktivität der SLAC1 Anionenkanäle reguliert, ist auf Schließzellen begrenzt. Da sich Schließzellen aber erst spät in der Evolution von Landpflanzen etablierten, erhob sich die Frage, wann in der Evolution geriet SLAC1 unter die Kontrolle des ABA-Signalwegs? Geht diese Regulation von SLAC1 mit der Entstehung von Schließzellen einher oder bestand dieser Regulationsmechanismus bereits in Pflanzen, die keine Schließzellen besitzen. Zur Beantwortung dieser Frage untersuchte ich die einzelnen Komponenten des Signalwegs und ihre Beziehungen zu einander im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten.

Im Laufe dieser Arbeit wurden Schlüsselemente des ABA-Signalwegs aus sechs verschiedenen Versuchspflanzen kloniert und in Oozyten charakterisiert. Für die

Untersuchung der Evolution des schnellen ABA-Signalwegs wurden die sechs Versuchspflanzen aus je einem rezenten Vertreter der Grünalgen (*Klebsormidium nitens*), der Lebermoose (*Marchantia polymorpha*), der Laubmoose (*Physcomitrella patens*), der Lycophyten (*Selaginella moellendorffii*) und der Farne (*Ceratopteris richardii*) ausgewählt und mit der Samenpflanze *Arabidopsis thaliana* verglichen. Die sechs Pflanzengruppen spalteten sich an unterschiedlichen Zeitpunkten im Laufe der pflanzlichen Evolution von der Entwicklung der restlichen Pflanzen ab und erlauben so einen bestmöglichen Einblick in den jeweiligen Entwicklungsstand der Landpflanzen während der Entstehung der einzelnen Pflanzenfamilien. Obwohl sich die ersten Stomata erst in den Laubmoosen entwickelten, besitzen schon die Grünalgen OST1-Kinasen und SLAC1-Kanäle. Interessanterweise konnte wir zeigen, dass schon die frühen OST1-Kinasen aus Algen und Moosen dazu in der Lage sind, in den höher entwickelten Samenpflanzen die Rolle in der Regulation der ABA-abhängigen Expression von Genen zu übernehmen. Außerdem zeigte sich im Laufe meiner biophysikalischen Untersuchungen, dass alle dreizehn getesteten OST1-Kinasen aus den sechs unterschiedlichen Versuchspflanzenarten in Lage sind, den Anionenkanal SLAC1 aus *Arabidopsis* in *Xenopus* Oozyten zu aktivieren. Diese Austauschbarkeit von den *At*SLAC1-aktivierenden Kinasen deutet auf eine sehr starke Konservierung der Struktur und Funktion von OST1 hin. Anders verhielt es sich bei der funktionellen Analyse der Anionenkanäle aus den verschiedenen Versuchspflanzen: Hier bildete nur der evolutionär gesehen jüngsten SLAC-Kanal *At*SLAC1 aus *Arabidopsis* ein funktionelles Pärchen mit OST1. Die SLAC1 Kanäle aus der Grünalge, dem Lebermoos, den Lycophyten und dem Farn blieben ohne messbare Aktivität bei einer Co-expression mit den verschiedenen OST1 Kinasen. Nur beim Laubmoos (*Physcomitrella patens*) konnte noch ein funktionelles Kinase-Anionenkanal Pärchen gefunden werden. Struktur-Funktionsuntersuchungen erlaubten mir schließlich zu zeigen, dass bestimmte funktionelle Domänen sowohl im N-terminus als auch im C-terminus von SLAC1 erforderlich sind, um eine Aktivierung des Kanals durch OST1 Kinasen sicherzustellen. Diese Domänen besaß nur *At*SLAC1 aus *Arabidopsis* und in ersten Ansätzen der SLAC1 Kanal aus *Physcomitrella*. So stellten sich die Termini der SLAC-Kanäle als entscheidend für die Interaktion und Regulation der Kanäle durch die OST1-Kinasen heraus.

Wir konnten also zeigen, dass sich die SLAC-Kanäle an ihre Rolle im ABA-Signalweg angepasst haben, während die OST1-Kinasen in ihrer Funktion schon seit den ersten Landpflanzen hoch konserviert waren. Durch die Entstehung einer Kombination aus Phosphorylierungs- und Interaktionsdomänen in den Termini entwickelten sich die SLAC-Kanäle nach und nach hin zur OST1-kontrollierten ABA-Signalkaskade. Im Laubmoos *Physcomitrella patens* tauchte parallel zu den ersten wenigen Stomata (nur im Sporophyten) das erste funktionelle OST1/SLAC1-Paar auf. Dieses Paar ging jedoch vermutlich während

der Entstehung der Lycophyten und Farne wieder verloren. Das Fehlen weiterer funktioneller OST1/SLAC1 Paare in den untersuchten Pflanzen, legt allerdings auch nahe, dass die endgültige funktionelle Eingliederung der SLAC1-Kanäle in den schnellen ABA-Signalweg der Schließzellen, erst während der Entwicklung der Samenpflanzen erfolgte.

Summary

Since the beginnings of the colonization of the land, plants had to overcome numerous obstacles. In this new environment the major challenge was the preservation of water supply despite the severe changes in the availability of water. Due to these new requirements plants had to balance water loss and the necessary uptake of CO₂ for photosynthesis. Along the evolution of land plants they evolved numerous adaptations to the new environment like the cuticle and adjustable stomata. The stomata are small pores embedded in the epidermis of the leaves. A pair of guard cells regulates the aperture of the pore (stoma) via their turgor pressure. Potassium and the counter ions chloride and nitrate are the major osmolytes driving the opening and closing of the stoma. Specialized transport proteins regulate the ion fluxes across the plasma membrane of guard cells. In seed plants like the model plant *Arabidopsis thaliana*, the control of guard cells under drought stress conditions is well understood. Upon water shortage the plants produce the phytohormone ABA (abscisic acid). Following the perception of ABA by its receptors, the phytohormone activates the protein kinase OST1. The activated kinase on the one hand controls the expression of ABA dependent genes that lead to drought-adaptation and tolerance. On the other hand, the OST1 kinase phosphorylates and activates SLAC1-type anion channels. In turn, the activation of SLAC1 leads to the release of anions, thereby initiating guard cell depolarization which leads to the release of anions together with potassium. This depolarization step represents the initiation of ABA-dependent stomatal closure.

The transcriptional ABA signaling pathway that regulates gene expression and the adaptation to drought stress is a very ancient and conserved pathway. It can be found in all plant tissues during periods of water shortage. In contrast, the ABA pathway leading to the activation of SLAC1 is restricted to guard cells only. Guard cells evolved rather late during the evolution of land plants. Therefore, the question arises, when did the ancient ABA signaling pathway co-opt SLAC1? Did the control of SLAC1 activity through the ABA-signaling pathway already exist before the stomata appeared in early land plants or did it co-evolve with stomata rather recently? To answer these questions, we investigated the relationship between the single components of the signaling cascade in the heterologous expression system of *Xenopus laevis* oocytes.

To investigate the evolution of fast ABA signaling, we cloned the key players of the signaling cascade from six different model plants and functionally characterized the ABA-signaling components in oocytes. The model plants were chosen from green algae (*Klebsormidium nitens*), liverworts (*Marchantia polymorpha*), mosses (*Physcomitrella patens*), lycophytes

(*Selaginella moellendorffii*) and ferns (*Ceratopteris richardii*) and their ABA-signaling components were compared to those of the seed plant *Arabidopsis thaliana*. These plant families diverged during evolution of land plants at distinct evolutionary steps. Thus these plant species should allow us insights into the evolution of land plants.

Although the first stomata were found in mosses, already the green algae *Klebsormidium nitens* expressed SLAC1-type anion channels and the OST1 kinase. Gene expression studies with *Arabidopsis* protoplasts revealed that already the OST1 kinase of green algae is able to regulate ABA-dependent gene expression in seed plants. This indicates that the substrate specificity of OST1 kinases remained highly conserved during evolution.

This notion was reinforced by biophysical investigations in the oocyte system. All thirteen tested OST1 kinases originating from the six model plants were capable to activate the evolutionary youngest SLAC channel *AtSLAC1* from *Arabidopsis* in the heterologous expression system. Thus the structure and function of OST1 kinases is highly conserved during the evolution of land plants. In contrast, SLAC1 channels originating from ferns, lycophytes, liverworts and algae could not be activated by any of the OST1 kinases. Only the SLAC1 channel and the OST1 kinase of the seed plant *Arabidopsis thaliana* formed a functional anion channel/kinase-pair. Apart from *Arabidopsis* SLAC1, only the moss (*Physcomitrella patens*) *PpSLAC1* could be activated by the *Arabidopsis* and one of the moss OST1 kinases. Subsequent detailed structure-function analysis revealed several essential domains in the anion channel's N-terminus and C-terminus which are important for the functional interaction between SLACs and OSTs.

Taken together, we could show that SLAC1-type anion channels evolved towards the already existing ancient ABA signaling pathway. Thus, OST1 kinases seem to be conserved in their functions since the first land plants. The development of several regulatory sites in their termini allowed SLAC1 channels to integrate in the OST1-based ABA signaling pathway. Interestingly, we found a first functional SLAC1/OST1 pair in the moss *Physcomitrella patens*. This finding correlates with the appearance of first primitive stomata in mosses. However, this functional channel/kinase pair did not persist during evolution from moss to lycophytes and ferns. Thus, functional pairs between OST1 kinases and SLAC1 anion channels must have been re-evolved only lately during the evolution of seed plants.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	IV
Inhaltsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Die Evolution der Landpflanzen	2
1.2 Die Stomata	8
1.2.1 Die Evolution der Stomata	10
1.2.2 Stomabewegung	14
1.2.3 Die Stomaöffnung	15
1.2.4 Der Stomaschluss	20
1.3 Zielsetzung	37
2. Material und Methoden	38
2.1 DNA-Techniken	38
2.1.1 Die IVT-PCR	38
2.1.2 Mutagenese PCR	39
2.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten	40
2.1.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	40
2.1.5 Die USER-Klonierungsmethode	41
2.1.6 Verwendete Vektoren	42
2.1.7 DNA-Sequenzierung	43
2.1.8 Herstellung von Bakterienstocks	43
2.1.9 Synthese von Genen	44
2.2 Molekularbiologische Methoden mit <i>E. coli</i>	44
2.2.1 Bakterientransformation und Kultivierung	45
2.2.2 Herstellung von Bakterienkulturen	45
2.2.3 Plasmid-Mini-Präparationen	46

2.3	RNA-Techniken.....	47
2.3.1	<i>In vitro</i> Transkription IVT	47
2.4	Expression in heterologen Expressionssystemen.....	48
2.4.1	Transiente Expressionsanalysen in <i>Arabidopsis</i> Protoplasten.....	48
2.4.2	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	48
2.4.3	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten als heterologes Expressionssystem	49
2.4.3.1	Präparation der <i>Xenopus</i> Oozyten.....	49
2.4.3.2	Injektion der cRNA in Oozyten.....	50
2.5	Auswertung der Homologie und Phylogenetik	51
2.6	Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Technik (DEVC)	52
2.6.1	Das Messprinzip.....	52
2.6.2	Der Messaufbau.....	53
2.6.3	Elektroden und Pipetten	54
2.6.4	Konventionen	55
2.6.5	Datenerfassung und Spannungsprotokolle.....	55
2.6.6	Messreihen und Messlösungen.....	56
2.7	Biophysikalische Grundlagen	58
2.7.1	Bestimmung von Umkehrspannungen und relativen Permeabilitäten	59
2.8	LSM Mikroskopie und BIFC-Technik	60
3.	Ergebnisse	63
3.1	Auswahl der Versuchspflanzen	63
3.1.1	Die Modellpflanze <i>Klebsormidium nitens</i> ist ein Vertreter der Grünalgen:.....	64
3.1.2	Moose/Bryophyten (<i>Marchantia polymorpha</i> ; <i>Physcomitrella patens</i>) entwickelten die ersten Stomata-ähnlichen Strukturen:	65
3.1.3	Bärlapppflanzen/Lycophyten (<i>Selaginella moellendorffii</i>):.....	67
3.1.4	Farne/Monilophyten (<i>Ceratopteris richardii</i>):.....	68
3.1.5	Samenpflanzen/Spermatophyten (<i>Arabidopsis thaliana</i>):	69
3.2	Identifizierung und Klonierung der Orthologen Proteine des schnellen ABA-Signalwegs	71
3.3	Phylogenetische Einordnung.....	75

3.3.1	Phylogenetischer Vergleich der SLAC-Kanäle.....	75
3.3.2	Phylogenetischer Vergleich der OST1-Kinasen.....	77
3.4	Elektrophysiologische Charakterisierung.....	79
3.4.1	Die Komponenten des ABA-Signalweg in Algen und Moosen	79
3.4.2	Die Komponenten des ABA-Signalweg in Lycophyten und Farnen.....	98
4.	Diskussion.....	110
4.1	Die Entwicklung der OST1 Kinasen im Laufe der pflanzlichen Evolution.	110
4.2	Die negative Regulation des ABA-Signalwegs	114
4.3	Die SLAC1 Kanäle entwickelten sich im Laufe der Evolution auf die ABA-Signalkaskade zu.....	115
4.4	<i>Selaginella</i> markiert den Scheitelpunkt in der Evolution der S-Typ-Anionenkanäle 120	
4.5	Evolution des schnellen ABA-Signalwegs zur Kontrolle der Stomata	122
5.	Anhang.....	127
5.1	Messlösungen	127
5.2	Sequenzvergleich der SLAC-Kanäle und OST1-Kinasen	131
5.3	BIFC Analysen	133
5.4	Literaturverzeichnis	135
5.5	Abbildungsverzeichnis.....	151
6.	Publikationsliste.....	153
6.1	Publikationsliste	153
7.	Eidesstattliche Erklärung und Danksagung.....	156
7.1	Eidesstattliche Erklärung.....	156
7.2	Danksagung.....	157

1. Einleitung

Pflanzen, Algen und photosynthetisch-aktive Bakterien an Land und im Wasser sind die Basis unseres heutigen auf Kohlenstoffverbindungen und Sauerstoff (O₂) basierenden Ökosystems. Die phototropen Organismen fixieren während der Photosynthese Kohlenstoff als Grundbaustein für alle organischen Kohlenstoffverbindungen und produzieren dabei gleichzeitig O₂. Die Photosynthese ist ein Prozess, in dem phototrope Organismen mit Hilfe der Lichtenergie den chemischen Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) und das Reduktionsäquivalent NADP/H (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat + H⁺) synthetisieren (Lichtreaktion). Diese chemische Energie wird anschließend genutzt um Kohlendioxid (CO₂) aus der Atmosphäre zu fixieren. Dabei wird CO₂ reduziert und, mit Hilfe der in der Lichtreaktion gewonnenen Energie, vorwiegend in Form von Zuckern fixiert (Dunkelreaktion). Diese Zucker dienen der Pflanze als Kohlenstoffquelle und transportabler Energiespeicher. Als Nebenprodukt der Kohlenstofffixierung entsteht bei der Photosynthese zusätzlich O₂, der ca. 21% der heutigen Atmosphäre ausmacht. Mit der Fixierung von CO₂ aus der Atmosphäre und dessen Umwandlung in Kohlenhydrate bilden Pflanzen die Primärproduzenten von Kohlenstoffverbindungen nahezu aller Nahrungsketten der Erde. Der bei der Photosynthese freiwerdende O₂ ist zusätzlich für einen Großteil der Lebewesen auf der Erde essenziell für ihre Energiegewinnung aus Kohlenstoffverbindungen in den Mitochondrien einer jeden Zelle. Das durch die Verbrennung von Kohlenstoffverbindungen entstehende CO₂ bildet wiederum die Grundlage für die Photosynthese der Pflanzen. Dadurch schließt sich der Kohlenstoffkreislauf (Lüttge et al., 2010).

Für die Photosynthese benötigen die Pflanzen neben CO₂ auch Wasser (H₂O) als Elektronendonator. Das H₂O wird von Landpflanzen in der Regel mit Hilfe ihrer Wurzeln aus dem Boden aufgenommen. Durch das Leitgewebe und hier vor allem das Xylem wird das H₂O anschließend in der gesamten Pflanze verteilt. Der Transport aus der Wurzel in den Spross wird durch die Transpiration von Wasser aus den Blättern in die Atmosphäre angetrieben. Um einen exzessiven Wasserverlust zu minimieren, ist die Oberfläche der Epidermis aller Gefäßpflanzen mit einer extrazellulären Matrix überzogen, der Cuticula. Die Cuticula besteht hauptsächlich aus hydrophoben Cutinen und Lipiden, die zusammen als cuticulare Wachse eine wasserabweisende Schutzschicht bilden (Lee and Suh, 2015). Sie verhindert nicht nur den Verlust von H₂O, sondern ist auch eine Barriere gegen eindringendes Wasser und den darin gelösten Stoffen, Pathogenen und schädlicher Strahlung (Reicosky and Hanover, 1978; Eigenbrode and Espelie, 1995; Barthlott and Neinhuis, 1997; Riederer and Schreiber, 2001; Solovchenko and Merzlyak, 2003). Da H₂O für Landpflanzen nicht immer gleichbleibend

verfügbar ist, mussten sie Mechanismen entwickeln, um den Wasserverlust an die schwankende Verfügbarkeit von Wasser anzupassen. Durch regulierbare Öffnungen in der Epidermis, die Stomata, können Pflanzen ihren transpirationsbedingten Wasserverlust regulieren. Durch das Schließen der Stomata kann der Wasserverlust so minimiert werden. Dabei verringert die Pflanze allerdings gleichzeitig die Aufnahme von CO_2 aus der Atmosphäre. Die Verfügbarkeit von CO_2 , dessen Anteil an der heutigen Atmosphäre ca. 383 ppm beträgt (Glueck et al., 2010), stellt neben der Wasserverfügbarkeit einem weiteren limitierenden Faktor der Photosynthese dar (Hetherington and Woodward, 2003; Herzs Schuh et al., 2011).

1.1 Die Evolution der Landpflanzen

Die Entstehung von Leben auf der Erde ist nach wie vor ein umstrittenes Thema. Neben Theorien, dass das Leben in Form resistenter Sporen von Mikroorganismen aus dem Weltall auf die Erde kam, gehen viele Forscher davon aus, dass Leben hier auf der Erde entstanden ist. So konnte Sidney W. Fox in den 1950er und 60er Jahren zeigen, dass sich erste Vorstufen von Zellen in den Urmeeren der Erde gebildet haben könnten (Fox, 1965; Fox, 1980). Diese Mikrosphären oder auch Protozellen bildeten sich aus organischen Molekülen und einfachen Proteinen und stellen abgegrenzte Reaktionsräume zu dem sie umgebenden Medium dar, einer essenziellen Eigenschaft lebender Zellen.

Unabhängig davon wie Leben auf die Erde kam oder wie es hier entstand, dienen uns Fossilien als die ersten Beweise für urzeitliches Leben auf der Erde. In Gesteinsformationen in Westaustralien konnten Mikrofossilien von prokaryotischen, fadenförmigen Bakterien auf ein Alter von 3,4 bis 3,5 Milliarden Jahren datiert werden. Einige dieser Bakterien bildeten so genannte Stromatoliten, Schichten fadenförmiger Mikroorganismen und Sediment, wie sie auch heute noch von einigen Bakterien gebildet werden. Bei den heutigen Stromatolitenbildenden Bakterien handelt es sich um die ebenfalls fadenförmigen Cyanobakterien, die aktiv Photosynthese betreiben. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Mikrofossilien vor ca. 3,5 Milliarden Jahren die ersten photosynthetisch-aktiven Organismen auf der Erde darstellen könnten (Schopf, 1993). Für die darauffolgenden 1,4 Milliarden Jahre waren diese prokaryotischen Organismen die einzigen bisher bekannten Lebensformen auf unserem Planeten. Man geht heute davon aus, dass sich erst vor ca. 2,1 Milliarden Jahren die ersten komplexeren eukaryotischen Organismen entwickelten.

Die photosynthetisch-aktiven Bakterien begannen durch die Produktion von O_2 während der Photosynthese mit einer Veränderung der gesamten Atmosphäre unseres Planeten. Dadurch

kam es zu einer starken Erhöhung der O₂-Konzentration im Laufe der folgenden ca. 3 Milliarden Jahre. Die gestiegene O₂-Konzentration hatte zwei für die Evolution entscheidende Folgen. Zum einen lagen vor ca. 450 Millionen Jahren (Mio. J) schließlich ähnliche O₂-Konzentrationen wie heute vor aus der sich eine Ozonschicht in den höheren Schichten der Atmosphäre bildete (Holland, 2006). Diese Ozonschicht filtert einen Großteil der schädlichen UV-Strahlung aus dem Sonnenlicht, was den damaligen Organismen erstmals ermöglichte auch die oberen Schichten der Ozeane und die Küstenbereiche zu bevölkern und dort noch effektivere Photosynthese zu betreiben. Außerdem entstand ein neuer Stoffwechselprozess, die Atmung. Bei der Atmung werden zur Energiegewinnung organische Verbindungen unter zu Hilfenahme von O₂ gespalten. Die Atmung lieferte eine deutlich höhere Energieausbeute als die anaerobe Spaltung von organischen Verbindungen unter O₂-Ausschluss der bis dato anaerob lebenden Bakterien (Raven et al., 2006).

Mit der zunehmenden O₂-Konzentration bildeten sich auch die ersten eukaryotischen Zellen. Die eukaryotischen Zellen bilden bis heute die Basis aller Lebewesen abgesehen von den Bakterien und Archaea (Prokaryonten). Eukaryotische Zellen unterscheiden sich von prokaryotischen durch einen abgegrenzten Zellkern in dem das Erbgut verpackt ist und neuen Zellorganellen wie den Mitochondrien und den Chloroplasten. Die Mitochondrien (der Ort der Zellatmung) und die Chloroplasten (der Ort der Photosynthese) sind Zellorganelle, die sich nach der Endosymbiontentheorie aus prokaryotischen Bakterien entwickelten (McFadden, 2001). Diese Bakterien lebten zunächst als Symbionten in eukaryotischen Einzellern und aus diesen Endosymbionten entstanden schließlich die Plastiden der eukaryotischen Zellen. Untersuchungen der Chloroplasten heutiger Pflanzen zeigen eine deutliche Verwandtschaft zu den prokaryotischen Cyanobakterien und bestätigen die Endosymbiontentheorie (Schwartz and Dayhoff, 1978).

Die eukaryotischen Einzeller begannen vor mindestens 650 Mio. J sich zu mehrzelligen Organismen zusammenzuschließen, was den ersten Schritt zur Entwicklung komplexerer Organismen mit spezialisierten Zellen darstellte (Raven et al., 2006). Auch viele heute rezente Algen besitzen noch einen sehr einfachen Aufbau, der oft nur aus einer oder wenigen Zellen bestehen. Es gibt jedoch auch eine Vielzahl von hoch entwickelten Algen mit unterschiedlichen, spezialisierten Geweben. Phylogenetische Studien legen nahe, dass die Landpflanzen ihren Ursprung in einem gemeinsamen Vorfahren aus der Familie der Grünalgen besitzen und hier wahrscheinlich aus der Gruppe der Armleuchteralgen (*Charophyceae* oder *Charales*) (Graham, 1993). Wann die Pflanzen genau begannen das Land zu erobern ist noch umstritten. Untersuchungen von Proteinen des Zellkern sprechen dafür, dass erste Algen und Pilze schon vor ca. 700 Mio. J begannen, terrestrische Lebensräume zu besiedeln (Heckman et al., 2001).

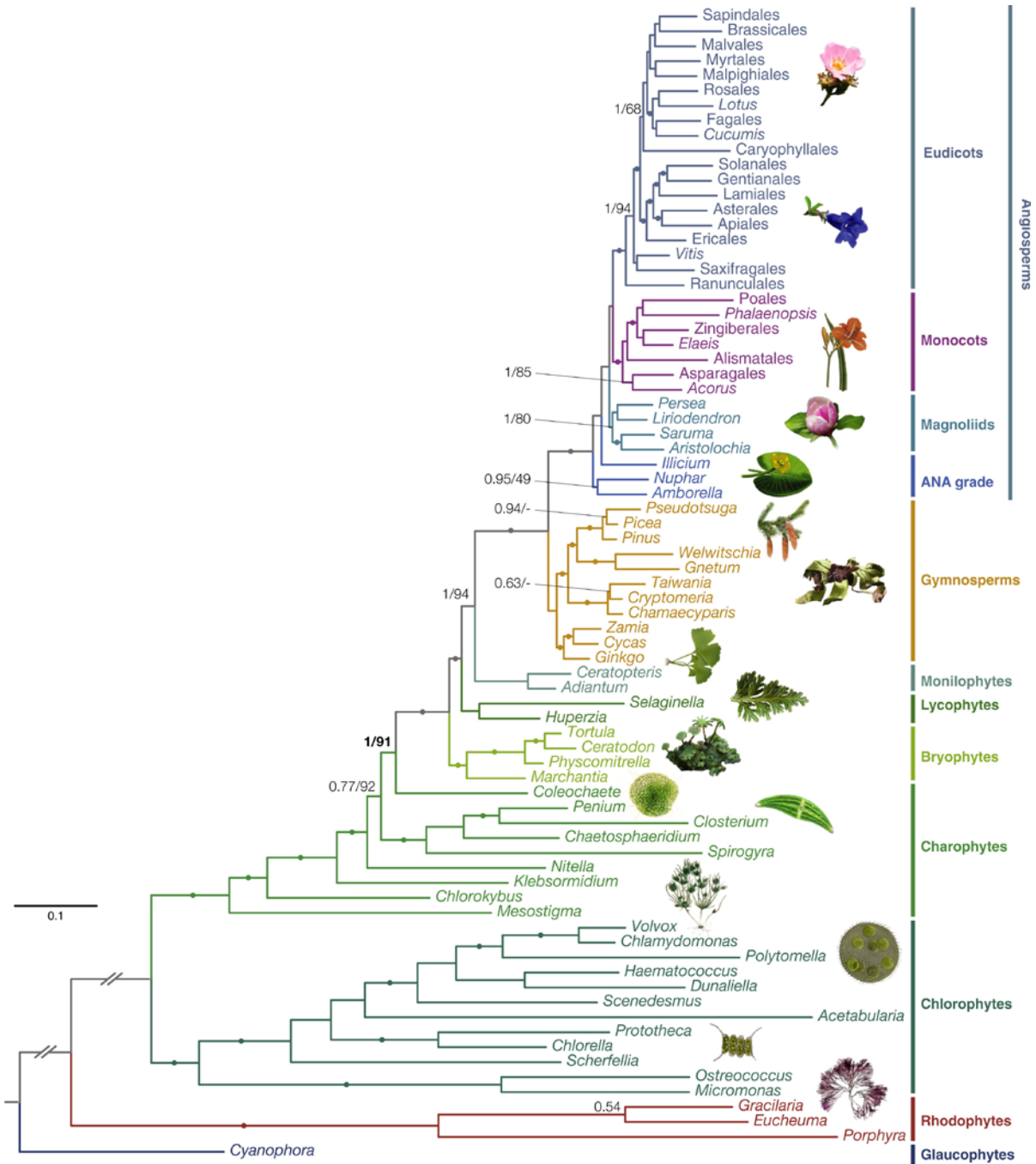


Abbildung 1-1: Die Evolution der Landpflanzen

Der Vergleich der genomischen Sequenz ribosomaler Proteine ist ein anerkanntes Merkmal für die Untersuchung von Verwandtschaftsverhältnissen zwischen Organismen (Marletaz et al., 2006). Finet et al. erstellten einen phylogenetischen Vergleich dieser ribosomalen Proteine aus 77 Pflanzenarten von der einzelligen Grünalge *Cyanophora* bis hin zu den Samenpflanzen mit den Monokotylen und den Dikotylen (Finet et al., 2010).

Wahrscheinlich waren Grünalgen die ersten Landpflanzen. Eine Symbiose mit Pilzen in einer Form erster Flechten ermöglichte ihnen das Land zu besiedeln (Gehrig et al., 1996). In dieser Symbiose ergänzten sich die beiden Organismen und brachten den Algen und Pilzen Vorteile, die ihnen eine gemeinsame Besiedlung des Landes ermöglichten. Die Myzelien des Pilzes waren gut an die dreidimensionale Erschließung des Substrats und das Lösen der darin

enthaltenen Nährstoffe und Mineralien angepasst. Die phototropen Algen dagegen waren auf die Nutzung der Lichtenergie und den Gasaustausch mit der Atmosphäre spezialisiert (Selosse and Le Tacon, 1998). Im Laufe der Entwicklung der Landpflanzen waren Symbiosen wahrscheinlich oft entscheidend für Sprünge in der Evolution. Am Beispiel der Mykorrhiza-Symbiose, die die meisten phototropen Organismen an Land eingehen, sieht man, dass symbiontische Beziehungen eine sehr hilfreiche, wenn nicht sogar eine essentielle Beziehung darstellen. Auch Symbiosen von speziellen Algen und Pizen sind noch heute ein erfolgreiches Prinzip, das es den Flechten ermöglicht vor Allem extreme Habitats zu erschließen (Selosse and Le Tacon, 1998).

Im Laufe der Evolution entstanden aus diesen ersten Algen an Land komplexe Landpflanzen wie die Moose und die Gefäßpflanzen. Sie entwickelten einen zweiphasigen Lebenszyklus und bildeten spezialisierte Organe für die Fortpflanzung (Gametangien), die Verbreitung (Samen), eine optimierte Photosynthese (Blätter), einen Stamm mit strukturgebendem Gewebe (Holz) sowie Strukturen zur Wasser- und Nährstoffaufnahme (Wurzeln) und deren Transport (Leitgewebe). Diese und andere Neuerungen entwickelten sich ab Mitte des Ordoviziums (vor ca. 470 Mio. J) bis zum Ende des Devons (vor ca. 360 Mio. J) und ermöglichten den Pflanzen das Land für sich zu erobern und damit ein komplett neues Ökosystem zu formen (Kenrick and Crane, 1997).

In Gesteinsschichten aus dem Ordovizium und dem frühen Silur vor 470 bis 430 Mio. J finden sich die ältesten Fossilien von ersten Landpflanzen. Dabei handelt es sich um Fossilien von Sporen, die den Lebermoos- oder Laubmoosartigen zugeordnet werden (Raymond and Metz, 1995). Ab dem Mittelsilur (vor ca. 430 Mio. J) finden sich die ersten Megafossilien von Strukturen und ganzen Pflanzen der frühen Bryophyten wie den Lebermoosen und Hornmoosen. Bei diesen Bryophyten handelt es sich bis auf wenige Ausnahmen um kleine Gewächse von weniger als 10 cm Höhe mit einer hohen Diversität (Hueber, 1992). Ab dem frühen Devon vor ca. 400 Mio. J steigt die Anzahl der gefundenen Fossilien von Pflanzen und es finden sich die ersten Gefäßpflanzen wie zum Beispiel *Pinnatiramosus qianensis* mit ersten Tracheid-ähnlichen Strukturen (Cai et al., 1996). Ab dem Devon bis zum Ende des Perm (vor ca. 250 Mio. J) entstand aus diesen ersten Vorfahren eine große Vielfalt an Gefäßpflanzen, die sich schließlich zu den dominanten Pflanzen der terrestrischen Flora entwickelten (Knoll et al., 1984; Gray, 1993; Raymond and Metz, 1995).

Um an Land überleben und gedeihen zu können, mussten sich die Pflanzen jedoch an viele neue Faktoren anpassen. Die Landpflanzen (**Embryophyten**) entwickelten unter dem Druck der Anpassung an die geringere Verfügbarkeit von Wasser, die höhere Strahlungsbelastung außerhalb des Wassers und das Fehlen des Wassers als stützende Kraft ihres Aufbaus eine große Vielfalt neuer Familien und Arten. Die Entwicklung eines zweiphasigen Lebenszyklus (Remy et al., 1993), die Internalisierung der Organe zur Gasaufnahme (interzelluläre

Gasräume) und eine nach Außen schützende Cuticula waren dabei die ersten Anpassungen an die neuen, sie umgebenden Umwelteinflüsse. Diese Anpassungen zusammen mit der Entstehung der Stomata und des Leitgewebes waren unerlässlich für die Entwicklung der homiohydren Lebensweise vieler rezenter Embryophyten (Raven, 1993; Raven, 2002).

Die ersten molekularbiologischen Untersuchungen der verwandtschaftlichen Verhältnisse von Pflanzen basierten hauptsächlich auf Analysen der mitochondrialen und chloroplastidären Genome unterschiedlicher Arten (Qiu et al., 1998; Qiu et al., 2010; Ruhfel et al., 2014). Die Verfügbarkeit einer stetig ansteigenden Zahl sequenzierter Pflanzengenome macht es heute allerdings möglich, zusätzlich dazu auch die Gene aus dem Zellkern der Pflanzen in phylogenetischen Studien zu betrachten. Diese neuen Möglichkeiten konnten viele Ergebnisse früherer Untersuchungen bestätigen. Die Vielzahl an Daten macht jedoch die Nutzung unterschiedlicher Datenfilterungsprozesse und Analysealgorithmen erforderlich, was zu unterschiedlichen Auslegungen führen kann (Wickett et al., 2014). Im Allgemeinen ist die monophyletische Entstehung der **Streptophyten** (Landpflanzen und ihre nächsten Verwandten aus der Familie der Grünalgen) anerkannt. Die Frage aus welcher Algenfamilie der Streptophyten sich schließlich die Embryophyten entwickelten, bleibt jedoch umstritten. Während viele Studien besagen, dass sich die Landpflanzen aus den Grünalgen der *Charales* entwickelt haben (Karol et al., 2001), deuten neuere Analysen darauf hin, dass eine Gruppe aus den *Coleochaetales* und den *Zygnematophyceae* die nächsten Verwandten der Landpflanzen sind (Turmel et al., 2007; Chang and Graham, 2011).

Die ersten Embryophyten waren die **Bryophyten** (Moose) mit den Lebermoosen, den Hornmoosen und den echten Moosen. Die Reihenfolge der Entwicklung dieser drei Untergruppen und ihrer Stellung zu den **Tracheophyten** (Gefäßpflanzen) ist jedoch noch nicht endgültig geklärt (Qiu et al., 1998; Renzaglia et al., 2000; Shaw et al., 2011). Die Bryophyten zeigen als Anpassungen an das Landleben schon erste interzelluläre Gasräume für eine verbesserte CO₂-Aufnahme aus der Atmosphäre bei reduziertem Wasserverlust. Außerdem bilden manche Arten, abgesehen von den Lebermoosen, schon erste Stomata in Teilen des Sporophyten aus. Aus den Bryophyten entwickelten sich die Tracheophyten mit den ersten ausgeprägten Leitgefäßen. Die Leitgefäße der Tracheophyten ermöglichten den Pflanzen nicht nur einen verbesserten Stofftransport innerhalb der Pflanze, sondern bildeten auch die Grundlage für die Entwicklung von festigendem Gewebe (Holz). Die Tracheophyten waren auch die ersten Pflanzen, die einen Wandel hin zu einem dominant sporophytischen Lebenszyklus vollzogen, während die Bryophyten noch einen dominant gametophytischen Lebenszyklus aufweisen.

Einer der ersten Vertreter der Tracheophyten sind die **Lycophyten** (Bärlapppflanzen) (Smith et al., 2006; Wickett et al., 2014). Sie sind die ersten Pflanzen mit echtem Leitgewebe und echten Wurzeln, was ihnen eine bessere Aufnahme und Verteilung von Wasser und

Nährstoffen innerhalb der gesamten Pflanze ermöglicht. Mit diesen letzten Anpassungen an das Landleben sind die Lycophyten die ersten Pflanzen die nach der Definition von Raven et al. alle für eine homiohydre Lebensweise erforderlichen Komponenten besitzen (Cuticula, interzelluläre Gasräume, Stomata, Leitgewebe, Wurzeln) (Raven, 2002). Dies ermöglichte den Lycophyten vor 360 Mio. J aus dem Bereich der krautigen Pflanzen herauszuwachsen und erste Bäume und Wälder auf der Erde entstehen zu lassen. Für die nächsten 60 Mio. J dominierten die Lycophyten die Landflora der Erde. Von den Lycophyten spalteten sich schließlich die Farne ab. Sie sind die ersten Pflanzen mit einer echten Blattspreite für eine verbesserte Photosynthese in den Blättern. Die evolutionsgeschichtlich jüngste Gruppe der Pflanzen bilden die **Spermatophyten** (Samenpflanzen). Die Spermatophyten waren durch ihre beständigen Samen und deren einfache Verbreitung in der Lage die Lycophyten und Farne als die dominanten Pflanzen der Landflora abzulösen. Der schon in den Lycophyten und Farnen dominante Sporophyt übernimmt in den Spermatophyten eine noch größere Rolle im Lebenszyklus der Pflanze und es findet sich gar kein eigenständiger Gametophyt mehr. Die Samenpflanzen teilen sich auf in die Gymnospermen (Nacktsamigen) und Angiospermen (Blütenpflanzen/Bedecktsamigen) (Kenrick and Crane, 1997; Wickett et al., 2014). Die Samenpflanzen stellen heute die Gruppe der Pflanzen mit der größten Vielfalt dar und bilden den Großteil der rezenten Landflora vor Allem im Bereich der nicht krautigen Pflanzen.

1.2 Die Stomata

Die unregelmäßige Verfügbarkeit von Wasser an Land stellte eine große Herausforderung für die ersten Landpflanzen dar. Die ersten Pflanzen an Land waren einfache Grünalgen, die vermutlich durch die Symbiose mit Pilzen auf Wasser aus der Erde zugreifen konnten (Gehrig et al., 1996). Die Bryophyten als erste Landpflanzen waren meist Gewächse mit krautiger Gestalt, deren Höhe selten 10 cm überschritt. Durch die geringe Größe war eine Rehydrierung der gesamten Pflanze auch nach der Austrocknung noch möglich, was bei größeren Pflanzen, bis auf wenige Spezialisten, allerdings fatale Folgen hätte. Die Pflanzen waren also darauf angewiesen ihren Wasserhaushalt so zu regulieren, dass sie sich an die wechselnde Verfügbarkeit von H₂O anpassen konnten. Für eine derartige homiohydre Lebensweise sind eine Cuticula, interzellulare Gasräume, Stomata, Leitgewebe und Wurzeln erforderlich (Raven, 2002). Die Cuticula verhindert dabei die unregulierte Transpiration von Wasser aus dem Spross, während die Wurzeln und das Leitgewebe für eine Versorgung der gesamten Pflanze mit dem zur Verfügung stehenden H₂O sorgen. Damit die Pflanzen trotz Cuticula noch effizient Photosynthese betreiben können sind die interzellularen Gasräume erforderlich, deren Öffnungen zur Atmosphäre wiederum durch Poren, die Stomata (griechisch: Mund), reguliert werden. Die Stomata stellen damit eine entscheidende Anpassung der Pflanzen an das Landleben dar, die ihnen eine erfolgreiche Besiedlung dieses neuen Habitats ermöglichte. Die vor ca. 400 Mio. Jahren zum ersten Mal auftauchenden Stomata verliehen den Landpflanzen die Möglichkeit, ihren Wasserverlust an die Atmosphäre effektiv zu regulieren (Cowan and Farquhar, 1977; Raven, 1977).

Die Stomata sind Öffnungen in der Epidermis des Sprosses, die durch ein symmetrisch aufgebautes Paar von Schließzellen gebildet wird. Sie verbinden die interzellularen Gasräume in den photosynthetisch aktiven Geweben der Pflanzen mit der Atmosphäre. Sie regulieren damit sowohl den Wasserverlust durch Transpiration als auch die CO₂-Aufnahme der Pflanze. Grundsätzlich kann man dabei zwei verschiedene Stomatatypen unterscheiden. Beim Gras- oder *Graminaceen*-Typ sind die beiden Schließzellen hantelförmig aufgebaut mit einer länglichen Spaltöffnung zwischen den beiden Schließzellen. Die Schließzellen des Helleborus-Typs, zu dem auch unter anderem *Arabidopsis*, *Selaginella* und *Ceratopteris* zählen, sind nierenförmig und bilden eine elliptische Spaltöffnung in ihrer Mitte. Die Öffnungsweite der Stomata wird durch den Turgordruck in den Schließzellen reguliert. Beim Turgor(druck) handelt es sich um den Druck des Zytoplasmas von Innen auf die die Zelle umgebenden Zellwände. Dieser Druck ist abhängig von der Konzentration gelöster osmotisch-aktiver Teilchen in der Zelle und dem Apoplasten. Durch steigenden Turgordruck öffnen sich die Stomata und durch fallenden Turgor schließen sie sich. Dieses Funktionsprinzip ist eine

Rückversicherung gegen Austrocknung, da der fallende Turgordruck der Zellen bei Dehydrierung gleichzeitig zu einem passiven Schluss der Stomaöffnung führt. Durch das Schließen der Stomata wird so ein weiterer Wasserverlust minimiert.

Die Anordnung und Anzahl der Stomata in der Epidermis ist nicht willkürlich, sondern stark reguliert. Es gibt drei verschiedene Muster der Stomataverteilung auf der Blattoberfläche, die hypo-, epi-, und amphistomatischen Blätter. Der am weitesten verbreitete Typ sind die hypostomatischen Blätter. Bei diesen Blättern befinden sich die Stomata nur oder hauptsächlich auf der Unterseite des Blattes (abaxial). Bei epistomatischen Blättern befinden sich die Stomata nur auf der Blattoberseite (adaxial). Dieser Typ findet sich vor allem bei Schwimmblättern von Wasserpflanzen, die nur auf der dem Wasser abgewandten Oberseite des Blattes Gasaustausch betreiben können. Bei vielen krautigen Pflanzen findet man auf beiden Seiten des Blattes Stomata. Diese gleichmäßige Verteilung der Stomata auf beiden Blattseiten wird als der amphistomatische Typ bezeichnet. Die Anzahl der Stomata pro Quadratmillimeter wird mit dem Spaltöffnungsindex angegeben. Dieser kann sich von Klasse zu Klasse aber auch bei den unterschiedlichen Verteilungsmustern auf Blattober- und Unterseite stark unterscheiden. So liegt er bei der sukkulenten Amerikanischen Agave (*Agave americana*) auf beiden Seiten der Blätter bei 21 Stomata pro Quadratmillimeter (amphistomatisch), beim Bergahorn (*Acer pseudoplatanus*), der nur auf der Blattunterseite Stomata besitzt (hypostomatisch), bei 860 Stomata pro Quadratmillimeter (Lüttge et al., 2010). Die Anordnung der Stomata in der Epidermis wird durch Musterbildungsmechanismen reguliert und unterliegt dabei der Ein-Zell-Regel. Diese besagt, dass immer mindestens eine nicht Schließzelle zwischen zwei Schließzellpaaren liegen muss, denn nur wenn die Schließzellen von „normalen“ Epidermiszellen umgeben sind, sind sie voll funktionsfähig (Kagan and Sachs, 1991) und können sich sterisch ungehindert Turgor-abhängig erweitern und schrumpfen. Die Entwicklung und Ausdifferenzierung von Stomata ist in der Epidermis von *Arabidopsis thaliana* gut untersucht. Hier sind für die Stomaentwicklung hauptsächlich Transkriptionsfaktoren der bHLH(basic-**H**elic-**L**oop-**H**elix)-Familie, die SPCH, MUTE, FAMA und SCRM-Faktoren, verantwortlich (MacAlister et al., 2007; Pillitteri et al., 2007; Kanaoka et al., 2008). Diese Transkriptionsfaktoren (oder zumindest ein Teil von ihnen) waren bisher in allen untersuchten Pflanzen mit Stomata für deren Entstehung verantwortlich (Peterson et al., 2010). So besitzt schon *Physcomitrella patens* als Modellpflanze der Moose und eine der ersten Pflanzen mit Stomata (Raven, 2002) verschiedene FAMA-Transkriptionsfaktoren (Peterson et al., 2010). Diese sind in *Physcomitrella* wahrscheinlich alleine für die Differenzierung der Stomata verantwortlich. Dies lässt die Vermutung zu, dass FAMA Transkriptionsfaktoren anfangs alleine für die Differenzierung der Stomata verantwortlich waren und sich SPCH, MUTE und SCRM Faktoren erst später entwickelten (Peterson et al., 2010; Caine et al., 2016).

Wie entscheidend die Stomata für Pflanzen sind, zeigt sich auch dadurch, dass sie sich im Laufe der Evolution noch vor Blüten, Blättern, Wurzeln und dem Leitgewebe entwickelt haben (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) (Freeman, 2008). Schon erste in Fossilien entdeckte Stomata in Pflanzen mit und ohne Leitgewebe sehen den Stomata heutiger Pflanzen wie zum Beispiel denen von *Arabidopsis thaliana* sehr ähnlich (Edwards et al., 1998). Abgesehen von Lebermoosen besitzt ein Großteil der heute lebenden Landpflanzen Stomata in der Epidermis ihres Sporophyten. Daher stellt sich die Frage wie und wann im Laufe der Evolution der Landpflanzen sich die Stomata entwickelten und welche Faktoren für ihre Entstehung entscheidend waren.

1.2.1 Die Evolution der Stomata

Wenn man die Evolution der Stomata betrachtet, stellt sich die Frage, welcher Selektionsdruck war entscheidend für die Evolution von Stomata und entstanden sie nur einmal in einem gemeinsamen Vorfahren aller Pflanzen mit Stomata (monophyletisch) oder unabhängig von einander in mehreren unterschiedlichen Spezies. Stomata stellen einen entscheidenden Schritt in der Entwicklung der Homiohydrie von Pflanzen dar. Durch sie waren Pflanzen erstmals in der Lage ihren Wasserverlust an ihre Umgebung an die Verfügbarkeit von Wasser anzupassen (Raven, 2002). Doch abgesehen von den Stomata sind für eine homiohydre Lebensweise der Pflanzen noch andere Komponenten erforderlich. Erst in mehrlagigem Gewebe mit einem nach außen abgegrenzten interzellularen Gasraum sind Stomata bei der Regulierung des Gasaustauschs mit der Atmosphäre dienlich. Eine effektive Trennung des Pflanzeninneren von deren Umgebung wird dabei erst durch eine Cuticula auf der Außenseite der Epidermis ermöglicht. Zusätzlich benötigen homiohydre Pflanzen interne Wasserleitbahnen und ein Wasseraufnahmesystem, das der Pflanze Wasser aus dem Boden zur Verfügung stellt (Cowan and Farquhar, 1977; Raven, 1977; Wong et al., 1979).

Während die Existenz und Entwicklung von Stomata für Pflanzen mit ausgeprägtem Leitgewebe unumstritten ist (Kenrick and Crane, 1997), wird es bei der Betrachtung existierender Embryophyten abseits der Pflanzen mit Leitgewebe schwieriger. In Horn- und Laubmoosen zum Beispiel besitzt der Sporophyt oft schon strukturell entwickelte Stomata, deren Funktionalität allerdings umstritten ist (Paton and Pearce, 1957). Lebermoose dagegen besitzen noch keinerlei Stomata (Kenrick and Crane, 1997).

Wenn man die ältesten Fossilienfunde von Landpflanzen betrachtet scheint es, als seien Hornmoose die ersten Landpflanzen gewesen (Taylor, 1995; Renzaglia et al., 2000). Untersuchungen des mitochondrialen Genoms rezenter Landpflanzen von Qui et al. (Qiu et al., 1998) sprechen jedoch dafür, dass Lebermoose die ersten Landpflanzen waren.

Diese Diskussion zeigt, dass die Frage nach den ersten Landpflanzen noch nicht endgültig geklärt ist. Wenn man von Lebermoosen als ersten Landpflanzen ausgeht, kann man auch von einer monophyletischen Entstehung der Stomata nach den Lebermoosen ausgehen (Kenrick and Crane, 1997). Sollten Hornmoose jedoch die ersten Pflanzen an Land gewesen sein (Renzaglia et al., 2000), müssen die Stomata in der Entwicklung von Lebermoosen wieder verloren gegangen sein.

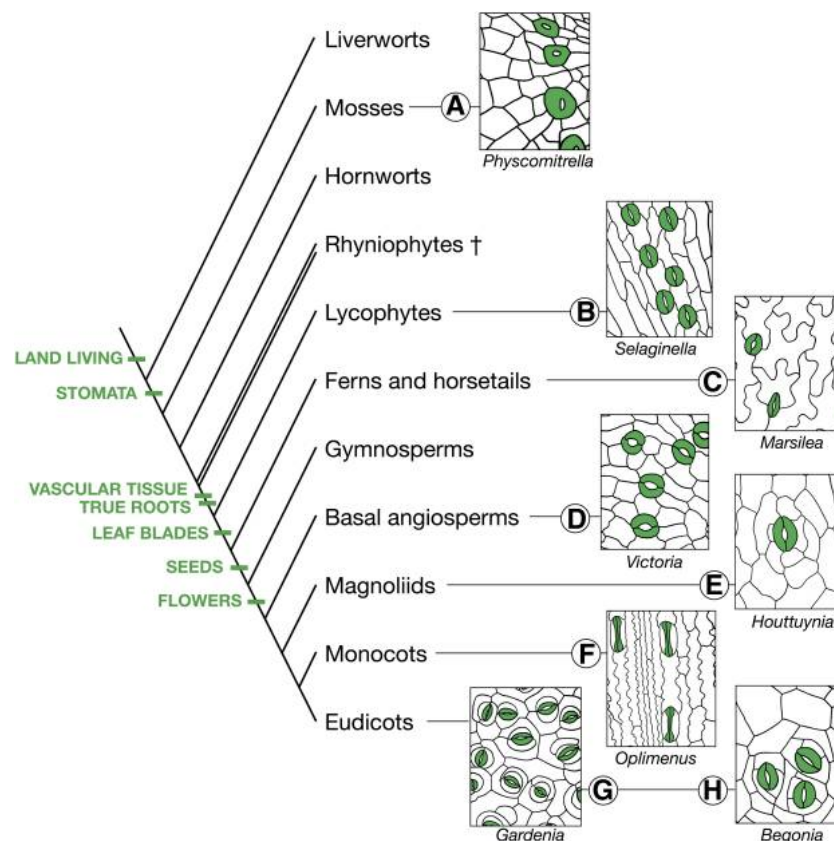


Abbildung 1-2: Entwicklung der Stomata im Laufe der Evolution von Landpflanzen

Im Laufe der Evolution der Landpflanzen entstanden schon sehr früh Öffnungen in der Epidermis der Gewebe, für den Gasaustausch mit der Atmosphäre. Aus einfachen unregulierten Poren in den Lebermoosen entwickelten sich die präzise gesteuerten Stomata aus zwei Schließzellen wie man sie auch in allen Gefäßpflanzen findet. In Grün dargestellt sind die evolutionären Errungenschaften im Laufe der Evolution. (Peterson et al., 2010)

Die Stomata bieten heute lebenden Pflanzen viele Vorteile, unabhängig von der Frage, ob sie sich monophyletisch oder mehrmals im Laufe der Evolution in den Lebermoosen oder den Hornmoosen entwickelt haben. Der erste und offensichtlichste evolutionäre Vorteil für Pflanzen mit Stomata ist die Optimierung der Kohlenstofffixierung bei gleichzeitiger Minimierung des Wasserverlustes durch Transpiration. Mit Hilfe ihrer Stomata können Pflanzen die Aufnahme von CO₂ und den damit verbundenen Wasserverlust an die jeweiligen Umweltbedingungen anpassen. Dadurch können sie bei geringer Verfügbarkeit von H₂O oder einer erhöhten Transpiration bei niedriger Luftfeuchtigkeit in der Atmosphäre, ihren Wasserverlust minimieren

und trotzdem noch effizient Photosynthese und damit Kohlenstofffixierung betreiben (Cowan and Farquhar, 1977; Wong et al., 1979). Unter extremen Bedingungen sind Pflanzen dadurch in der Lage, sich vor einem fatalen Wasserverlust zu schützen, der zu Embolien in den Xylemgefäßen und schließlich zur Austrocknung der Pflanze führen könnte.

Abgesehen von der Wasserversorgung des Sprosses spielen Stomata auch für den Transport von Ionen und anderen Nährstoffen eine wichtige Rolle. Das durch die Stomata entweichende Wasser erzeugt einen Transpirationssog. In diesem Sog werden die im Wasser gelösten Ionen und Nährstoffe, die über die Wurzeln aus der Erde aufgenommen wurden, in den Spross der Pflanze transportiert (Church, 1919/1968). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser Transport auch bei sehr geringer Transpiration, also auch ohne Stomata, möglich ist (Woodward, 1998). Dabei erhöht sich die Konzentration der Ionen im Xylemsaft, doch die Nährstoffversorgung des Sprosses und dessen Wachstum bleiben nahezu unbeeinträchtigt.

Eine Grundvoraussetzung für Stomata waren interzelluläre Gasräume, deren Öffnungen zur Atmosphäre durch die Stomata kontrolliert werden können. Diese Gasräume vergrößerten die Oberfläche des photosynthetischen Gewebes zur Gasphase und führen so zu einer verbesserten CO₂-Aufnahme (Raven, 2002). Für eine effektive Abgrenzung dieser interzellulären Gasräume benötigten die Pflanzen außerdem eine Epidermis mit einer Cuticula, die einen unkontrollierten Gasaustausch verhinderte. Die Cuticula entwickelte sich im Laufe der Evolution vermutlich zu nächst als Schutz vor Parasiten, Fraßfeinden, UV-Strahlung und eindringendem Wasser und übernahm erst später die Rolle als eine Barriere gegen unkontrollierten Gasaustausch (Edwards D, 1996). Mehrlagige Gewebe mit integrierten interzellulären Gasräumen führten gleichzeitig zu einer erhöhten Stabilität des Pflanzenkörpers, was den Pflanzen erlaubte höher zu wachsen. Dies führte nicht nur zu einem besseren Wachstum hin zum Licht, sondern auch zu einem Abheben aus der bodennahen Luftschicht. Die dadurch erreichten Luftschichten oberhalb der krautigen Pflanzen bestehen aus einem besser durchmischten Luftgemisch und einer damit verbundenen besseren CO₂-Verfügbarkeit (Edwards D, 1996).

Lebermoose als die ersten rezenten Pflanzen, die sich an Land entwickelten (Kenrick and Crane, 1997; Finet et al., 2010), besitzen zwar interzelluläre Gasräume und eine rudimentäre Cuticula allerdings noch keine Stomata. Ihre interzellulären Gasräume sind nur durch einfache kaum regulierbare Poren von der Atmosphäre abgegrenzt. Sie ermöglichen noch keine direkte Regulation des Gasaustauschs. Die ersten entdeckten fossilen Nachweise von voll entwickelten Stomata in Pflanzen finden sich in den Sporophyten von Hornmoosen. Auch der Sporophyt rezenter Hornmoose besitzt funktionelle Stomata. Außerdem besitzen Hornmoose interzelluläre Gasräume und eine Cuticula, jedoch noch kein Leitgewebe. Damit besitzen sie, abgesehen vom Leitgewebe und richtigen Wurzeln, schon alle nötigen Voraussetzungen für eine homiohydre Lebensweise mit effektiv arbeitenden Stomata (Frahm,

2001). Der Sporophyt der Hornmoose macht jedoch nur einen sehr kleinen Teil der Pflanze aus und wächst auf dem dominanten Gametophyten. Dadurch besitzen die Stomata in den Sporophyten der Hornmoose und auch der Laubmoose wahrscheinlich nur einen geringen Einfluss auf den Wasserhaushalt der dominant gametophytisch lebenden Moose. Betrachtet man die Vorteile, die Stomata den heute-lebenden Gefäßpflanzen bieten, zusammen mit deren Nutzen zur Zeit der Entwicklung der Stomata, lassen sich erste Schlüsse auf den Evolutionsdruck bei der Entstehung der Stomata ziehen (Raven, 2002). Für das Verhindern von Embolien in den Xylemgefäßen spielten die Stomata in den ersten Hornmoosen noch keine Rolle, da diese noch keine Leitgefäße besaßen. Untersuchungen rezenter Pflanzen ohne Stomata, wie den Lebermoosen, zeigen, dass auch der Transport von Nährstoffen in den Spross krautiger Pflanzen ohne Stomata gut funktioniert. Diese Punkte können daher nicht die evolutionären Vorteile gewesen sein, die zur Entstehung der Stomata geführt haben (Konrad et al., 2000).

Um die Frage des evolutionären Vorteils von Stomata zu beantworten, muss man deren Vorteile im Zusammenhang mit den damaligen Umweltbedingungen betrachten. So unterlagen entscheidende Faktoren wie die CO₂- und O₂-Konzentration der Atmosphäre im Laufe der Zeit großen Schwankungen. Diese unterschieden sich vor Allem zur Zeit der ersten entdeckten Stomata im Sporophyten von Moosen im Obersilur vor ca. 410 Millionen Jahren stark von heutigen Bedingungen (Edwards et al., 1998). Die damalige CO₂ Konzentration entsprach mindestens der 10fachen Konzentration der heutigen Atmosphäre. Dies erlaubte auch Pflanzen ohne Stomata, wie den Flechten, Algen und Lebermoosen eine deutlich höhere photosynthetische Ausbeute pro Mol verbrauchten Wassers. Die Böden im Obersilur, der Zeit des Auftreten erster Pflanzen mit Stomata, waren allerdings noch sehr karg und konnten nur wenig H₂O aufnehmen (Raven JA, 2001). Dies führte zu einer sehr schwankenden Wasserverfügbarkeit für damalige Pflanzen. Berechnungen in Modellen mit den damaligen Umweltbedingungen zeigen, dass Pflanzen mit regulierbaren Stomata auch bei der damaligen hohen Verfügbarkeit von CO₂ einen evolutionären Vorteil durch Stomata erzielten. Durch die Stomata waren die Pflanzen dazu in der Lage ihre Photosyntheseleistung pro Mol verbrauchten Wassers zu optimieren und bestmöglich an die jeweilige Verfügbarkeit von H₂O anzupassen (Raven, 2002).

1.2.2 Stomabewegung

Bei der Bewegung der Spaltöffnung handelt es sich um eine nastische Bewegung, die durch eine Änderung des Turgordrucks in den Schließzellen angetrieben wird. Die beiden Schließzellen der Stomata sind parallel angeordnet, wobei die Zellwände zwischen den beiden Zellen nicht durch eine Mittellamelle miteinander verschweißt sind. Dadurch ergibt sich der Zentralspalt zwischen den beiden Zellen. Bei einer Turgorzunahme steigt auch das Volumen der Schließzellen. Die Mikrotubuli in den Schließzellen bilden ein radial angeordnetes Geflecht, was den Zellen bei Turgorzunahme/Volumenzunahme nur eine Ausdehnung in Längsrichtung ermöglicht und eine seitliche Ausdehnung verhindert. Außerdem befinden sich auch in der Zellwand der Schließzellen asymmetrisch angeordnete Mikrofibrillen, die die Bewegungsrichtung der Zellen bestimmen. Da die Zellwände am Ende der beiden Schließzellen mit einander Verbunden sind ergibt sich aus der Ausdehnung der Schließzellen in Längsrichtung eine Wölbung beider Zellen nach außen. Dadurch öffnet sich der zentrale Spalt zwischen den Schließzellen (Stomaöffnung). Der Druck in den Schließzellen vervielfacht sich dabei während der Stomaöffnung (Franks et al., 2001). Bei einer Abnahme des Turgordruck in den Schließzellen lässt die Ausdehnung in Längsrichtung nach und der Spalt zwischen den beiden Zellen verengt sich wieder (Stomaschluss). Durch diesen Mechanismus kann die Pflanze die Öffnungsweite der Stomata präzise regulieren (Lüttge et al., 2010). Die deutlich größeren Epidermiszellen um die Stomata herum können durch ihre Größe die Druckschwankungen der Schließzellen kompensieren. Für das Öffnen der Stomata müssen die Schließzellen deshalb einen vielfach höheren Turgordruck erzeugen als die sie umgebenden Epidermiszellen (Wu et al., 1985; Klein et al., 1996).

Die Turgorveränderungen in den Schließzellen sind abhängig von den Konzentrationen osmotisch-aktiver Substanzen (Osmotika). Schließzellen sind auf Grund fehlender Plasmodesmata in der Lage ihr osmotisches Potential unabhängig vom sie umgebenden Gewebe zu regulieren (Wille and Lucas, 1984). In den Schließzellen fungieren sowohl Zucker als auch organische und anorganische Ionen als Osmotika. Diese Teilchen besitzen auf Grund ihrer Ladung oder polaren Eigenschaften eine hohe Löslichkeit in Wasser. Ihre Ladung oder Polarität sorgt dafür, dass die Osmotika die polaren H₂O-Moleküle in Form einer Hydrathülle an sich binden. Dies führt zu einer geringeren Verfügbarkeit von freiem H₂O und somit zu einem geringeren Wasserpotential. Auf Grund des entropischen Effekts ist H₂O bestrebt dieses Wasserpotential auszugleichen, was dazu führt, dass H₂O von Orten mit höherem Wasserpotential (niedrige Konzentration von Osmotika) zu Orten mit niedrigerem Wasserpotential (hohe Konzentration von Osmotika) fließt (Taiz and Zeiger, 2014).

Während die Konzentration von Zuckern und organischen Substanzen lang- und mittelfristig durch deren Biosynthese in der Zelle verändert werden kann, ist für eine schnelle Veränderung

der Konzentration von Osmotika ein Transport zwischen dem Zellinnerem und dem extrazellulären Raum, dem Apoplast, erforderlich. Für den Transport über die Plasmamembran sind membranständige Transportproteine verantwortlich, die einzelne Substrate/Ionen meist sehr spezifisch transportieren. Das H₂O folgt dabei stets dem osmotischen Gradienten der verschobenen Osmotika. Das Wasser kann zwar durch die Plasmamembranen diffundieren, ein Großteil des H₂O-Transports erfolgt allerdings durch wasserpermeable Proteine in der Membran, sogenannte Aquaporine, die den Transport beschleunigen (Shope and Mott, 2006).

Um die Zusammensetzung des Zytosols durch die Verschiebung osmotisch-aktiver Teilchen nicht zu starken Schwankungen auszusetzen, werden die meisten osmotisch aktiven Teilchen in der Vakuole der Schließzellen gespeichert. Dadurch kann die Zusammensetzung des Zytosols nahezu konstant gehalten werden und es werden toxische Effekte durch zu hohe Ionenkonzentrationen im Zytosol verhindert (MacRobbie, 2006).

1.2.3 Die Stomaöffnung

Abgesehen von den CAM-Pflanzen, bei denen der gesamte Gasaustausch nur nachts stattfindet, öffnen die Stomata der meisten Pflanzen hauptsächlich tagsüber, um Gasaustausch für eine effektive Photosynthese betreiben zu können. Um die Stomata am Morgen zu öffnen reagieren diese zum Beispiel auf blaues und rotes Licht. Die Stomaöffnung wird außerdem durch eine geringe CO₂ Konzentration oder durch hohe Luftfeuchtigkeit induziert.

Zum Öffnen der Stomata reichern die Schließzellen hauptsächlich Kalium (K⁺), Zucker und Anionen an (Fischer, 1968; Talbott and Zeiger, 1998). Durch das nachströmende Wasser steigt der Turgor in den Schließzellen und die Spaltöffnungen weiten sich. Dem Öffnen der Stomata liegen hauptsächlich aktive oder sekundäraktive Transportprozesse zu Grunde. Diese Transportprozesse werden entweder direkt durch ATP energetisiert oder beruhen auf der protonenmotorischen Kraft, die unter ATP-Verbrauch von Plasmamembran H⁺-ATPasen aufgebaut wird. Dies stellt auch den geschwindigkeitslimitierenden Faktor der Stomaöffnung dar (Roelfsema and Hedrich, 2005).

1.2.3.1 Der Motor der Stomaöffnung - die protonenmotorische Kraft

Die Schließzellen reagieren auf Belichtung mit der Abgabe von Protonen (H^+), was zu einer Ansäuerung des Apoplasten führt. Dies stellt eine Grundvoraussetzung für das Öffnen der Stomata dar (Raschke and Humble, 1973). In Schließzellprotoplasten zeigt sich, dass die Zellen auf Blaulicht mit einer Ansäuerung des Außenmediums reagieren und daraufhin ihr Volumen vergrößern. In intakten Spaltöffnungen führt diese Volumenzunahme zum Öffnen der Stomata (Zeiger and Hepler, 1977; Shimazaki et al., 1986). Plasmamembran-assoziierte Photo-Rezeptorkinasen (PHOT1/2) in der Schließzelle sind verantwortlich für die Wahrnehmung des Blaulichts (Kinoshita et al., 2001). Die Belichtung führt in den beiden Photorezeptoren zu einer Autophosphorylierung, was zu einer anschließenden Bindung eines 14-3-3 Proteins führt. Diese Interaktion setzt eine Signalkaskade in Gang, die die Aktivierung von Plasmamembran-ständigen Protonenpumpen (P-typ H^+ -ATPasen, (Amodeo et al., 1992) und darüber das Öffnen der Stomata einleitet. Ob es sich dabei um eine direkte Aktivierung der H^+ -ATPase durch die Rezeptorkinasen handelt oder noch andere Interaktionspartner zwischen geschaltet sind, ist noch nicht vollständig geklärt (Takemiya et al., 2013). Im inaktiven Zustand verhindert eine autoinhibitorische Domäne im C-Terminus (CT) der H^+ -ATPase deren Aktivität. Der durch Blaulicht aktivierte Signalweg ermöglicht durch eine Phosphorylierung dieser Domäne eine Interaktion mit einem 14-3-3 Protein. Dies hält die Protonenpumpe, ähnlich wie bei den Photorezeptoren, im aktiven Zustand (Fuglsang et al., 2003). Die Protonenpumpe ist in ihrer Aktivität außerdem abhängig vom pH-Wert und wird durch zytosolische Ansäuerung aktiviert (Becker et al., 1993). Deaktiviert wird die H^+ -ATPase in Dunkelheit durch die Phosphorylierungsaktivität der Proteinphosphatase 1 (Takemiya et al., 2013).

Neben der Ansäuerung des Apoplasten hyperpolarisieren die H^+ -ATPasen durch den selektiven Transport von positiven Ladungen aus den Schließzellen die Plasmamembran (Assmann et al., 1985). Untersuchungen der Mutanten *ost2-1* und *ost2-2* (open stomata 2) von *Arabidopsis thaliana* zeigen einen deutlichen Phänotyp bei der Stomabewegung (Merlot et al., 2007). Dafür verantwortlich ist eine Hyperaktivität der H^+ -ATPase AHA1. Dies deutet daraufhin, dass die Protonenpumpe AHA1 und der durch sie aufgebaute elektrochemische Protonengradient über die Plasmamembran der Schließzellen für das Öffnen der Stomata entscheidend sind.

1.2.3.2 Kalium ist das Kation der Stomaöffnung

Schon 1968 stellte Fischer bei der Untersuchung von Epidermisstreifen fest, dass für die Bewegung der Stomata die Aufnahme und Abgabe von Kalium (K^+) erforderlich sind (Fischer, 1968). Heute ist bekannt, dass K^+ -Kanäle der pflanzlichen Shaker-Familie in der Plasmamembran der Schließzelle hauptverantwortlich für den K^+ -Transport sind. Man unterscheidet zwei funktionell verschiedene Gruppen spannungsabhängiger K^+ -Kanäle. Dabei unterscheidet man K^+ -Auswärtsgleichrichter (in *Arabidopsis* nur GORK), die bei depolarisierten Membranspannungen aktiv werden und K^+ -Einwärtsgleichrichter, die bei hyperpolarisierten Membranpotential Aktivität zeigen. Vertreter dieser beiden Gruppen wurden in vielen Pflanzenarten entdeckt und charakterisiert (Schroeder, 1988; Fairleygrenot and Assmann, 1993; Hoshi, 1995; Roelfsema and Prins, 1997; Ache et al., 2000; Szyroki et al., 2001; Becker et al., 2003). In den Schließzellen sind unter physiologischen Bedingungen die K^+ -Einwärtsgleichrichter zuständig für die Aufnahme und die K^+ -Auswärtsgleichrichter für die Abgabe von K^+ .

Durch die Aktivierung der H^+ -ATPase bei der Stomaöffnung kommt es zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran. Die Stärke der Hyperpolarisation kann in unterschiedlichen Pflanzenspezies sehr verschieden sein, entspricht aber immer mindestens dem Potential, das für eine Aktivierung der jeweiligen K^+ -Aufnahme-Kanäle erforderlich ist (-120mV bis -180mV) (Dietrich et al., 2001). Die negative Membranspannung sorgt für einen Einstrom von Kalium durch die geöffneten Kanäle (Thiel and Blatt, 1991; Roelfsema and Prins, 1998). Zusätzlich zu ihrer Rolle beim Aufbau der Membranspannung spielt die H^+ -ATPase durch die Ansäuerung des Apoplasten eine weitere wichtige Rolle bei der Aktivierung der K^+ -Aufnahme-Kanäle. Durch die Ansäuerung wird nicht nur das spannungsabhängige Öffnen der Kanäle hin zu positiveren Membranpotentialen verschoben, sondern auch deren Anzahl in der Plasmamembran erhöht (Blatt, 1992; Ilan et al., 1996; Dietrich and Hedrich, 1998). Dies zeigt, dass die Funktionen der H^+ -ATPase und der K^+ -Aufnahme-Kanäle durch die Spannung und den apoplastischen pH-Wert eng mit einander verknüpft sind.

1984 konnte Schroeder et al zeigen, dass K^+ -selektive Kanäle in der Plasmamembran von Schließzellen für den Transport von K^+ verantwortlich sind (Schroeder et al., 1984). Die ersten beiden charakterisierten Gene von K^+ -Kanälen stammen von *Arabidopsis thaliana* und wurden KAT1 (Anderson et al., 1992) und AKT1 (Sentenac et al., 1992) genannt. Bei den beiden Kanälen handelt es sich um K^+ -Aufnahme-Kanäle der Shaker-Familie die selektiv K^+ -Ionen transportieren (Dietrich et al., 2001). Durch Knock-out Experimente von KAT1, der sehr stark in Schließzellen exprimiert wird, stellte man fest, dass es noch andere K^+ -Aufnahme-Kanäle in Schließzellen geben muss (Szyroki et al., 2001). Zusätzlich zu KAT1 wurden in Schließzellen von *Arabidopsis* die K^+ -Aufnahme-Kanäle KAT2 (Pilot et al., 2001), AKT1, AKT2

und AtKC1 identifiziert, die jedoch eine deutlich schwächere Expressionsrate als KAT1 zeigen (Szyroki et al., 2001). Die fünf verschiedenen K^+ -Aufnahme-Kanäle bilden in den Schließzellen vermutlich homotetramere und/oder heterotetramere Komplexe (Dreyer et al., 1997) und modellieren durch deren Zusammensetzung die Transporteigenschaften des gesamten Komplexes. Mit seiner hohen Expressionsrate übernimmt KAT1 dabei die Hauptrolle bei der K^+ Aufnahme in Schließzellen (Kwak et al., 2001), und die anderen vier Kanäle spielen eine ergänzende und modifizierende Rolle. Im Falle eines Verlustes der KAT1-Funktion sind die restlichen vier Kanäle jedoch dazu in der Lage dessen Verlust zu kompensieren (Szyroki et al., 2001).

1.2.3.3 Anionen kompensieren die Aufnahme von Kalium

Der Einstrom von K^+ -Ionen in die Schließzelle wird elektrisch kompensiert durch Anionen. Die Anionenaufnahme ist flexibel und richtet sich nach der Verfügbarkeit der Anionen. Untersuchungen an Epidermisstreifen haben gezeigt, dass in Anwesenheit von Chlorid (Cl^-), gleiche Mengen von Cl^- und Malat²⁻ den Einstrom von K^+ ausgleichen. In Abwesenheit von Cl^- sind die Schließzellen allerdings auch in der Lage das einströmende K^+ allein durch die Synthese von Malat²⁻ auszugleichen (Raschke and Schnabl, 1978). Malat wird dabei in den Chloroplasten der Schließzelle durch den Abbau von Stärke synthetisiert. Die Synthese von Malat wird durch Blaulicht initiiert, benötigt während der Synthese allerdings auch Rotlicht oder photosynthetisch-aktives Licht (PAR photosynthetically activ radiation) als Energielieferanten (Ogawa et al., 1978; Ogawa, 1981; Zeiger et al., 1983). Aufgrund des negativen Membranpotentials und des nach außen gerichteten Anionengradienten über die Plasmamembran der pflanzlichen Zellen sind Anionenkanäle aus thermodynamischen Gründen nicht in der Lage für die Beladung der Schließzellen mit Anionen zu sorgen. Deshalb muss es bisher nicht identifizierte Protonen-gekoppelte Anionentransporter in Schließzellen geben, die Anionen gegen den elektrochemischen Anionengradienten in die Schließzellen pumpen. Erste Hinweise auf die Beteiligung von sekundär-aktiven Transportern bei der Anionenbeladung lieferte eine Verlustmutante des NO_3^- -Transporters NRT1.1 (CHL1) in *Arabidopsis* (Guo et al., 2003). Im Vergleich zum WT zeigte die Verlustmutante *chl1* eine verringerte Stomaöffnung und eine geringere Transpiration bei Licht (Guo et al., 2003). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die protonenmotorische Kraft über der Plasmamembran die treibende Kraft für den Symport der Anionen in die Schließzellen ist, wie es schon früh vermutet wurde (Macrobbie, 1987).

1.2.3.4 Zucker fungieren als zusätzliches Osmotikum

Zusätzlich zur Aufnahme von Ionen können auch Zucker als Osmotika in den Schließzellen verwendet werden. Dazu ersetzt die Schließzelle im Laufe des Tages die aufgenommenen Ionen durch osmotisch aktive Zuckermoleküle, um die Stomata längerfristig geöffnet zu halten (Tallman and Zeiger, 1988). In Schließzellprotoplasten von *Pisum Sativum* konnte diese Aufnahme von Glucose und Fructose gezeigt werden (Ritte et al., 1999). Die Zucker werden dabei wahrscheinlich durch protonengekoppelte Transporter wie der Saccharosetansporter *AtSUC3* oder der Monosaccharidtransporter *AtSTP1* in die Zelle transportiert (Stadler et al., 2003; Meyer et al., 2004). Die Abhängigkeit des Zuckertransportes vom Protonengradient der Schließzellen konnte durch das Toxin Fusicoccin gezeigt werden. Bei Fusicoccin handelt es sich um ein Pilzgift, das die Aktivität der H⁺-ATPase steigert und im Schließzellprotoplasten zu einer erhöhten Zuckeraufnahme führt (Reddy and Das, 1986; Ritte et al., 1999).

1.2.4 Der Stomaschluss

Durch die Stomabewegung ist die Pflanze dazu in der Lage auf Veränderungen in der Wasserversorgung und den jeweiligen Wasserverbrauch zu reagieren. Dabei ist das Schließen der Stomata für die Pflanze von essenzieller Bedeutung, da ein Verringern der Öffnungsweite den Wasserverlust an die Atmosphäre deutlich reduziert. Beim Stomaschluss handelt es sich um eine deutlich schnellere Bewegung als bei der Stomaöffnung. In *Vicia faba* zum Beispiel konnte nach ABA-Gabe gezeigt werden, dass der Stomaschluss nahezu dreimal schneller abläuft als die Stomaöffnung (Langer et al., 2004). Die unterschiedlichen Bewegungsgeschwindigkeiten beim Öffnen und Schließen der Stomata ergeben sich vermutlich aus den unterschiedlichen Transportmechanismen, die den beiden Bewegungsrichtungen zu Grunde liegen. Während für die Stomaöffnung hauptsächlich aktive und sekundäraktive Transportmechanismen zur Beladung der Schließzellen mit Osmotika verantwortlich sind, funktioniert der Stomaschluss großteils durch passive Transportprozesse von Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten aus der Zelle in den Extrazellularraum (Roelfsema and Hedrich, 2005).

Mehrere Umweltfaktoren haben einen Einfluss auf die Stomabewegung und führen zum Schluss der Stomata. Bei Trockenstress zum Beispiel sorgt das Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA) für ein Schließen der Stomata (MacRobbie, 1998). Neben Trockenstress können außerdem auch Licht, Pathogenbefall oder erhöhte CO₂- oder Ozon-Konzentrationen zum Schließen der Stomata führen (Torsethaugen et al., 1999; Schroeder et al., 2001). Eine erhöhte CO₂-Konzentration erleichtert die CO₂-Aufnahme für die Pflanze, sodass die Pflanze die Öffnungsweite der Stomata verringern kann, um nicht unnötig Wasser zu verlieren. Die Stomata stellen als Poren in der Epidermis auch Schwachpunkte in ihrer Verteidigung gegen Pathogene dar, die über die Stomata in das Pflanzeninnere vordringen können. Durch den Stomaschluss als Abwehrmaßnahme können sich Pflanzen vor Schäden durch Pilze, Bakterien (Deger et al., 2015) oder Ozon schützen (Torsethaugen et al., 1999). Ozon, das abiotisch in der Troposphäre gebildet wird, wirkt in der Pflanze als starkes Oxidationsmittel. Über die Stomata dringt der Schadstoff in die interzellularen Gasräume der Pflanze ein und kann Biomoleküle der Plasmamembran angreifen (Kangasjarvi et al., 2005). Dabei können diese Proteine oder andere Membranbestandteile zerstört werden oder es kommt zur Bildung weiterer reaktiver Sauerstoff-Spezies (RSS oder im Englischen reactive oxygen species, ROS) (Saji et al., 2008; Vahisalu et al., 2010). RSS werden jedoch auch von der Pflanze selbst gebildet und besitzen Funktionen bei der Pathogenabwehr, der Polymerisierung von Stoffen wie Lignin oder auch als Botenstoffe (Mittler, 2002). Durch das unkontrollierte Eindringen von Ozon und die Bildung von RSS kann es allerdings zu einer Vielzahl von Fehlreaktionen bis hin zur Zerstörung des Gewebes kommen, der sogenannten hypersensitiven Reaktion. Dabei

kommt es zum programmierten Zelltod von Zellen als Immunantwort auf Pathogen in Pflanzen mit einer Resistenz gegen das jeweilige Pathogen (Pontier et al., 1998; Heath, 2000).

1.2.4.1 Das Trockenstresshormon ABA

Unter Trockenstressbedingungen ist es für die Pflanze besonders wichtig, durch das Schließen der Stomata möglichst viel Wasser zu sparen, um sich vor Austrocknung zu schützen. Das Phytohormon ABA (**ab**scisic **a**cid / Abscisinsäure) stellt den entscheidenden Regulator dafür dar (Kim et al., 2010). Schon vor ca. 50 Jahren wurde die inhibitorische Wirkung von ABA auf die Transpiration von Pflanzen beschrieben (Little and Eidt, 1968; Mittelheuser and VanStevenink, 1969). Bei Trockenstress steigt die Konzentration von ABA in den Blättern auf das 20- bis 40-fache der normalen Werte an (Harris et al., 1988). Die Pflanze reagiert aber nicht nur auf Trockenstress mit der Synthese von ABA, sondern auch auf andere Stressfaktoren, wie zum Beispiel Salzstress oder Kältestress. Das Hormon wirkt dabei nicht nur auf die Schließzellen, in denen es zum Stomaschluss führt, sondern wirkt in der gesamten Pflanze. Auch hier kann es regulatorische Prozesse starten, die zu einer Anpassung an eine geringere Wasserverfügbarkeit führen. Dadurch kommt es unter anderem zu einer veränderten Genexpression und die Zellen lagern mehr Osmotika ein, um dem Wassermangel entgegen zu wirken (Seki et al., 2007; Cutler et al., 2010a). Außer seiner Rolle als das „Trockenstresshormon“ besitzt ABA auch wichtige Funktionen in der Entwicklung der Pflanze. So fungiert ABA unter anderem als Regulator der Embryonal- und Samenentwicklung sowie der Fruchtreifung (Zeevaart and Creelman, 1988; Finkelstein et al., 2008; Yang and Feng, 2015).

Die Struktur und Synthese von ABA basieren auf Isopentenyl (IDP). Damit gehört es zur Gruppe der Isoprenoiden (Nambara and Marion-Poll, 2005). ABA besteht aus 15 Kohlenstoffatomen und wird durch die Spaltung von C₄₀-Carotinoiden in den Plastiden gebildet (Milborrow and Lee, 1998). Die für die Synthese von ABA verantwortlichen Enzyme ABA2 (**ABA** deficient **2**), NCED3 (**9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3**) und AAO3 (**ab**scisic **a**ldehyde **o**xidase **3**) wurden anfangs unter osmotischen Stressbedingungen hauptsächlich im Leitbündelgewebe der Wurzeln entdeckt (Cheng et al., 2002b; Tan et al., 2003; Koiwai et al., 2004). Dies führte zu der Hypothese, dass ABA in der Wurzel gebildet wird und von dort in den Spross zu seinen Wirkorten transportiert wird (Wilkinson and Davies, 2002).

Spätere Analysen zeigten allerdings eine starke Akkumulation von NCED3 unter Trockenstress auch im Parenchym der Leitbündel in den Blättern (Endo et al., 2008). Außerdem werden hier auch ABA2 und AAO3 exprimiert (Koiwai et al., 2004; Endo et al., 2008). Neuere Studien untermauern das Modell der Synthese von ABA im Leitgewebe der

Blätter und sogar in den Stomata selbst (Holbrook et al., 2002; Christmann et al., 2005; Christmann et al., 2007; Ikegami et al., 2009; Bauer et al., 2013). Eine Hypothese für die Weiterleitung des Trockenstresssignals von der Wurzel in den Spross ist ein Signal durch eine Änderung im hydraulischen Drucks im Leitgewebe. Diese Druckveränderung könnte dann von den Parenchymzellen im Leitgewebe der Blätter wahrgenommen werden und die ABA-Synthese aktivieren. Vom Leitgewebe aus wird ABA anschließend zu den Schließzellen transportiert, um dort den Stomaschluss einzuleiten (Seo and Koshiba, 2011).

Der genaue ABA-Transportweg vom Leitgewebe des Blattes zu den Stomata ist noch nicht vollständig geklärt. Eine passive Diffusion des ABA zu den Stomata mit dem Wasserfluss ist eine Möglichkeit, da ABA im protonierten Zustand auch durch die Plasmamembran der Zelle diffundieren kann. Durch diese Theorie lässt sich allerdings nur die Diffusion von niedrigem pH-Wert zu höherem pH erklären, wie es beim Eintritt in die Zelle der Fall wäre. Für den Austritt aus der Zelle wäre dabei ein spezifischer ABA-Transporter nötig (Wilkinson and Davies, 2002). Vor wenigen Jahren konnten die beiden ABC-Transporter *AtABCG25* und *AtABCG40* als ABA-Transporter identifiziert werden. Der Transporter *AtABCG25* wird im Leitgewebe exprimiert und transportiert ABA dort aus den Zellen (Kuromori et al., 2010). *AtABCG40* dagegen wurde in Schließzellen gefunden und scheint hier für die ABA-Aufnahme mitverantwortlich zu sein (Kang et al., 2010).

Der ABA-Signalweg wurde in einer Vielzahl von Pflanzen und in unterschiedlichen Geweben untersucht (Gepstein et al., 1982; Meyer et al., 1994; Chen et al., 2016). Die Signalkaskade des Phytohormons besteht aus einer Vielzahl von Komponenten, die das ABA-Signal in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und verschiedenen Zelltypen in die entsprechenden Signale dekodieren können. In Samenpflanzen kann man bei der Wirkung des ABA-Signalwegs eine langsame und eine schnelle Reaktion unterscheiden. Im langsamen Teil des ABA-Signalwegs wirkt ABA auf die Regulation der Expression von Genen ein, die eine entscheidende Rolle für die Entwicklung von Pflanzen spielen oder für die Anpassung an Stressbedingungen benötigt werden (Zeevaart and Creelman, 1988; Allagulova et al., 2003; Fujii et al., 2009). Dieser langsame Effekt von ABA auf die Expression von Genen ist neben den Samenpflanzen auch in vielen anderen Pflanzenfamilien bekannt (Hickok, 1983; Rodriguez et al., 1998; Cutler et al., 2010a). Zusätzlich zu dieser langsamen Komponente des ABA-Signalwegs konnte in den Stomata von Samenpflanzen auch eine schnelle Reaktion auf ABA beobachtet werden. In den Schließzellen führt ABA dabei innerhalb weniger Minuten zum Schließen der Stomata (Little and Eidt, 1968; Mittelheuser and VanStevenink, 1969; Harris et al., 1988). Der Genaue Signalweg der für diese schnelle Reaktion auf ABA in den Schließzellen von Samenpflanzen verantwortlich ist, beruht zu Beginn auf denselben Komponenten wie der langsame ABA-Signalweg (Abbildung 1-3) (Geiger et al., 2009; Geiger et al., 2010).

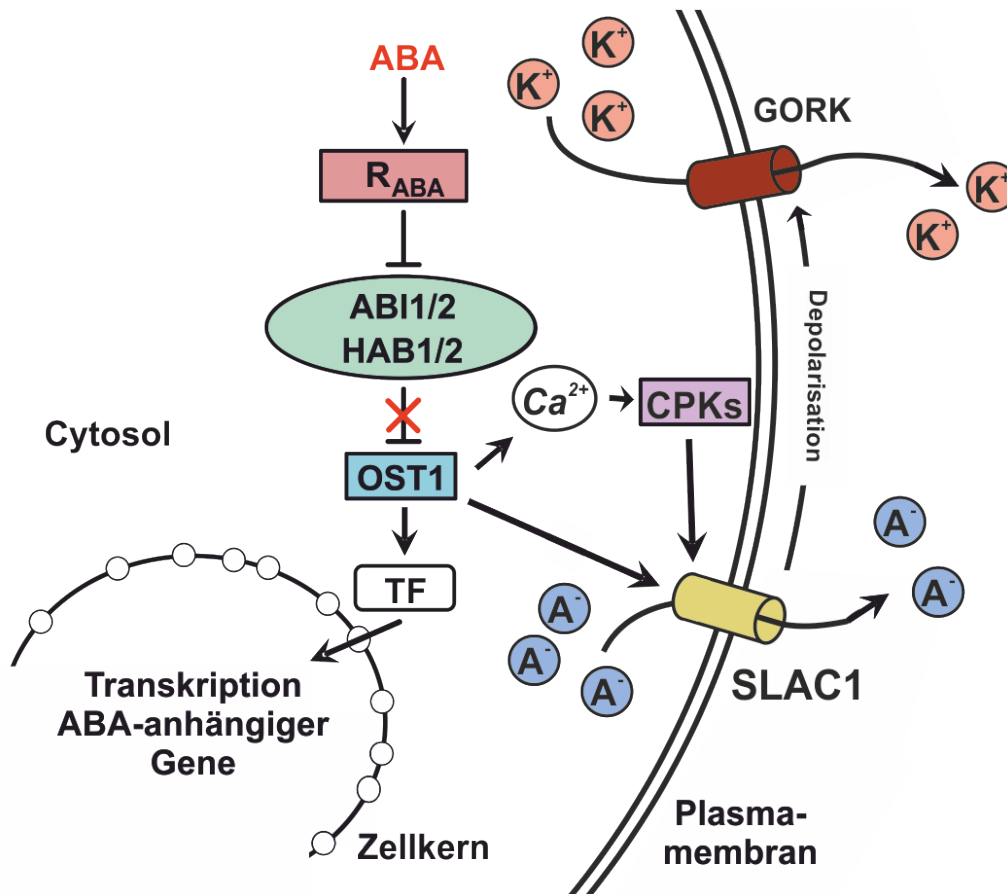


Abbildung 1-3: Der ABA-Signalweg in Schließzellen von Samenpflanzen

Die schematische Darstellung zeigt einen Teil des Signalwegs des Phytohormons ABA (Abscisinsäure) in Schließzellen. Der Signalweg reguliert einerseits die Expression ABA-abhängiger Gene und führt aber in Samenpflanzen auch gleichzeitig zum Schluss der Stomata. Wenn ABA an einen ABA-Rezeptor (R_{ABA}) bindet, kommt es zu einer Inhibierung der PP2C-Phosphatasen (ABI1/2, HAB1/2). Durch die Inhibierung der Phosphatasen kommt es zur Autoaktivierung der Kinase OST1. OST1 ist verantwortlich für die Übersetzung des ABA-Signals in unterschiedliche Effekte. Im langsamen Teil des ABA-Signalwegs wird über OST1 die Genexpression von ABA-abhängigen Genen reguliert und im schnellen Teil des Signalwegs wird der Stomaschluss eingeleitet. Dafür aktiviert OST1 den Anionenkanal SLAC1 entweder direkt und/oder über die Aktivierung von Ca^{2+} -Abhängigen Kinasen (CPKs/CIPKs). Durch den aktiven SLAC-Kanal kommt es zu einem Ausstrom von Anionen (A^-), die zu einer Depolarisation der Plasmamembran führen. Die Depolarisation der Plasmamembran wiederum führt zur Aktivierung des K^+ -Auswärtskanals GORK und somit zum Ausstrom von Kalium (K^+). Der Kombinierte Ausstrom von Kationen und Anionen führt zum Abfallen des Turgors, was schließlich zum Schließen der Stomata führt.

Bei der langsamen wie auch bei der schnellen Reaktion auf ABA steht die Familie der PYR/PYL/RCAR-ABA-Rezeptoren am Beginn der Signalkaskade (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Durch die Bindung von ABA ist der Rezeptor/ABA-Komplex dazu in der Lage mit den PP2C-Phosphatasen der ABI1/2 und der HAB1/2-Familie zu interagieren und deren Aktivität zu inhibieren (Soon et al., 2012). Die PP2C-Phosphatasen sind negative Regulatoren des ABA-Signalwegs und durch die verringerte Aktivität der Phosphatasen werden die Ca^{2+} -abhängigen und die Ca^{2+} -unabhängigen Kinasen aktiv (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2006) und können den langsamen wie auch den schnellen ABA-Signalweg einleiten. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Ca^{2+} -unabhängige Kinase OST1. Sie interagiert mit

Transkriptionsfaktoren und leitet so die langsame ABA-Wirkung ein, die über die Regulation der Genexpression ABA-abhängiger Gene wie zum Beispiel Dehydrinen funktioniert (Shinozaki and YamaguchiShinozaki, 1996; Nylander et al., 2001). Außerdem führt sie entweder indirekt über die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Kinasen (CPKs/CIPKs) oder über eine direkte Interaktion zur Aktivierung der R- und S-Typ-Anionenkanäle und somit zur schnellen Wirkung des Phytohormons (Hedrich et al., 1990; Hedrich and Marten, 1993; Vahisalu et al., 2008; Geiger et al., 2009; Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011; Scherzer et al., 2012; Imes et al., 2013). Die Aktivierung der S-Typ-Anionenkanäle und hier vor Allem SLAC1 führt zum Ausstrom von Anionen aus den Schließzellen, was zu einer Depolarisation der Plasmamembran der Zellen führt (Schroeder and Keller, 1992; Grabov et al., 1997; Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009). Diese Depolarisation wiederum aktiviert die K^+ -Auswärtskanäle (in *Arabidopsis* nur GORK) und es kommt zusätzlich zum Ausstrom von Anionen zu einem Ausstrom von K^+ (Ache et al., 2000; Becker et al., 2003; Hosy et al., 2003b). Der Kombinierte Ausstrom von Anionen und Kationen führt zum Abnehmen des Turgors der Schließzellen und somit schließlich zum Schließen der Stomata (Abbildung 1-3).

Diese einzelnen Komponenten der ABA-Signaltransduktionskette, die für die langsame wie auch die schnelle Reaktion auf das Phytohormon verantwortlich sind, werden in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben (Siehe Abschnitte 1.2.4.2 bis 1.2.4.10).

1.2.4.2 Rezeptoren sind verantwortlich für die Wahrnehmung von ABA

Für die Wahrnehmung von ABA benötigen Zellen ABA spezifische Rezeptoren um die unterschiedlichen ABA Signale in den verschiedenen Zelltypen und Entwicklungsstadien der Pflanze differenziert umsetzen zu können. Schon früh wurden erste ABA-bindende Proteine beschrieben (Hornberg and Weiler, 1984) und im Zuge der ABA-Forschung wurden drei verschiedene Gruppen von potentiellen ABA-Rezeptoren gefunden. Bei den G-Protein gekoppelten GCPR-Typ Rezeptoren GTG1 und GTG2 handelt es sich um membranassoziierte Rezeptoren, während sich die MG-Chelatase in den Plastiden befindet. Die beiden Rezeptorfamilien können beide ABA binden, scheinen jedoch nur für einen kleineren Teil der ABA-Wahrnehmung verantwortlich zu sein (Chen et al., 2006; Pandey et al., 2006; Shen et al., 2006; Pandey et al., 2009). Im Jahr 2009 wurde eine dritte ABA-Rezeptorfamilie identifiziert, die zytosolischen Proteine der PYR/PYL/RCAR-Familie (**py**rabactin **r**esistance/**PYR1** **l**ike/**r**egulatory **c**omponent of **A**BA **r**eceptor). Die Rezeptoren der PYR/PYL/RCAR-Familie scheinen insgesamt den größten Anteil an der ABA-Wahrnehmung auszumachen (Ma et al., 2009; Park et al., 2009).

Die PYR/PYL/RCAR-Rezeptorfamilie hat in *Arabidopsis thaliana* 14 Mitglieder, die vermutlich einen hohen Grad an funktioneller Redundanz aufweisen. Für die beiden Rezeptoren PYR1 und RCAR1/PYL9 konnte eine ABA-Bindung und eine Interaktion mit PP2C-Phosphatasen (**2C** protein **p**hosphatases) gezeigt werden. Dabei inhibieren die Rezeptoren ABA-abhängig die Aktivität der PP2C-Phosphatasen ABI1, ABI2 (**ABA-insensitive 1**) und HAB1 (**h**omology to **ABI1**) (Saez et al., 2004; Ma et al., 2009; Park et al., 2009).

Durch Untersuchungen der Kristallstruktur mehrerer Rezeptoren der PYR/PYL/RCAR-Familie konnte die Struktur der Rezeptoren, sowie deren ABA-Bindung und die Weiterleitung des Signals genau beleuchtet werden (Melcher et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Cutler et al., 2010b; Hubbard et al., 2010; Melcher et al., 2010b; Melcher et al., 2010a; Raghavendra et al., 2010; Umezawa et al., 2010). Für eine ABA-Bindung der Rezeptoren in physiologischen Konzentrationen ist auch die Anwesenheit der PP2C-Phosphatasen erforderlich. Die Rezeptoren bilden dabei mit den Phosphatasen in unterschiedlichen Kombinationen Korezeptorkomplexe. Durch die Variationsmöglichkeiten in der Zusammensetzung dieser Rezeptor-Phosphatase Komplexe können ABA-Signale in unterschiedlichem Gewebe differenziert decodiert werden (Szostkiewicz et al., 2010).

Die ABA-Rezeptoren bilden sowohl im langsamen wie auch im schnellen ABA-Signalweg in Samenpflanzen die erste Komponente des ABA-Signalwegs. Sie nehmen die Veränderungen in den Konzentrationen des ABA-Signals wahr und geben diese Information über die Interaktion mit den PP2C-Phosphatasen weiter (Siehe Abschnitt 1.2.4.3 PP2C-Phosphatasen - die Negativregulatoren des ABA-Signalwegs).

1.2.4.3 PP2C-Phosphatasen - die Negativregulatoren des ABA-Signalwegs

Da ABA einen großen Einfluss auf viele Prozesse in der Pflanze hat, muss seine Wirkung zuverlässig reguliert werden. In der Pflanze sind dafür Phosphatasen verantwortlich, die eine Weiterleitung des ABA Signals in Abwesenheit von ABA unterdrücken. Die PP2C-Phosphatasen ABI1, ABI2 und HAB1 wurden in *Arabidopsis thaliana* als solche negativen Regulatoren der ABA-Signalkaskade identifiziert (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994; Rodriguez et al., 1998; Santiago et al., 2009). So zeigt sich in den Mutanten *abi1-1* und *abi2-1* eine ABA-Insensitivität in vielen Geweben. Daraus lässt sich schließen, dass die Phosphatasen ein essenzieller Teil des generellen ABA-Signalweges sind.

Die beiden Phosphatasen ABI1 und ABI2 wurden der Gruppe A der PP2C-Phosphatasen zugeordnet, die in *Arabidopsis thaliana* neun Mitglieder besitzt (Schweighofer et al., 2004). Zu der Gruppe gehören auch die Phosphatasen HAB1 und HAB2, die eine starke Homologie zu den ABI-Phosphatasen aufweisen (Saez et al., 2004). Die Verlustmutanten von PP2C-

Phosphatasen der Gruppe A zeigen eine Hypersensitivität gegenüber ABA, da die Phosphatasen als negative Regulatoren des ABA-Signalweges fehlen (Hirayama and Shinozaki, 2007). In doppel- und dreifach-Mutanten der PP2C-Phosphatasen lässt sich die ABA-Insensitivität noch steigern, was dafürspricht, dass die Mitglieder der Gruppe überlappende Funktionen in der ABA-Signaltransduktion besitzen (Nishimura et al., 2007). Die Phosphatasen unterscheiden sich dabei in ihrer Expression in unterschiedlichen Geweben und auch in ihrer intrazellularen Lokalisation. Während einige der PP2C-Phosphatasen nur im Nukleus der Zelle zu finden sind, befindet sich ABI1 zum Beispiel sowohl im Zytosol als auch im Nucleus (Umezawa et al., 2009).

Schlüsselrepressoren von Signalwegen werden in der Zelle entweder durch die proteolytische Degradation oder durch die Inhibierung ihrer Aktivität reguliert. Die Regulation der PP2C-Phosphatasen des ABA-Signalweges erfolgt über die Reprimierung ihrer Aktivität. In Anwesenheit von ABA binden die ABA-Rezeptoren der PYR/PYL/RCAR-Familie die Phosphatasen und verringern so deren Aktivität. Die Inhibierung der Phosphatasen ermöglicht die Weiterleitung des ABA-Signals, das ansonsten durch die Phosphatasen inhibiert wird (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Santiago et al., 2009). Die PP2C-Phosphatasen fungieren als das Bindeglied des ABA-Signalwegs zwischen den ABA-Rezeptoren und den Proteinkinasen des ABA-Signalwegs. Durch sie wird die Kinaseaktivität von OST1 ABA-abhängig reguliert (Siehe Abschnitt 1.2.4.5 Ca²⁺-unabhängige Kinasen).

1.2.4.4 Die Rolle der Kinasen am Stomaschluss

Neben ihrer Rolle bei der Regulation von Transkriptionsfaktoren des langsamen Teils des ABA-Signalwegs (Himmelbach et al., 2002) sind PP2C-Phosphatasen auch verantwortlich für die Reprimierung von Proteinkinasen des schnellen ABA-Signalwegs (Geiger et al., 2009; Geiger et al., 2010; Brandt et al., 2012). Dazu gehören sowohl Ca²⁺-abhängige als auch Ca²⁺-unabhängige Kinasen. Im aktiven Zustand können diese Kinasen Transkriptionsfaktoren modifizieren und direkt mit Zielproteinen wie Kanälen und Transportern interagieren. Als einen der ersten Interaktionspartner von ABI1 wurde die ABA-aktivierte Proteinkinase OST1 (open stomata 1) identifiziert (Mustilli et al., 2002). Die beiden Proteine interagieren direkt miteinander, wobei es zu einer Dephosphorylierung der Proteinkinase und somit zu ihrer Inhibierung kommt (Yoshida et al., 2006; Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009). Im Gegensatz zu den PP2C-Phosphatasen, die als negative Regulatoren des Stomaschlusses gelten, fungieren die Proteinkinasen des ABA-Signalweges als positive Regulatoren des Stomaschlusses.

1.2.4.5 Ca²⁺-unabhängige Kinasen

In Weizen (*Triticum aestivum*) (Johnson et al., 2002), der Ackerbohne (*Vicia faba*) (Li and Assmann, 1996) und *Arabidopsis thaliana* (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002) wurden ABA-aktivierte und Kalzium-unabhängige Proteinkinasen beschrieben. Diese AAPK (**A**BA **a**ctivated **p**rotein **k**inase) genannten Kinasen spielen eine entscheidende Rolle während des ABA-induzierten Stomaschlusses. Eine der ersten AAPKs war die Proteinkinase AtOST1/SnRK2.6, die als Interaktionspartner von ABI1 identifiziert wurde (Mustilli et al., 2002). OST1 gehört zur Familie der SnRK-Proteinkinasen, die in *Arabidopsis* 38 Mitglieder zählt (Hrabak et al., 2003). Jedoch ist nur ein kleiner Teil der SnRK-Kinasen ABA-abhängig. Neben OST1 wird auch die Aktivität von SnRK2.2 und SnRK2.3 durch ABA reguliert (Fujii et al., 2007). Sie werden aber im Gegensatz zu OST1 nicht spezifisch in den Schließzellen exprimiert, sondern auf einem niedrigen aber gleichmäßigen Level im gesamten Spross und der Wurzel (Fujii et al., 2007). Daher haben sie keinen so starken Einfluss auf den ABA induzierten Stomaschluss wie OST1 (Fujii et al., 2007; Fujii and Zhu, 2009; Umezawa et al., 2009; Fujii et al., 2011). Durch yeast-to-hybrid Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Kinase OST1 über ein spezielles Bindemotiv in ihrem C-Terminus (CT) verfügt, welches für die Interaktion mit der Phosphatase ABI1 entscheidend ist (Yoshida et al., 2006). Verantwortlich für die Interaktion mit den Phosphatasen ist die Domäne 2 am Ende des CT der ABA-abhängigen SnRK-Kinasen. In Abwesenheit von ABA binden die PP2C-Phosphatasen an diese ABA-Box und blockieren gleichzeitig das aktive Zentrum der SnRK-Kinase (Soon et al., 2012). In vivo führt ABA zu einer Aktivierung von OST1 durch mehrere Autophosphorylierungsereignisse im Bereich ihrer Aktivierungsdomäne (Vlad et al., 2009). In Abwesenheit von ABA führt die Interaktion von OST1 und ABI1 zu einer Dephosphorylierung der Kinase durch die Phosphatase. Dadurch wird OST1 in einen inaktiven Zustand gehalten und eine Signalweiterleitung hin zu Transkriptionsfaktoren, Kanälen und anderen Proteinen wird unterdrückt (Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009).

Im aktiven Zustand führt OST1 zu einer Vielzahl von Reaktionen. Nach ABA-Gabe lässt sich schon nach kürzester Zeit (2-3 Min) eine Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration und eine erhöhte H₂O₂ (allgem. ROS)-Produktion in den Schließzellen feststellen. Sowohl Ca²⁺ als auch H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) sind positive Regulatoren des Stomaschlusses und sind eng mit einander verknüpft. So lässt sich durch die Unterdrückung der H₂O₂-Produktion auch der ABA-induzierte Stomaschluss verhindern (Pei et al., 2000). Verantwortlich für die H₂O₂-Produktion in *Arabidopsis* sind zehn verschiedene NADPH-Oxidasen in der Plasmamembran der Zellen. In der Schließzelle sind die NADPH-Oxidasen *At*rbohD und *At*rbohF (**r**espiratory **b**urst **o**xidase **h**omologue **D/E**) entscheidend für die ABA-induzierte ROS-Produktion (Kwak et al., 2003). Die Verbindung zwischen den unterschiedlichen Signalen des Stomaschlusses

konnte erst 2009 geklärt werden. Sirichandra et al konnten zeigen, dass OST1 mit der NADPH-Oxidase *AtrbohF* interagiert und sie durch Phosphorylierung aktiviert, was wiederum die Produktion von H_2O_2 startet (Sirichandra et al., 2009).

Außer indirekt über die H_2O_2 (ROS)-Produktion, ist OST1 auch dazu in der Lage direkt mit Ionenkanälen in der Schließzelle zu interagieren und sie mittels Phosphorylierung zu aktivieren (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009; Sato et al., 2009; Imes et al., 2013). Der wichtigste Anionenkanäle dabei ist der S-Typ-Anionenkanal SLAC1 in der Schließzelle. Er wird durch OST1 aktiviert und vermittelt in seinem aktiven Zustand den Ausstrom von Anionen aus den Schließzellen (Siehe Abschnitt 1.2.4.7 Anionenkanäle ff). Diese Aktivierung der Anionenkanälen ist entscheidend für das Schließen der Stomata, da erst der Ausstrom von Anionen zu einer Depolarisation der Plasmamembran führt, die für den Stomaschluss essenziell ist (Grabov et al., 1997). OST1 stellt die Weiche zwischen der langsamen und der schnellen Reaktion auf ABA-Signale. Durch ihre Interaktion mit Transkriptionsfaktoren reguliert OST1 die langsame Genexpression und durch die Aktivierung der Anionenkanäle sorgt die Kinase für einen schnellen ABA-induzierten Stomaschluss (Lee et al., 2009; Geiger et al., 2010).

1.2.4.6 Die Ca^{2+} -abhängigen Kinasen

Die durch OST1 angeregte Produktion von H_2O_2 führt unter anderem auch zur Aktivierung von bisher noch unbekanntem Ca^{2+} -Kanälen und damit zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den Schließzellen (Pei et al., 2000). So lässt sich nach ABA Gabe ein schneller Anstieg der freien Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol der Schließzellen beobachten. Dieser Anstieg von freiem Ca^{2+} wiederum kann zur Aktivierung von Anionenkanälen führen (Schroeder and Hagiwara, 1989; Hedrich et al., 1990; Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992). Dieses Ca^{2+} -Signal konnte schon Anfang der neunziger Jahre von McAinsh in den Schließzellen der Tagblume *Commelina communis* gezeigt werden (McAinsh et al., 1990, 1992). Kalzium ist in Pflanzen jedoch ein weit verbreitetes Signalmolekül und die Dekodierung der unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen in die jeweilige, spezifische, physiologische Antwort der Pflanze ist ein noch Großteils ungeklärter Prozess. Pflanzen besitzen ein Repertoire von Ca^{2+} -Sensoren die auf steigende und fallende zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen reagieren können. Dabei kann man zwei unterschiedliche Familien von Ca^{2+} -Sensoren unterscheiden, die eine Rolle in der Schließzelle spielen. Die Familie der CBLs (**C**alcineurin-**B** like proteins) stellt eine Gruppe von Ca^{2+} -Sensoren dar, die das Ca^{2+} -Signal an interagierende Kinasen, die CIPKs (**C**BL-**i**nteracting **p**rotein **k**inases), weiterleiten (Albrecht et al., 2003). Im Gegensatz dazu vereinigen die C(D)PKs (**c**alcium-

dependent **p**rotein **k**inases) die beiden Funktionen von Ca^{2+} -Sensor und Kinasefunktion in einem Protein (Cheng et al., 2002a; Harper et al., 2004).

In *Arabidopsis thaliana* gibt es zehn verschiedene CBLs und 26 CIPKs, die in unterschiedlichen Kombinationen miteinander interagieren können und so eine große Varianz an Signalinterpretationsmöglichkeiten bieten (D'Angelo et al., 2006). Die CBL-Proteine sind kleine, stark konservierte Proteine mit vier EF-Hand-Motiven, die für die Ca^{2+} -Bindung verantwortlich sind. Das Binden von Ca^{2+} ermöglicht den CBL-Proteinen die Interaktion mit den CIPK-Kinasen, wodurch ein aktiver CBL/CIPK-Kinasekomplex entsteht. Für CBL1 und CBL9 konnte eine Beteiligung am ABA-Signalweg in Schließzellen nachgewiesen werden. CBL1 stellt dabei einen positiven Regulator in unterschiedlichen Stresssituationen wie zum Beispiel Trockenstress dar (Albrecht et al., 2003; Cheong et al., 2003). In CBL-Verlustmutanten zeigt jedoch nur CBL9 einen deutlichen Phänotyp hinsichtlich der ABA-Signaltransduktion. Dieser Phänotyp zeigt sich sowohl bei der Samenkeimung, als auch dem Wachstum der Pflanze und der Expression ABA-abhängiger Gene (Pandey et al., 2004). Die Rolle von CBL9 bei der Dekodierung von ABA-Signalen in der Samenkeimung beruht auf der Interaktion von CBL9 mit der Kinase CIPK3, die durch die Interaktion der beiden Proteine aktiviert wird (Kim et al., 2003; Pandey et al., 2008). In der Schließzelle führen Ca^{2+} -Signale dazu, dass sowohl CBL1 als auch CBL9 mit der Kinase CIPK23 interagieren und diese aktivieren. Für CIPK23 konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle in der Regulierung von K^+ -Kanälen in der Wurzel wie auch in der Schließzelle spielt (Cheong et al., 2007). Außerdem konnte erst kürzlich in Schließzellen eine Regulation der Anionenkanäle SLAC1 (**s**low **a**nion **c**hannel **1**) und SLAH3 (**S**LAC1 **h**omologue **3**) durch CIPK23 in Kombination mit CBL1/9 festgestellt werden (Maierhofer et al., 2014a).

Außer den CBL/CIPK-Kinasekomplexen gibt es in *Arabidopsis* noch 34 C(D)PK-Kinasen, die ebenfalls Ca^{2+} -abhängige Signale weiterleiten können. Vier dieser CPKs (CPK3/4/6/11) werden ebenfalls mit der ABA-abhängigen Stomabewegung in Verbindung gebracht (Mori et al., 2006; Zhu et al., 2007). Die CPK-Kinasen benötigen im Gegensatz zu den CIPK-Kinasen kein interagierendes Ca^{2+} -Sensorprotein wie die CIPK/CBLs, da sie Veränderungen in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration selbst wahrnehmen können. Dafür besitzen die CPKs ähnlich wie die CBLs vier EF-Hand-Motive. Diese ermöglichen ihnen Ca^{2+} -Ionen zu binden, was zu einer Modulation ihrer Kinaseaktivität führt (Cheng et al., 2002a; Harper et al., 2004). Obwohl alle CPK-Kinasen vier EF-Hände besitzen, zeigen sie doch eine stark unterschiedliche Ca^{2+} -Affinität und Aktivität. Dies ist gut am Beispiel der ebenfalls in den Schließzellen exprimierten CPK Kinasen CPK21 und CPK23 zu sehen. Während CPK21 eine sehr hohe Ca^{2+} -Affinität besitzt, zeigt CPK23 nur eine geringe Affinität zu Ca^{2+} . Dafür besitzt CPK23 allerdings schon in Abwesenheit von freiem Ca^{2+} eine hohe Basisaktivität im Gegensatz zu CPK21, die nur in Anwesenheit von freiem Ca^{2+} Kinaseaktivität zeigt (Geiger et al., 2010).

Für die CPK-Kinasen 3, 6, 21 und 23 konnten die S-Typ-Anionenkanäle der Schließzelle (SLAC1/SLAH3) als Substrat identifiziert werden (Mori et al., 2006; Geiger et al., 2010). Durch die Interaktion und die Ca²⁺-abhängige Phosphorylierung aktivieren die CPKs, wie schon der CIPK23-CBL1/9-Komplex oder die Ca²⁺-unabhängige Kinase OTS1, die S-Typ-Anionenkanäle (Siehe Abschnitt 1.2.4.8 S-Typ Anionenkanäle) und leiteten so den Stomaschluss ein (Abbildung 1-3) (Mori et al., 2006; Geiger et al., 2010; Maierhofer et al., 2014a).

1.2.4.7 Anionenkanäle - der Startschuss für den Ausstrom der Osmotika

Wie schon oben beschrieben, spielen die Anionenkanäle eine entscheidende Rolle während des Stomaschlusses. Durch die Aktivierung der Anionenkanäle kommt es zu einem Ausstrom von Anionen, der zu einer Depolarisation der Plasmamembran führt. Diese Depolarisation wiederum ist verantwortlich für die Aktivierung von K⁺-Auswärtskanälen und der Ausstrom von K⁺ und Anionen führt so schließlich zum Schließen der Stomata.

Die Anionenkanäle der Schließzellen können in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden, die schnellen R-Typ Kanäle (Keller et al., 1989; Hedrich et al., 1990) und die langsamen S-Typ Kanäle (Schroeder and Hagiwara, 1989; Linder and Raschke, 1992). Die beiden Typen unterscheiden sich vor allem dadurch, dass die Offenwahrscheinlichkeit der R-Typ Anionenkanäle bei negativen Spannungen stark sinkt, während die S-Typ Kanäle keine starke Spannungsabhängigkeit zeigen. Die spannungsabhängige Aktivierung und Deaktivierung der R-Typ-Kanäle verlaufen in wenigen Millisekunden (Mumm et al., 2013). Im Gegensatz dazu verläuft die Aktivierung und Deaktivierung der S-Typ-Kanäle mit ca. zehn Sekunden deutlich langsamer (Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992; Dietrich and Hedrich, 1994).

Beim Stomaschluss sind sowohl R-Typ- als auch S-Typ-Anionenkanäle beteiligt, ihr jeweiliger Anteil unterscheidet sich allerdings von Umweltreiz zu Umweltreiz (Roelfsema et al., 2004). Bei Trockenstress werden sowohl R-Typ- als auch S-Typ-Kanäle durch ABA aktiviert. Eine Erhöhung des CO₂-Partialdruckes dagegen führt nur zu einer Aktivierung der S-Typ-Kanäle, während die R-Typ-Kanäle dabei sogar deaktiviert werden können (Raschke, 2003).

1.2.4.8 S-Typ Anionenkanäle

Der erste S-Typ-Anionenkanal der Schließzelle wurde vor über 10 Jahren unabhängig voneinander bei der Untersuchung von *Arabidopsis* Mutanten auf Ozon-Sensitivität (Kangasjarvi et al., 2005) und CO₂-Insensitivität beschrieben (Negi et al., 2005). Die beiden Mutanten *rcd3* (radical induced cell death 3) und *cdi3* (carbon dioxide insensitive 3) zeigten Mutationen im selben Gen (*AtSLAC1*) und wurden später, als die Funktion des Proteins mit dem langsamen Anionenkanal in Verbindung gebracht wurde, in *slac1-1/2* (slow anion channel associated 1/2) umbenannt (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Bei SLAC1 handelt es sich um einen S-Typ-Anionenkanal, der hoch spezifisch in den Schließzellen exprimiert wird und eine essenzielle Rolle beim Stomaschluss spielt. So war der Stomaschluss in SLAC1-Verlustmutanten als Reaktion auf alle wichtigen Stimuli wie zum Beispiel Ca²⁺, ROS, ABA, CO₂, Ozon, Luftfeuchtigkeit oder Dunkelheit gestört (Negi et al., 2008; Saji et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). In den Schließzellen der Mutanten waren zwar noch R-Typ- aber keine S-Typ-Anionenströme mehr messbar.

Schon zehn Jahre vor der Entdeckung der SLAC1 Mutanten konnte gezeigt werden, dass die S-Typ-Anionenkanäle in ihrer Aktivität durch regulatorische Mechanismen wie Phosphorylierung und Dephosphorylierung gesteuert werden (Schmidt et al., 1995). Nach der Entdeckung des Gens, das für *AtSLAC1* kodiert, blieben erste Untersuchungen im heterologen Expressionssystem der Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* jedoch erfolglos (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Erst ein Jahr später konnte Geiger et al die genaue Funktion des Proteins als Anionenkanal in dem heterologen Expressionssystem zeigen. Für eine funktionelle Expression des Kanals SLAC1 in den Froscheiern war die Koexpression eines regulatorischen Proteins zusätzlich zu dem Kanal erforderlich (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009). In den Studien in *Xenopus* Oozyten konnte gezeigt werden, dass SLAC1 erst in Verbindung mit der Kinase OST1 makroskopische Anionenströme vermittelt (Geiger et al., 2009). Die Charakterisierung des Kanals zeigte, dass er eine langsame Kinetik, eine hohe Permeabilität für Nitrat (NO₃⁻), und Chlorid (Cl⁻) und eine sehr geringe Permeabilität für Malat, Bikarbonat oder Sulfat besitzt. Diese Eigenschaften bestätigten die Annahme, dass es sich bei SLAC1 um die Hauptkomponente der S-Typ-Anionenströme in den Schließzellen von *Arabidopsis* handelt (Schmidt and Schroeder, 1994; Geiger et al., 2009).

Bei der Interaktion von SLAC1 durch OST1 kommt es zu einer Phosphorylierung des Kanals, die essenziell für dessen Aktivierung ist. Die Schließzellen der OST1 Verlustmutante *ost1-2* zeigt daher auch deutlich verringerte S-Typ-Anionenströme (Geiger et al., 2009). Die Termini von SLAC1 bieten mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen für Kinasen. Dreyer et al. konnten beim Vergleich unterschiedlicher SLAC-Kanäle in Gefäßpflanzen neun konservierte Serin/Threonin-Reste in den Termini der Kanäle als potentielle Phosphorylierungsstellen

identifizieren (S59, S86, S107, S113, S116, S120, T513) (Geiger et al., 2009; Vahisalu et al., 2010; Brandt et al., 2012; Maierhofer et al., 2014a). Einige dieser prognostizierten Stellen konnten auch schon experimentell als Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. In Pflanzen mit einer Mutation der Serine S59, S86 oder S120 zeigte sich ein Stomaphänotyp mit einer gestörten Stomabewegung, der vergleichbar ist mit der SLAC1-Verlustmutante (Vahisalu et al., 2008; Vahisalu et al., 2010). Für die Aktivierung von SLAC1 durch OST1 im heterologen Expressionssystem der Oozyten konnte das Serine S120 im N-Terminus (NT) sowie das Threonin T513 im CT des Kanals als Phosphorylierungsstellen bestätigt werden (Geiger et al., 2009; Maierhofer et al., 2014a). So zeigte sich, dass eine Mutation des Serins S120 die Aktivierung des Kanals durch OST1 verhindert (Geiger et al., 2009). Auch das Threonin T513 am Anfang des CT von SLAC1 scheint eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Kanals zu spielen. So führt der Austausch des Threonins durch ein Aspartat (T513D), das eine Phosphorylierung imitiert, zu einer Aktivierung des Kanals auch in Abwesenheit einer aktivierenden Kinase (Maierhofer et al., 2014a).

Abgesehen von der SLAC1-Aktivierung durch OST1, konnte schon früh mit Hilfe der Patch Clamp Technik in Schließzellprotoplasten gezeigt werden, dass Änderungen in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zu einer Aktivierung von S-Typ-Anionenströmen führen kann (Schroeder and Hagiwara, 1989). Für die Verarbeitung dieser Ca^{2+} -Signale sind unter anderem die oben beschriebenen Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinasen verantwortlich. Für die Kinasen CPK3 und CPK6 konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass sie eine Rolle in der ABA-abhängigen und Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung von S-Typ-Anionenströmen spielen (Mori et al., 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass SLAC1 durch Kinasen der CPK-Familie und auch durch CIPK/CBL-Kinasekomplexe direkt aktiviert werden kann. Bei Koexpressionsstudien in *Xenopus* Oozyten stellte sich heraus, dass neben CPK3 und 6 auch die Kinasen CPK21, CPK23 und CIPK23/CBL1/9 zu einer Aktivierung von SLAC1 führen (Geiger et al., 2010; Maierhofer et al., 2014a).

Die CO_2 -Konzentration der Luft hat auch einen Einfluss auf die Stomabewegung und es konnte eine Verbindung zur Aktivität der S-Typ-Anionenkanäle hergestellt werden. Die β -Anhydrase ist dafür verantwortlich, dass in der Schließzelle aus CO_2 Bikarbonat (HCO_3^-) gebildet wird, das zu einer Aktivierung von SLAC1 führen kann (Hu et al., 2010; Xue et al., 2011). Diese Bikarbonat-abhängige Aktivierung von SLAC1 funktioniert ebenfalls über die Kinase OST1 und wird durch die Kinase HT1 inhibiert (Hashimoto et al., 2006; Xue et al., 2011).

Erst dieses Jahr wurde entdeckt, dass neben CO_2 auch das farblose Gas Schwefelwasserstoff (H_2S) die Aktivität von S-Typ-Anionenkanälen modelliert (Wang et al., 2016). Das faulig riechende Gas ist schon lange in tierischen wie auch in pflanzlichen Zellen als Signalmolekül bekannt und wird in Pflanzen enzymatisch synthetisiert. H_2S spielt in Pflanzen eine Rolle in der Anpassung an unterschiedliche abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Salzstress oder

Hitze. Sein Einfluss auf den Stomaschluss und die S-Typ-Anionenkanäle funktioniert wie auch bei Bikarbonat und ABA über die Kinase OST1, die zur Aktivierung der S-Typ-Anionenkanäle führen (Wang et al., 2016).

Im Jahr 2010 entdeckten Chen et al. durch bioinformatische Analysen von SLAC1-ähnlichen Proteinen eine Vielzahl von potentiellen, orthologen Kanalproteinen in unterschiedlichen Spezies (Chen et al., 2010). Für einen besseren Einblick in Struktur und Funktion dieser Kanalfamilie wurden 43 Proteine genauer betrachtet. Von ihnen ließ sich nur das mit der Teluritresistenz assoziierte Protein *HiTehA* aus dem Bakterium *Haemophilus influenzae* (Taylor et al., 1994) für weitere Untersuchung mittels Röntgenstrukturanalyse kristallisieren. Aus der Kristallstruktur von *HiTehA* mit einer Auflösung von 1.20 Å konnte ein Modell für die Struktur der Superfamilie SLAC1-ähnlicher Kanäle erstellt werden (Chen et al., 2010; Thomine and Barbier-Brygoo, 2010). Die Struktur der Kanäle basiert auf zehn transmembranen Domänen, die in einem äußeren und einem inneren Ring aus je fünf Transmembranen angeordnet sind. Außerdem lassen die Untersuchungen vermuten, dass die S-Typ-Anionenkanäle als Trimere in der Plasmamembran vorliegen (Chen et al., 2010).

Im Sequenzvergleich zwischen *AtSLAC1* und *HiTehA* ließen sich stark konservierte und weniger stark konservierte Bereiche in den Transmembranen erkennen. Vor allem die fünf Transmembranen des inneren Rings wiesen dabei einen hohen Grad der Konservierung auf und bilden in ihrer Mitte die Pore des Kanals. Die Pore der Kanäle hat einen Durchmesser von ca. 5 Å und ist überwiegend mit hydrophoben oder Hydroxyl-Resten ausgekleidet. Im Gegensatz zu anderen bekannten Cl⁻-Transportproteinen (CLCs) finden sich allerdings keine Anionenbindestellen in oder an der Porenregion (Dutzler et al., 2002). Bei der Untersuchung besonders hoch konservierter Aminosäuren in dieser Porenregion stellte sich vor Allem ein exponiertes Phenylalanin (F450 in *AtSLAC1*) als wichtiges Element der Pore heraus. Bei Untersuchungen der Mutanten, die an Stelle dieses Phenylalanins ein Alanin (*AtSLAC1* F450A und *HiTehA* F260A) tragen, zeigte sich im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten eine konstitutive Aktivität des Kanals auch ohne die Koexpression einer aktivierenden Kinase (Chen et al., 2010). Die Aktivität des Kanals wird anscheinend durch die Bewegung des in die Pore ragenden Phenylrestes reguliert. So wird beim Öffnen des Kanals der Phenylrest vermutlich durch eine Konformationsänderung aus dem Permeationsweg der Pore bewegt, was den Kanal in seinen offenen Zustand versetzt.

Neben SLAC1 finden sich im Genom von *Arabidopsis* noch vier weitere S-Typ-Anionenkanäle, die SLAC1 Homologe SLAH1-4. Neben SLAC1 wird nur SLAH3 ebenfalls in den Schließzellen exprimiert und hat einen Anteil an den S-Typ-Anionenströmen der Schließzellen (Geiger et al., 2011). Die Expression von SLAH3 ist im Gegensatz zu SLAC1 nicht auf die Schließzellen beschränkt. In Mesophyllzellen ist SLAH3 alleine für die S-Typ-Anionenströme verantwortlich (Geiger et al., 2009; Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011; Demir et al., 2013). Außerdem

wurde *AtSLAH2* als ein NO_3^- -spezifischer und durch NO_3^- aktivierter S-Typ-Anionenkanal in der Steele der Wurzeln von *Arabidopsis* identifiziert. Genau wie *SLAC1* benötigen *SLAH2* und *SLAH3* für ihre Aktivierung ebenfalls die Interaktion mit einer aktivierenden Kinase (z.B.: *CPK21/23*, *CIPK23/CBL1/9*) (Geiger et al., 2011; Maierhofer et al., 2014b). Mit Hilfe der Kristallstruktur von *HtTehA* konnte auch für die *SLAH*-Kanäle ein Strukturmodell erstellt werden, das eine sehr ähnliche Porenstruktur zeigte. Das exponierte Phenylalanin aus *HtTehA* und *AtSLAC1* konnte ebenfalls in den *SLAH* Kanälen entdeckt werden und hat auch hier einen starken Einfluss auf das Öffnungsverhalten der Kanäle (Maierhofer et al., 2014b). In *SLAH2* konnten mit Hilfe des Strukturmodells außerdem weitere essenzielle Aminosäuren in der Nähe des Phenylalanins identifiziert werden, die für die NO_3^- -Selektivität des Kanals verantwortlich sind (Maierhofer et al., 2014b).

Zusammen mit den R-Typ-Anionenkanälen sind die *SLAC/SLAH*-Kanäle entscheidend für den Stomaschluss. Nachdem die Anionenkanäle aktiviert wurden, vermitteln sie einen Ausstrom von Anionen (vor Allem Cl^- und NO_3^-). Dieser Ausstrom von Anionen führt zu einer Depolarisation der Schließzellmembran und die wiederum die K^+ -Auswärtskanäle (in *Arabidopsis* nur *GORC*) aktiviert (Siehe Abschnitt 1.2.4.10 Kationenkanäle beim Stomaschluss).

1.2.4.9 R-Typ Anionenkanäle

Neben den S-Typ-Anionenkanälen konnte 2010 auch die Beteiligung des R-Typ-Anionenkanal *AtALMT12* (**a**luminum activated **m**alate **t**ransporter) am Stomaschluss nachgewiesen werden (Meyer et al., 2010; Sasaki et al., 2010). *ALMT12* ist in der Plasmamembran der Schließzellen lokalisiert und seine Charakterisierung in *Xenopus* Oozyten ergab, dass er für die Malat-sensitive R-Typ-Anionenströme während der Stomabewegung verantwortlich sein könnte (Meyer et al., 2010). Messungen in Oozyten wie auch in intakten Schließzellen ergaben, dass *ALMT12* bei depolarisierter Plasmamembran im Bereich von -100 mV die maximalen Anionenausströme generiert (Keller et al., 1989; Pei et al., 2000; Meyer et al., 2010). Extrazelluläres Malat wirkt dabei als Modulator für die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit, während das für die *ALMT*-Familie namensgebende Aluminium auf die Aktivität von *ALMT12* keinen Einfluss hat. Daher wurde der Kanal 2010 in *QUAC1* (**q**uickly activating **a**nion **c**hannel **1**) umbenannt (Meyer et al., 2010).

Neben *ALMT12/QUAC1* gibt es noch 13 weitere *ALMT* Kanäle in *Arabidopsis* (Hoekenga et al., 2006). Die Verlustmutante *almt12-1* zeigt nur einen Verlust von 40% der R-Typ-Anionenströme in Schließzellen, was bedeutet, dass noch weitere R-Typ-Anionenkanäle an der Schließzellbewegung beteiligt sein müssen. Neben *QUAC1* sind die anderen *ALMTs*

allerdings nicht rein schließzellspezifisch exprimiert und es konnte noch nicht endgültig geklärt werden, welche weiteren R-Typ-Kanäle an der Stomabewegung beteiligt sind.

Die Aktivität der R-Typ-Anionenkanäle ist stark abhängig vom Membranpotential und der extrazellulären Malat-Konzentration (Pei et al., 2000; Meyer et al., 2010; Sasaki et al., 2010). Der genaue Signalweg zur Aktivierung der ALMT-Kanäle konnte erst 2013 aufgeklärt werden. Wie auch SLAC1 steht die Aktivität von QUAC1 unter der Kontrolle von ABA. Untersuchungen des R-Typ-Anionenkanals in Schließzellen wie auch in *Xenopus* Oozyten konnten zeigen, dass die ABA-abhängige Proteinkinase OST1, die auch für die Aktivierung von SLAC1 verantwortlich ist, eine wichtige Rolle in der Aktivierung von QUAC1 spielt (Imes et al., 2013). Dies erklärt auch warum die OST1-Verlustmutante (*ost1-2*) einen deutlich stärkeren Phänotyp zeigt, als die Einzelmutanten von *slac1* und *quac1*. Zusammen mit den S-Typ-Anionenkanälen vermitteln die R-Typ-Anionenkanäle den Ausstrom von Anionen der über die Depolarisation der Plasmamembran zur Aktivierung der K⁺-Auswärtskanäle in den Schließzellen führt (Abbildung 1-3).

1.2.4.10 Kationenkanäle beim Stomaschluss

Der Stomaschluss basiert auf der Reduzierung des Turgordrucks in den Schließzellen, der hauptsächlich durch den Ausstrom von Anionen und Kationen aus den Zellen erreicht wird. Dabei spielen die Anionenkanäle die initiale Rolle und führen durch ihr Öffnen und den damit verbundenen Anionenausstrom zu einer Depolarisation der Plasmamembran der Schließzellen. Diese Depolarisation wiederum ist entscheidend für die Aktivierung der K⁺-Auswärtskanäle (Schroeder et al., 1984; Schroeder, 1988; Thiel and Blatt, 1991). Die Regulation der Aktivität der K⁺-Kanäle ist essenziell für die Stomabewegung und ist daher streng reguliert. Die Aktivität der Kanäle wird durch eine Vielzahl von Faktoren wie unter anderem ABA-abhängigen Kinasen und Phosphatasen modifiziert (Blatt, 1992; Becker et al., 2003; Lefoulon et al., 2016).

Der Shaker-ähnliche K⁺-Kanal GORK (**g**uard cell **o**utward **r**ectifying **K**⁺ channel) ist verantwortlich für den K⁺-Ausstrom beim Schließen der Stomata. Seine Charakterisierung im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten zeigte die für den Stomaschluss typischen K⁺-Auswärtsströme (Ache et al., 2000). Die Verlustmutante *gork1-1* zeigt einen kompletten Verlust der K⁺-Auswärtsströme in den Schließzellen und damit verbunden auch einen gestörten durch ABA oder Dunkelheit induzierten Stomaschluss (Hosy et al., 2003a). Die *gork1-1* Pflanzen zeigen daher auch einen höheren Wasserverlust und damit verbunden eine geringere Widerstandsfähigkeit gegen Trockenstress. Zusätzlich ist das Öffnen der Stomata in der Mutante leicht beschleunigt. Grund dafür ist die Verschiebung des

Geleichgewichts zwischen K^+ -Ein- und K^+ -Ausstrom aus den Schließzellen durch das Fehlen des K^+ -Auswärtskanals (Hosy et al., 2003a).

Die Expression von GORK im Spross wird durch eine steigende ABA Konzentrationen proportional gesteigert. Dafür verantwortlich sind die aus dem ABA-Signalweg bekannten PP2C-Phosphatasen ABI1 und ABI2. In Schließzellen ist die Expression von GORK jedoch ABA unabhängig (Becker et al., 2003). Die Aktivität von GORK wird durch mehrere Faktoren reguliert. Dazu gehören unter anderem ROS, extrazelluläres K^+ (Ache et al., 2000; Eisenach et al., 2014), der intra- wie extrazelluläre pH-Wert (Lacombe et al., 2000) und Phosphatasen und Kinasen des ABA-Signalwegs (Armstrong et al., 1995; Lee et al., 2007; Lefoulon et al., 2016).

Wurden die K^+ -Auswärtskanäle der Schließzellen aktiviert, vermitteln sie bei einer Depolarisation der Plasmamembran den Ausstrom von K^+ und sorgen so zusammen mit dem Ausstrom von Anionen für ein Abfallen des Turgordrucks der Schließzellen. Der fallende Turgor in den Schließzellen bewirkt schlussendlich das Schließen der Stomata.

1.3 Zielsetzung

In den höher entwickelten Samenpflanzen sind die Mechanismen für die Regulation des Wasserhaushalts seit Jahrzehnten das Ziel ausgiebiger Forschungsarbeiten. Ein Schlüsselement zur Regulation des Wasserhaushalts in Spermatophyten sind regulierbare stomatäre Komplexe, die sich bei Trockenheit schnell schließen lassen. Dabei spielt das Phytohormon ABA eine entscheidende Rolle (Little and Eidt, 1968; Mittelheuser and VanStevenink, 1969; Harris et al., 1988; Schroeder et al., 2001; Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002; Roelfsema et al., 2004; Nambara and Marion-Poll, 2005). Nach der ABA-Perzeption aktiviert eine kurze ABA-Signalkaskade Schließzell-exprimierte SLAC1-typ Anionenkanälen, die im aktiven Zustand den Stomaschluss initiieren und so ein Verwelken der Pflanze verhindern. Wie schützen sich aber evolutiv ältere Pflanzen, die noch keine Stomata oder nur rudimentäre Atemöffnungen besitzen, vor dem Austrocknen?

Seit dem Landgang der ersten Algen war die Evolution der Pflanzen durch eine Vielzahl von notwendigen Anpassungen an diesen neuen Lebensraum geprägt. Schon bei der Grünalge *Klebsormidium* ist bekannt, dass das Phytohormon ABA, die Expression von Genen reguliert, die zur Austrocknungstoleranz der Alge beitragen (Holzinger and Karsten, 2013; Holzinger et al., 2014). Der genaue Aufbau des ABA-Signalwegs der frühen Landpflanzen ist dabei allerdings noch weitgehend unbekannt und es bleibt die Frage offen, wie und wann in der Evolution die Anionenkanäle der SLAC1-Familie, die in höheren Pflanzen die Stomabewegung regulieren, unter die Kontrolle von ABA gestellt wurden? Ging die ABA-abhängige Regulation von Anionenkanälen mit der Entwicklung der Stomata einher?

Das Ziel dieser Dissertation war es deshalb, den schnellen ABA-Signalweg in evolutiv unterschiedlich alten Pflanzenarten zu beleuchten, um die Entwicklung der Trockentoleranz und des ABA-abhängigen Stomaschlusses im Laufe der Evolution zu verstehen. Zu diesem Zweck wurden Modellpflanzen mit unterschiedlichem evolutiven Alter ausgewählt und deren ABA-Signalkomponenten kloniert. Mit Hilfe dieser Komponenten konnte anschließend die ABA-Signalkette im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten rekonstruiert und schließlich funktionell untersucht werden. Dabei halfen die ständig wachsenden Sequenzinformationen aus Genom- und Transkriptomsequenzierungen bei der Suche nach geeigneten Modellpflanzen und den zu klonierenden Komponenten des ABA-Signalwegs. Eine Kombination aus bioinformatischen, molekularbiologischen und biophysikalischen Methoden und Techniken sollte schließlich zur Aufklärung der Evolution des schnellen ABA-Signalwegs beitragen.

2. Material und Methoden

Die Grundlagen des Material und Methoden Teils dieser Arbeit basieren auf meiner Diplomarbeit („Struktur- und Funktions-untersuchungen am Anionenkanal SLAH2 aus *Arabidopsis thaliana*“, 2011) und wurden dem Sachverhalt entsprechend angepasst. Die Standardtechniken wurden, sofern nicht anders erwähnt oder genauer beschrieben, entsprechend den Werken „Current Protocols in Molecular Biology“ (Wiley 2016) und „Molecular Cloning“ (Green and Sambrook, 2012) durchgeführt.

2.1 DNA-Techniken

2.1.1 Die IVT-PCR

Bei der IVT-PCR (*in vitro* Transkription) handelt es sich um eine herkömmliche PCR mit spezifischen Primern (IVT-Primern) die speziell für die in dieser Arbeit verwendeten pNBlu Vektoren designt wurden. Dabei wird aus den in die Vektoren klonierten Genen ein cDNA-Fragment synthetisiert, das zur Herstellung von cRNA mittels *in vitro* Transkription benutzt werden kann. Durch die Verwendung der speziell designten IVT-Primer entstehen in der IVT-PCR die linearisierten DNA-Matrizen für die RNA-Synthese. Die IVT-Primer setzen hierzu auf den verwendeten pNBlu-Vektoren so auf, das die entstehenden DNA-Matrizen den für die IVT-Transkription benötigten Promotor für die virale T7-RNA-Polymerase, die in den Vektor klonierte cDNA und die am 3' und 5' Ende des Gens befindlichen untranslatierten Regionen (UTRs des β -Globulins aus *Xenopus laevis*) enthalten. Bei den pNBlu-Vektoren #18 und #20 wurden zusätzlich an das N-terminale oder das C-terminale Ende des klonierten Gens noch die Sequenz eines Reportergens (YFP/BIFC) angehängt. Durch die IVT-PCR entfiel der Schritt einer Linearisierung des Vektors vor der IVT-Transkription.

Der Ansatz einer IVT-PCR setzte sich wie folgt zusammen und wurde dem anschließenden Protokoll folgenden Programm in den PCR-Cyclern durchgeführt.

Ansatz der IVT-PCR:

1 μ l Template DNA

1 μ l Phusion Cx DNA-Polymerase (2 U/ μ l)

1 μ l dNTP Mix (je 10 mM)

- 1 µl IVT-Primer forward (10 µM)
- 1 µl IVT-Primer reverse (10 µM)
- 10 µl 5x Reaktionspuffer Phusion HF
- 35 µl Nuklease-freies Wasser für Gesamtvolumen der Reaktion von 50 µl

	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Initiale Denaturierung	98	60
Denaturierung	98	25
Primer-Annealing	56	25
Elongation	72	X = 30 s pro 1000bp
Abschluss der Synthese	72	120

} 30x

2.1.2 Mutagenese PCR

Die Mutagenese-PCR ist eine spezielle Form der PCR bei der mittels der modifizierten USER-Methode eine gezielte Mutation in das zu untersuchende Gen eingefügt wird. Dabei kann es sich um eine Punktmutation, einen Austausch ganzer Genabschnitte oder die Deletion bestimmter Sequenzen handeln. Dafür wird eine PCR mit speziellen USER-kompatiblen Mutagenese-Primern auf der Plasmid-DNA des Klons durchgeführt. Dazu setzen die Primer im Gegensatz zu einer normalen PCR nicht an den Enden des Konstrukts auf, sondern an der Stelle an der die Mutation eingefügt werden soll und überlappen mit 8-12 Basenpaaren. Durch das Verändern einzelner Basen in der Überlappungssequenz der beiden Primer lassen sich so Punktmutationen an nahezu jeder gewünschten Stelle in einem Gen einfügen. Ein zweites Primerpaar setzt in der Ampicillinresistenz des Vektors auf. Dadurch wird in zwei einzelnen PCR-Reaktionen je ein Teil des Gens und eine Hälfte des Vektors von der Mutationsstelle in beide Richtungen bis zur Ampicillinresistenz des Vektors repliziert. Anschließend werden die zwei Hälften in einer USER-Reaktion wieder zu einem kompletten Plasmid vereint. Durch die modifizierten Basen in den Überhängen der Mutagenese-Primer wird so die gewünschte Mutation in das Gen eingefügt und es befindet sich direkt wieder in demselben transfizierbaren Ausgangsvektor. Durch die Positionierung des zweiten Primerpaars in der Antibiotikaresistenz des Vektors wird gleichzeitig sichergestellt, dass sich nur ein Vektor aus den beiden unterschiedlichen PCR-Produkten zu einem funktionellen Vektor verbinden kann und es nicht

zu einer zufälligen Ligation einer der Hälften alleine kommt. Die Vektoren einschließlich des mutierten Gens wurden anschließend in *Escherichia coli* Bakterien transformiert und selektiert.

2.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Weiterverwendung der PCR-Produkte in sensiblen Reaktionen, wie z.B. IVT-Transkription oder einer Sequenzierung, ist eine Aufreinigung der PCR-Fragmente erforderlich. Mit Hilfe eines QIAquick PCR-Purification Kit von Qiagen werden dabei Enzyme und Reste des PCR-Ansatzes von den PCR-Produkten getrennt.

Die 50µl PCR-Produkt werden mit 250µl PB-Bindungspuffer gemischt und durch eine Säule des Kits zentrifugiert. Dabei lagert sich das PCR-Produkt an die stationäre Phase der Säule an. Durch Waschen in zwei Schritten mit insgesamt 750µl PE-Waschpuffer werden die unerwünschten Edukte und Enzyme aus der Säule gespült. Abschließend wird das PCR-Produkt mit 30-50 µl EB-Eluierungspuffer oder H₂O mittels erneuter Zentrifugation aus der Säule gelöst und in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.1.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung verschieden großer Nukleinsäurefragmente. Das Agarosegel liegt hierzu in einer Gelelektrophoresekammer mit 1x TAE (485g Tris, 74,4g EDTA, 114.2ml Essigsäure, 4l H₂O) als Laufpuffer. Die Proben werden in die Taschen des Agarosegels geladen und wandern entlang des angelegten elektrischen Feldes durch das Gel. Agarose ist ein Polysaccharid, das in dem Gel eine Matrix aufbaut, deren Poren mit steigender Agarose-Konzentration immer kleiner werden. Die auf Grund des Phosphatrückgrats der Stränge negativ geladenen Nukleinsäuren werden zum positiven Pol der Elektrophoresekammer gezogen. Lange Stränge wandern langsamer durch die Gelmatrix als kleinere Fragmente, wodurch die Nukleinsäurefragmente der Größe nach aufgetrennt werden. Für Stränge mit einer Länge von über 1000 bp werden 1%ige Gele (Universal Agarose, Bio&Sell) verwendet, bei kleineren Strängen 2-3%ige Gele. Die Auftrennung erfolgt bei einer angelegten Spannung von ca. 100 mV. Als Referenz für die Länge der Proben dient ein λ-PstI-Marker der durch den Verdau der DNA des λ-Phagen mit dem Restriktionsenzym PstI gewonnen wird. Die dabei entstehenden DNA-Fragmenten haben eine definierte Basenlänge und bilden eine konstante Referenz für DNA-Proben mit einer Länge zwischen 250 bp und 11 kb. Um die Fragmente innerhalb des Gels sichtbar zu machen, wird dem

Agarosegel der Farbstoff GelGreen (BIOTIUM) beigemischt und die Proben vor dem Auftragen mit einem 5x DNA-Probenpuffer vermischt. Unter einem Intas UV Imager können die Fragmente so durch die Belichtung mit UV-Licht bei 254-366 nm Wellenlänge sichtbar gemacht werden.

2.1.5 Die USER-Klonierungsmethode

Beim Klonieren handelt es sich um ein Verfahren ein gewünschtes Gen in unterschiedliche Plasmide zu übertragen und so für unterschiedliche Transfektions- und Vermehrungsmethoden zugänglich zu machen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden als Empfängerorganismus für die Vermehrung der Plasmid-DNA meist *Escherichia coli* verwendet. Die Plasmidvektoren werden dafür von den Bakterienzellen aufgenommen und repliziert und durch enthaltene Resistenzen in den Vektoren lassen sich die positiv transformierten Zellen gut selektieren. Bei herkömmlichen Klonierungstechniken werden die Plasmide durch Restriktionsendonukleasen aufgeschnitten, die spezifische einzelsträngige Überhänge bilden. An diesen Stellen können dann DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen eingefügt werden. Der Nachteil dieser Klonierungsmethode ist, dass man für eine gerichtete Klonierung immer zwei verschiedene Restriktionsschnittstellen vor und hinter seinem Gen so wie in den für die Klonierung vorgesehenen Vektoren benötigt. Außerdem bilden sich durch herkömmliche Restriktionsenzyme nur kurze Überhänge von 2-4 Basen, die einen zusätzlichen Ligationsschritt während der Klonierung erfordern.

Beim USER-Cloning (uracil-specific excision reagent) (Nour-Eldin et al., 2006; Nour-Eldin et al., 2010) handelt es sich um eine besonders schnelle und unkomplizierte Klonierungsmethode, bei der auf einen zusätzlichen Ligationsschritt verzichtet werden kann. Dies wird ermöglicht durch eine Generierung von 8-12 Basen langen 3' Überhängen am Vektor und den komplementären 5' Überhängen am einzufügenden PCR-Produkt. Diese bilden ein Hybridisierungsprodukt, dass stabil genug für eine Transformation ist und so eine Ligation überflüssig macht. In den Vektor ist dafür eine spezielle 38 bp lange Klonierungssequenz eingebaut, die USER-Kassette. Durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym PacI und dem Nickingenzym Nt.BbvCI (New England Biolabs Inc.) werden die gewünschten 8 Basen langen 3' Überhänge im Zielvektor erzeugt, die zu einander nicht komplementär sind. Dadurch wird sowohl eine Rehybridisierung des leeren Vektors verhindert, als auch eine gerichtete Insertion des gewünschten Gens ermöglicht. Die 8 Basen langen Enden am PCR-Produkt des zu klonierenden Gens werden durch spezielle USER-Primer erzeugt, die ein Uracil enthalten. Durch einen Verdau mit dem USER-Enzymmix, bestehend aus Uracil DNA Glycosylase und DNA Glycosylase-Lyase Endo VIII, wird das Uracil aus den USER-Primern abgespalten und

die Enden mit den einzelsträngigen 8 Basen langen Überhängen komplementär zu den im Vektor erzeugten Überhängen freigelegt.

Für die USER-Klonierung werden der linearisierte Vektor und das USER-PCR-Produkt mit dem USER-Enzymmix zusammengegeben und für 30 min bei 37°C und anschließend für 30 min bei 25°C inkubiert. Während dieser Zeit entstehen die komplementären Überhänge am PCR-Produkt und es bilden sich stabile Hybridisierungsprodukte aus dem linearisierten Vektor und dem zu klonierenden PCR-Produkt, die in kompatible Bakterien transformiert werden können.

Reaktionsansatz einer USER-Reaktion:

1,5 µl Vektor

3-4 µl PCR-Produkt

1 µl USER-Enzymmix

auf 10 µl mit TE- oder EB-Puffer auffüllen

➔ 30Min Inkubation bei 37°C und anschließende 30 Min Inkubation bei 25°C

Die In der USER-Reaktion entstandenen Vektoren werden in der Reaktion nicht vollständig ligiert, sind jedoch stabil genug für die Transformation in kompetente Bakterien. Daher ist eine anschließende Transfektion nötig, da die unligierten Vektoren eine nur unzureichende Stabilität für eine längerfristige Lagerung besitzen.

2.1.6 Verwendete Vektoren

Zur Untersuchung der Interaktion der SLAC-Kanäle mit den OST1 Kinasen wurden spezielle USER kompatible Vektoren verwendet. Bei den Vektoren handelt es sich um spezielle Plasmide zur Vorbereitung von Genen für die Expression im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten. Für eine einfache Klonierung unterschiedlicher Konstrukte in die Vektoren besitzen sie eine USER-Kassette in die das jeweilige Gen kloniert wird. Die USER Kassette ist umgeben von den 3'- und 5'-UTRs sowie einem für die Transkription essenziellen T7-Promotor. Für die Erstellung einer geeigneten Matrize für die RNA-Synthese ist dieses ganze Fragment von den Primerbindungsstellen der hier verwendeten IVT-Primer gesäumt. Abgesehen davon enthalten alle pNBI-Oozytenvektoren das Ampicillin-Antibiotika-Resistenzgen für eine effektive Selektion der transformierten *E. coli* Bakterien. Die Vektoren wurden in unserer Arbeitsgruppe selbst vermehrt und präpariert.

pNB1u #16 ohne Reportergeren

pNB1u #18 N-terminale Hälfte des YFP am 3'Ende der USER-Kassette

pNB1u #20 C-terminale Hälfte des YFP am 3'Ende der USER-Kassette

Die im Laufe der Arbeit verwendeten SLAC-Kanäle wurden dabei meistens in den Vektor pNB1u #18 und die OST1-Kinasen in den Vektor pNB1u #20 kloniert. Dadurch wurden die Kanäle C-terminal mit der N-Terminalen Hälfte des Reportergeren YFP (**y**ellow **f**luorescent **p**rotein) fusioniert und die Kinasen C-terminal mit der N-terminalen Hälfte des YFP. Dies ermöglichte die Untersuchung der Interaktion zwischen Kanal und Kinase mittels BIFC-Analyse bei LSM-Messungen (2.8 LSM Mikroskopie).

2.1.7 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der durchgeführten Klonierungen und hergestellten Mutanten wurden DNA-Sequenzierungen der Klone durchgeführt. Um die Sequenzierung durch zu führen wurden die Proben an die Firmen LGC-Genomics oder GATC-Biotech geschickt. Dazu mussten die passenden Primer ausgewählt und die Proben auf eine Konzentration von 40-100 ng/µl eingestellt werden. Von den Proben wie auch von den Primern wurde eine Mindestmenge von 20 µl verlangt, die für ca. vier Reaktionen ausreichte. Die verwertbare Sequenz einer Sequenzierung betrug im Schnitt ca. 1000 Basen. Für längere Konstrukte war es daher erforderlich mit mehreren Primern von vor, hinter und in dem Gen selbst zu sequenzieren um eine Überlappung der Sequenzierungen und damit ein vollständiges Ergebnis zu erhalten. Die Ergebnisse der Sequenzierungen waren meist innerhalb eines Tages online einsehbar. Die Sequenzen wurden daraufhin mit Hilfe des Programms Vektor NTI 10 (Invitrogen) mit der theoretischen Sequenz des Konstruktes verglichen und der Klon somit auf Fehler kontrolliert. Erst nach einer positiven, kompletten Sequenzierung wurden die neuen Konstrukte für weitere Arbeitsschritte verwendet und längerfristig gelagert.

2.1.8 Herstellung von Bakterienstocks

Zur langfristigen Lagerung der Vektoren mit einem eingebauten Gen wurden Bakterienstocks angelegt, da sich sowohl die selektiven LB-Agarplatten als auch die Übernachtskulturen bei 4°C nur für einen sehr begrenzten Zeitraum lagern lassen. Für Bakterienstocks werden 400 µl der Übernachtskultur mit 400 µl 85%igem Glycerin gemischt und sofort durch flüssigen Stickstoff

bei -196°C fixiert. Die Lagerung der Bakterienstocks erfolgte bei -80°C . Aus den Stocks ließ sich jederzeit mit sehr geringen Mengen eine neue Bakterienkultur animpfen und der gewünschte Klon vermehren.

2.1.9 Synthese von Genen

Die Klonierung einzelner Gene zeigte sich auf Grund des Fehlens ausreichender Template-Proben als äußerst schwierig. Ein sehr zeitsparendes und Effizientes System für die Erzeugung klonierbarer Gene stellt in solchen Fällen die kommerzielle Synthese der DNA-Sequenz dar. Bei der Firma ThermoFischer Scientific wurde daher das Gen des Kanals PpSLAC1 auf Basis seiner Sequenz im GeneArt Gene Synthesis Verfahren synthetisiert.

Dafür werden Oligonukleotide des Gens synthetisiert und anschließend zum Vollständigen Gen zusammengesetzt. Das vollständige Gen wird anschließend in einen Standard-Klonierungsvektor kloniert und vollständig Sequenziert. Nach einer 100%igen Kontrolle der Sequenz wird das Gen in dem Klonierungsvektor in lyophilisierter Form verschickt und kann nach dem erneuten Lösen in H_2O für weitere Klonierungsschritte verwendet werden.

2.2 Molekularbiologische Methoden mit *E. coli*

Escherichia coli eignet sich auf Grund seiner geringen Generationszeit und der einfachen Handhabung sehr gut zur Amplifikation der verwendeten Plasmid Vektoren. Durch die schnelle Vermehrung lassen sich innerhalb kürzester Zeit große Mengen an DNA erzeugen und in Form von Bakterienstocks auch langfristig gut lagern.

Im Laufe dieser Diplomarbeit werden nur am Institut selbsthergestellte, chemisch kompetente *E. coli* Zellen basierend auf dem Stamm XL1-Blue MRF['] (Stratagene) verwendet. Die Zellwand der Bakterien muss für die Aufnahme von Plasmid-DNA erst kompetent gemacht werden, zum Beispiel durch Calciumchlorid. Dadurch lässt sich später leicht die Aufnahme fremder Plasmid-DNA stimulieren.

2.2.1 Bakterientransformation und Kultivierung

Zur Transformation Bakterien wurden die Vektoren zu den chemisch kompetenten *E. coli* gegeben und mittels Hitzeschock die Aufnahme in die Bakterien stimuliert. Die chemische Vorbehandlung mit Calciumchlorid oder Rubidiumchlorid verringert die Abstoßung zwischen der negativ geladenen DNA und der negativ geladenen Zellmembran der Bakterien, wodurch die Aufnahme der DNA erleichtert wird. Die auf -80°C gelagerten 50 μl -Aliquots chemisch kompetenter *E. coli* wurden dafür zunächst schonend auf Eis aufgetaut und anschließend auf die schon abgeschlossenen 10 μl USER-Reaktionen gegeben. Ein Hitzeschock von 40 Sekunden in einem 42°C warmen Wasserbad brachte die Bakterien dazu die DNA-Plasmide aus der USER-Reaktion aufzunehmen. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis für weitere 3 Minuten inkubiert.

Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte auf selektiven LB-Agarplatten, auf die die Zellen ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Durch die in den LB-Agarplatten enthaltenen Antibiotika (meist Ampicillin (50 mg/l)) konnten nur die antibiotikaresistenten Zellen überleben. Dadurch wurden die *E. coli* Bakterien darauf selektiert, ob sie ein Plasmid mit dem entsprechenden Resistenzgen aufgenommen hatten. Durch eine IVT-PCR auf die Bakterien direkt oder die daraus extrahierten Plasmide konnte kontrolliert werden, ob in die überlebenden Bakterien nur einen leeren Vektor aufgenommen hatten oder einen Vektor mit dem gewünschten Gen.

2.2.2 Herstellung von Bakterienkulturen

Nach der Kontrolle der transformierten Kolonien mittels IVT-PCR wurden die restlichen Bakterien der positiven Kolonien weiter vermehrt. Dafür wurden sie in ca. 5 ml flüssigem LB-Medium angeimpft. Um den selektiven Druck auf die Bakterien zu erhalten und damit sicher zu stellen, dass die transformierten Plasmide nicht wieder verloren gehen enthielt auch das LB-Medium das dem Plasmid entsprechende Antibiotikum. Die Falcons wurden über Nacht in einem 37°C Schüttelschrank (Inkubator Shaker Model G25“, New Brunswick scientific co. Inc.) inkubiert. Der Inkubator bietet dabei die perfekte Umgebung für die fakultativ anaeroben *E. coli* Bakterien wodurch ein Vermehrungsoptimum erreicht wird.

2.2.3 Plasmid-Mini-Präparationen

Bei Minipräparationen handelt es sich um eine Form zur mittelfristigen und langfristigen Lagerung von Plasmid-Vektoren und den darin enthaltenen Konstrukten. Im Gegensatz zu Bakterienstocks werden die Plasmide hierzu aus den Bakterien extrahiert, aufgereinigt und anschließend bei -20°C gelagert. Für eine Plasmid-Mini-Präparation wurden 1,5 ml einer Übernackkultur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in dem verbleibenden Medium wieder resuspendiert. Dadurch wurde die Konzentration der Bakterien erhöht um die Ausbeute der Plasmidextraktion zu steigern. Für die Mini-Präparation wurden die Mini-Kits von Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit - Cat No./ID: 27106) und Genaxxon (Plasmid PLUS DNA Purification Mini Spin Column Kit – Cat#: S5369) verwendet.

Die beiden Kits basieren auf demselben Prinzip und die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgt nach einem nahezu identischen Protokoll. Dabei wurden die Zellen zunächst in einem Resuspensions-Puffer aufgenommen und anschließend durch einen Lyse-Puffer für 2 – 5 Min lysiert um die DNA freizulegen. Durch die Zugabe eines Neutralisierungs-Puffer wurde die Lysierung abgebrochen und die freigelegte Plasmid-DNA anschließend über eine Säule in mehreren Zentrifugationsschritten aufgereinigt.

Die gewonnene Plasmid-DNA konnte direkt für eine Sequenzierung verschickt werden oder als Template für weitere Reaktionen verwendet werden.

2.3 RNA-Techniken

2.3.1 *In vitro* Transkription IVT

Um die erstellten Klone mittels DEVC elektrophysiologisch untersuchen zu können, musste aus den in der IVT-PCR entstandenen cDNA Matrizen eine entsprechende cRNA synthetisiert werden. Die im Laufe dieser Promotionsarbeit verwendeten Vektoren enthalten zu diesem Anlass alle den T7-Promotor der T7-RNA-Polymerase aus dem T7-Bakteriophagen. Mit Hilfe dieser T7-Polymerase konnten aus den aufgereinigten ICT-PCR Matrizen die cRNAs der unterschiedlichen Konstrukte synthetisiert werden.

Die IVT-Reaktion wurde mit Hilfe des "AmpliCap-Max™ T7 High Yield Message Maker Kit" (CellScript, Inc.) durchgeführt, das eine hohe RNA-Ausbeute und eine schnelle unkomplizierte Form der *in vitro* Transkription darstellt.

Eine IVT-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

2,75 µl DNA-Template

1 µl Puffer

1 µl DTT

1 µl T7-Polymerase

4 µl Cap/NTPmix

0,25 µl RNase Inhibitor

Der Ansatz wurde gemischt und anschließend für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert in denen die T7-Polymerase die DNA-Matrize transkribiert. Nach der Inkubation wurden 20 µl NH₄Ac zugegeben und der Ansatz für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für eine Stunde bei 4°C und 20.000g zentrifugiert um die synthetisierte RNA zu fällen. Nach einem Waschschrift mit 70%igem eiskaltem Ethanol wurde die RNA getrocknet und schließlich in 12 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Ein Mikroliter der gewonnenen RNA wurde für photometrische die Konzentrationsbestimmung in einem Nanodrop 2000c (ThermoFischer Scientific) verwendet. Zur Kontrolle der Qualität wurde mit einem weiteren Mikroliter der RNA eine RNA-Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Konzentration der einzelnen Konstrukte wurde auf Grund von Erfahrungswerten auf 500ng/µl für die RNA der Kanäle, Kinasen und Phosphatasen eingestellt. Dadurch konnte eine bestmögliche Vergleichbarkeit der einzelnen Kanal-Kinase Kombinationen in den Oozytenversuchen erzielt werden.

2.4 Expression in heterologen Expressionssystemen

2.4.1 Transiente Expressionsanalysen in *Arabidopsis* Protoplasten

Die Transienten Expressionsanalysen in Protoplasten wurden in der kooperierenden Gruppe von Jian-Kang Zhu im Shanghai Institut für Biological Sciences durchgeführt. Dafür wurden *Arabidopsis thaliana* Sprösslinge in einer Kulturkammer unter Kurztagbedingungen herangezogen (13h Licht bei 23°C, 11h bei 20°C) herangezogen. Als Reporter für die Analysen wurde das Luciferase-Gen mit dem ABA-abhängigen Promotor RD29B fusioniert. Die unterschiedlichen Komponenten des untersuchten Signalwegs wurden in den Vektor pHBT95 kloniert und transient in den Protoplasten exprimiert. Als interner Standard wurde das Konstrukt ZmUBQ-GUS verwendet. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur in einer Inkubationslösung (0,5 M Manitol, 20 mM KCl, 4 mM MES pH=5,7) durchgeführt. Vor der Messung wurde der Protoplastenlösung 5 µM ABA zugesetzt (Kontrolle ohne Zugabe von ABA) und für 5 Stunden unter Licht inkubiert. (Sheen, 1998; Fujii et al., 2009; Zhao et al., 2013).

2.4.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Um die Qualität der RNA abgesehen von der Konzentration aus der photometrischen Messung zu bestimmen wurde sie ähnlich wie DNA mittels Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurden die gleichen 1%igen Agarosegel verwendet (siehe oben).

Die RNA-Proben mussten vor dem Auftragen auf das Gel im Gegensatz zu DNA-Proben vorbehandelt werden. Zu 1 µl RNA-Probe wurden 3 µl RNA-Probenpuffer zugegeben und das Gemisch für 20 Min auf 70°C erhitzt um Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen und anschließend für 2 Min auf Eis wieder herunter gekühlt. Nach dieser Behandlung konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden, das in einer Gelelektrophoresekammer mit 1x TAE als Laufpuffer gefahren wurde. Die angelegte Spannung bei der Gelelektrophorese von RNA betrug wie bei DNA-Gelen ca. 100 mV und dauerte 30 bis 45 Minuten. Die Banden der Proben nach Abschluss der Elektrophorese konnten wie bei den DNA-Gelen durch UV-Belichtung sichtbar gemacht werden.

2.4.3 *Xenopus laevis* Oozyten als heterologes Expressionssystem

Der glatte afrikanische Krallenfrosch *Xenopus Laevis* der vor allem im Süden Afrikas heimisch ist, zeichnet sich durch seine relativ anspruchslose, permanent aquatische Lebensweise aus und lässt sich daher als Versuchstier sehr leicht halten. Seine reifen Oozyten haben einen Durchmesser von ca. 1mm, einen dotterreichen vegetativen Pol und einen dunklen animalen Pol. Die Eier eignen sich auf Grund ihres hohen Gehalts an Speicherstoffen sowie ihrer hohen Anzahl an maternalen Ribosomen und den für die Translation wichtigen Bestandteilen sehr gut als heterologes Expressionssystem.

Nach dem *Xenopus laevis* bis in die 1960er Jahre in Apotheken zur Durchführung von Schwangerschaftstests verwendet wurde, wird er seit 1971 erfolgreich als heterologes Expressionssystem eingesetzt. Gurdon et al. entdeckten, dass, nach Injektion von Fremd-RNA in *Xenopus* Oozyten, das entsprechende Protein translatiert und in die Membran der Oozyte eingebaut wird (Gurdon et al., 1971; Moar et al., 1971). Im Jahr 1983 konnte erstmals eine funktionelle Expression von Rezeptoren und Ionenkanälen in *Xenopus* Oozyten gezeigt werden (Gundersen and Miledi, 1983; Gundersen et al., 1983b, a). Heute gehört das Expressionssystem zu den anerkannten Standardmethoden für die Translation und Expression von tierischen und pflanzlichen Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren und deren elektrophysiologischen Untersuchung.

Das heterologe Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten ermöglicht die Charakterisierung von Proteinen isoliert von ihrer natürlichen Umgebung. Die Größe der Oozyten erleichtert die Handhabung und das Einstechen bei DEVC Messungen. Die große Oozyten-Oberfläche ermöglicht bei der Untersuchung von Ionenkanälen die Messung von Ströme im μA -Bereich. Dies liegt auch an der guten Translationsleistung und der Fähigkeit der Oozyten auch artfremde Proteine funktionell zu exprimieren und in die Plasmamembran einzubauen.

2.4.3.1 Präparation der *Xenopus* Oozyten

Für die DEVC-Untersuchung der verschiedenen Konstrukte wurden Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) verwendet, die in 20-22°C warmen Aquarien gehalten wurden. Die Oozyten wurden aus den mit Tricaine betäubten und durch Eis herunter gekühlten Tieren operiert. Die Bauchhaut und das darunterliegende Muskelwebe wurde hierfür chirurgisch geöffnet, die Ovarlappen mit einer Pinzette herauspräpariert und in einer Aufbewahrungslösung (ND96+) aufgefangen. Nach der Entnahme von ca. 10ml der Ovarlappen wurde der Bauchraum der Tiere mit wenigen Stichen wieder verschlossen.

Die Oozyten wurden anschließend unter dem Binokular mit feinen Uhrmacherpinzetten möglichst vorsichtig in kleinere Portionen aufgeteilt. Dies war erforderlich damit die Collagenase, mit der die Oozyten anschließend verdaut wurden, die einzelnen Oozyten besser erreichen konnte. Mit Hilfe der Collagenase wurde das restliche Gewebe der Ovarlappen, Gefäße und die die Oozyten umgebende Gallertschicht verdaut und die Oozyten somit vereinzelt. Dafür wurde Collagenase (0,263 PZU/mg, 32mg/14ml) in Ca^{2+} -freier ND96-Lösung zu den Oozyten hinzugegeben und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem schütteln inkubiert. Der Verdau in Ca^{2+} -freier ND96-Lösung war nötig, da die Collagenase in Anwesenheit von Ca^{2+} eine unkontrollierbare Aktivität zeigt, die einen gleichmäßigen Verdau der Oozyten verhindern würde. Anschließend wurden die Oozyten mehrfach mit Ca^{2+} -freier ND96-Lösung gewaschen um die Collagenase und die Reste des Verdaus zu entfernen. Abschließend wurden die nun einzeln vorliegenden Oozyten in ND96+ Lösung mit 1 mM Ca^{2+} gegeben und in einer großen Petrischale im Kühlschrank bei 16°C aufbewahrt. Für eine stabile Lagerung der Oozyten wurde der ND96+ Lösung noch das Antibiotikum Gentamycin zugesetzt. Da sich nicht alle Oozyten auf Grund unterschiedlicher Größe oder Verletzungen zur weiteren Nutzung eigneten, wurden die Oozyten noch nach optischen Merkmalen aussortiert und nur die unversehrten Oozyten weiterverwendet.

2.4.3.2 Injektion der cRNA in Oozyten

Um die Oozyten die gewünschten Konstrukte exprimieren zu lassen, wurde die aus der *in vitro* Transkription erhaltene cRNA mit Hilfe eines Nanoject II Auto Nanoliter Injectors (Drummond) in die Oozyten injiziert. Dazu wurden Mikropipetten aus Glas gezogen und unter einem Mikroskop zu einer möglichst feinen und scharfen Spitze abgebrochen. Die Mikropipette wurde anschließend mit einem gefärbten Öl blasenfrei gefüllt, das den Druck des Stempels des hydraulischen Injektionsapparates ohne Verlust auf die eingesaugte wässrige cRNA-Lösung übertrug. Mittels Knopfdruck wurde der Stempel in der Mikropipette ausgefahren oder eingezogen um die cRNA-Lösung aufzusaugen und in die Oozyten zu injizieren. Für die Injektion wurde die feine Mikropipette mittels eines Mikromanipulators in die Oozyten eingestochen und eine Menge von 50,6 nl der zu injizierenden cRNA-Lösung in die Froscheier injiziert. Durch das Einstechen in jede einzelne Oozyte mit der Mikropipette ließ sich eine exakt gleichmäßige Injektion über alle Oozyten erreichen. Dadurch wurde eine größtmögliche Vergleichbarkeit unter den einzelnen Oozyten erreicht, die mit der gleichen cRNA injiziert wurden. Die Oozyten lagen hierbei in einer speziell dafür angefertigten Kammer in einzelnen Vertiefungen um sie zu stabilisieren. Die Kammer war mit ND96+ Lösung mit 1 mM Ca^{2+} gefüllt

und fasste drei mal 15 Oozyten. Die injizierten Oozyten wurden anschließend in derselben Lösung bei 16 °C gelagert und nach zwei bis drei Tagen vermessen

2.5 Auswertung der Homologie und Phylogenetik

In Kooperation mit Ingo Dreyer (Universidad de Talca, Talca - Center for Bioinformatics and Molecular Simulations (CBSM)) und weiteren Kolaborationspartnern (siehe Danksagungen) wurden die Genomsequenzen von *Klebsormidium nitens*, *Marchantia polymorpha*, *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii* und *Ceratopteris richardii* nach Homologen zu dem S-Typ-Anionenkanal AtSLAC1 (Dreyer et al., 2012), der Proteinkinase AtOST1 und der Phosphatase AtABI1 durchsucht. Dabei wurden zehn neue SLAC-Kanäle, zwölf neue OST1-Kinasen und vier ABI1-Phosphatasen gefunden. Um die Homologie der gefundenen Proteine zu AtSLAC1, AtOST1 und AtABI1 zu bestimmen, wurde die online verfügbare Software LALIGN verwendet um die DNA- und Aminosäure-Sequenzen vergleichend gegenüber zu stellen (Huang and Miller, 1991).

Für die Erstellung der phylogenetischen Stammbäume der Kanäle, Kinasen und Phosphatasen wurde das freie Onlineprogramm **Phylogeny.fr** verwendet (Dereeper et al., 2008). Mit Hilfe der „One Click“ Option wurden dabei die Aminosäure-Sequenzen der unterschiedlichen Proteine verglichen und ihre Verwandtschaft in Form eines phylogenetischen Baumes dargestellt, der anschließend noch geringfügig angepasst werden konnte um eine bessere Übersicht zu erhalten.

2.6 Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Technik (DEVC)

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (double-electrode-voltage-clamp DEVC) in Kombination mit dem heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten ist eine anerkannte und erprobte Standardmethode für die elektrophysiologische Untersuchung von Ionenkanälen, Transportern, Rezeptoren und ihre regulatorischen Kofaktoren.

Hierbei wird der charakteristische Stromfluss über die gesamte Plasmamembran der *Xenopus* Oozyten bei einer definierbaren Membranspannung gemessen. Das konstante halten einer Membranspannung beim gleichzeitigen messen der über die Membran fließenden Ströme ist nur durch das doppelte Einstechen mit zwei Elektroden möglich (Finkel and Gage, 1985).

2.6.1 Das Messprinzip

Bei der Zwei Elektroden Spannungsklemmen Technik wird mit zwei Mikroelektroden aus Glas in die *Xenopus* Oozyte eingestochen um die Ströme zu messen, die über die Plasmamembran der Eizelle fließen.

Die beiden eingestochenen Elektroden erfüllen dabei unterschiedliche Aufgaben. Eine der Beiden, die Spannungselektrode, misst das Membranpotential, dass über die Membran der Oozyte anliegt. Dafür wird der Spannungsunterschied zwischen der Spannungselektrode in der Eizelle in Relation zum Potential der Badelektrode (Referenzelektrode) in der die Oozyte umgebenden Badlösung gemessen. Die zweite intrazelluläre Elektrode, die Stromelektrode, wird über eine Rückkopplungsschleife gesteuert und appliziert Strom in die Oozyte. Dabei wird immer genau so viel Strom eingespeist, dass die eingestellte Sollspannung aufrechterhalten bleibt. Der applizierte Strom wird aus der Differenz zwischen der gemessenen aktuellen Membranspannung und der eingestellten Sollspannung berechnet. Die applizierten Ströme sind damit direkt proportional zu den Strömen die über die Transporter und Kanäle in der gesamten Oozytenmembran fließen.

Um Transportproteine und Kanäle in der Membran zu charakterisieren werden schnelle Spannungswechsel an der Membran angelegt und die daraus resultierenden Ströme gemessen. Diese Ströme setzen sich zusammen aus dem instantanen, kapazitiven Strom und dem Strom der durch die Transportproteine fließt. Die kapazitiven Ströme entstehen durch sehr schnelle Ladungsumlagerungen in der Membran und sind nur kurz nach der Spannungsänderung messbar. Durch ein versetztes ablesen der gemessenen Spannungen lassen sich diese Umlagerungseffekte umgehen und sind dadurch für die Charakterisierung von Kanälen und anderen Transportproteinen nicht relevant.

2.6.2 Der Messaufbau

Der Messaufbau besteht aus einem mechanooptischen Teil und den elektronischen Elementen mit dem Messrechner. Der mechanooptische Versuchsaufbau ist sehr anfällig für Störungen verschiedener Art und muss daher durch mehrere Maßnahmen geschützt werden. Um die Messapparatur mit der Stereolupe, den Mikromanipulatoren, der Messkammer und der Lichtquelle vor mechanischen Störungen zu schützen, befand sich der gesamte Aufbau auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Da sehr geringe Ströme (teilweise im nA-Bereich) gemessen wurden, musste der Messaufbau zusätzlich durch einen faradayschen Käfig vor elektrischen Störungen aus der Umgebung abgeschirmt werden. Zusätzlich wurden alle leitenden Elemente der Messapparatur unter Vermeidung von Erdungsschleifen geerdet. Die elektrischen Elemente des Aufbaus mit Ausnahme des Vorverstärkers wurden außerhalb des faradayschen Käfigs positioniert.

Die Oozyte lag in einer Badkammer und wurde mit wechselnden Lösungen gleichmäßig umspült. In der Badlösung befand sich auch die Bad- oder Referenz-Elektrode, die an die Erde des Vorverstärkers der Spannungselektrode angeschlossen war. Die Mikrokapillaren zum Einstechen der Spannungs- und der Stromelektrode waren je auf einem Mikromanipulator befestigt, der eine optimale dreidimensionale Ausrichtung der Elektroden ermöglichte. Die von der Membran abgeleitete Stromantwort wurde über den Vorverstärker in den eigentlichen Messverstärker (Turbo TEC 10CD, NPI electronics) geleitet. Im Messverstärker wurde das Signal noch einmal tiefpassgefiltert um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Die Messung konnte auf einem simulierten Oszilloskop auf dem Messrechner beobachtet werden. Der Messrechner (IBM PC, Maxdata) wurde über einen 16 Bit AD/DA-Wandler mit dem Messverstärker verbunden. In dem Messprogramm „PatchMaster“-Programmes (HEKA-Elektronik) konnten vom Messrechner aus verschiedene Spannungen angelegt und Spannungspuls-Protokolle gefahren werden, die über den Messverstärker an die Membran angelegt wurden.

Durch ein Akustisches Signal des Verstärkers wurde das Einstechen der Kapillaren auf den Mikromanipulatoren unterstützt, das abhängig von den Widerständen der Elektroden war. Die Oozyten wurden während allen Messungen konstant mit Lösungen umspült wobei Lösungsart und Fließgeschwindigkeit der Lösungen durch ein angeschlossenes Perfusionssystem kontrolliert wurde.

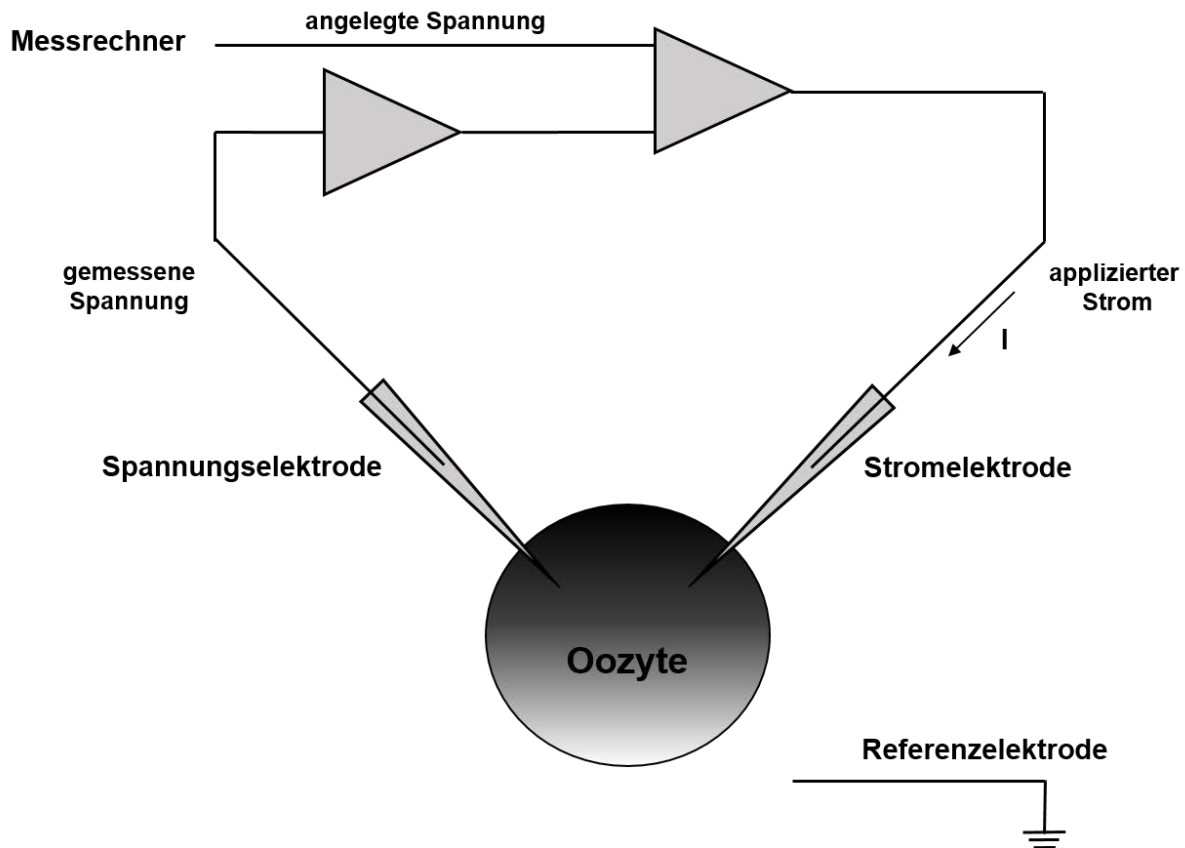


Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines DEVC Messplatzes

Bei den DEVC-Messungen werden zwei Elektroden in die Oozyte, die das zu untersuchende Gen exprimiert, eingestochen. Eine Dritte Elektrode befindet sich als Referenzelektrode (Badelektrode) in der die Zelle umgebende Badlösung. Über die eingestochene Spannungselektrode und die Badelektrode wird die Spannung über die gesamte Plasmamembran der Oozyte gemessen. Mit Hilfe des Messrechners wird die benötigte Spannung errechnet, die benötigt wird um eine konstante Spannung nach Wahl aufrecht erhalten zu können. So ermöglicht die Methode bei beliebigen Spannungen die Ströme zu messen, die über die Membran der Zelle fließen.

2.6.3 Elektroden und Pipetten

Die Silber/Silberchloridelektroden der Mess- und Referenzelektroden wurden aus einem Silberdraht hergestellt, der mit Hilfe eines Chloriergerätes (ACI-01, npi-Electronics, Tamm) in 2M KCl-Lösung elektrolytisch chloriert wurde. Für die beiden Messelektroden wurden mit einem Kapillarziehgerätes (Scientific Instrument Lab, Narishige Japan) spezielle Einstichpipetten aus Borsilikatgaskapillaren (KWIK-FIL™, World Percision Instruments Inc., USA) gezogen. Der Öffnungsdurchmesser dieser Kapillaren war mit 2-3 μm sehr klein um die Verletzung der Oozytenmembran zu minimieren. Die geringe Öffnungsweite der Kapillare verhinderte außerdem, dass die 3 M KCl-Lösung, mit denen die Kapillaren gefüllt waren, während der Messungen aus den Kapillaren heraus und in das Oozyteninnere hinein diffundieren konnte.

Für die Badelektrode wurde ein dünner PVC-Schlauch mit einem Durchmesser von ca. 1 mm mit einem Agarpfropfen (2% Agarose in 3 M KCl) auf einer Seite verschlossen und der Schlauch ebenfalls mit 3 M KCl gefüllt. Die Silber/Silberchloridelektrode wurde anschließend von der nicht verschlossenen Seite in den Schlauch gesteckt. Während der Agarpfropfen eine Diffusion von Anionen wie Chlorid oder Gluconat nahezu nicht beeinflusst, wurde damit verhindert, dass die KCl-Lösung der Badelektrode einfach aus dem Schlauch herausläuft und zu Potentialveränderungen in der Badlösung führt.

2.6.4 Konventionen

Die Membranspannung wird durch die Potentialdifferenz zwischen der zytosolischen Membranseite und dem Potential des extrazellulären Raums bestimmt. Das extrazelluläre Potential wird dabei Konventionsgemäß auf null gesetzt. Ein Kationeneinstrom in die Zelle entspricht damit einem negativen Strom und ein Kationenausstrom einem positiven Strom. Für die im Laufe dieser Arbeit ausschließlich gemessenen Anionenströme bedeutet dies genau umgekehrt, dass ein Anioneneinstrom in die Zelle einem positiven Strom und ein Anionenausstrom aus der Zelle einem negativen Strom entspricht.

2.6.5 Datenerfassung und Spannungsprotokolle

Vor dem Einstechen in die Plasmamembran der Oozyten wurden, nach dem Eintauchen der Elektroden in die die Oozyte umgebende Lösung, die Offset-Potentiale durch Potentiometer auf null abgeglichen und die Pipettenwiderstände überprüft. So lange sich die Widerstände der Pipetten dabei in dem Bereich zwischen 0,4 und 1,5 M Ω befanden, wurden sie zum Einstechen in die Membran und die anschließenden Messungen verwendet. Das Einstechen wurde optisch durch ein Binokular verfolgt und durch ein akustisches Signal kontrolliert. Im Spannungsklemmen-Modus wurde eine Haltespannung U_H von 0 mV gewählt. Um die Abdichtung zwischen Membran und Elektrode zu überprüfen und gegebenenfalls vorhandenen Leckströme zu detektieren, wurde zu Beginn jeder Messung ein Testpuls appliziert. Dazu wurden ausgehend von der Haltespannung Spannungssprünge zu einer Spannung von +20 und -20 mV mit einer Applikationsdauer von 10 ms durchgeführt. Lagen die Leckströme dieser Testpulse unter 300nA konnten die Oozyten für die Messreihen verwendet werden.

Um das Verhalten der Kanäle in Abhängigkeit von der Membranspannung zu untersuchen, wurde meist ein Einfachspannungspuls appliziert. Beim Einfachspannungspuls folgte ausgehend von der Haltespannung U_H von 0 mV eine Testspannung U_T für 50 ms. Diese wurde von +60 mV auf bis zu -150 mV in 10 mV Schritten bei jedem Durchlauf abgesenkt. Nach jeder einzelnen Testspannung sprang die Spannung wieder auf die Haltespannung zurück.

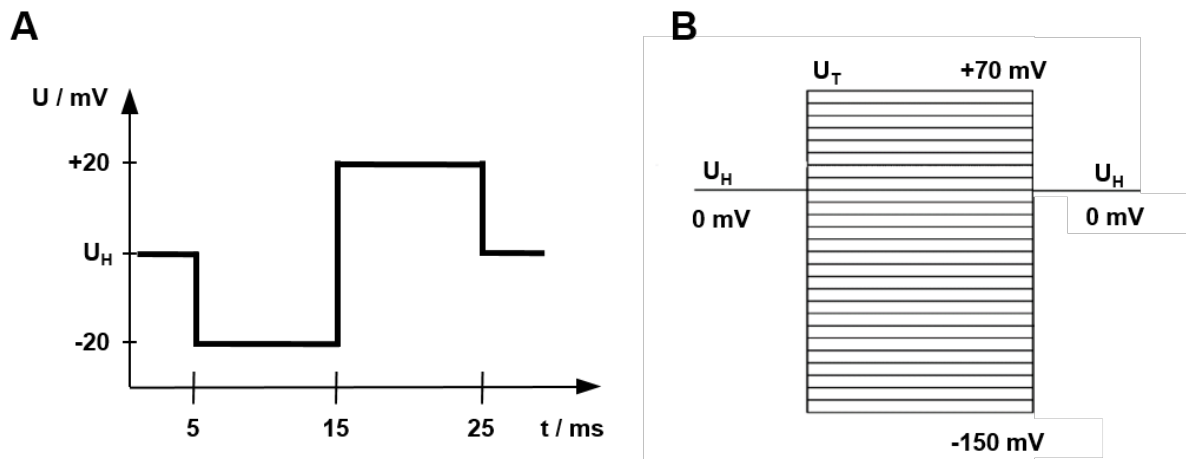


Abbildung 2-2: Spannungsprotokoll eines Testpulses und des Standardmessprotokolls

A) Um die Qualität der Oozyte und der eingestochenen Kapillaren testen zu können wurde zu Beginn jeder Messung der dargestellte Testpuls durchlaufen. Von der Haltespannung wurde dazu auch -20 mV und anschließend auf +20 mV gesprungen um zu testen wie dicht die Zelle in 100 mM Gluconat-Lösung ist. **B)** Das dargestellte Standardmessprotokoll wurde zur Charakterisierung der unterschiedlichen SLAC-Kanäle und ihrer Mutanten in den unterschiedlichen Messlösungen verwendet. Von der Haltespannung bei 0 mV wurde auf eine Spannung von +70 mV gesprungen und dieser Sprung in jedem Durchlauf um 10 mV verringert, bis im letzten Durchlauf zu einer Spannung von -150 mV gesprungen wurde. Die aufgezeichneten Gleichgewichtsströme der SLAC-Kanäle wurden anschließend mit einander verglichen.

2.6.6 Messreihen und Messlösungen

Die Kanäle und ihre Mutanten wurden auf ihre Funktionalität und ihre Selektivität gegenüber verschiedenen Anionen hin untersucht. Außerdem wurden Messungen zur Untersuchung der Aktivierbarkeit der Kanäle durch unterschiedliche Kinasen durchgeführt.

Dazu wurden die folgenden Lösungen hergestellt und verwendet (genaue Zusammensetzung siehe Anhang).

Funktionalitäts- und Aktivierungsmessung:

100 mM Gluconat-Lösung

100 mM Chlorid-Lösung

100 mM Nitrat-Lösung

Selektivitätsmessung:

50 mM Gluconat-Lösung

50 mM Chlorid-Lösung

50 mM Nitrat-Lösung

50 mM Sulfat-Lösung

50 mM Malat-Lösung

2.7 Biophysikalische Grundlagen

Die biophysikalischen Grundlagen inklusive Abschnitte 2.7.1-2 wurden zum Teil aus der Diplomarbeit von Dr. Dietmar Geiger übernommen und dem Sachverhalt entsprechend angepasst. Als Antwort auf ein Standard-Spannungspulsprotokoll ist in Abbildung 2-3 die Stromantwort des aktivierten AtSLAC1-Kanals zu erkennen. Nach dem Abklingen der kapazitiven Ströme nach dem Spannungssprung wurden die immer noch zu den instantanen Strömen zählenden Ganzzellströme im hinteren Bereich der Spannungspulse abgegriffen.

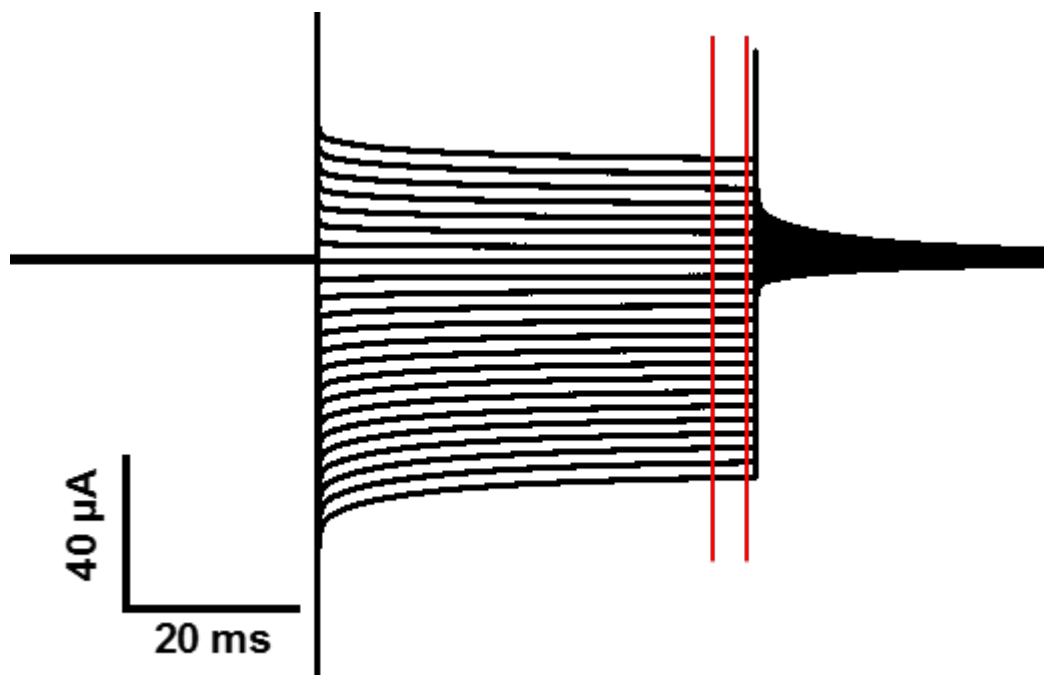


Abbildung 2-3: Stromantwort von AtSLAC1 auf das Standard-Spannungsprotokoll

Dargestellt ist die exemplarische Stromantwort einer *Xenopus* Oozyte in der AtSLAC1 und AtOST1 koexprimiert wurden. Mit Hilfe der DEVC-Methode wurde ein Spannungsprotokoll mit Spannungen von +70 bis -150 mV in einer 100 mM NaCl Lösung durchlaufen. In Rot ist der Bereich markiert, indem die instantanen Ganzzellströme der SLAC-Kanäle abgegriffen wurden.

Bei einem Ionenkanal, bei dem nur ein Zustand leitend ist, lässt sich der Gesamtstrom über der Oozytenmembran durch folgende Gleichung ausdrücken (Gleichung 1):

$$I(U, t) = N \cdot i(U, \Delta A^-) \cdot p_0(U, t) \quad (1)$$

P_0 = Offenwahrscheinlichkeit, abhängig vom Membranpotential und der Zeit

N = Anzahl der aktivierbaren Kanäle

i = Einzelkanalstrom, abhängig von der Spannung und dem Konzentrationsgradienten des gemessenen Anions

I = Ganzelloozytenstrom, abhängig von der Spannung und der Zeit

2.7.1 Bestimmung von Umkehrspannungen und relativen Permeabilitäten

Die Umkehrspannung eines Kanals ist dadurch charakterisiert, dass die Summe aller Ionenströme über der Membran gleich Null ist. Ist ein Kanal selektiv für nur eine Ionensorte, z.B. Nitrat, so liegt das Umkehrpotential U_{rev} beim Nitratgleichgewichtspotential U_N . Bei der Bestimmung von U_{rev} wird ausgenutzt, dass das spannungsabhängige Schalten der Ionenkanäle im Vergleich zur instantanen Änderung der Membranspannung langsam ist. Durch die Voraktivierung der Kanäle bei einer konstanten Spannung ist die Anzahl N der geöffneten Kanäle konstant. Auch die Offenwahrscheinlichkeit p_0 (U_{VP}) ändert sich in diesem kurzen Zeitintervall nicht, sodass die Stromamplitude I_T ($t=0$) proportional zum Einzelkanalstrom $i(U, \Delta NO_3^-)$ ist. In Zweifachspannungspuls-Experimenten konnte U_{rev} demnach als Nullstrompotential aus den Relaxationsströmen I_T bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Permeabilitätseigenschaften eines Ionenkanals können über die Umkehrspannung relative Permeabilitäten ermittelt werden. Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (GHK-Gleichung) gibt das Umkehrpotential bei einer Beteiligung mehrerer Ionensorten an (Goldman, 1943; Hodgkin und Katz, 1949):

$$U_{rev} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_X \cdot [X^+]_{au\beta en} + P_Y \cdot [Y^+]_{au\beta en} + P_Z \cdot [Z^-]_{in n e n}}{P_X \cdot [X^+]_{i n n e n} + P_Y \cdot [Y^+]_{i n n e n} + P_Z \cdot [Z^-]_{au\beta en}} \quad (2)$$

Die Symbole R , F und T ihre übliche Bedeutung als physikalische Konstanten und die Temperatur. P symbolisiert die jeweiligen Permeabilitätskoeffizienten der unterschiedlichen Ionen. Bei der Betrachtung eines Anionenkanals in Gegenwart eines einzelnen verfügbaren Anions vereinfacht sich die GHK-Gleichung zur Nernst-Gleichung:

$$U_{rev} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_X \cdot [X^-]_{au\beta en}}{P_X \cdot [X^-]_{i n n e n}} \quad (3)$$

Bei einer absoluten Temperatur von 298,15 K und dem Einsetzen der physikalischen Konstanten lässt sich die Nernst-Gleichung vereinfacht schreiben als:

$$U_{rev} = 59,1mV \cdot \lg \frac{P_X \cdot [X^-]_{au\beta en}}{P_X \cdot [X^-]_{innen}} \quad (4)$$

Das Umkehrpotential verschiebt sich somit bei einer zehnfachen Änderung der extrazellulären Konzentration des untersuchten Anions um 59,1 mV. Dabei liegt auf beiden Seiten der Membran jeweils nur ein permeierendes, monovalentes Anion X^- vor. Bei Messungen an Oozyten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik ist die intrazelluläre Konzentration von Ionen nicht exakt bekannt. Deshalb wurden relative Permeabilitäten im Vergleich zur Nitratkontrolllösung berechnet:

$$\frac{P_X}{P_N} = 10^{\frac{\Delta U_{rev}}{59,1mV}} \cdot \frac{[NO_3^-]_{au\beta en}}{[X^-]_{au\beta en}} \quad (5)$$

Hierbei bezeichnet ΔU_{rev} die Differenz der in X^- und NO_3^- gemessenen Umkehrspannungen. Für die Bestimmung der Permeabilität von divalenten Anionen im Vergleich zu monovalenten Anionen wurde die Formel wie folgt umgestellt (Fatt and Ginsborg, 1958):

$$\frac{P_{X^{2-}}}{P_N} = 10^{\frac{\Delta U_{rev}}{59,1mV}} \cdot \left(10^{\frac{U_{revX^{2-}}}{59,1mV}} + 1 \right) \cdot \frac{[NO_3^-]_{au\beta en}}{4[X^{2-}]_{au\beta en}} \quad (6)$$

Wobei X^{2-} für das divalente Anion steht.

2.8 LSM Mikroskopie und BIFC-Technik

Um die Fluoreszenz der in den Oozyten exprimierten Enzyme zu messen, wurde ein LSM-Mikroskop der Firma Leica Microsystems verwendet. Für das Mikroskopieren von Oozyten wurden entweder ein 25faches Immersionsobjektiv zum Eintauchen in die Oozyten Lösung, oder ein 10fach Objektiv mit 2,5fachem digitalem Zoom verwendet. Die Bilder wurden mit der Software „Leica Application Suite (LAS AF)“ von Leica Microsystems aufgezeichnet und ausgewertet.

Bei der LSM-(Laser-Scanning-Mikroskopie) Mikroskopie handelt es sich um eine spezielle Form der konfokalen Lichtmikroskopie. Das Präparat wird dabei durch einen fokussierten Laser mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge Punkt für Punkt beleuchtet und die emittierte Fluoreszenz des Präparats mittels unterschiedlicher Photomultiplier aufgezeichnet.

Das eigentliche Bild wird dabei erst durch die zugehörige Software erzeugt, die die einzelnen Bildpunkte wieder zu einem Gesamtbild des Präparats zusammensetzt. Durch das fokussierte Abrastern des Bildes wird je nur ein Punkt in einer Ebene des Präparats, der Fokalebene, abgebildet. Signale von Molekülen die nicht in der Fokalebene liegen, werden durch ein Blendensystem vor dem Detektor und durch die Fokussierung des Lasers auf jeden einzelnen Bildpunkt gleich doppelt unterdrückt. Dies ermöglicht eine sehr genaue Abbildung durch die Minimierung unterschiedlicher sich überlagernder Signale aus mehreren Ebenen des Präparats.

Beim Mikroskopieren der Oozyten mit einem Durchmesser von ca. einem Millimeter reicht die Energie des Lasers bei einer Fokussierung auf die Äquatorebene der Oozyten nicht aus um bis ins Innere der Oozyten zu gelangen. Die Fülle an Speicherstoffen in den Froscheiern verhindern dabei nicht nur, dass das Laserlicht bis ins Innere der Oozyten vordringt, sondern verhindern auch, dass eine mögliche Fluoreszenz von YFP wieder aus der Oozyte heraus gelangen kann. Da es sich bei den hier verwendeten Proteinen allerdings um membranständige SLAC-Kanäle und die mit ihnen interagierenden Kinasen handelt, ist eine mögliche Fluoreszenz im Inneren der Oozyte nicht zu erwarten und wäre auch nicht relevant für die Untersuchung der Proteine. Die Hintergrundfluoreszenz und unspezifische Fluoreszenz von Molekülen der Oozyte und der sie umgebenden Lösung wurde zu Beginn jeder Messung mit uninjizierten Oozyten als Nullwert abgeglichen. So wurden diese unspezifische natürliche Fluoreszenz oozyteneigener Proteine herausgefiltert und nur das darüber hinaus durch YFP entstehende Fluoreszenzsignal wurde aufgezeichnet.

Bei YFP handelt es sich um das gelb fluoreszierende Protein (**y**ellow **f**luorescent **p**rotein), das eine genetische Mutante des grün fluoreszierenden Proteins aus der Qualle *Aequorea victoria* darstellt. Mit Hilfe der BIFC- (**b**imolecular **f**luorescence **c**omplementation) oder auch split-YFP- genannten Methode konnte in dieser Arbeit die Interaktion zwischen den verwendeten SLAC-Kanälen (S1) und OST1-Kinasen (O1) untersucht werden (Abbildung 2-4).

Das Funktionsprinzip der BIFC-Methode basiert auf der Komplementierung des YFP-Reporterproteins aus seinen beiden Hälften. Zu einer derartigen Wiederherstellung des funktionalen fluoreszierenden Proteins kommt es nur, wenn die C-terminale- und die N-Terminale-Hälfte des YFP einander nahekommen und sich wieder an einander lagern. Dies geschieht nur, wenn sich die beiden Proteine, die mit der jeweiligen Hälfte des Fluorophors fusioniert wurden, bei einer Interaktion stark annähern (Ghosh et al., 2000; Horstman et al., 2014). Lagern sich die beiden YFP-Hälften aneinander bildet sich das Fluorophor mit den exakt selben Eigenschaften wie ein intaktes YFP-Molekül. Die Positionierung der YFP-Hälften an den zu untersuchenden Interaktionspartnern kann dabei genauso entscheidend sein wie die Interaktion der beiden selber. Durch das anhängen der YFP Hälften kann es zu

Veränderungen in der Proteinstruktur der markierten Proteine kommen, die deren Funktion verändern kann.

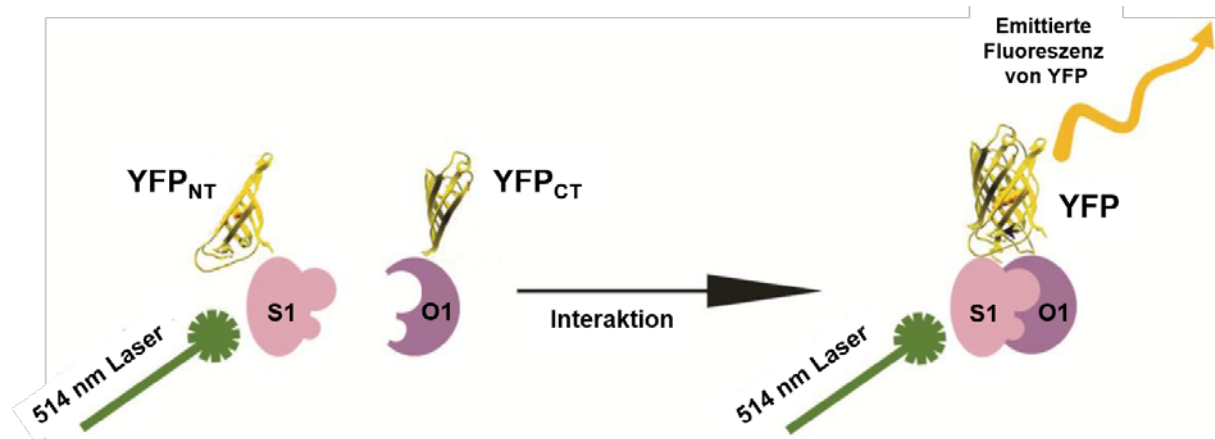


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der split-YFP/BIFC-Methode

Für die BIFC Methode wird das fluoreszierende Protein YFP in zwei Hälften geteilt, die N-terminale (YFP_{NT}) und die C-terminale Hälfte (YFP_{CT}). Die beiden Hälften werden an zwei Proteine fusioniert, deren Interaktion untersucht werden soll (S1=SLAC1, O1=OST1). Kommt es zu einer Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine bildet sich aus den beiden Hälften ein funktionelles YFP-Molekül. Durch die Anregung mit Laserlicht bei 514nm emittiert das YFP seine spezifische Fluoreszenz. (Darstellung verändert nach (Horstman et al., 2014))

Außerdem birgt die BIFC-Methode das Risiko von Falsch-Positiven Ergebnissen. Kommen sich die beiden YFP-Hälften einmal so nahe, dass sie zu einem vollständigen Fluorophor verschmelzen, dann ist dies Verbindung irreversibel. Das bedeutet, dass auch sehr flüchtige Interaktionspartner durch die beiden YFP-Hälften an einander geknüpft werden. Dieser Effekt kann so Kontakte zwischen zwei Interaktionspartnern artifiziell verstärken, die in vivo keine Rolle spielen würden.

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl der Versuchspflanzen

Um die Evolution der Pflanzen zu erforschen, können unterschiedliche Herangehensweisen verwendet werden. In der Paläobotanik werden an Hand von Fossilien Rückschlüsse auf die Evolution der Pflanzen geschlossen. In der Reihe der Fossilfunde gibt es jedoch oft große Lücken zwischen unterschiedlichen Entwicklungsschritten die im Laufe der Evolution unterschiedlicher Arten entstanden. Auch das Fehlen von lebendem Gewebe begrenzt die Erforschung der Arten stark, da die Fossilien meist keinen Einblick in die physiologischen und genetischen Abläufe erlauben.

Evolutionsforscher bedienen sich zur Beantwortung vieler Fragen daher an Modellorganismen. Dabei handelt es sich um rezente Organismen, die sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Laufe der Evolution von der Entwicklung der restlichen Arten abgespalten haben. Die Untersuchung von pflanzlichen Fossilien (Abbildung 1-1) und phylogenetische Studien rezenter Pflanzen lassen vermuten, dass sich die heutigen Landpflanzen aus nur einem gemeinsamen Vorfahren aus der Gruppe der Grünalgen entwickelt haben. Die ersten wirklichen Landpflanzen waren die Bryophyten. Diese Gruppe bestehen aus den Lebermoosen, den Hornmoosen und den Laubmoosen. Aus den Bryophyten entwickelten sich schließlich die Gefäßpflanzen mit den Lycophyten, den Farnen und den Samenpflanzen (Kenrick and Crane, 1997).

Unter der Vielzahl von rezenten Pflanzen gibt es einige gut untersuchte Modellorganismen aus unterschiedlichen Gruppen und Familien, die sich für die Untersuchung der Evolution von Landpflanzen eignen. Um die Evolution der regulatorischen Elemente der Stomata zu untersuchen, wurden im Laufe der Forschungen für diese Dissertation mehrere Proteine aus sechs evolutionär unterschiedlichen Pflanzen charakterisiert und verglichen. In chronologischer Reihenfolge der Entstehung ihrer Pflanzenarten (Kenrick and Crane, 1997) waren dies die Alge *Klebsormidium nitens*, das Lebermoos *Marchantia polymorpha*, das Laubmoos *Physcomitrella patens*, der Moosfarn *Selaginella moellendorffii*, der Farn *Ceratopteris richardii* und die Samenpflanze *Arabidopsis thaliana*.

3.1.1 Die Modellpflanze *Klebsormidium nitens* ist ein Vertreter der Grünalgen:

Eine Modellpflanze der Grünalgen als Vorstufe der ersten Landpflanzen ist die Süßwasseralge *Klebsormidium nitens*. Sie gehört schon zur Gruppe der Streptophyten, die die Landpflanzen und ihre nächsten Verwandten umfasst. Die Gattung *Klebsormidium* ist weltweit verbreitet und lebt Großteils in oder in der Nähe von stehendem oder fließendem Süßwasser. Die Alge kann aber auch in extremen Habitaten wie in den Hochlagen der europäischen Alpen gefunden werden (Lokhorst, 1996). Als Pionierpflanze sind sie dazu in der Lage Böden zu besiedeln, die zu wenig Wasser und/oder nicht genügend Halt und Nährstoffe für Gefäßpflanzen bieten. So gehört *Klebsormidium* zum Beispiel auch zu den Erstbesiedlern von Hängen nach Vulkanausbrüchen (Pluis, 1993). Dabei trotzen sie starken Temperaturschwankungen, starker UV-Strahlung und einer oft sehr geringen Wasserverfügbarkeit (Mikhailyuk et al., 2015). Die Anpassungsfähigkeit an so extreme und variable Umweltbedingungen machen die Gattung *Klebsormidium* zu einer beliebten Modellpflanze für die Erforschung verschiedener Stresssituationen für Pflanzen, wie zum Beispiel Trockenstress, Hitze-/Kältestress oder Stress durch UV-Strahlung (Holzinger and Karsten, 2013; Karsten and Holzinger, 2014). Die Algen haben einen sehr einfachen und einheitlichen Aufbau, der die Unterscheidung einzelner Arten oft schwierig gestaltet. Sie bilden unverzweigte Fäden von einzelnen, zylindrischen Zellen, die durch einen Fuß an einem Ende am Substrat befestigt sind oder frei im Wasser treiben können. Jede der zylindrisch gleich aufgebauten Zellen besitzt einen wandständigen Chloroplasten, der ungefähr die Hälfte des Zellvolumens beansprucht und einen zentralen Pyrenoid besitzt, in dem die Kohlenstoffassimilation stattfindet. Die Fortpflanzung von *Klebsormidium* erfolgt vornehmlich ungeschlechtlich durch den leichten Zerfall der Zellfäden oder die Produktion von Zoosporen mit zwei Geißeln. Nach dem Niederlassen bildet sich aus der Zoosporen wieder eine zylindrische Zelle, die durch Teilung einen neuen Zellfaden bildet (Lokhorst, 1996; Linne von Berg et al., 2004).

Als einfach gebaute Alge ohne stark differenzierte Gewebestrukturen stellt *Klebsormidium* in dieser Arbeit die Modellpflanze mit den ursprünglichsten Anpassungen an das Landleben dar. *Klebsormidium* besitzt noch keine spezialisierten Gewebe, wie eine Epidermis, interzelluläre Gasräume, Leitgefäße, Wurzeln oder Stomata. Trotzdem lassen sich schon viele homologe Komponenten des schnellen ABA-Signalwegs in der Grünalge finden. Dies eröffnet die Möglichkeit diese Komponenten des ABA-Signalwegs abseits ihrer bekannten Funktionen in der Schließzelle von Samenpflanzen zu untersuchen und deren ursprüngliche Rolle zu beleuchten.

3.1.2 Moose/Bryophyten (*Marchantia polymorpha*; *Physcomitrella patens*) entwickelten die ersten Stomata-ähnlichen Strukturen:

Die Moose stellen eine Gruppe der Embryophyten dar, die über die ganze Erde verbreitet sind. Es sind ca. 16.000 unterschiedliche Arten bekannt, die in drei Unterabteilungen aufgeteilt werden: Die *Marchantiophytina* (Lebermoose), die *Bryophytina* (Laubmoose) und die *Anthocerotophytina* (Hornmoose). Die Moose gelten als die ersten rein an das Landleben adaptierten Pflanzen. Ihre Anpassung an dieses neue Habitat ist allerdings oft noch nicht so vollständig erfolgt wie in den höheren Pflanzen, weshalb viele Moose feuchte Habitate bevorzugen. Da Moose noch kein Leitgewebe ausbilden und ihre Zellwände noch nicht durch Lignin verstärkt sind, bleiben Moose kleinwüchsige Organismen. Sie sind noch nicht dazu in der Lage ihren Wasserhaushalt so effektiv zu regulieren wie die höheren Pflanzen und werden daher auch als wechselfeuchte oder poliohydre Pflanzen bezeichnet (Frahm, 2001).

Die hier verwendete Versuchspflanze *Marchantia polymorpha* gehört zur Gruppe der Lebermoose und damit zu der vermutlich ursprünglichsten Familie der Landpflanzen (Qiu et al., 1998). Lebermoose sind weltweit verbreitet und vermehren sich sowohl vegetativ als auch über Sporen, die im Sporophyt der Pflanze gebildet werden. Den Großteil des Lebenszyklus der Lebermoose stellt jedoch der Gametophyt dar. Der Gametophyt bildet einen dorsiventral organisierten, lappigen Thallus aus. Dieser gelappte Aufbau erinnert leicht an den lappigen Aufbau der Leber, wodurch die Klasse der Lebermoose ihren Namen erhielt. Der kleine Sporophyt der Pflanze wächst auf den Thalli des Gametophyten. Das Lebermoos *Marchantia* besitzt schon eine sehr einfache Cuticula und internalisierte Gasräume. Diese Gasräume/Atemhöhlen sind durch einfache Poren/Öffnungen an der Oberseite des Gametophyten mit der Atmosphäre verbunden. Durch Veränderungen im Wasserhaushalt des Thallus schrumpfen oder weiten sich diese Poren leicht und bilden dadurch eine passive Regulation des Gasaustauschs mit der Umgebung (Frahm, 2001). Damit besitzen sie bereits zwei essenzielle Anpassungen der Pflanzen an das Landleben, die sich auch in allen späteren Pflanzenarten finden, die Internalisierung des Gewebes für den Gasaustausch und eine Abgrenzung zur Umwelt durch eine Cuticula (Raven, 2002). Die Poren und die internen Gasräume der Lebermoose sind vermutlich erste Vorläufer der Stomata und des Schwammparenchyms der Gefäßpflanzen und dienen einem effizienteren Gasaustausch für die Photosynthese. Zusätzlich besitzt *Marchantia polymorpha* kleine Fortsätze mit stark hydrophober Cuticula an den Poren, die ein Füllen der Poren durch Wasser verhindern sollen, da sie die Kapillarkräfte an der Pore reduzieren (Schonherr and Ziegler, 1975).

Marchantia besitzt wie alle Lebermoose noch keine Stomata, so dass auch kein schneller ABA-Signalweg für den Porenschluss erforderlich ist, wie man es aus den Gefäßpflanzen kennt. Mit seinen interzellularen Gasräumen in den Thalli besitzt *Marchantia* aber schon ein für die

Photosynthese spezialisiertes Gewebe mit einer stark erweiterten Oberfläche für den Gasaustausch. Als Landpflanzen benötigen sie daher auch ohne Stomata und den damit verbundenen ABA-abhängigen Stomaschluss einen effektiven Mechanismus zur Regulation des Wasserhaushalts. Das Lebermoos kann die Poren in der Oberfläche des Thallusgewebes allerdings noch nicht direkt kontrollieren, wie es bei höheren Pflanzen in ihren Stomata der Fall ist. Die Öffnungen reagieren aber zusammen mit dem gesamten Gewebe auf Veränderungen im Wasserhaushalt der Pflanze. Die damit verbundene Veränderung des Turgordrucks im gesamten Thallus führt dabei passiv zu einer Verengung oder Weitung der Poren. Damit stellt *Marchantia* eine Zwischenstufe zwischen den Grünalgen und den ersten Stomata tragenden Pflanzen dar.

Das Moos *Physcomitrella patens* vertritt in dieser Arbeit als eine Modellpflanze der Laubmoose die artenreichste Klasse der Moose. Wie auch in den Lebermoosen ist der Gametophyt der Laubmoose die dominante Form der Pflanze und ihr Sporophyt stellt nur einen kurzen Abschnitt in ihrem Lebenszyklus dar. Der Gametophyt besteht aus einem Stämmchen mit einfachen Blättchen. Die Blättchen bestehen aus einem einschichtigen Assimilationsgewebe und einer Mittelrippe mit Hydroiden und Leptoiden, ersten Vorläufern der Leitgewebe. Dieses leitende Gewebe ist in der Mittelrippe der Blätter und im Stämmchen des Sprosses zu finden. Der Wassertransport in den Hydroïden ist allerdings noch nicht so effizient wie im Leitgewebe der Gefäßpflanzen und ein Großteil des Wassers wird noch durch Kapillarkräfte zwischen dem Stängel und eng am Stängel anliegenden Blättchen transportiert (Lüttge et al., 2010). Durch ihre dominant gametophytische Lebensweise sind Moose schon seit den 1920er Jahren interessant für die botanische Forschung vor Allem in der Genetik (Wettstein, 1928). Die haploide Lebensweise des dominanten Gametophyten erleichtert deutlich die Isolation und Analyse von Mutanten im Vergleich zu anderen dominant diploid lebenden Pflanzen (Cove, 2005).

Die Laubmoose sind die ersten Pflanzen mit rudimentären Stomata, die nur aus einer Schließzelle mit einer Pore in der Mitte bestehen. Es finden sich jedoch nur einige wenige Stomata in der Epidermis des Sporophyten der Pflanze, während der Gametophyt, der den Großteil des Pflanzenkörpers ausmacht, keine Stomata ausbildet. Der kleine Sporophyt von *Physcomitrella patens* sitzt auf der Spitze der Stämmchen des Gametophyten und besitzt einen Ring aus Stomata um die Sporenkapsel. Die Verteilung der Stomata wird dabei in dem Laubmoos schon durch orthologe Gene derselben Transkriptionsfaktoren reguliert, die auch für die Verteilung der Stomata in Samenpflanzen wie *Arabidopsis* verantwortlich sind (Caine et al., 2016). Die Stomata von *Physcomitrella* reagieren schon auf die exogene Verabreichung von ABA, CO₂ und Licht, ähnlich wie die Stomata in höheren Pflanzen. Durch exogenes ABA und CO₂ schließen die Stomata und durch einen tageszyklischen Lichtrhythmus öffnen sie sich. Auch die spezifische Expression von ABA-abhängigen und schließzellspezifischen

Genen kann in *Physcomitrella* schon durch die Gabe von exogenem ABA angeregt werden (Chater et al., 2011).

Als eine der ersten Pflanzen mit funktionsfähigen Stomata ist *Physcomitrella* besonders interessant für die Untersuchung des schnellen ABA-Signalwegs in den Stomata. Auch wenn die Stomata nur an einem kleinen Teil der Pflanze zu finden sind und daher wahrscheinlich noch keine entscheidende Rolle für den Wasserhaushalt der gesamten Pflanze spielen, konnte in *Physcomitrella* schon eine ABA-abhängige Regulation der Stomabewegung gezeigt werden.

3.1.3 Bärlapppflanzen/Lycophyten (*Selaginella moellendorffii*):

Die Gruppe der Gefäßpflanzen (Tracheophyten) besteht aus den Lycophyten (Bärlapppflanzen) und den Euphyllophyten (Farne und Samenpflanzen). Die Lycophyten stellen einen entscheidenden Schritt in der Evolution der Landpflanzen hin zu den Gefäß- und schließlich den Samenpflanzen dar. Der Moosfarn *Selaginella moellendorffii* vertritt in dieser Arbeit die Gruppe der Lycophyten und somit die ersten rezenten Gefäßpflanzen. Der evolutionäre Erfolg der Bärlapppflanzen zeigt sich zum Beispiel in den ausgestorbenen Lycophytenarten der Ordnung *Lepidodendron*. Vor 360 Mio. J bildeten einige *Lepidodendron*-Arten die ersten größeren Bäume der Erde aus. Mit einer Größe von bis zu 40 m und einer Dicke von bis zu 5 m formten sie im Karbon-Zeitalter (360 – 300 Mio. J) die ersten Wälder und stellten die dominanten Pflanzenarten der damaligen Vegetation dar (Lüttge et al., 2010).

Selaginella moellendorffii ist eine beliebte Modellpflanze, da sie zu den ersten Gefäßpflanzen abseits der Samenpflanzen zählt, deren relativ kleines Genom (ca. 100 Megabasen) komplett sequenziert wurde (Banks et al., 2011). Die Lycophyten spalteten sich im Laufe der Evolution kurz nach der Entstehung des Leitgewebes von den restlichen Gefäßpflanzen ab und stehen daher zwischen den Bryophyten und den Euphyllophyten (Kenrick and Crane, 1997). Sie besitzen sowohl Eigenschaften der Gefäßpflanzen als auch der Bryophyten. Die dominante Generationsform der Lycophyten ist der Sporophyt mit einem ausgeprägten Leitgewebe wie bei den Gefäßpflanzen. Der Sporophyt produziert allerdings in speziellen Blättern in Ährenform, den Strobili, haploide Heterosporen (unterschieden in ♂ und ♀). Aus diesen haploiden Mikro- (♂) und Makrosporen (♀) bilden sich vom Sporophyt unabhängige Gametophyten wie bei den Bryophyten. Der daraus entstehende Mikrogametophyt produziert bewegliche Spermien und der Makrogametophyt Eier (Banks et al., 2011). Die Differenzierung der Gametophyten findet oft noch im Sporophyten statt, wo es dann auch zur Befruchtung kommt. Aus der Verschmelzung eines Spermiums und einer Eizelle der Gametophyten entsteht die Zygote und schließlich der Embryo eines neuen Sporophyten. *Selaginella* besitzt

wie alle Lycophyten noch keine richtigen Blätter. Die Blätter des Sporophyten von *Selaginella*, die Mikrophylli, besitzen einen sehr einfachen Aufbau. Die Mikrophylli weisen nur eine unverzweigte Leitgewebsader in der Mitte der Blättchen auf. Auf den Blättern finden sich voll ausgeprägte Stomata, deren Funktionalität allerdings noch umstritten ist (Kaplan, 2001; Peterson et al., 2010).

Die Lycophyten stellen mit ihrer dominant sporophytischen Lebensweise die ersten Gefäßpflanzen mit voll funktionsfähigen Stomata in der Epidermis der Pflanze dar. Damit steht *Selaginella* von seinem Aufbau her den Angiospermen schon sehr nahe. Der Lycophyt besitzt neben den Stomata auch interzelluläre Gasräume, eine abdichtende Cuticula, Wurzeln und ein ausgeprägtes Leitgewebe. Damit besitzen die Lycophyten alle für eine homiohydre Lebensweise erforderlichen Komponenten (Raven, 2002). Die Reaktion der Stomata von *Selaginella* auf das Phytohormon ABA ist jedoch umstritten. Unter Wasserstress produziert der Moosfarn zwar wie Samenpflanzen ABA und schließt seine Stomata, jedoch können die Stomata trotz anhaltend hoher ABA-Konzentrationen bei einer Rehydrierung wieder geöffnet werden (Brodribb and McAdam, 2011; McAdam and Brodribb, 2012). Dies spricht dafür, dass die Stomabewegung nicht so streng an ABA gekoppelt ist wie in den Samenpflanzen. Andere Studien dagegen konnten zeigen, dass endogenes ABA den Stomaschluss in *Selaginella* einleitet (Ruszala et al., 2011). Trotz oder gerade auf Grund dieser Kontroverse stellt der Moosfarn eine interessante Versuchspflanze für die angestrebte Untersuchung der Entstehung der Regulation der Stomabewegung dar.

3.1.4 Farne/Monilophyten (*Ceratopteris richardii*):

Als Versuchspflanze der Farne diente in dieser Arbeit *Ceratopteris richardii*. Sie ist eine Modellpflanze der echten Farne, den Polypodiopsiden und gehört zur Gruppe der Monilophyten (Farne und Schachtelhalme) (Hickok et al., 1995). Die Monilophyten spalteten sich vor ca. 400 Mio. J von den restlichen Gefäßpflanzen ab und ihre Gruppe stellt die nächsten Verwandten der Samenpflanzen dar (Pryer et al., 2001). Der aquatisch oder teilweise aquatisch lebende Farn *Ceratopteris* kommt in den meisten tropischen und subtropischen Regionen der Erde vor. Er ist einer der wenigen Farne, die sekundär zu einer aquatischen Lebensweise zurückkehrten. *Ceratopteris* besiedelt vornehmlich Teiche, Flüsse und Bäche. Der Farn lässt sich jedoch unter feuchten Bedingungen auch problemlos in einem Gewächshaus anziehen und stellt eine genügsame Versuchspflanze dar. Bei den Farnen stellt wie schon bei den Lycophyten der Gametophyt nur noch einen kleinen Teil des Lebenszyklus dar und die dominante Generationsform ist der Sporophyt. *Ceratopteris* ist leicht zu kultivieren, hat eine geringe Generationszeit (ca. 12 Wochen von Spore bis Spore) und bildet eine große

Anzahl gleichartiger Homosporen (Hickok and Warne, 1998). Die Homosporen sind sehr leicht in großer Zahl zu kultivieren und entwickeln sich, wie auch bei den Lycophyten, zu einem vom Sporophyt unabhängigen Gametophyt (Chasan, 1992). Der einfach gebaute Gametophyt besteht hauptsächlich aus einem nur ca. 2mm großen Thallus, auf dem die Sexualorgane (Archegonien♀ und Antheridien♂) sitzen. Nur 9-10 Tage nach der Aussaat der Sporen ist der Gametophyt ausgewachsen und nach der Befruchtung eines Gametangiums (meist Selbstbefruchtung) wächst daraus ein neuer Sporophyt heran. Der kleine Gametophyt stirbt daraufhin ab. Der Sporophyt der Pflanze bildet Wurzeln und wird ca. 5-20cm groß. Er besteht aus einem kurzen aufrechten Stamm mit Blättern, die Stomata besitzen. Über die Funktionalität dieser Stomata ist allerdings noch nicht viel bekannt. Der ausgewachsene Sporophyt bildet neue Homosporen in Sporangien am Rand der Blätter. Da sich jeder Gametophyt selbst befruchten kann, ist es möglich schon nach einer Generation komplett homozygote Sporophyten zu erhalten (Hickok and Warne, 1998; Cordle, 2012). Die schnelle und einfache Kultivierbarkeit, sowie der einfache Zugang zur haploiden und zur diploiden Form der Pflanze machen *Ceratopteris* vor Allem für Genetiker zu einer geeigneten Modellpflanze (Plackett et al., 2015). Aber auch für Botaniker anderer Forschungsgebiete oder in der Lehre ist *Ceratopteris* eine sehr attraktive Versuchspflanze (Hickok et al., 1995).

Der Farn *Ceratopteris* schließt in der Reihe der hier verwendeten Versuchspflanzen die Lücke zwischen den ersten Gefäßpflanzen (Lycophyten) und den besser erforschten Samenpflanzen (Spermatophyten). Trotz seiner sekundären Anpassung an eine aquatische Lebensweise ist der Farn dank seiner Stomata und dem ansonsten den Gefäßpflanzen entsprechenden Aufbau (interzellulare Gasräume, Cuticula, Leitgewebe, Wurzeln und Stomata) zu einer homiohydren Lebensweise im Stande. Die Farne stehen neben den Lycophyten am Anfang der Entwicklung der Gefäßpflanzen und sind deren nächste Verwandte (Pryer et al., 2001). Schon Anfang der 80er Jahre konnte in Mutanten gezeigt werden, dass ABA in *Ceratopteris* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Fortpflanzung spielt (Hickok, 1983, 1985; Banks, 1997). Über den ABA-Signalweg und hier im speziellen den schnellen ABA-Signalweg in den Schließzellen von *Ceratopteris* ist ansonsten aber noch nichts bekannt.

3.1.5 Samenpflanzen/Spermatophyten (*Arabidopsis thaliana*):

Unter den Samenpflanzen, den Spermatophyten, ist die Acker-Schmalwand ***Arabidopsis thaliana*** die am besten erforschte Modellpflanze. *Arabidopsis* gehört zur evolutionsgeschichtlich jüngsten aber auch größten Gruppe der Landpflanzen, den bedecktsamigen Angiospermen (Blütenpflanzen). Die Angiospermen umfassen über 250.000 rezente, beschriebene Arten und es werden täglich neue Arten entdeckt. Die ersten Fossilien

von Angiospermen stammen aus der Zeit vor ca. 140 Mio. J. Mit ihrer Entstehung begann das Neophytikum, das Zeitalter der Angiospermen, und seit ca. 90 Mio. J sind sie die dominierende Pflanzengruppe der terrestrischen Flora (Lüttge et al., 2010). Bei den Angiospermen hat die Rolle des Gametophyten als Teil des Lebenszyklus im Vergleich zu den bisher beschriebenen Versuchspflanzen noch weiter abgenommen und der Sporophyt bildet nahezu den gesamten Pflanzenkörper.

Die Acker-Schmalwand *Arabidopsis* ist weltweit verbreitet. Zu ihren großen Vorteilen als Versuchspflanze gehören ihre leichte Kultivierbarkeit und ihre hohe Reproduktionsleistung, da jede einzelne Pflanze eine Vielzahl von Samen produziert. Ein weiterer großer Vorteil von *Arabidopsis* ist ihr kleines diploides Genom, das mit nur 125-150 Megabasen im Vergleich zu anderen Angiospermen relativ übersichtlich ist (Bennett et al., 2003). Im Jahr 2000 wurde die Genomsequenz von *Arabidopsis thaliana* als das erste pflanzliche Genom überhaupt veröffentlicht und wurde zur Referenz für die gesamte botanische Forschung (The Arabidopsis-Genome-Initiative, 2000). Jedoch schon vor der Entschlüsselung ihres Genoms wurden viele genetische Methoden zur Erzeugung und Untersuchung von Mutanten in *Arabidopsis* entwickelt und Datenbanken mit unterschiedlichsten Mutanten angelegt und untersucht.

Als Samenpflanze besitzt *Arabidopsis* alle notwendigen Komponenten für eine homiohydre Lebensweise und als Modellpflanze der Angiospermen ist ihr ABA-Signalweg sehr gut erforscht. Dabei wurde auch der schnelle, membranassoziierte Teil des ABA-Signalweges in den Schließzellen bereits ausgiebig untersucht (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009; Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011; Brandt et al., 2012; Soon et al., 2012). Durch die Erkenntnisse in der ABA-Signaltransduktion in *Arabidopsis* Schließzellen weltweit und in unserem Labor, dienen die Komponenten des ABA-Signalwegs aus *Arabidopsis* (*AtSLAC1*, *AtOST1*, *AtABI1*) als Referenzen für die Untersuchung der Kanäle, Kinasen und Phosphatasen aller verwendeten Versuchsorganismen.

3.2 Identifizierung und Klonierung der Orthologen Proteine des schnellen ABA-Signalwegs

Die entscheidenden Faktoren des schnellen ABA-Signalwegs in den Schließzellen von Samenpflanzen sind schon lange das Thema ausgiebiger Untersuchungen und dementsprechend gut charakterisiert. Dazu gehören die ABA-Rezeptoren der PYR/PYL/RCAR-Familie, die PP2C-Phosphatasen, die ABA-anhängigen Kinasen der SnRK2-Familie und die S-Typ Anionenkanäle der SLAC1-Familie aus den Schließzellen von *Arabidopsis*. Bei den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konzentrierte ich mich auf die SLAC1-Kanäle, die SLAC1-aktivierenden OST1-Kinasen und ABI1-Phosphatasen der schnellen ABA-Signalkaskade. Zusammen bilden diese Komponenten einen essenziellen Teil des schnellen ABA-Signalwegs in den Schließzellen der Angiospermen und sind für die Funktion des ABA-induzierten Stomaschlusses unerlässlich. Auf der Basis von veröffentlichten und noch unveröffentlichten Genominformationen der unterschiedlichen Versuchspflanzen wurden Orthologe zu den aus *Arabidopsis thaliana* bekannten Komponenten des schnellen ABA-Signalwegs identifiziert. Die Gene wurden anschließend aus cDNA der Pflanzen kloniert oder an Hand der bekannten und verifizierten Sequenzen synthetisiert.

So konnten insgesamt elf verschiedene putative SLAC1-Kanäle, 13 putative OST1-Proteinkinasen und drei putative ABI1-Phosphatasen kloniert werden und ihre Sequenz wurde mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert. In den Tabellen (Tabelle 3-1 bis 3) sind die klonierten Proteine aufgelistet, die im Folgenden charakterisiert wurden.

Die Sequenzen der verschiedenen SLAC-Kanalproteine stammen aus unterschiedlichen veröffentlichten und unveröffentlichten Genomprojekten und wurden an Hand ihrer Homologie zum S-Typ-Anionenkanal *AtSLAC1* aus *Arabidopsis* ausgesucht. Sie unterscheiden sich in ihrer Sequenz und ihrer Gesamtlänge (389As-722As). Während die Kanäle aus *Klebsormidium*, *Marchantia* und *Selaginella* zwischen 100 und 150 As kürzer als *AtSLAC1* sind, haben die Kanäle aus *Physcomitrella* und *Ceratopteris* ca. 100 bis 170 As mehr als der Kanal aus *Arabidopsis*. Den größten Anteil an der unterschiedlichen Länge der Proteine haben dabei der N- und der C-Terminus (NT und CT), die auch die am wenigsten konservierten Bereiche der Kanäle sind. Die Länge des NT variiert dabei zwischen 50 bp in *KnSLAC1* und 333 bp in *CrSLAC1a* und die Länge des CT zwischen 19 bp ebenfalls in *KnSLAC1* und 103 bp in *PpSLAC2*.

Die Homologie der klonierten SLAC-Kanalproteine zu *AtSLAC1* liegt bei Betrachtung der identischen Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz zwischen 31,6 und 59,3%. Betrachtet man in dem Vergleich der Kanäle zusätzlich auch die Übereinstimmung ähnlicher Aminosäuren, zeigt sich sogar eine Homologie von 66,4 bis 82,6%. Dabei zeigen *KnSLAC1*

und *Mp*SLAC1 aus der Alge und dem Lebermoos die geringste Homologie zu *At*SLAC1 mit nur 32 bis 38% Identität in der Aminosäuresequenz. Die SLAC-Kanäle aus *Physcomitrella*, *Selaginella* und *Ceratopteris* zeigen eine etwas höhere Ähnlichkeit zu *At*SLAC1 mit 49 bis 59% identischer Aminosäuren.

Tabelle 3-1: Auflistung der klonierten und untersuchten SLAC1-Orthologen.

Trivialname	Genbank-Nummer	Länge des Proteins	Homologie zu <i>At</i> SLAC1
<i>Kn</i> SLAC1	LN794222	389 As	38,3 - 70,8%
<i>Mp</i> SLAC1	LN794219	475 As	31,6 - 66,4%
<i>Pp</i> SLAC1	XM_001757599	659 As	54,2 - 75,8%
<i>Pp</i> SLAC2	XM_001756335	627 As	54,5 - 81,4%
<i>Sm</i> SLAC1	XM_002978628	594 As	59,3 - 81,7%
<i>Sm</i> SLAC2	XM_002989218	450 As	56,6 - 82,6%
<i>Sm</i> SLAC3	XM_002986966	399 As	53,8 - 81,0%
<i>Sm</i> SLAC4	XM_002976542	459 As	48,9 - 77,3%
<i>Cr</i> SLAC1a	(Atallah and Banks, 2016)	722 As	56,3 - 81,7%
<i>Cr</i> SLAC1b	(Atallah and Banks, 2016)	712 As	56,0 - 82,6%
<i>At</i> SLAC1	NM_101120	556 As	-

Die Tabelle zeigt die elf unterschiedlichen SLAC-Kanäle mit ihren Trivialnamen aus den sechs untersuchten Versuchspflanzen *Klebsormidium nitens* (*Kn*-), *Marchantia polymorpha* (*Mp*-), *Physcomitrella patens* (*Pp*-), *Selaginella moellendorffii* (*Sm*-), *Ceratopteris richardii* (*Cr*-) und *Arabidopsis thaliana* (*At*-). Zusätzlich zur Aminosäuresequenzlänge wird außerdem die Homologie der Kanäle zu *At*SLAC1 auf DNA-Ebene und Proteinebene dargestellt (identische Aminosäuren (As) - ähnliche Aminosäuren).

Wie schon die verschiedenen SLAC1-Kanäle wurde in den Genomsequenzen der fünf Versuchspflanzen auch nach putativen OST1-Kinasen auf Grund ihrer Homologie zu *At*OST1 gesucht. Ein Wichtiges Erkennungsmerkmal dabei war die ABA-Box in der Domäne 2 des CT der Kinasen (Yoshida et al., 2006). Diese Domäne ist verantwortlich für die Interaktion der Kinasen mit den PP2C-Phosphatasen des ABA-Signalwegs. Durch diesen letzten Teil des CT der SnRK2-Kinasen lassen sich in *Arabidopsis* die ABA-abhängigen und die ABA-unabhängigen Kinasen der Familie unterscheiden.

Die zwölf gefundenen OST-Kinasen unterscheiden sich im Gegensatz zu den SLAC Kanälen nur wenig in der Gesamtlänge der Proteine (331As-365As). Die Kinasen aus *Klebsormidium*, *Marchantia*, *Physcomitrella* und *Selaginella* sind dabei alle ca. 20-30 Aminosäuren kürzer als *At*OST1 (abgesehen von *Sm*OST1.3). Die Kinasen zeigen auf Aminosäure-Ebene eine sehr hohe Homologie zu *At*OST1 mit 71 bis 81% identischer Übereinstimmungen. Wenn man

zusätzlich auch ähnliche Aminosäuren beim Vergleich mit in Betracht zieht, zeigt sich sogar eine Homologie von 87 bis 91%. Betrachtet man alle OST1-Kinasen von den Algen bis hin zu den Samenpflanzen zeigt sich also eine deutlich stärkere Konservierung der Proteinsequenz der Kinasen verglichen mit der Sequenzkonservierung der SLAC-Kanäle.

Trivialname	Genbank-Nummer	Länge des Proteins	Homologie zu AtOST1
<i>Kn</i> OST1	LN794223	342 As	75,9 - 89,9%
<i>Mp</i> OST1.1	LN794220	349 As	78,8 - 91,2%
<i>Mp</i> OST1.2	LN794221	347 As	75,1 - 90,3%
<i>Pp</i> OST1.1	XM_001777226	349 As	80,5 - 90,9%
<i>Pp</i> OST1.2	XM_001778449	348 As	80,5 - 91,2%
<i>Pp</i> OST1.3	XM_001769272	340 As	80,6 - 90,7%
<i>Pp</i> OST1.4	XM_001769527	348 As	78,5 - 90,7%
<i>Sm</i> OST1.1	XM_002987780	334 As	75,3 - 88,7%
<i>Sm</i> OST1.2	XM_002992234	331 As	74,4 - 89,1%
<i>Sm</i> OST1.3	XM_002969797	360 As	73,5 - 88,9%
<i>Cr</i> OST1a	(Atallah and Banks, 2016)	361 As	75,0 - 90,1%
<i>Cr</i> OST1b	(Atallah and Banks, 2016)	365 As	71,1 - 86,5%
<i>At</i> OST1	NM_119556	362 As	-

Tabelle 3-2: Auflistung der klonierten und untersuchten OST1-Orthologen.

Die Tabelle zeigt die elf unterschiedlichen OST1-Kinasen mit ihren Trivialnamen aus den sechs untersuchten Versuchspflanzen *Klebsormidium nitens* (*Kn*-), *Marchantia polymorpha* (*Mp*-), *Physcomitrella patens* (*Pp*-), *Selaginella moellendorffii* (*Sm*-), *Ceratopteris richardii* (*Cr*-) und *Arabidopsis thaliana* (*At*-). Zusätzlich zur Aminosäuresequenzlänge wird außerdem die Homologie der Kinasen zu *At*OST1 auf Proteinebene dargestellt (identische Aminosäuren - ähnliche Aminosäuren).

Zusätzlich zu den SLAC-Kanälen und OST1-Kinasen wurden in den Genomen von *Marchantia* und *Physcomitrella* Homologe der Phosphatase *At*ABI1 aus *Arabidopsis* gesucht. Dabei konnten drei putative Phosphatasen kloniert werden, die sich schon durch eine ca. 130-150As längere Proteinsequenz von der Phosphatase aus *Arabidopsis* unterscheiden. Die *Mp*- und *Pp*ABIs besitzen auf Aminosäure-Ebene eine Sequenzhomologie identischer Aminosäuren zwischen 47,3% und 50,2% zu *At*ABI1. Nimmt man zusätzlich auch ähnliche Aminosäuren in den Vergleich mit auf, zeigt sich sogar eine Homologie von 70,0% bis 71,0%.

Trivialname	Genbank-Nummer	Länge des Proteins	Homologie zu <i>AtABI1</i>
<i>MpABI1</i>	GQ504039	568 As	47,3 - 70,4%
<i>PpABI1a</i>	AB369256	595 As	49,0 - 71,0%
<i>PpABI1b</i>	AB369255	587 As	50,2 - 70,0%
<i>AtABI1</i>	AY142623	434 As	-

Tabelle 3-3: Auflistung der klonierten und untersuchten ABI1-Orthologen.

Die Tabelle zeigt die elf unterschiedlichen ABI1-Phosphatasen mit ihren Trivialnamen aus vier der sechs untersuchten Versuchspflanzen *Marchantia polymorpha* (*Mp*), *Physcomitrella patens* (*Pp*-) und *Arabidopsis thaliana* (*At*-). Zusätzlich zur Aminosäuresequenzlänge wird die Homologie der Kanäle zu *AtABI1* auf DNA-Ebene und Proteinebene dargestellt (identische Aminosäuren - ähnliche Aminosäuren).

3.3 Phylogenetische Einordnung

Die orthologen SLAC-Kanäle, OST1-Kinasen und ABI1-Phosphatasen zeigen, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, Unterschiede in ihrer Sequenz und ihrer Gesamtlänge. Durch phylogenetische Vergleiche der Aminosäure-Sequenzen konnten aus diesen Unterschieden Rückschlüsse auf die Ähnlichkeit und damit den Verwandtschaftsgrad der Proteine zu einander angestellt werden. Außerdem wurden noch bekannte Homologe und ähnliche Kanäle, Kinasen und Phosphatasen aus *Arabidopsis* in die Vergleiche mit aufgenommen (SLAHs, SnRKs, ABI2/HABs)

3.3.1 Phylogenetischer Vergleich der SLAC-Kanäle

Die klonierten und untersuchten SLAC-Kanäle wurden auf Grund ihrer Homologie zu AtSLAC1 ausgewählt und gehören zu den S-Typ Anionenkanälen. Innerhalb der S-Typ Anionenkanäle gibt es jedoch nicht nur die SLAC-Kanäle, sondern auch homologe Kanäle, die SLAH-Kanäle, mit teilweise abweichenden Eigenschaften und Aufgaben. Dabei unterscheidet man in *Arabidopsis* die Gruppe der SLAH2/3-Kanäle mit einer Nitrat-abhängigen Aktivierung und im Fall von SLAH2 einer strikten Selektivität für Nitrat und der Gruppe der SLAH1/4-Kanäle die wahrscheinlich eine modifizierende Wirkung auf die anderen S-Typ-Anionenkanäle besitzen. Die SLAC1-Kanäle lassen sich jedoch wie von Dreyer et al. (Dreyer et al., 2012) beschrieben an Hand einer SLAC1-spezifischen Erkennungssequenz von den beiden SLAH-Familien unterscheiden. Um die Position und den Verwandtschaftsgrad der S-Typ Anionenkanäle aus *Klebsormidium*, *Marchantia*, *Physcomitrella*, *Selaginella* und *Ceratopteris* innerhalb einiger bekannter SLAC-Kanäle einordnen zu können, wurde eine phylogenetische Analyse mit AtSAC1 und weiteren SLAC-Proteinen aus Samenpflanzen unternommen.

Der Phylogenetische Baum in Abbildung 3-1 zeigt die Verwandtschaft der untersuchten SLAC-Kanäle und ihre Einordnung im Vergleich zu einer Vielzahl von bekannten SLAC-Sequenzen aus Samenpflanzen. Gleich zu Beginn des phylogenetischen Baumes spaltet sich der SLAC-Kanal der einzelligen Grünalge *Chlorella variabilis* von der Entwicklung aller weiteren SLAC-Kanäle ab und bildet einen deutlich abgegrenzten eigenen Ast. Die Kanäle aus *Klebsormidium* und *Marchantia* grenzen sich am Fuß des Baumes der restlichen SLAC-Kanäle ab und bilden ebenfalls einen eigenen Ast. Die Kanäle aus *Physcomitrella*, *Selaginella* und *Ceratopteris* zeigen eine deutlich größere verwandtschaftliche Nähe zu den Kanälen der Samenpflanzen mit AtSLAC1. Die SLAC-Kanäle des Farns *Ceratopteris* zeigen dabei den größten Verwandtschaftsgrad den SLAC-Kanälen aus Samenpflanzen.

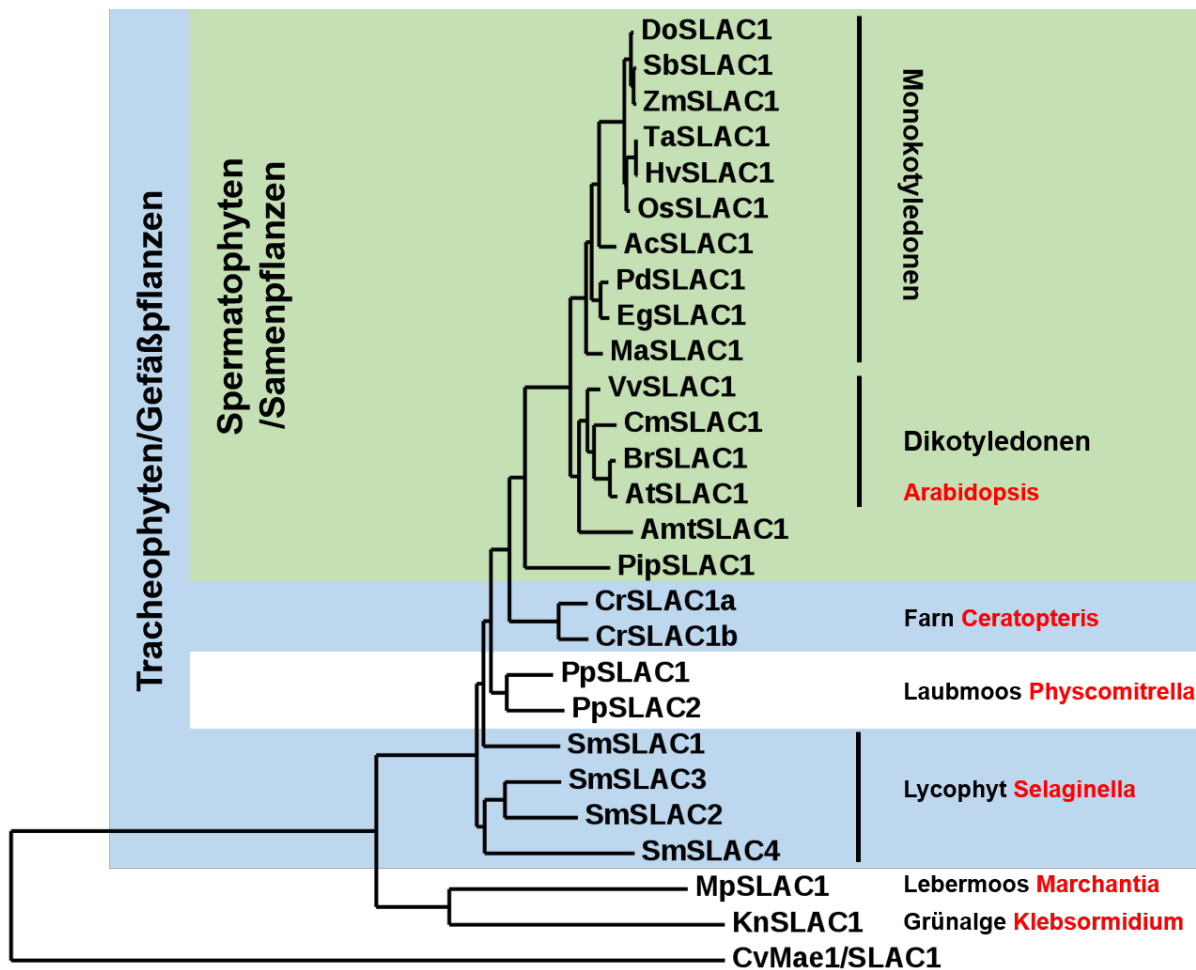


Abbildung 3-1: Phylogenetische Einordnung der untersuchten SLAC1-Kanäle

Die Aminosäuresequenzen der SLAC-Kanäle aus den untersuchten Versuchspflanzen *Klebsormidium nitens* (*Kn*-), *Marchantia polymorpha* (*Mp*-), *Physcomitrella patens* (*Pp*-), *Selaginella moellendorffii* (*Sm*-) und *Ceratopteris richardii* (*Cr*-) wurden in einer phylogenetischen Analyse neben *Arabidopsis thaliana* (*At*-) auch mit weiteren Vertretern der Samenpflanzen und der Grünalge *Chlorella variabilis* (*Cv*-) verglichen. Die weiteren Samenpflanzen waren *Dichanthelium oligosanthes* (*Do*-), *Sorghum bicolor* (*Sb*-), *Zea mays* (*Zm*-), *Triticum aestivum* (*Ta*-), *Hordeum vulgare* (*Hv*-), *Oryza sativa* (*Os*-), *Ananas comosus* (*Ac*-), *Phoenix dactylifera* (*Pd*-), *Elaeis guineensis* (*Eg*-), *Musa acuminata* (*Ma*-), *Vitis vinifera* (*Vv*-), *Cucumis melo* (*Cm*-), *Brassica rapa* (*Br*-), *Amborella trichopoda* (*Amt*-) und *Pinus parviflora* (*Pip*-). Die in dieser Arbeit untersuchten SLAC-Kanäle aus der Alge, den beiden Moosen, dem Lycophyten und dem Farn siedeln sich dabei eher in der anfänglichen Entwicklung der SLAC-Kanäle an noch vor der Entstehung der Samenpflanzen. (Die Länge der Äste ist proportional zur Anzahl der Substitutionen. Verglichen wurden die Aminosäuresequenzen der SLAC1-Kanalproteine)

Erstaunlicher Weise gruppieren sich die beiden Kanäle des Laubmooses *PpSLAC1/2* noch über den Kanälen des Lycophyten *Selaginella moellendorffii* in dem phylogenetischen Baum ein und damit näher an den Kanälen der Spermatophyten. Bei den SLACs aus *Selaginella* zeigt sich außerdem eine größere Varianz zwischen den einzelnen Kanälen des Moosfarns. Die Kanäle *SmSLAC2-4* bilden einen extra Ast wobei *SmSLAC4* die größte Distanz in der Verwandtschaft zu den Kanälen der höher entwickelten Pflanzen zu zeigen scheint. *SmSLAC1* dagegen gruppiert sich in den Ast zu den SLAC-Kanälen der höheren Pflanzen und den *PpSLAC*-Kanälen.

Unter den Samenpflanzen lässt sich eine deutliche Trennung zwischen den SLAC-Kanälen der Monokotyledonen und der Dikotyledonen (inkl. *Arabidopsis thaliana*) erkennen. An der Basis der Samenpflanzen spalten sich jedoch zuerst der Kanal aus der Kiefer *Pinus parviflora* und der Kanal aus dem jüngsten gemeinsamen Vorfahren aller Samenpflanzen *Amborella trichopoda* (Amborella Genome, 2013) von den restlichen Spermatophyten ab. Die SLAC-Kanäle der einzelnen untersuchten Versuchspflanzen zeigten jeweils jedoch meistens die höchste Verwandtschaft zu den Kanälen der eigenen Art und bildeten abgesehen von den Kanälen aus *Selaginella* je einen eigenen Ast des phylogenetischen Baumes. Die Kanäle des Moosfarns verteilen sich auf mehrere Äste, wobei *SmSLAC1* ein wenig von den anderen drei *SmSLACs* abgrenzt.

3.3.2 Phylogenetischer Vergleich der OST1-Kinasen

Die zu *AtOST1* homologen Kinasen aus *Klebsormidium*, *Marchantia*, *Physcomitrella*, *Selaginella* und *Ceratopteris* zeigen wie in Tabelle 3-2 zu erkennen ist eine sehr starke Ähnlichkeit zu *AtOST1*. Da *AtOST1* zur Familie der SnRK2-Kinasen gehört, wurden noch vier weitere bekannte SnRK-Kinasen aus *Arabidopsis* in den phylogenetischen Vergleich mit den unterschiedlichen OST1-Kinasen aus den untersuchten Modellpflanzen einbezogen. Bei den Kinasen *AtSnRK2.2* und *AtSnRK2.3* handelt es sich um ABA-abhängige Kinasen während die Kinasen *AtSnRK2.7* und *AtSnRK2.8* als ABA-unabhängige Kinasen charakterisiert wurden.

In Abbildung 3-2 sieht man die phylogenetischen Verhältnisse der zwölf OST1-Kinasen aus den untersuchten Versuchspflanzen zusammen mit den fünf SnRK2-Kinasen aus *Arabidopsis*. Der Baum teilt sich in drei Hauptäste auf. Im untersten Ast befinden sich die beiden ABA unabhängigen SnRK2-Kinasen *AtSnRK2.7+8* aus *Arabidopsis* zusammen mit den OST1-Kinasen *KnOST1* und *SmOST1.1+2*. Die beiden *AtSnRKs* und die *SmOSTs* bilden dabei eigene Gruppen, während *KnOST1* isoliert zwischen diesen beiden Gruppen lokalisiert ist. Der obere Ast des phylogenetischen Baumes besteht aus den ABA-abhängigen *AtSnRKs* *AtSnRK2.2+3*, *AtOST1* und den OST1 Kinasen aus *Physcomitrella* (*PpOST1.1-4*) und *MpOST1.1*. Diese Kinasen zeigen die größte Homologie zu *AtOST1*. Die ABA abhängigen *AtSnRKs* zusammen mit *AtOST1* bilden dabei einen gemeinsamen Zweig und die OST1 Kinasen aus *Physcomitrella* zeigen einen hohen Verwandtschaftsgrad zu einander. *MpOST1.1* liegt zwischen diesen beiden Gruppen. In der Mitte zwischen den beiden äußeren Ästen befindet sich noch ein weiterer Ast der zwischen den ABA-abhängigen und den ABA unabhängigen Kinasen zu liegen scheint. Er umfasst die OST1-Kinasen von *Ceratopteris* (*CrOST1a+b*), die einen gemeinsamen Zweig bilden und den beiden einzelstehenden

Kinasen *Mp*OST1.2 und *Sm*OST1.3 etwas abseits von den restlichen Kinasen aus *Marchantia* und *Selaginella*.

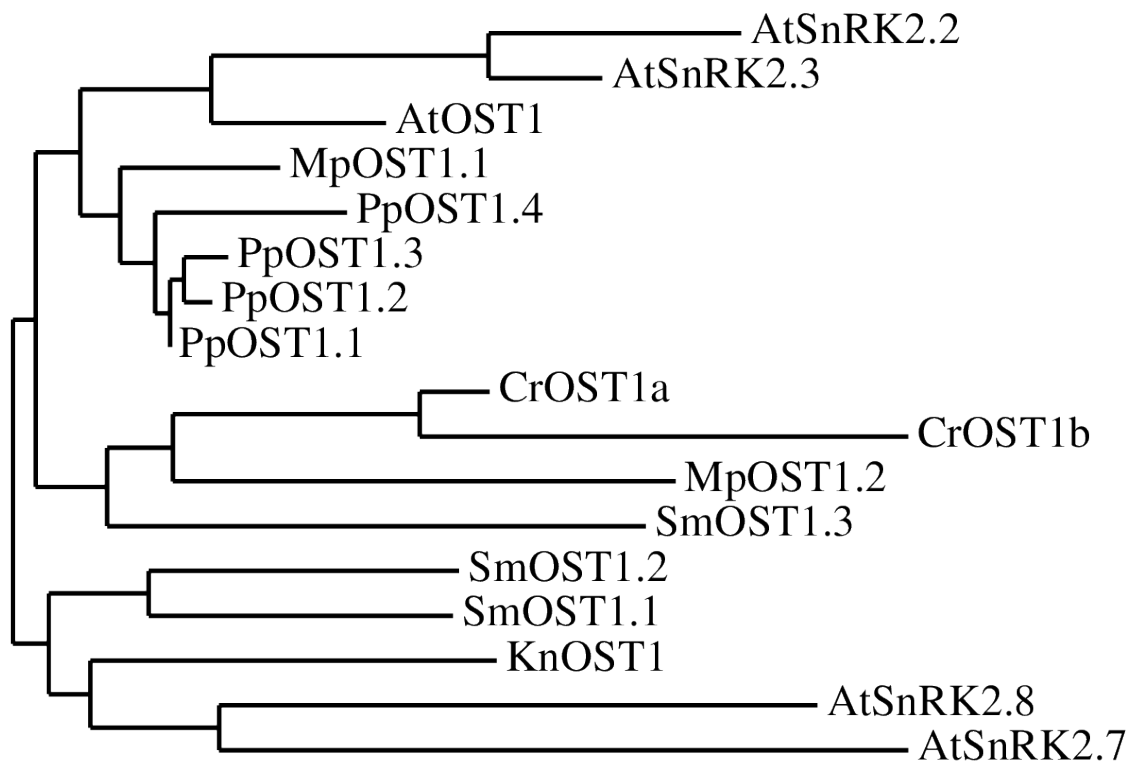


Abbildung 3-2: Phylogenetische Einordnung der untersuchten OST1-Kinasen

Die Aminosäuresequenz der OST1-Kinasen aus *Klebsormidium nitens* (*Kn*-), *Marchantia polymorpha* (*Mp*-), *Physcomitrella patens* (*Pp*-), *Selaginella moellendorffii* (*Sm*-) und *Ceratopteris richardii* (*Cr*-) wurden in einer phylogenetischen Analyse zusammen mit den *At*OST1 und vier weiteren *At*SnRKs aus *Arabidopsis thaliana* (*At*-) verglichen. Die Länge der Äste ist proportional zur Anzahl der Substitutionen.

3.4 Elektrophysiologische Charakterisierung

Die Charakterisierung von S-Typ-Anionenkanälen geht auf Patch-Clamp-Messungen an Schließzellprotoplasten in den 1990er Jahren zurück, als der S-Typ-Kanal aus *Vicia faba* entdeckt und beschrieben wurde (Hedrich et al., 1990; Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992). Als fast 20 Jahre später *AtSLAC1* als das erste Gen eines S-Typ-Kanals in *Arabidopsis thaliana* entdeckt wurde, standen die Wissenschaftler vor dem Problem, dass der Kanal alleine in heterologen Expressionssystemen nicht aktiviert werden konnte (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Schon zuvor konnte allerdings gezeigt werden, dass die S-Typ-Anionenströme in Schließzellen durch Kinasen mittels Phosphorylierung und Dephosphorylierung auf einem Ca^{2+} -abhängigen und einem Ca^{2+} -unabhängigen Weg reguliert werden (Schroeder and Hagiwara, 1989; Schmidt et al., 1995; Li and Assmann, 1996; Levchenko et al., 2005; Mori et al., 2006). Durch die Koexpression von *AtSLAC1* mit der Proteinkinase *AtOST1* konnte der Kanal als funktioneller S-Typ-Anionen schließlich in *Xenopus laevis* Oozyten beschrieben und charakterisiert werden (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009). Neben diesem Ca^{2+} -unabhängigen Weg konnte auch die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von *AtSLAC1* durch die Kinasen *AtCPK21* und *AtCPK23* und die negative Regulation dieser beiden Aktivierungswege durch die Phosphatase *AtABI1* gezeigt werden (Geiger et al., 2010; Brandt et al., 2012; Scherzer et al., 2012). Es hat sich gezeigt, dass *SLAC1* und die ihn kontrollierenden Komponenten eine wichtige Rolle bei der Regulation der Schließzellbewegung in *Arabidopsis* spielen.

Um die putativen *SLAC1* Kanäle, *OST1*-Kinasen und *ABI1*-Phosphatasen der hier verwendeten Versuchspflanzen zu untersuchen und zu charakterisieren, wurden die Komponenten einzeln und in Kombination in *Xenopus laevis* Oozyten (ko-)exprimiert. Die in den injizierten Oozyten exprimierten Proteine konnten anschließend mittels DEVC-Technik vermessen werden. Als Referenz für die Untersuchung der potentiellen Kanäle, Kinasen und Phosphatasen wurden die oben beschriebenen Komponenten des schnellen ABA-Signalweg aus *Arabidopsis* verwendet, deren Sequenzen schon als Vorlage für die Suche nach den orthologen Proteinen aus *Klebsormidium*, *Marchantia*, *Physcomitrella*, *Selaginella* und *Ceratopteris* verwendet wurden (*AtSLAC1*, *AtOST1* und *AtABI1*).

3.4.1 Die Komponenten des ABA-Signalweg in Algen und Moosen

Die Rolle der unterschiedlichen Komponenten des schnellen ABA-Signalweges in Schließzellen sind in Samenpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* schon genau untersucht und

charakterisiert worden (Vahisalu et al., 2008; Geiger et al., 2009; Geiger et al., 2010). Neben *AtSLAC1* konnten bereits die Gene von anderen SLAC-Kanälen in vielen verschiedenen Pflanzen identifiziert werden. Dreyer et al. suchten zum Beispiel in den Genomen von 29 verschiedenen Pflanzenarten nach S-Typ- und R-Typ-Anionenkanälen der SLAC- und QUAC-Familien und konnten dabei 135 verschiedene, vollständige Gene von SLAC-Kanälen identifizieren (Dreyer et al., 2012). Abgesehen von zwei Ausnahmen stammten jedoch alle von Dreyer et al. verglichenen Kanalproteine aus Samenpflanzen. Dementsprechend wurde dort hauptsächlich die Entwicklung der beiden Kanalfamilien in den Samenpflanzen beleuchtet, also nur die Evolution der letzten ca. 140 Mio. J. Im Laufe der Forschungen für diese Arbeit wurden die Komponenten des schnellen ABA-Signalweg zusätzlicher Versuchspflanzen aus dem Reich der Grünalgen und Moose und im späteren Verlauf auch der Lycophyten und Farne betrachtet. Durch die elektrophysiologische Charakterisierung der untersuchten SLAC-Kanäle und ihrer regulatorischen Proteine konnte so das Bild der Evolution dieser Proteinfamilien über die Betrachtung der Samenpflanzen hinaus erweitert werden.

3.4.1.1 Die SLAC1 – OST1 Beziehung in Algen und Moosen

Zu Beginn der Untersuchungen zur Evolution des schnellen ABA-Signalweges in Landpflanzen wurden zunächst die orthologen Kanäle und Kinasen aus *Klebsormidium nitens*, *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* kloniert. Die identifizierten Proteine dieser drei Versuchspflanzen aus dem Reich der Algen und Moose wurden mittels DEVC-Technik in Oozyten untersucht. Wie schon in Kapitel 3.3 aufgeführt, konnten aus der Grünalge *Klebsormidium nitens* ein SLAC1-Kanal (*KnSLAC1*) und eine OST1-Kinase (*KnOST1*) kloniert werden. In den Genomen der beiden Moose *Marchantia polymorpha* (Lebermoos) und *Physcomitrella patens* (Laubmoos) fanden sich drei SLAC1-Kanäle (*MpSLAC1* und *PpSLAC1/2*) und sechs OST1 Kinasen (*MpOST1.1/2* und *PpOST1.1-4*).

Aus der Untersuchung von *AtSLAC1* ist bekannt, dass bei einer heterologen Expression des Kanals in Oozyten nur durch die Koexpression einer aktivierenden Proteinkinase wie zum Beispiel *AtOST1* makroskopische Ströme messbar sind (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009). Zur Charakterisierung der Beziehungen und Funktionalität der Kanäle und Kinasen in der Alge und den beiden Moosen, wurden die Kanal-Kinase-Pärchen in dem heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften hin untersucht. Dafür wurden Split-YFP-(BIFC)-Konstrukte der Kanäle und Kinasen verwendet (Ghosh et al., 2000; Horstman et al., 2014). Zu diesem Zweck wurden die SLAC1-Kanäle C-terminal mit der N-Terminalen Hälfte eines YFP

fusioniert. Die OST1-Kinasen wurden ebenfalls C-terminal mit der C-terminalen Hälfte eines YFP verknüpft.



Abbildung 3-3: Split-YFP (BIFC) Analyse der SLAC-Kanäle mit AtOST1

Koexpression von *AtSLAC1*, *PpSLAC1/2*, *MpSLAC1* und *KnSLAC1* aus *Arabidopsis* und den untersuchten Algen und Moosen zusammen mit der Kinase *AtOST1* aus *Arabidopsis*. Für die Analyse der Interaktion zwischen Kanal und Kinase wurden BIFC Konstrukte verwendet, die nur bei einer Interaktion der beiden Komponenten zu einer Komplementierung der YFP-Fluoreszenz führen. Die Fluoreszenz in allen Kombinationen lässt auf eine physikalische Interaktion aller Kanäle mit *AtOST1* vermuten.

Durch die Verwendung der BIFC-Konstrukte konnte die Interaktion zwischen Kinase und Kanal an Hand der Fluoreszenz-Komplementation untersucht werden. Zudem zeigte die Fluoreszenz die Expression beider Proteine an. Dafür wurde *AtOST1* zusammen mit den unterschiedlichen SLAC-Kanälen aus Algen und Moosen in den Froscheiern koexprimiert. Die Interaktion zwischen *AtSLAC1* und *AtOST1* konnte schon mehrfach in BIFC-Experimenten so wie auch in Phosphokinaseassays gezeigt werden und diente als Positivkontrolle für die Fluoreszenzmessungen (Geiger et al., 2009). Die Analyse der Fluoreszenz zeigte ein deutliches Fluoreszenzsignal bei allen fünf SLAC1 Kanälen bei einer Koexpression mit *AtOST1* (Abbildung 3-3). Die Fluoreszenz-Komplementation mit den Kanälen aus *Physcomitrella*, *Marchantia* und *Klebsormidium* zeigte dabei die selbe, starke Interaktion von Kanal und Kinase wie zwischen *AtSLAC1* und *AtOST1*.

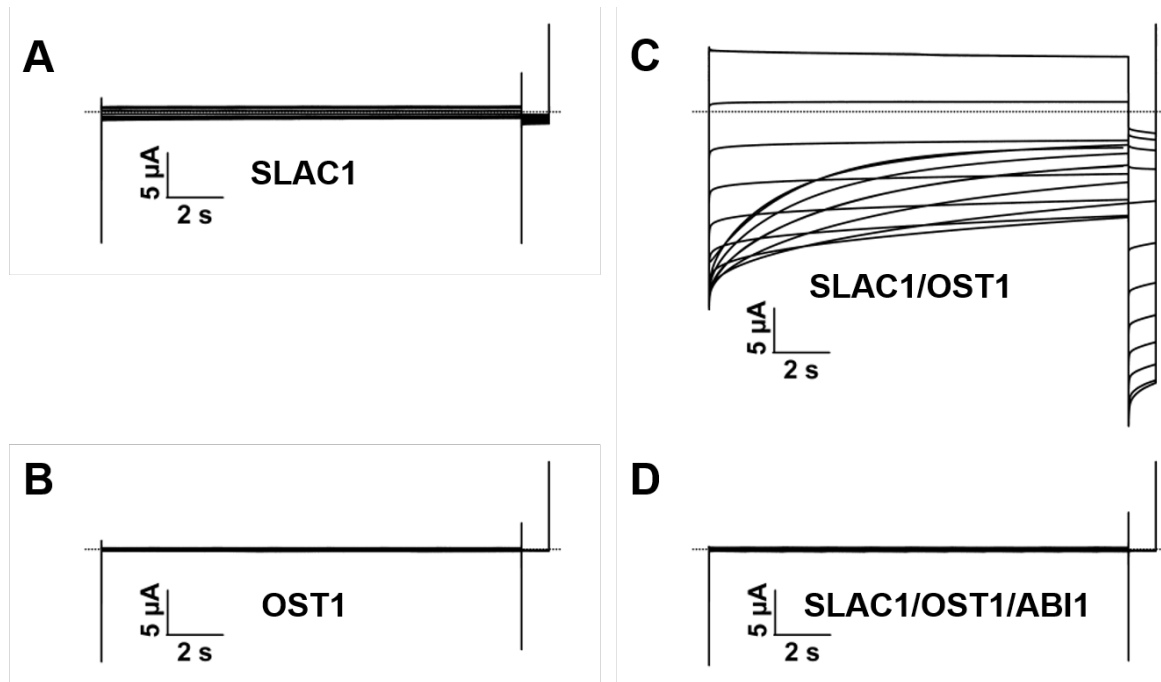


Abbildung 3-4: Elektrophysiologische Charakterisierung von *AtSLAC1*

Die Charakterisierung des S-Typ-Anionenkanals *AtSLAC1* aus *Arabidopsis* in *Xenopus* Oozyten durch Geiger et al. zeigt, dass der Kanal eine aktivierende Kinase benötigt um Anionenströme zu vermitteln. **A)** Oozyten die den Kanal alleine exprimierten zeigten keine makroskopischen Anionenströme. **B)** Auch die Kinase OST1 alleine erzeugt keine messbaren Ströme in Oozyten. **C)** Die Koexpression von *AtSLAC1* zusammen mit *AtOST1* führt zu einer deutlichen Aktivierung des Kanals und es lassen sich charakteristische S-Typ-Anionenströme messen. **D)** Durch die zusätzliche Expression der PP2C-Phosphatase *AtABI1* wird die Aktivierung des Kanals durch OST1 inhibiert und der Kanal wird inaktiviert. (beispielhafte Einzelzellen (Geiger et al., 2009))

Geiger et al. und Lee et al. konnten in *Xenopus* Oozyten bereits zeigen, dass sich bei der Koexpression von *AtSLAC1* und *AtOST1* charakteristische S-Typ-Anionenströme messen lassen (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009). Während der Kanal alleine keine messbaren Ströme in Oozyten zeigt, bewirkt die Kinase eine Aktivierung des Kanals und es lassen sich Anionenströme über die Plasmamembran der Eizellen messen (Abbildung 3-4). Die Aktivierung des Kanals wird durch die zusätzliche Expression einer PP2C-Phosphatase des ABA-Signalwegs inhibiert. Durch die Expression von *AtABI1* zusammen mit *AtOST1* und *AtSLAC1* kommt es zu einer starken Reduzierung der durch OST1-aktivierten Anionenströme (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009).

Da alle fünf SLAC Kanäle aus den unterschiedlichen Modellpflanzen in den BIFC-Versuchen eine Interaktion mit *AtOST1* zeigten, stellte sich die Frage, ob diese Interaktion auch zu funktionell aktiven Kanal/Kinase-Paaren führt. Dazu wurden die *At-/Pp-/Mp-/KnSLAC*-exprimierenden Oozyten elektrophysiologisch vermessen. Zusätzlich zu *AtOST1* aus *Arabidopsis*, wurden auch die sieben OST1-Kinasen aus *Physcomitrella*, *Marchantia* und *Klebsormidium* auf ihre Funktionalität mit *AtSLAC1* und den SLAC1 Anionenkanälen aus der Alge und den Moosen in allen möglichen Kombinationen getestet.

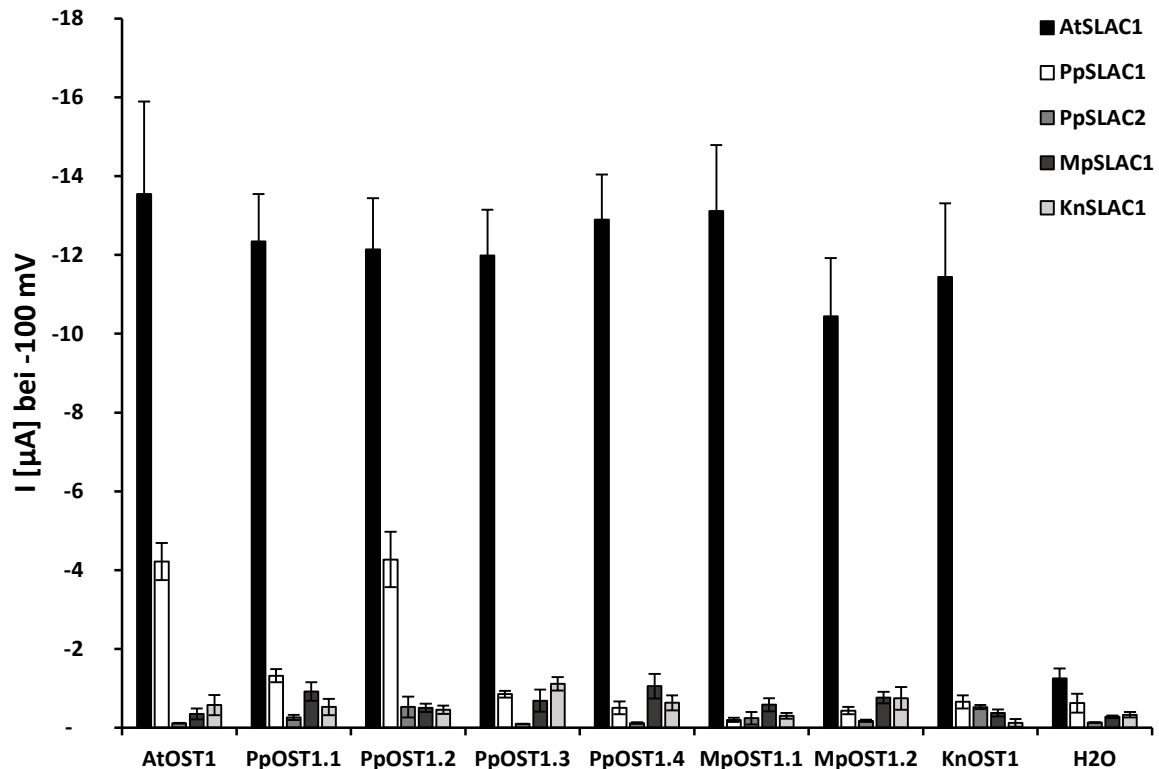


Abbildung 3-5: Koexpression der SLAC1 und OST1 Kinasen aus Algen und Moosen in Oozyten
Ganzzell-Stromableitungen der instantanen Ströme von den unterschiedlichen Kanal-Kinase Kombinationen aus *Arabidopsis* (*At*-), *Physcomitrella* (*Pp*-), *Marchantia* (*Mp*-) und *Klebsormidium* (*Kn*-) bei -100mV in einer 100mM NaCl Badlösung. Als Negativkontrolle wurden alle Kanäle mit H₂O an Stelle der Kinasen injiziert und vermessen (rechts). (\pm SE; $n \geq 5$)

Wie in Abbildung 3-5 zu sehen ist, ließen sich in Abwesenheit der OST1-Kinasen (H₂O rechts) für keinen der vermessenen Kanäle signifikante Ströme messen. Oozyten die *At*SLAC1 und *At*OST1 koexprimierten dagegen zeigten sehr deutliche Cl⁻-Auswärtsströme. Abgesehen von dieser bekannten Positivkontrolle lassen sich allerdings auch bei einer Koexpression von *At*SLAC1 mit den übrigen OST1-Kinasen aus *Physcomitrella*, *Marchantia* und *Klebsormidium* starke S-Typ-Anionenströmen beobachten. Die Ströme zeigten dabei eine mit der Positivkontrolle *At*SLAC1 + *At*OST1 vergleichbare Amplitude zwischen -10,5µA und -13,5µA. Die SLAC1-Kanäle aus den beiden Moosen und der Grünalge zeigten abgesehen von einer Ausnahme keine Reaktion auf die Koexpression zusammen mit den unterschiedlichen OST1-Kinasen. Dabei bestand kein Unterschied ob es sich um die OST1 Kinasen aus der eigenen Art oder einer der anderen Spezies handelte. Die einzige Ausnahme stellte der Kanal *Pp*SLAC1 aus *Physcomitrella* dar. Neben den Strömen von *At*SLAC1 ließen sich nur bei dem Kanal *Pp*SLAC1 signifikante Anionenströme messen. Dabei führte nur die Koexpression von *Pp*SLAC1 zusammen mit *At*OST1 oder *Pp*OST1.2 aus dem Laubmoos zu einer Aktivierung des Kanals. Die messbaren Anionenströmen von *Pp*SLAC1 erreichten mit -4,2µA jedoch nur ca. 35% der Stromamplitude von *At*SLAC1, unabhängig davon ob der Kanal mit *At*OST1 oder

PpOST1.2 koexprimiert wurde. Die restlichen OST1-Kinasen waren nicht dazu in der Lage den Kanal zu aktivieren und es zeigten sich keine messbaren Anionenströme.

Als einziger, aktivierbarer Kanal neben *AtSLAC1* wurde *PpSLAC1* für weitere Untersuchungen herangezogen und genauer charakterisiert. Dabei wurden die Eigenschaften des Kanals, wie seine Aktivierung, sein Spannungsabhängigkeit oder seine Selektivität für Anionen genauer beleuchtet. Auch in erneuten Messungen konnte gezeigt werden, dass der Kanal tatsächlich nur durch die beiden Phosphatasen *AtOST1* und *PpOST1.2* aktiviert werden kann (Abbildung 3-6). In Abwesenheit einer aktivierenden Kinase zeigten sich keinerlei S-Typ-Anionenströme. Die Stromantwort der Kanäle auf längere Spannungspulse zeigte die für S-Typ-Anionenkanäle typische Kinetik mit einer langsamen Deaktivierungskinetik über mehrere Sekunden bei hyperpolarisierenden Spannungen.

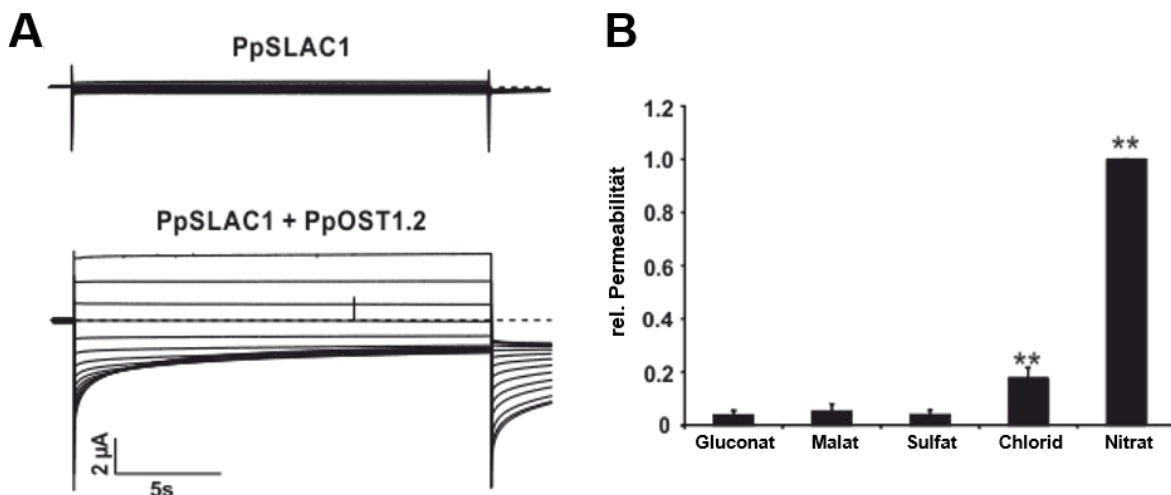


Abbildung 3-6: Charakterisierung des SLAC1-Kanals *PpSLAC1* aus *Physcomitrella patens*

A) Messungen mit einem langen Spannungspulsprotokoll zeigen, dass *PpSLAC1* nur in Gegenwart von *AtOST1* (nicht gezeigt) und *PpOST1.2* makroskopische Ströme generiert. Diese Ströme zeigen die für S-Typ-Anionenkanäle charakteristische langsame Deaktivierungskinetik (beispielhafte Zellen in 50mM NaCl Lösung). **B)** Im Modus der Stromklemme wurde die relative Permeabilität des Kanals für unterschiedliche physiologische Ionen bestimmt. *PpSLAC1* zeigt eine signifikante Permeabilität für Nitrat und Chlorid. (Anionenkonzentration von je 50mM, \pm SE; $n \geq 5$; Signifikanz wurde mittels des ANOVA-Tests ermittelt: ** steht für einen P-Wert $\leq 0,01$)

Für die Bestimmung der Selektivität des Kanals, wurde *PpSLAC1* in Badlösungen mit unterschiedlichen physiologisch relevanten Anionen vermessen. Aus den gemessenen Umkehrpotentialen wurde die relative Permeabilität der einzelnen Ionen im Vergleich zur Nitratpermeabilität des Kanals errechnet (P für Nitrat = 1). Neben der Leitfähigkeit für Nitrat zeigt *PpSLAC1* auch eine signifikante Leitfähigkeit für Chlorid, die mit einem Verhältnis $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ von 5,7 auf dem Niveau von *AtSLAC1* liegt. Für die Anionen Gluconat, Malat oder Sulfat zeigte der Kanal keine Permeabilität. Diese Eigenschaften charakterisieren den Kanal als S-Typ-Anionenkanal und entsprechen den Eigenschaften von *AtSLAC1*.

Da der Kanal nur durch zwei der getesteten Kinasen aktiviert werden konnte, stellte sich die Frage, welche regulatorischen Elemente/Domänen für diese Spezialisierung verantwortlich sind. Es ist bekannt, dass *AtSLAC1* durch *AtOST1* mittels Phosphorylierung aktiviert wird. Essentiell für die Aktivierung von *AtSLAC1* durch *OST1* ist die Phosphorylierungsstelle Serin120 im zytosolischen N-Terminus (Geiger et al., 2009). Neben Serin120 scheint auch das Serin 59 eine Rolle bei der *SLAC1*-Aktivierung zu spielen (Brandt et al., 2012; Maierhofer et al., 2014a). Beim Vergleich der Sequenz zwischen *AtSLAC1* und *PpSLAC1* zeigt sich, dass die Kanäle sich vor allem in den Termini sehr stark unterschieden. Sowohl der N- als auch der CT von *PpSLAC1* sind mit einer Länge von 251 und 101 Aminosäuren (As) deutlich länger als die Termini von *AtSLAC1* mit 188 As und 58 As. Im NT von *PpSLAC1* lassen sich allerdings nur sehr weit entfernte Homologien zu den beiden Phosphorylierungsstellen S59 und S120 aus *AtSLAC1* entdecken. Um den Effekt aller regulatorischen Elemente des NT auf die S-Typ-Kanäle zu untersuchen, wurden Chimären des Kanals *PpSLAC1* erzeugt. Dabei wurde der NT des Kanals durch den NT von *AtSLAC1* ersetzt (Abbildung 3-7 oben). Die Chimäre *AtNT-PpSLAC1* wurde anschließend im Vergleich zu den beiden Wildtyp-Kanälen *AtSLAC1* und *PpSLAC1* zusammen mit den *OST1*-Kinasen aus *Arabidopsis* und den Algen und Moosen koexprimiert (Abbildung 3-1).

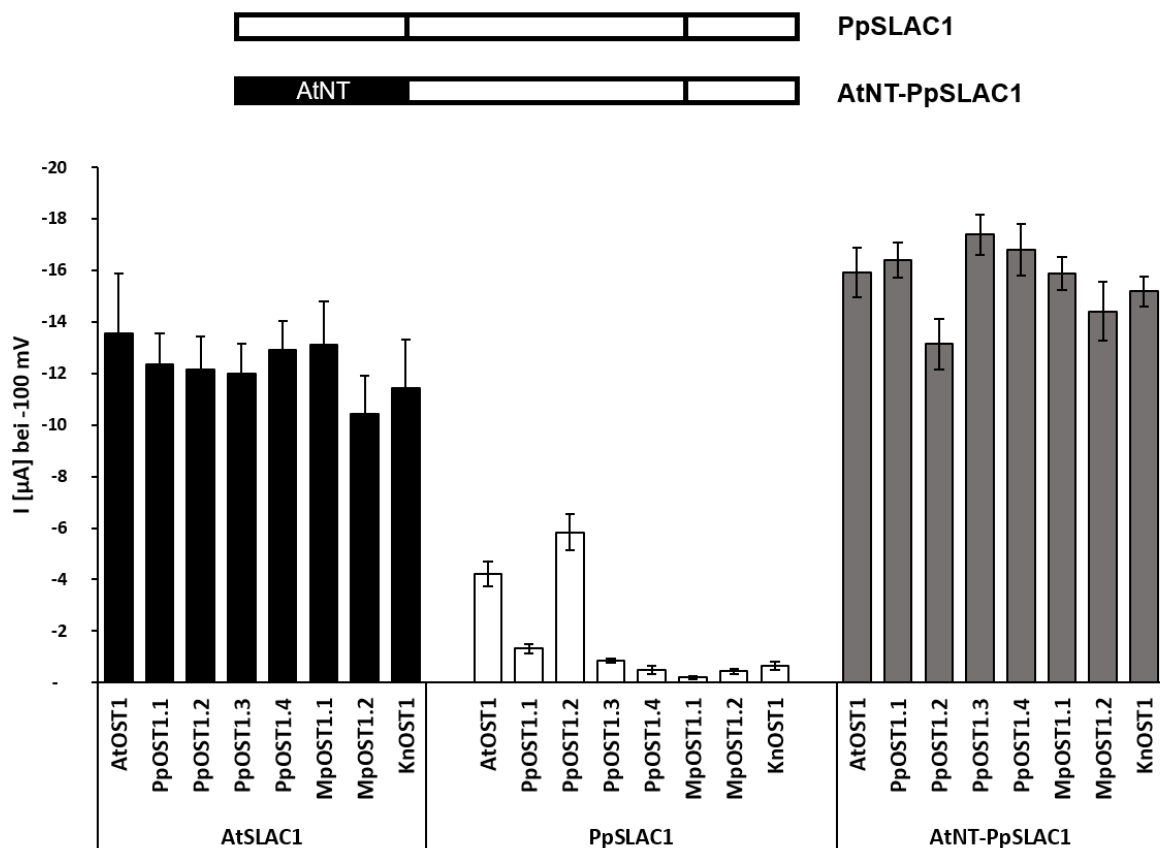


Abbildung 3-7: Chimären aus *AtSLAC1* und *PpSLAC1* führen zu einem voll funktionellen Kanal

Der Effekt der regulatorischen Elemente im N-Terminus von *AtSLAC1* wurde mit Hilfe der Chimären-Mutante *AtNT-PpSLAC1* untersucht. In der Mutante wurde der N-Terminus von *PpSLAC1* durch den N-Terminus von *AtSLAC1* ausgetauscht (oben). Die Chimäre wurde zusammen mit *AtOST1* und den Kinasen aus den Algen und Moosen koexprimiert und zusammen mit *AtSLAC1* und *PpSLAC1* vermessen. Die Chimäre *AtNT-PpSLAC1* zeigt im Gegensatz zum Wildtyp-Kanal *PpSLAC1* eine Aktivierbarkeit durch alle getesteten OST1-Kinasen wie *AtSLAC1*. Dargestellt sind die instantanen Ströme bei -100 mV in 100mM NaCl Lösung. (n≥5)

Vergleicht man die Anionenströme der Chimäre *AtNT-PpSLAC1* mit dem WT *PpSLAC1*, sieht man eine deutlich gesteigerte Amplitude der Ströme. Außerdem ließ sich die Chimäre der beiden Kanäle genau wie *AtSLAC1* durch alle getesteten Kinasen vollständig aktivieren. Die Amplitude der Anionenströme lag dabei mit -13 bis -17 μA auf demselben Niveau wie die Ströme von *AtSLAC1*. Die Ströme von *PpSLAC1* erreichten mit -6 μA zusammen mit *PpOST1.2* nur ca. 45% der Amplitude der Chimärenströme (Abbildung 3-7). Die sonstigen Eigenschaften des Kanals dagegen blieben unverändert. So führte der Austausch des NT in der Chimäre weder zu einer Veränderung der Stromkinetik noch zu einer Veränderung der Permeabilität des Kanals (nicht gezeigt).

Da sich die Eigenschaften des mutierten Kanals nicht verändert hatten, WT-Kanal und Chimäre aber eine unterschiedliche Aktivität zeigten, musste sich etwas in der Interaktion mit den OST1-Kinasen verändert haben. Um dies zu überprüfen wurde die Interaktion der Kanäle und Kinasen mittels der BIFC-Methode untersucht. Dafür wurden sowohl die Interaktion des Wildtyp-Kanals *PpSLAC1* wie auch der Chimäre *AtNT-PpSLAC1* zusammen mit allen OST1-Kinasen getestet. Die BIFC-Analyse in Oozyten zeigte eine deutliche Interaktion aller OST1-Kinasen mit *PpSLAC1* und *AtSLAC1* wobei die Interaktion mit allen Kinasen auf etwa gleichem Niveau lag. Die Interaktion mit *PpOST1.3* zeigte als einzige Kinase ein etwas geringeres, aber immer noch deutliches Fluoreszenzsignal. Die Chimäre aus *AtNT-PpSLAC1* mit dem NT von *AtSLAC1* aus *Arabidopsis* zeigte ebenfalls eine deutliche Fluoreszenz zusammen mit allen getesteten OST1-Kinasen (Abbildung 3-8).

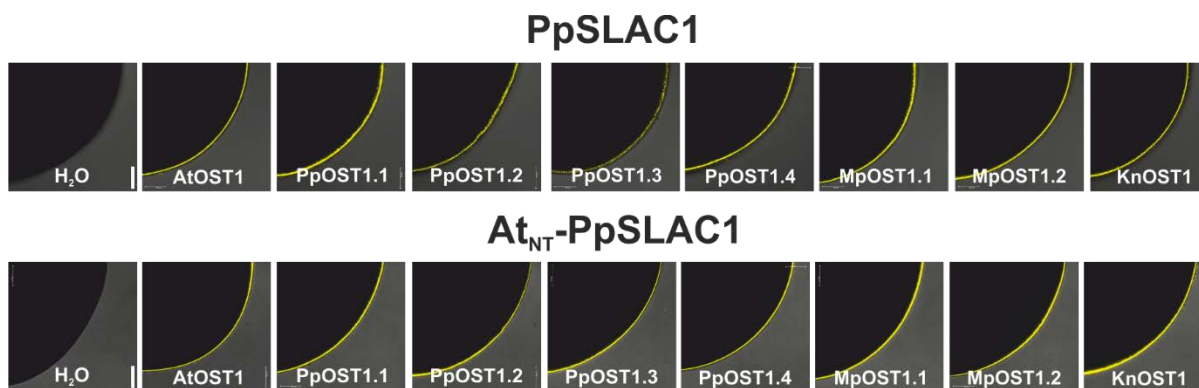


Abbildung 3-8: BIFC-Interaktion von *PpSLAC1* und *AtNT-PpSLAC1* mit OST1-Kinasen

Die Interaktion zwischen den SLAC-Kanälen und OST1-Kinasen wurde mittels der BIFC-Methode untersucht. Dazu wurden die Kinasen und Kanäle C-terminal mit der N-Terminale und der C-terminalen Hälfte eines YFP fusioniert, um die mögliche Interaktion an Hand der komplementierten

YFP-Fluoreszenz zu beobachten. Sowohl der Wildtyp-Kanal *PpSLAC1* als auch die Chimäre *AtNT-PpSLAC1* zeigte ein deutliches Fluoreszenzsignal mit allen OST1-Kinasen. Dargestellt ist je eine repräsentative Zelle jeder Kanal-Kinase Kombination. (Legende entspricht 100 μm)

Die BIFC-Analyse zeigt, dass schon der Wildtyp des Kanals dazu in der Lage ist mit allen OST1-Kinasen zu interagieren. Die funktionellen Analysen legen allerdings nahe dass nur zwei der getesteten Kinasen (*AtOST1* und *PpOST1.2*) dazu in der Lage waren den Kanal zu aktivieren. Die Chimäre kann genau wie die beiden Wildtypen aus *Arabidopsis* oder *Physcomitrella* ebenfalls mit allen Kinasen interagieren. Im Gegensatz zu *PpSLAC1* handelt es sich allerdings bei der Begegnung mit den Kinasen um funktionelle Interaktionen die zu einer Aktivierung des Kanals führen.

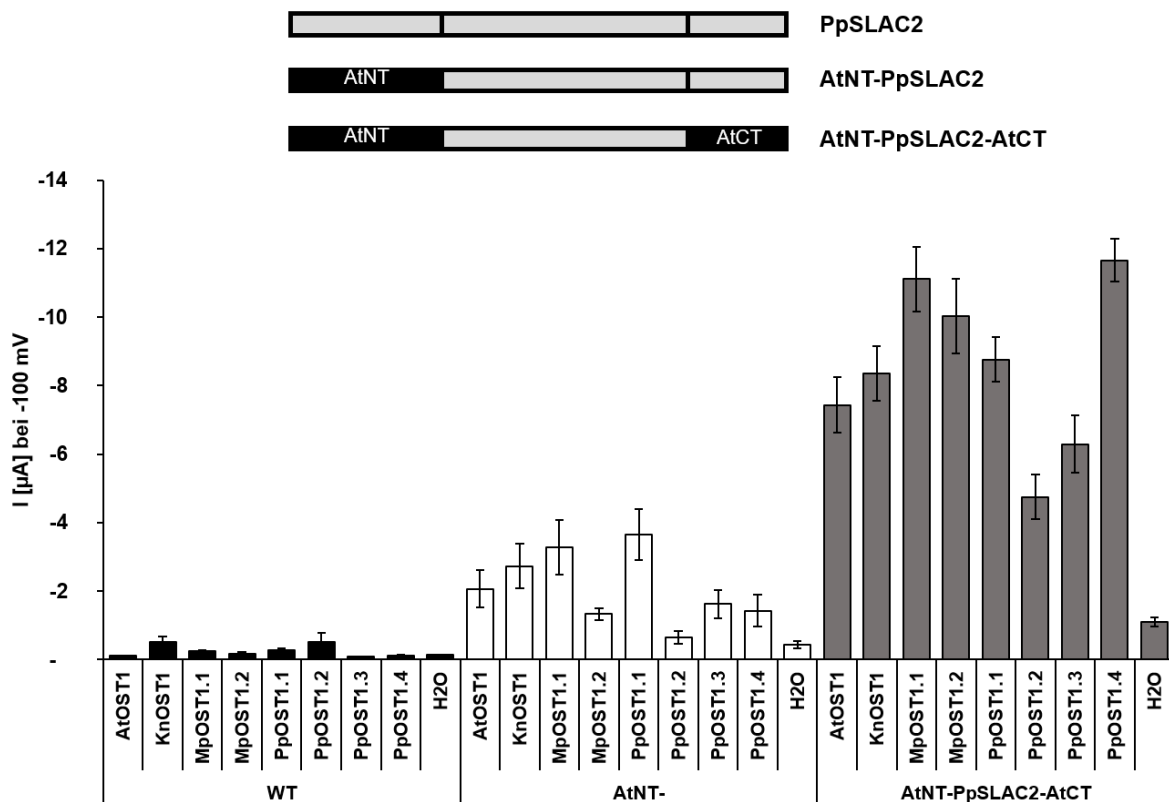


Abbildung 3-9: PpSLAC2 benötigt beide Termini von AtSLAC1 für eine volle Funktionalität

Wie schon in der Mutante *AtNT-PpSLAC1* wurden die Termini von *PpSLAC2* durch den NT und zusätzlich den CT von *AtSLAC1* ausgetauscht (oben). Die Chimären wurden zusammen mit *AtOST1* und den Kinasen aus den Algen und Moosen koexprimiert und zusammen mit *AtSLAC1* und *PpSLAC2* vermessen. Die Chimäre *AtNT-PpSLAC2* zeigt im Gegensatz zum Wildtyp-Kanal *PpSLAC2* eine leicht erhöhte Aktivierbarkeit durch die meisten getesteten OST1-Kinasen. Die Chimäre *AtNT-PpSLAC2-AtCT* mit beiden *AtSLAC1*-Termini zeigte eine deutlich gesteigerte Aktivierbarkeit durch alle Kinasen. Dargestellt sind die instantanen Ströme bei -100 mV in 100mM NaCl Lösung. (\pm SE; n=5)

Nachdem *PpSLAC1* ausgestattet mit dem NT von *AtSLAC1* zu einem voll aktivierbaren Kanal mutiert werden konnte, blieb die Frage, ob es sich mit dem zweiten SLAC-Kanal aus *Physcomitrella*, *PpSLAC2*, ebenso verhält. Wie bei *PpSLAC1* sind auch der N- und der CT von *PpSLAC2* mit 217 As und 103 As länger als die Termini von *AtSLAC1*, zeigen jedoch eine noch geringere Homologie zu den regulatorischen Elementen aus den Termini von *AtSLAC1*. So finden sich in *PpSLAC2* keinerlei Homologien zu den OST1-Phosphorylierungsstellen aus *AtSLAC1* S59 und S120. Der Wildtyp des Kanals *PpSLAC2* zeigte keine Aktivität mit keiner der untersuchten Kinasen. Um den Kanal mit den regulatorischen Elementen von *AtSLAC1* auszustatten, ersetzte ich den NT von *PpSLAC2* wie schon bei *PpSLAC1* durch den NT von *AtSLAC1*.

Die Chimäre *AtNT-PpSLAC2* zeigte in Koexpression zusammen mit den acht unterschiedlichen OST1-Kinasen nur eine geringe Erhöhung der Kanalaktivität. Während sich *PpSLAC2* durch keine der Kinasen aktivieren ließ, zeigte die Chimäre *AtNT-PpSLAC2* eine leichte Erhöhung der Anionenströme mit allen Kinasen außer *PpOST1.2*. Die Stromamplitude blieb dabei aber mit maximal -4 μA sehr gering. Da sich auch weitere regulatorische Domänen im CT von *AtSLAC1* befinden, die einen Teil in der Aktivierung durch unterschiedliche Kinasen spielen, tauschte ich zusätzlich zum NT auch den CT von *PpSLAC2* durch den CT von *AtSLAC1* aus. Die Chimäre *AtNT-PpSLAC2-AtCT* zeigte im Vergleich zur Chimäre *AtNT-PpSLAC2* noch einmal eine deutliche Steigerung der Anionenströme (Abbildung 3-9). *AtNT-PpSLAC2-AtCT* generierte mit -5 bis -12 μA eine deutlich höhere Stromamplitude als die N-terminale Chimäre und die erreichten Ströme waren auf dem Niveau der Chimäre *AtNT-PpSLAC1* und dem Wildtyp-Kanal *AtSLAC1* (siehe Abbildung 3-7).

Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Stromantwort der beiden *PpSLAC2* Chimären könnte eine veränderte Interaktion zwischen Kinase und Kanal sein. Durch den Austausch der Termini erhalten oder verlieren die Kanäle einen Großteil ihrer möglichen Bindungs- und Phosphorylierungsstellen, die entscheidend sein können für die Aktivierung durch unterschiedliche Kinasen. Wie schon bei den Chimären von *PpSLAC1* untersuchte ich daher die Interaktion zwischen den Kanälen und den Kinasen mittels BIFC-Analyse. Es zeigte sich, dass der Austausch der Termini allerdings keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen Kanal und Kinase hatte. Sowohl der Wildtyp Kanal *PpSLAC2* als auch alle Chimären zeigten Fluoreszenz in Kombination mit allen getesteten OST1-Kinasen. Wobei die Fluoreszenz bei der Interaktion mit *PpOST1.3* meist etwas geringer war als bei den restlichen Kanal-Kinase Kombinationen (Abbildung 5-3 im Anhang).

Aus diesen Ergebnissen mit den *PpSLAC*-Chimären ergaben sich neue interessante Fragen: Welche strukturelle Basis führt zu den Unterschieden zwischen *PpSLAC1* und *PpSLAC2*? Warum genügt es bei *PpSLAC1* dessen NT gegen den *AtSLAC1*-NT auszutauschen und für *PpSLAC2* ist es nötig den N- und den CT gegen die entsprechenden Termini von *AtSLAC1*

auszutauschen, um einen voll aktivierbaren Kanal zu generieren. Dank der Untersuchungen unseres Kooperationspartners Ingo Dreyer konnten wir eine Domäne am Anfang des CT der SLAC-Kanäle identifizieren, die in Gefäßpflanzen hoch konserviert ist. Bei dem konservierten C-terminalen Element handelt es sich um ein Segment aus zehn Aminosäuren. Diese Domäne ist auch in *PpSLAC1* konserviert, jedoch nicht in *PpSLAC2* (Abbildung 3-10 A). Um die Auswirkungen dieser konservierten Domäne des CT zu untersuchen, wurden mittels gerichteter Mutagenese die drei *PpSLAC2* Aminosäuren Q531, S534 und V535 in die entsprechenden As der konservierten Sequenz in Gefäßpflanzen und *PpSLAC1* umgewandelt. Die Mutationen Q531P-S534L-V535P wurden sowohl auf Basis von *PpSLAC2*(-CT_{MUT}) als auch auf der N-terminalen Chimäre *AtNT-PpSLAC2*(-CT_{MUT}) durchgeführt.

Die Mutation im CT *PpSLAC2*-CT_{MUT} alleine zeigte mit einer Stromamplitude von -2 μ A nur eine sehr geringe Aktivierung des Kanals bei einer Koexpression mit den Kinasen *AtOST1*, *KnOST1* oder *PpOST1.2*. Die Veränderung der konservierten Domäne am Anfang des NT auf Basis der Chimäre *AtNT-PpSLAC2* zeigte dagegen einen deutlich stärkeren Effekt auf die Aktivität des Kanals. Die Mutante *AtNT-PpSLAC2*-CT_{MUT} konnte durch alle acht Kinasen aus *Arabidopsis*, der Alge und den beiden Moosen aktiviert werden. Die Stromamplitude erreichte dabei mit bis zu -15 μ A dieselben Werte wie der Austausch der beiden gesamten Termini in der Chimäre *AtNT-PpSLAC2-AtCT* (Abbildung 3-7). Nur die Aktivierung durch die beiden Kinasen *PpOST1.3* und *PpOST1.4* war mit einem Strom von -6 und -4 μ A etwas niedriger als die Aktivierung durch die restlichen OST1-Kinasen.

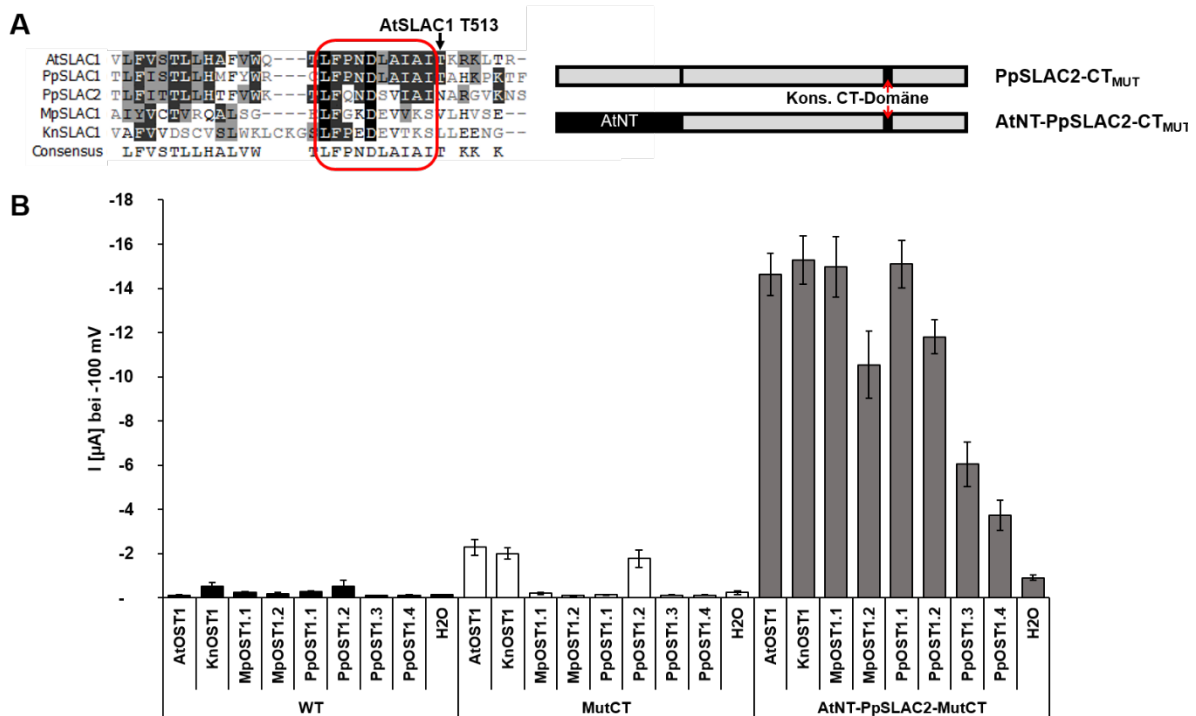


Abbildung 3-10: Die Konservierte Domäne am Anfang des SLAC C-Terminus

A) Die Untersuchung des CT von *PpSLAC1* und *PpSLAC2* ergab mehrere Unterschiede in einer konservierten Domäne (Kons. CT-Domäne). Während *AtSLAC1* und *PpSLAC1* hier dieselbe Sequenz aufzeigen, unterscheidet sich die Sequenz von *PpSLAC2* in drei Aminosäuren. Durch den Austausch dieser Aminosäuren (Q531P-S534L-V535P) wurde die Mutante *PpSLAC2-CT_{MUT}* generiert und diese auch mit der N-terminalen Chimäre kombiniert. **B)** Die elektrophysiologische Untersuchung der C-terminalen Mutante *PpSLAC2-CT_{MUT}* zeigt nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität bei Koexpression mit den OST1 Kinasen. Die Kombination aus Chimäre und der Mutation *AtNT-PpSLAC2-CT_{MUT}* zeigte eine gesteigerte Aktivität mit einer starken Aktivierbarkeit durch die OST1-Kinasen. Dargestellt sind die instantanen Ströme bei -100 mV in 100mM NaCl Lösung. (\pm SE; n=5)

Wie schon für die Chimäre von *PpSLAC1* wurde auch die Interaktion der Chimären und C-terminalen Mutanten von *PpSLAC2* mit den acht OST1-Kinasen aus *Arabidopsis*, der Alge und den beiden Moosen mittels BIFC-Analyse untersucht. Genau wie *PpSLAC1* und seine Chimäre zeigte auch *PpSLAC2* und seine Chimären und Mutanten ein Fluoreszenzsignal in Kombination mit allen Kinasen. Betrachtet man die elektrophysiologischen Messungen zusammen mit der Interaktionsstudie zeigt sich, dass es sich allerdings nur bei den Interaktionen von zwei Chimären von *PpSLAC2* um funktionelle Interaktionen zwischen Kanal und Kinase handelt (Abbildung 3-9; Abbildung 3-10). Die beiden Chimären, bei denen die Interaktion mit allen Kinasen auch eine funktionelle Relevanz aufwies, waren die, die sowohl über den NT von *AtSLAC1* als auch über einen veränderten CT verfügten (*AtNT-PpSLAC2-AtCT* und *AtNT-PpSLAC2-CT_{MUT}*).

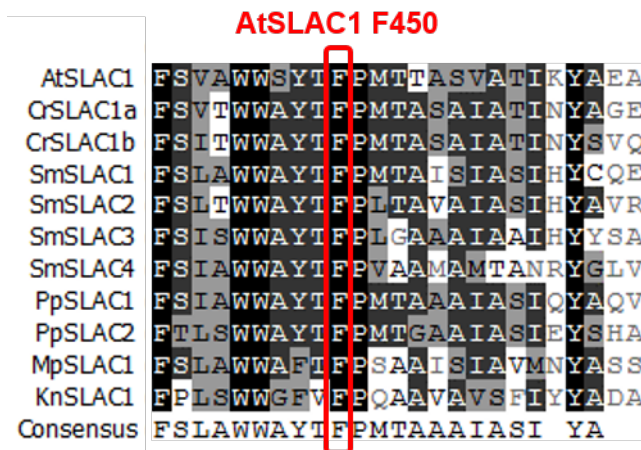


Abbildung 3-11: Vergleich der Transmembrane 9 der SLAC-Kanäle

Untersuchungen der Aminosäuresequenz der neunten Transmembranen der verwendeten SLAC-Kanäle. In Rot wurde das von Chen et al. beschriebene Phenylalanin (*AtSLAC1* F450) hervorgehoben. Die gesamte transmembran Region zeigt eine hohe Konservierung und das für die Regulation des Kanals entscheidende Phenylalanin ist in den Kanälen aller untersuchten Pflanzen vertreten.

Transmembranregionen der Kanalproteine ein hohes Maß der Konservierung zeigen (Abbildung 3-11). Das Phenylalanin F450 (Position in *AtSLAC1*) in Transmembrane 9 war bei allen Kanälen vorhanden. Um zu untersuchen, ob es sich bei *KnSLAC1* und *MpSLAC1* um funktionale Kanalproteine handelt, wurde das entsprechende Phenylalanin jeweils in ein Alanin mutiert. Die beiden daraus hervorgehenden Mutanten *KnSLAC1* F318A und *MpSLAC1* F389A wurden anschließend in Oozyten exprimiert und elektrophysiologisch untersucht.

Der Wildtyp des Kanals *MpSLAC1* aus dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* zeigte in Oozyten weder mit noch ohne die Koexpression einer aktivierenden Kinase eine messbare Stromantwort. Dies galt auch für alle getesteten OST1-Kinasen aus den anderen Versuchspflanzen. Die Phenylalaninmutante *MpSLAC1* F389A dagegen zeigte schon alleine eine starke Aktivität (Abbildung 3-12). Diese Aktivität des Kanals konnte auch durch die Zugabe einer Kinase wie *AtOST1* nur gering gesteigert werden (nicht gezeigt). Die Stromamplitude der Mutante *MpSLAC1* F389A erreichte dabei ca. 50% der Stromamplitude von *AtSLAC1*/OST1-exprimierenden Oozyten. Bei Messungen mit langen Spannungspulsen zeigte sich eine verringerte Spannungsabhängigkeit des Kanals aus dem Lebermoos verglichen *AtSLAC1* (Abbildung 3-4 (Geiger et al., 2009)). So ließ sich auch bei den ca. 20 Sekunden langen Spannungspulsen kaum eine Deaktivierungskinetik bei negativen Spannungen bestimmen. Die Selektivität von *MpSLAC1* ähnelte der Selektivität von z.B. *AtSLAC1* oder *PpSLAC1*. Dies bedeutet, dass der Kanal die einwertigen Ionen Chlorid und

Da die klonierten Kanäle aus *Klebsormidium* und *Marchantia* keinerlei Aktivität mit allen getesteten Kinasen zeigten, stellte sich die Frage, ob es sich bei den klonierten Proteinen wirklich um funktionelle Kanalproteine handelt. Chen et al. konnten 2010 zeigen, dass das Phenylalanin F450 in *AtSLAC1* eine entscheidende Rolle für die Aktivität des Kanals spielt. Durch den Austausch des Phenylalanins mit einem Alanin (*AtSLAC1* F450A) konnten sie eine konstitutiv aktive Kanalmutante von *AtSLAC1* erzeugen (Chen et al., 2010). Beim Vergleich der hier untersuchten SLAC-Kanäle ließ sich erkennen, dass vor allem die

Nitrat transportier. Er besitzt jedoch keinerlei Leitfähigkeit für Gluconat, Sulfat oder das zweiwertige Anion Malat.

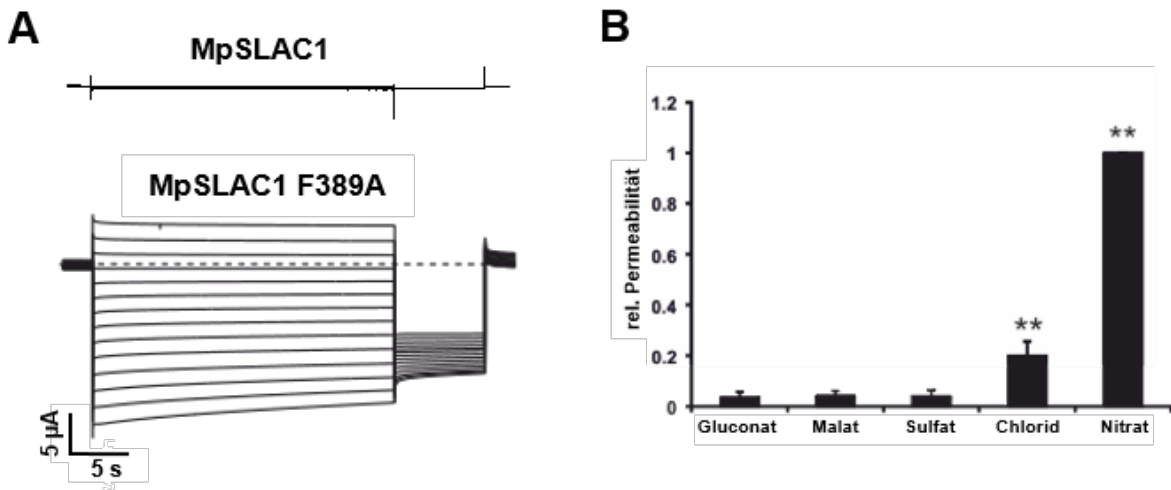


Abbildung 3-12: Charakterisierung des Kanals *MpSLAC1* aus *Marchantia polymorpha*

A) Der Wildtyp des Anionenkanals *MpSLAC1* aus dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* zeigte bei der Expression in *Xenopus* Oozyten keine messbaren Ströme mit oder ohne die Koexpression einer aktivierenden Kinase (oben exemplarisch). Die Phenylalaninmutante *MpSLAC1* F389A zeigte selbst ohne eine aktivierende Kinase signifikante Anionenströme in Cl^- und NO_3^- basierten Lösungsbedingungen. **B)** Die Selektivität der Mutante wurde auf unterschiedliche physiologisch relevante Anionen hin untersucht. Es zeigte sich eine vergleichbare Selektivität zu *AtSLAC1* oder *PpSLAC1* mit einer Cl^- und einer hohen Nitrat Leitfähigkeit. (Anionenkonzentration von je 50mM; \pm SE; $n \geq 5$; Signifikanz wurde mittels des ANOVA-Tests ermittelt: ** steht für einen P-Wert $\leq 0,01$)

Bei funktionellen Untersuchungen von *KnSLAC1* aus *Klebsormidium nitens* konnten ähnlich wie bei *MpSLAC1* keine makroskopischen Anionenströme in An- oder Abwesenheit von OST1-Kinasen aufgezeichnet werden. Nach der Mutation des Phenylalanin F318 in der prognostizierten Pore des Proteins zu einem Alanin (*KnSLAC1* F318A) wurde daher diese genauer untersucht. In Cl^- basierten Lösungen ließen sich jedoch auch mit der Mutante keine signifikanten Anionenströme messen. Erst in Nitrat-haltigen Badlösungen zeigten sich makroskopische Ströme (Abbildung 3-13). Diese Ströme ließen sich durch die Koexpression einer OST1-Kinase kaum mehr steigern (nicht gezeigt). Die Stromamplitude der *KnSLAC1* F318A Ströme erreichte dabei ca. 50% der Stromamplitude des aktivierten *AtSLAC1* Kanals. Auch bei dieser Phenylalaninmutante zeigte sich eine veränderte Kinetik der Stromantwort unter negativen Spannungen. Die für S-Typ Anionenkanäle typische, langsame Deaktivierung bei negativen Spannungen konnte in der artifiziellen Mutante *KnSLAC1* F318A nur stark reduziert gemessen werden.

Bei der Bestimmung der Selektivität bestätigte sich das Bild aus den Messungen in Cl^- und Nitrat Lösungen. Der Kanal zeigte keinerlei Permeabilität für die Anionen Gluconat, Malat oder Sulfat, und auch keine signifikant höheren Durchlass von Chlorid Ionen. Für Nitrat zeigte sich

jedoch eine sehr hohe Permeabilität, so dass man von einer deutlichen Bevorzugung von Nitrat als permeierendes Ion sprechen kann.

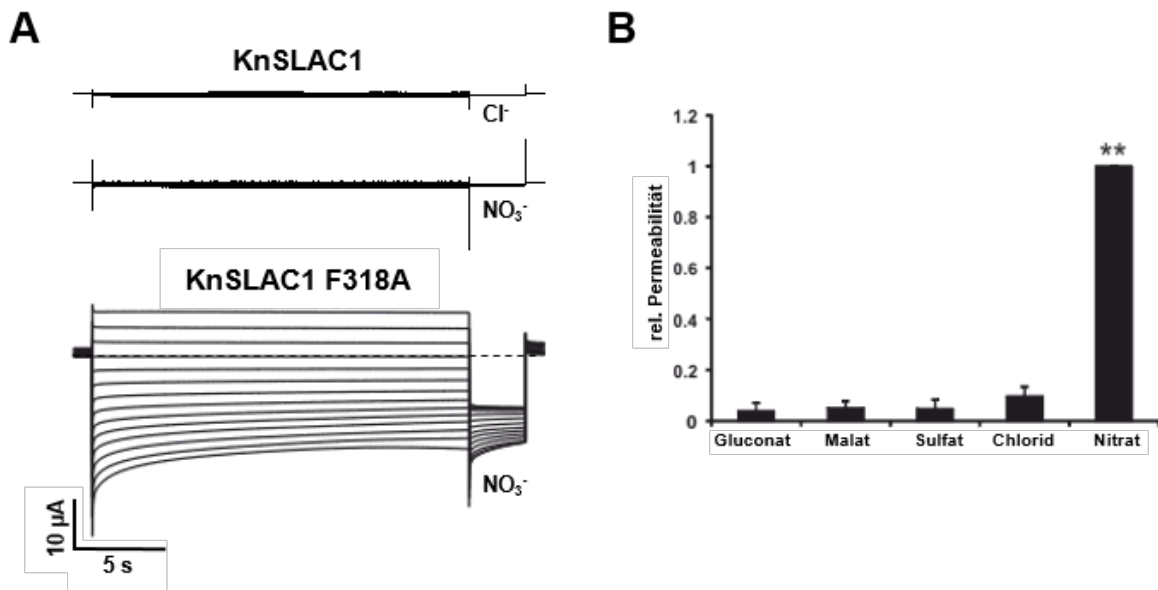


Abbildung 3-13: Charakterisierung des Kanals *KnSLAC1* aus *Klebsormidium nitens*

A) Bei der Charakterisierung des Anionenkanals *KnSLAC1* aus der Alge *Klebsormidium nitens* zeigten sich keine messbaren Ströme für den Wildtyp des Kanals. Auch für die Mutante *KnSLAC1* F318A ließen sich nur in NO₃⁻ basierten Medien signifikante Ströme aufzeichnen (exemplarische Oozyte). **B)** Bei der Bestimmung der relativen Permeabilität für fünf getestete, physiologisch relevante Anionen zeigte sich eine starke Selektivität für Nitrat. (Anionenkonzentration von je 50mM; ±SE; n≥5; Signifikanz wurde mittels des ANOVA-Tests ermittelt: ** steht für einen P-Wert≤0,01)

3.4.1.2 Die Inhibierung der OST1-Kinaseaktivität durch PP2C-Phosphatasen besteht schon in

Die Proteinkinase *AtOST1* ist als entscheidender Teil der ABA Signalkette in den Schließzellen von *Arabidopsis* bekannt (Mustilli et al., 2002). In Verlustmutanten zeigt sich ein deutlich gestörter ABA bedingter Stomaschluss. Als Teil der ABA Signaltransduktionskette steht OST1 unter der Kontrolle der PP2C-Phosphatasen ABI1/2, die wiederum durch die ABA Rezeptoren der PYR/PYL/RCAR-Familie reguliert werden (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009). Die Phosphatasen sind dabei negative Regulatoren der Kinaseaktivität von OST1.

Die ABA abhängige Regulation von OST1 konnte schon in vielen unterschiedlichen Spezies gezeigt werden und scheint ein konservierter Teil des ABA-Signalwegs zu sein. Die für eine Interaktion mit den Phosphatasen entscheidenden Aminosäuren sitzen im letzten Abschnitt des CT der OST1-Kinasen, der sogenannten C-terminalen Domäne 2 oder ABA-Box (Yoshida et al., 2006). Im Vergleich der Sequenzen des CT der klonierten SnRK2 Kinasen ließ sich eine starke Homologie in den Sequenzen der acht Kinasen erkennen. Insbesondere in den Stellen, die für die Interaktion mit den Phosphatasen verantwortlich sind (hauptsächlich negativ geladene Aminosäurereste), zeigt sich eine starke Konservierung (Abbildung 3-14).

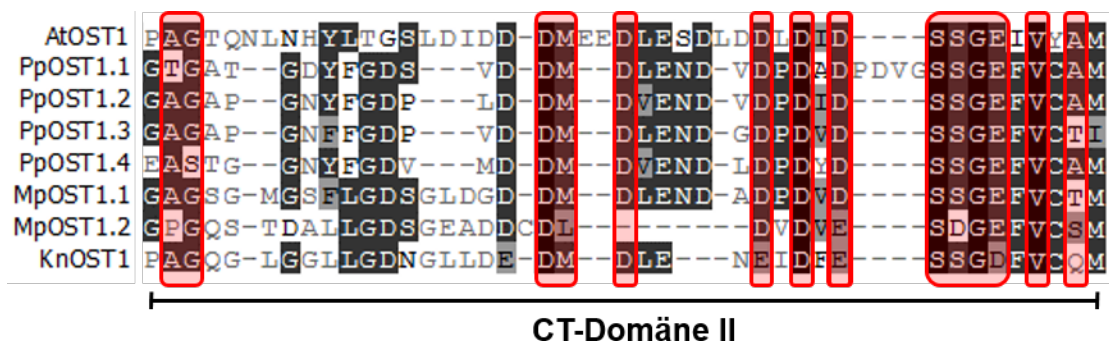


Abbildung 3-14: Vergleich der C-terminalen Domäne 2 der OST1-Kinasen

In *AtOST1* sind die Aminosäuren bekannt, die für eine Interaktion/Regulation der Kinase durch die PP2C-Phosphatasen verantwortlich sind (rot markiert nach Yoshida et al. 2006). Im Sequenzvergleich der OST1-Kinasen aus der Alge und den Moosen zeigt sich eine deutliche Konservierung der Aminosäuren, die an dieser Interaktion beteiligt sind.

Da alle orthologen OST1-Kinasen in Oozyten dazu in der Lage waren *AtSLAC1* zu aktivieren (Abbildung 3-5) stellte sich die Frage ob die OST1-Kinasen aus *Klebsormidium*, *Marchantia* und *Physcomitrella* schon unter der Kontrolle der PP2C-Phosphatasen stehen. Um diese Fragestellung zu untersuchen, betrachteten wir die Genome der Alge und der Moose auf der Suche nach Orthologen der ABI1-Phosphatasen. Dabei konnten die drei Phosphatasen *MpABI1* aus *Marchantia* und *PpABI1a/b* aus *Physcomitrella* identifiziert und kloniert werden. Die Funktionalität der Phosphatasen bei der Regulation der verschiedenen OST1-Kinasen

wurde in Koexpressionsstudien zusammen mit den unterschiedlichen Kinasen und AtSLAC1 in Oozyten untersucht.

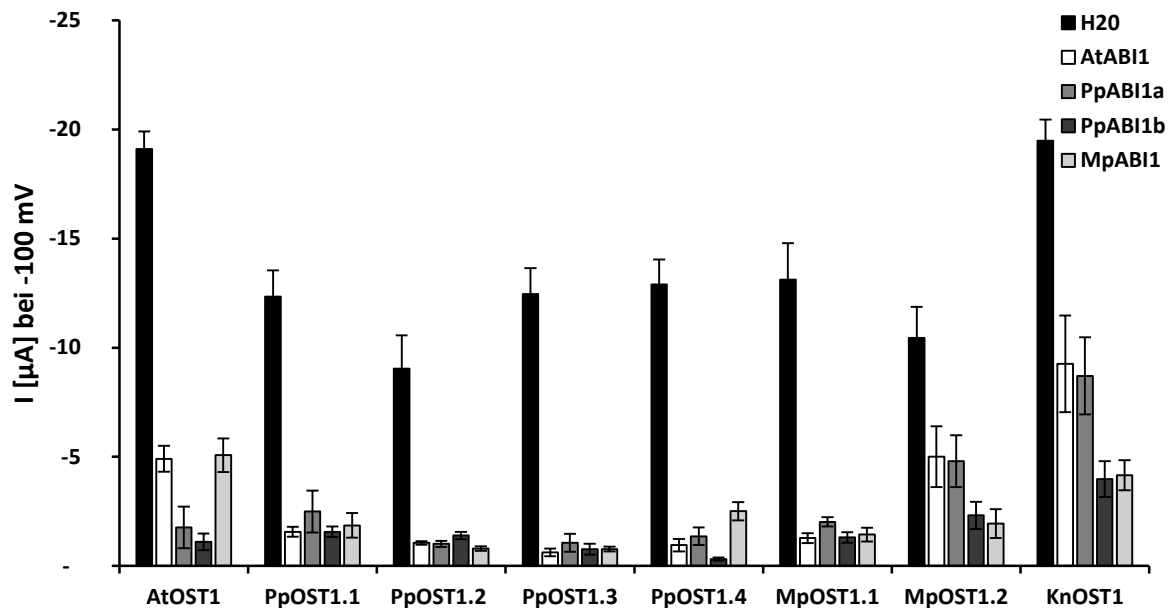


Abbildung 3-15 Regulation der Aktivität der OST1-Kinasen durch ABI1-Phosphatasen

Das Diagramm zeigt die instantanen Ströme der unterschiedlichen Kinasen aus *Arabidopsis* (*At*-), *Physcomitrella* (*Pp*-), *Marchantia* (*Mp*-) und *Klebsormidium* (*Kn*-) zusammen mit AtSLAC1 in An- und Abwesenheit von ABI1-Phosphatasen. Als Kontrolle wurden die Kinasen alleine mit AtSLAC1 ohne die zusätzliche Expression einer Phosphatase untersucht (H₂O). Die Ströme wurden bei -100mV in 100mM NaCl Lösung gemessen. (±SE; n≥5)

Die Expression von AtSLAC1 zusammen mit den acht verschiedenen Kinasen aus *Arabidopsis*, *Klebsormidium* und den beiden Moosen resultierte wie schon zuvor gezeigt bei allen Kanal-Kinase-Kombinationen in makroskopischen S-Typ-Anionenströmen (Abbildung 3-15). Wurde die PP2C-Phosphatase AtABI1 aus *Arabidopsis* zusätzlich zu den Kinasen und dem Kanal in Oozyten exprimiert, so war die bekannte inhibitorische Wirkung von AtABI1 auf die Interaktion und Aktivierung von AtSLAC1 durch AtOST1 deutlich in der Reduktion der Anionenströme zu erkennen. Im Fall der Aktivierung von AtSLAC1 durch AtOST1 sank die Stromamplitude bei -100mV von -19µA auf -5µA, was einer Reduktion um fast 75% entspricht. Die inhibitorische Wirkung von AtABI1 zeigte sich auch bei der Aktivierung des Kanals durch alle anderen getesteten Kinasen aus der Alge und den Moosen. Die Inhibierung der Kinasen und des Kanals führte dabei jeweils zu einer Reduzierung der Ströme zwischen 50% und 92%. Die geringste Wirkung zeigte die Phosphatase dabei auf die Aktivierung des Kanals durch die Kinasen MpOST1.2 und KnOST1. Hier kam es nur zu einer Reduzierung der Ströme um ca. 50%.

Die Phosphatasen aus *Physcomitrella* PpABI1a und PpABI1b zeigten ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die S-Typ-Ströme in allen Kombinationen der acht Kinasen mit

AtSLAC1. Die Messbaren Ströme wurden dabei immer ungefähr gleich stark reduziert wie durch die PP2C-Phosphatase aus *Arabidopsis*. Auch die Koexpression der Phosphatase *MpABI1* aus *Marchantia* führte zu einer signifikanten Reduzierung der Anionenströme von *AtSLAC1* wie schon bei den drei vorherigen Phosphatasen.

Neben ihrer Rolle bei der Aktivierung von *AtSLAC1* im schnellen ABA-Signalweg in Schließzellen, stellt OST1 auch einen wichtigen Regulator der Genexpression dar. Die Expression vieler ABA-abhängiger Gene wird ebenfalls durch die Aktivität von OST1 reguliert. In diesem langsamen ABA-Signalweg interagiert die Kinase mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren, die die Expression ABA-abhängiger Gene regulieren. Ein bekannter Transkriptionsfaktor für die ABA-abhängige Expression von Genen zur Regulation von Trockenstress ist ABF2. Die Überprüfung der Funktionalität der OST1-Kinasen in diesem Signalweg wurde durch einen unserer Kooperationspartner durchgeführt. In der Arbeitsgruppe von Jian-Kang Zhu im Shanghai Institut für Biological Sciences wurden zu diesem Zweck Expressionsstudien in transient transformierten *Arabidopsis* Protoplasten angestrengt.

Dabei wurde die Luciferaseaktivität in den Protoplasten in Anwesenheit und in Abwesenheit von ABA gemessen. Die Luciferase wurde unter die Kontrolle des ABA-abhängigen Promotor RD29B gestellt, um ein ABA abhängiges Reporter gen zu kreieren. Zusätzlich zu der jeweiligen Kinase wurde der Transkriptionsfaktor ABF2 in den Protoplasten exprimiert. In der Positivkontrolle von *AtOST1* zusammen mit ABF2 lässt sich eine deutliche Luciferaseaktivität in Anwesenheit von ABA erkennen (Abbildung 3-16). Als Negativkontrolle zeigt der Transkriptionsfaktor ABF2 alleine keinerlei Expression der Luciferase. Auch in Anwesenheit der Phosphatase ABI1 ist die Expression der Luciferase fast vollständig unterbunden. Genau wie *AtOST1* waren auch die Kinasen *KnOST1*, *MpOST1.1* und *PpOST1.2* dazu in der Lage zusammen mit ABF2 und in Anwesenheit von ABA, die Expression der Luciferase anzuregen. In Abwesenheit von ABA ließ sich bei keiner der OST1-Kinasen eine starke Anregung der Luciferaseaktivität erkennen. Als weitere Negativkontrolle wurde die ABA-unabhängige SnRK-Kinase SnRK2.4 zusammen mit ABF2 exprimiert. SnRK2.4 war dabei weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von ABA dazu in der Lage die Expression der Luciferase anzuregen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die klonierten OST1 Kinasen aus den evolutionär sehr unterschiedlichen Pflanzen bereits in der Lage waren das ABA-Signal auf dem transkriptionellen Signalweg zur Genregulation weiterzuleiten. Dies steht im starken Kontrast zur Tatsache, dass diese OST1 Kinasen aus den Moosen und der Grünalge nicht zur Aktivierung des Anionenkanals SLAC1 fähig sind.

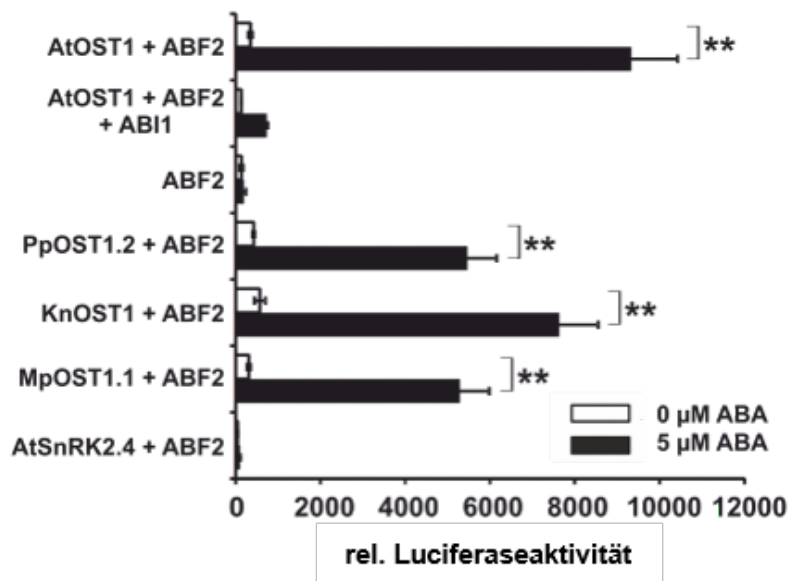


Abbildung 3-16: Funktionalität der OSTs aus Algen und Moosen im langsamen ABA-Signalweg

In transient transformierten *Arabidopsis* Protoplasten wurde die Wirksamkeit der Kinasen *KnOST1*, *MpOST1.1* und *PpOST1.2* auf die Aktivität ABA-abhängiger Promotoren untersucht. Dafür wurden die Kinasen zusammen mit dem Transkriptionsfaktor ABF2 exprimiert und die Aktivität von Luciferase gemessen, die unter der Kontrolle des ABA-abhängigen RD29B Promotor exprimiert wurde. Die Luciferaseaktivität wurde jeweils in Anwesenheit und in Abwesenheit von 5μM ABA gemessen. (Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Jian-Kang Zhu im Shanghai Institut für Biological Sciences durchgeführt)

3.4.2 Die Komponenten des ABA-Signalweg in Lycophyten und Farnen

Betrachtet man die Evolution der Landpflanzen erkennt man, dass sich zwischen den untersuchten Algen und Moosen und den durch *Arabidopsis* repräsentierten Samenpflanzen noch eine Vielzahl von Entwicklungsstufen zu finden sind (Kenrick and Crane, 1997; Peterson et al., 2010). Zusätzlich zu der Untersuchung der Komponenten des schnellen ABA-Signalwegs aus Algen und Moosen wollten wir daher auch Vertreter der Lycophyten und Farne in die Untersuchungen mit einbeziehen, die sich nach den Moosen, aber noch vor den Samenpflanzen entwickelten. Durch die Entwicklungen der Kanäle und Kinasen nach den Algen und den Moosen bis hin zu den Samenpflanzen linear weiter verlief.

Im Laufe der Evolution spalteten sich zwischen den Moosen und den Samenpflanzen unter anderem die Lycophyten ab. Sie bilden die ersten rezenten Vertreter der Gefäßpflanzen. Die Farne entwickelten sich noch zwischen den Lycophyten und den Samenpflanzen und bilden die nächste Schwestergruppe der Samenpflanzen (Kenrick and Crane, 1997). Aus dem Reich der Lycophyten bezogen wir daher noch die Modellpflanze *Selaginella moellendorffii* und aus dem Reich der Farne den Modellfarn *Ceratopteris richardii* in die Untersuchungen ein. Auch in den Genomen dieser Pflanzen finden sich SLAC1-Kanäle und OST1-Kinasen, die wir im Folgenden näher untersucht und charakterisiert haben. Dabei arbeitete ich in enger Kooperation mit meinem Masterstudenten Michael Andreas Geringer, der einen großen Teil der elektrophysiologischen Messungen an den Wildtyp-Kanälen in *Selaginella* und *Ceratopteris* durchführte und in Teilen in seiner Masterarbeit „Evolution des Membran-gebundenen ABA-Signalweges in Pflanzen: Co-Evolution von SLAC1-typ Anionenkanälen und ABA-abhängigen Kinasen.“ verwendete.

3.4.2.1 Die SLAC-Kanäle und OST1-Kinasen aus *Selaginella*

Der Moosfarn *Selaginella moellendorffii* besitzt als Bärlappgewächs schon vollständig ausgeprägte Stomata und weist damit als eine der ersten Vertreter der Gefäßpflanzen schon alle Komponenten auf, die für eine homiohydre Lebensweise benötigt werden. Daher besitzt die Kontrolle der Stomata für *Selaginella* eine vergleichbare Bedeutung wie für die Samenpflanzen in denen die Signalkette des Stomaschlusses schon genau erforscht ist. Aus dem Genom der Pflanze konnten vier SLAC-Kanäle (*SmSLAC1-4*) und drei OST1-Kinasen (*SmOST1.1-3*) kloniert werden. Für den Kanal *SmSLAC1* fanden sich zusätzlich zwei verschiedene Versionen/Allele mit geringfügigen Unterschieden im N- und CT des Kanals. Diese beiden Varianten wurden *SmSLAC1a/b* genannt. Zur Untersuchung der Eigenschaften der

Kanalproteine und Kinasen wurden sie zusammen mit *AtSLAC1* und *AtOST1* aus *Arabidopsis* in *Xenopus* Oozyten koexprimiert und elektrophysiologisch vermessen.

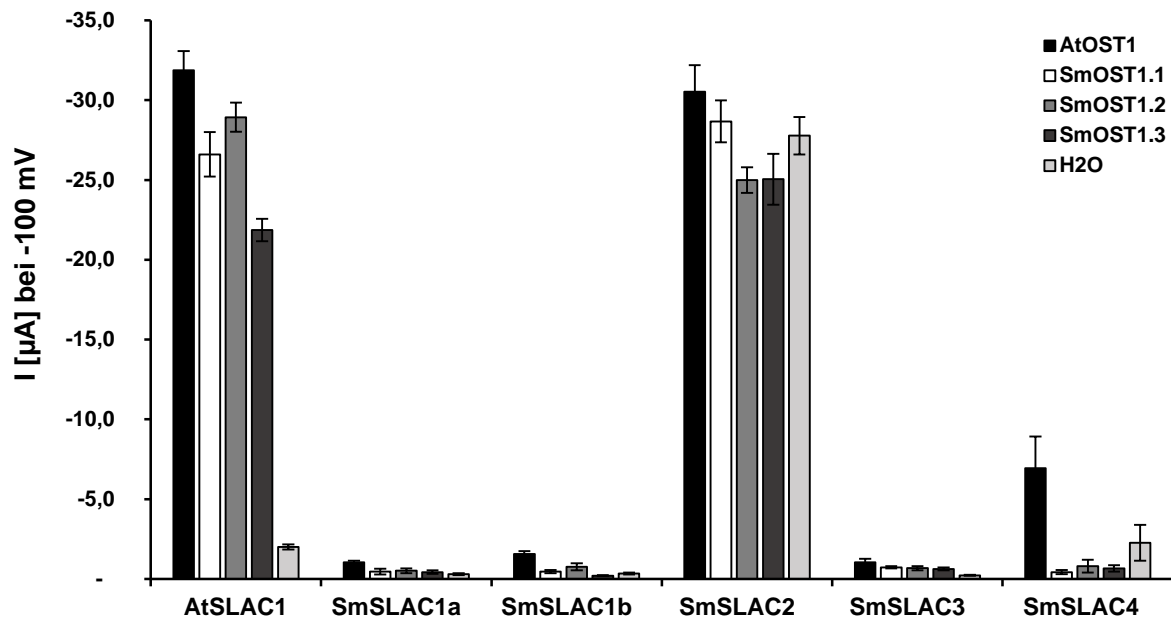


Abbildung 3-17: Charakterisierung der SLAC-Kanäle und OST1-Kinasen aus *Selaginella*

Die Kanäle *AtSLAC1* aus *Arabidopsis* und *SmSLAC1-4* aus *Selaginella* wurden zusammen mit den Kinasen *AtOST1* und *SmOST1.1-3* in Oozyten koexprimiert. Dargestellt sind die instantanen Ströme der Kanal-Kinase-Kombinationen bei -100mV in 100mM NaCl Lösung. Als Negativ Kontrolle wurden die Kanäle mit H₂O an Stelle der Kinasen injiziert. (\pm SE; $n \geq 5$)

Die instantanen Ströme von *AtSLAC1* in Kombination mit *AtOST1* und den drei *SmOST1* Kinasen zeigen deutliche Cl⁻-Ströme über die Plasmamembran der Oozyten. Die Amplitude der *AtSLAC1*-Ströme zeigte dabei keine starken Unterschiede zwischen den vier verschiedenen aktivierenden Kinasen wobei *AtOST1* mit -32 μ A die höchsten Ströme generierte und *SmOST1.3* mit -22 μ A die geringsten. Bei der Koexpression der beiden Varianten des Kanals *SmSLAC1* (a/b) und dem Kanal *SmSLAC3* mit den OST1 Kinasen aus *Arabidopsis* und *Selaginella* dagegen ließen sich in keiner Kombination deutliche Ströme messen. Auch für den vierten SLAC-Kanal des Lycophyten *SmSLAC4* ließen sich nur geringe Ströme in Kombination mit *AtOST1* messen, die jedoch aufgrund der hohen Schwankungsbreite in unseren Messungen kaum als *SmSLAC4/AtOST1*-spezifische Anionenströme zu bezeichnen sind.

Der Kanal *SmSLAC2* dagegen zeigte in Kombination mit allen gemessenen OST1-Kinasen eine vergleichbare Aktivierung wie *AtSLAC1* und es ließen sich makroskopische Ströme messen. Die Aktivität von *SmSLAC2* war dabei jedoch nicht von der Koexpression einer aktivierenden Kinase abhängig. In Abwesenheit von jeglicher exogen-applizierter Kinase zeigte der Kanal nach wie vor eine gleichbleibende, starke Aktivität bei den elektrophysiologischen Messungen in Oozyten. Die Amplitude der Ströme zeigte dabei im

Gegensatz zu den bisher gemessenen konstitutiv aktiven Kanalmutanten aus *Klebsormidium* oder *Marchantia* dieselbe Höhe wie der aktivierte *AtSLAC1*.

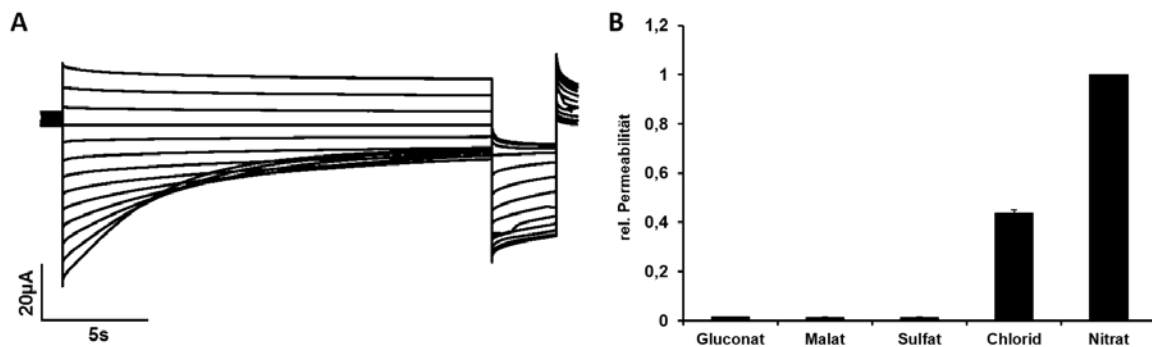


Abbildung 3-18: Charakterisierung des konstitutiv aktiven Kanals *SmSLAC2* aus *Selaginella*
A) Bei der Charakterisierung des Anionenkanals *SmSLAC2* aus dem Moosfarn *Selaginella moellendorffii* zeigten sich mit und ohne die Koexpression einer aktivierenden Kinase makroskopische Anionenströme in 50 mM Cl⁻-Lösung (exemplarische Einzelzelle). **B)** Bei der Bestimmung der relativen Permeabilität für fünf getestete, physiologisch relevante Anionen zeigte sich eine hohe Permeabilität für Nitrat und Chlorid. (\pm SE; $n \geq 5$)

Die genauere Untersuchung des Anionenkanal *SmSLAC2* zeigte deutlich, dass der Kanal konstitutiv aktiv S-Typ-Anionenströme vermittelt, die dem Niveau des durch eine Kinase aktivierten *AtSLAC1* entsprachen. Der Kanal zeigte dabei die typische Kinetik eines S-Typ-Kanals mit einer langsamen Deaktivierung des Kanals über mehrere Sekunden in stark negativen Spannungsbereichen. Wie *AtSLAC1* zeigten sich makroskopische Ströme in Cl⁻- und NO₃⁻-basierten Lösungen. Bei der Untersuchung der Selektivität des Kanals durch die Bestimmung der relativen Permeabilität für die schon für die restlichen Kanäle verwendeten physiologisch relevanten Anionen Gluconat, Malat, Sulfat, Chlorid und Nitrat wurde dieses Bild bestätigt. Während der Kanal *SmSLAC2* für Gluconat, Malat und Sulfat keinerlei Permeabilität besaß, zeigte sich eine starke Permeabilität für Nitrat und Chlorid. Die Leitfähigkeit für Chlorid war dabei mit einem NO₃⁻/Cl⁻-Verhältnis von 2,3 deutlich höher als bei *AtSLAC1* oder allen anderen untersuchten S-Typ-Anionenkanälen.

Um die Frage zu klären, woher die konstitutive Aktivität von *SmSALC2* herrührt, betrachtete ich die regulatorischen Termini des Kanals, die schon in den Chimären von *PpSLAC1* und *PpSLAC2* eine entscheidende Rolle für die Aktivität der Kanäle gespielt haben (Abbildung 3-7; Abbildung 3-9). Mit einer Länge von nur 81 As ist der NT von *SmSLAC2* nur etwa halb so lang wie der NT von *AtSLAC1* mit 188 As. Die C-Termini der beiden Kanäle unterschieden sich mit 65 As (*SmSLAC2*) und 58 As (*AtSLAC1*) in ihrer Länge dagegen nur wenig. Im Vergleich der Aminosäuresequenz zeigte sich, dass die Phosphorylierungsstellen im NT von *AtSLAC1* in *SmSLAC2* nicht konserviert sind und die beiden N-Termini nur eine sehr geringe Homologie aufweisen. Der Kanal verfügt auch über das in Gefäßpflanzen konservierte C-

terminale Element direkt nach der letzten transmembranen Domäne (Abbildung 3-10) mit nur einer geringfügigen Abwandlung eines Isoleucins in ein Leucin.

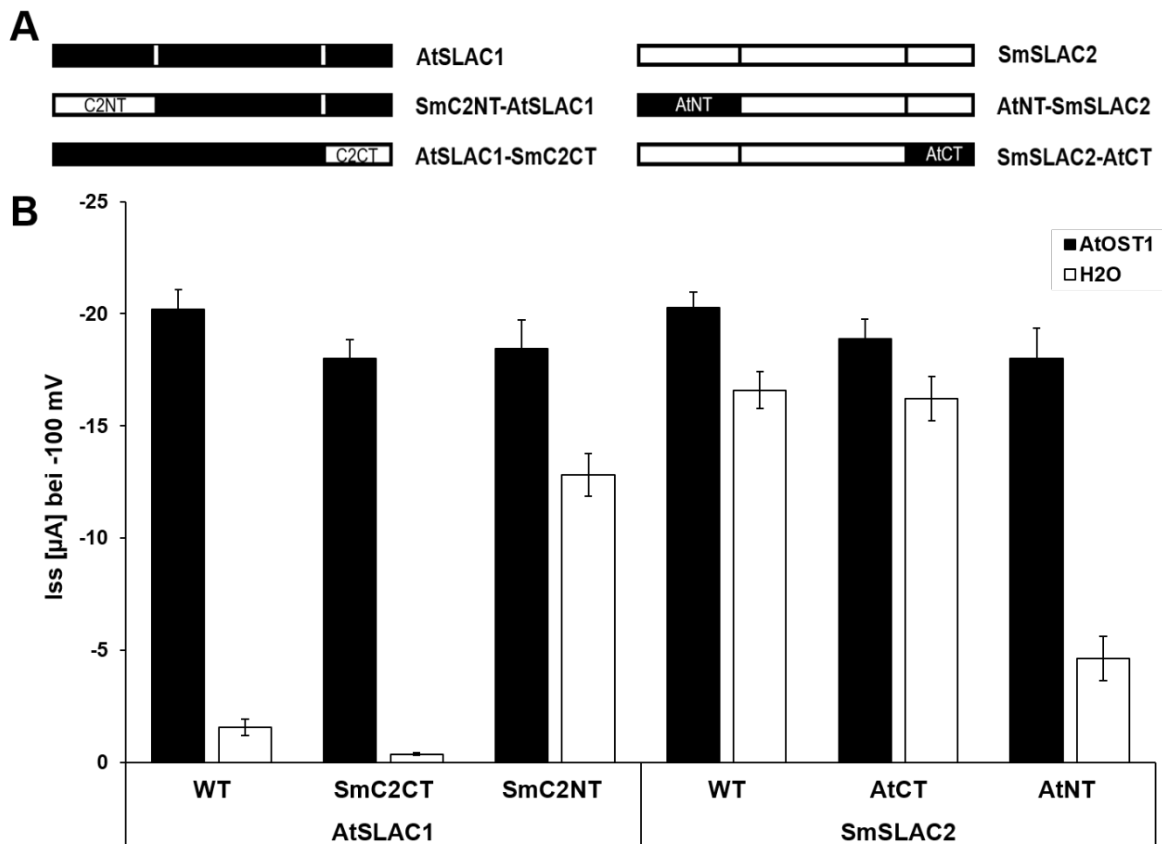


Abbildung 3-19: Regulatorische Domänen im konstitutiv aktiven Kanal *SmSLAC2*

A) Wie schon für die *PpSLAC*-Kanäle wurden auch für *SmSLAC2* Chimären aus *AtSLAC1* und *SmSLAC2* generiert. Dazu wurden der N- oder der CT von *SmSLAC2* mit den Termini von *AtSLAC1* ausgetauscht. Um den Effekt der Termini von *SmSLAC2* zu untersuchen wurden im Gegenzug auch die Termini von *AtSLAC1* mit den Termini von *SmSLAC2* ausgetauscht. **B)** Die Elektrophysiologischen Untersuchungen der vier Chimären und ihrer beiden Wildtypen zeigt, dass alle sechs Kanäle funktional sind. Die Chimäre *SmC2NT-AtSLAC1* zeigt dabei wie *SmSLAC2* (WT) eine konstitutive Aktivität ohne Kinase. Die *SmSLAC2* Chimäre *AtNT-SmSLAC2* dagegen benötigt wie *AtSLAC1* (WT) eine Kinase um vollständig aktiviert zu werden. Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme bei -100 mV in 100mM NaCl Lösung. (n≥5)

Mit Hilfe von vier Chimären wurde versucht die Rolle der Termini von *SmSLAC2* in Bezug auf dessen konstitutive Aktivität zu beleuchten. Dafür wurden je die N- oder C-Termini von *AtSLAC1* und *SmSLAC2* vertauscht und so die Chimären *SmC2CT-AtSLAC1* und *AtSLAC1-SmC2CT* generiert, in denen *AtSLAC1* je einen der Termini von *SmSLAC2* besitzt. Im Gegenzug dazu wurde *SmSLAC2* in den Chimären *AtNT-SmSLAC2* und *SmSLAC2-AtCT* mit je einem Terminus von *AtSLAC1* ausgestattet. Für die genauere Charakterisierung der Chimären wurden entweder alleine oder zusammen mit *AtOST1* als aktivierende Kinase in Oozyten koexprimiert und elektrophysiologisch untersucht (Abbildung 3-19).

Betrachtet man die beiden Wildtyp (WT) Kanäle *AtSLAC1* und *SmSLAC2* erkennt man deutlich, dass für *AtSLAC1* nur in Anwesenheit von *AtOST1* signifikante Anionenströme messbar sind. Für *SmSLAC2* dagegen ließen sich sowohl in An- wie auch in Abwesenheit der Kinase starke Ströme messen. Auch die vier Chimären aus den beiden Kanälen waren alle aktiv und es ließen sich deutliche S-Typ-Anionenströme mit allen Kanälen messen. Die gemessene Stromamplitude der sechs Kanäle in Anwesenheit von *AtOST1* war dabei mit -18 bis -20 μA für alle Kanäle auf demselben Niveau. Unterschiede in der Aktivität der Kanäle und Chimären zeigten sich nur beim Vergleich ihrer Aktivität in Abwesenheit der aktivierenden Kinase *AtOST1*.

Der Effekt des CT auf die Kanaleigenschaften von *AtSLAC1* und *SmSLAC2* wurde in den C-terminalen Austauschmutanten/Chimären untersucht. Bei den Chimären *AtSLAC1-SmC2CT* und *SmSLAC2-AtCT* zeigte sich allerdings kein Unterschied ihrer Aktivität im Vergleich zu dem jeweiligen Wildtypkanal. So benötigte die Chimäre auf Basis von *AtSLAC1* nach wie vor *AtOST1* um aktiviert zu werden, während die auf *SmSLAC2* basierenden Chimäre, wie auch der Wildtyp des Kanals, schon ohne Kinase seine volle konstitutive Aktivität zeigte. Der Austausch der N-Termini dagegen hatte einen deutlich größeren Effekt auf die Aktivität der Kanäle. In der Chimäre *SmC2NT-AtSLAC1* erhielt *AtSLAC1* durch den Austausch seines NT durch den von *SmSLAC2* eine konstitutive Aktivität vergleichbar zum Wildtyp von *SmSLAC2*. Die Chimäre benötigte für eine volle Aktivierung keine koexprimierte Kinase mehr, sondern generierte auch schon alleine starke Anionenströme. Die Ströme der konstitutiv aktiven Chimäre erreichten mit einer Amplitude von -13 μA dabei fast das Niveau der Koexpression der Chimäre zusammen mit *AtOST1* (-18 μA). Auch das Gegenstück zu dieser N-terminalen Chimäre in *SmSLAC2*, *AtNT-SmSLAC2*, hatte eine deutlich veränderte Aktivität. Durch den NT von *AtSLAC1* verlor die Chimäre die konstitutive Aktivität des *SmSLAC2* WT und war nur noch in Anwesenheit von *AtOST1* vollständig aktiv. Im Gegensatz zu *SmSLAC2* ließen sich in Abwesenheit der aktivierenden Kinase nur noch sehr geringe Ströme mit einer Amplitude von -4 μA in der Chimäre messen. Während der Austausch des CT zwischen den beiden Kanälen keinen messbaren Einfluss auf deren Aktivität hatte, zeigt sich mit dem Austausch der N-Termini auch eine Übertragung der Aktivierbarkeit der beiden Kanäle.

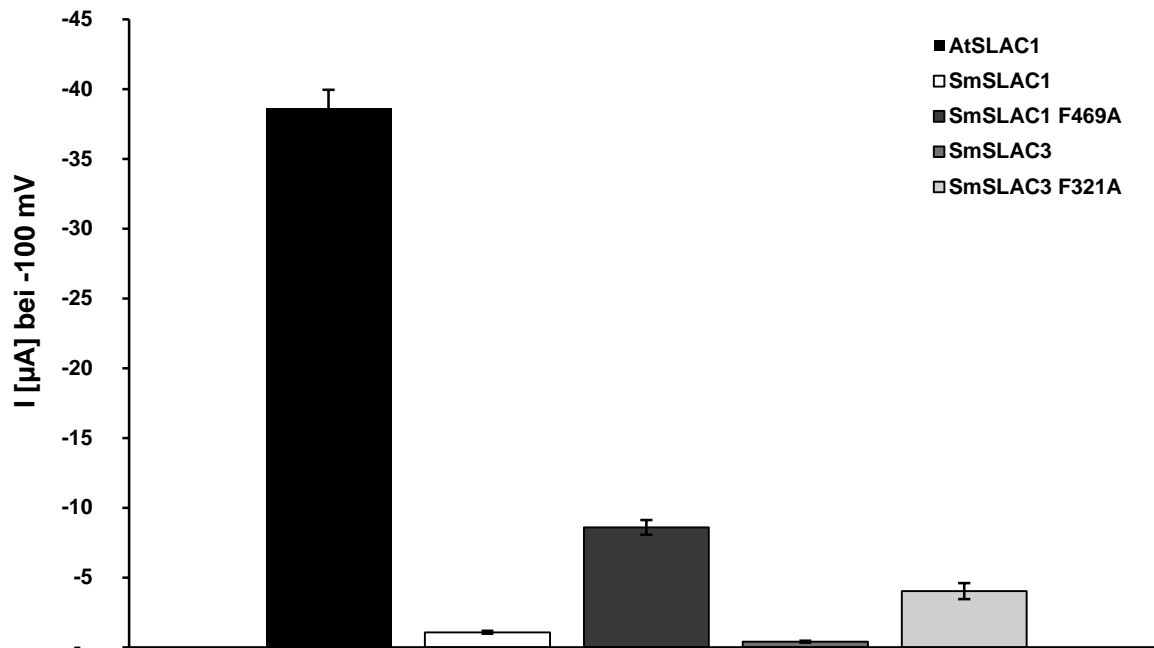


Abbildung 3-20: Phenylalaninmutanten der Kanäle *SmSLAC1* und *SmSLAC3* aus *Selaginella*
 Zur Überprüfung der Funktionalität der Kanäle *SmSLAC1* und *SmSLAC3* wurde jeweils die Mutation des Phenylalanins entsprechend der Mutante in *AtSLAC1* F450A vorgenommen. Die Mutanten *SmSLAC1* F469A und *SmSLAC3* F321A zeigen signifikant erhöhte Ströme im Vergleich zu den Wildtyp Kanälen. Die Kanäle wurden jeweils mit der Kinase *AtOST1* koexprimiert. Dargestellt sind die instantanen Ströme bei -100 mV in einer 100 mM NaCl Lösung. (\pm SE; $n \geq 5$)

Da sich bei der Untersuchung von *SmSLAC1* und *SmSLAC3* wie schon bei *KnSLAC1* und *MpSLAC1* keine makroskopischen Ströme messen ließen, wurde auch für diese Kanäle die Mutation des konservierten Phenylalanins in der Pore der Kanäle erzeugt, um Kinase-unabhängige konstitutiv aktive Kanäle zu erzeugen. Da sich zwischen den beiden Varianten von *SmSLAC1* (a/b) in den ersten Messungen keine Unterschiede zeigten, habe ich mich für die weiteren Untersuchungen von Mutanten von *SmSLAC1* auf Variante A beschränkt. In den Mutanten *SmSLAC1* F469A und *SmSLAC3* F321A wurde das Phenylalanin wieder durch ein Alanin ersetzt um den Phenylrest der Aminosäure aus der Pore zu entfernen. Bei der elektrophysiologischen Untersuchung der beiden Mutanten, konnten vor Allem für die Mutante von *SmSLAC1* signifikante S-Typ-Anionenströme gemessen werden (Abbildung 3-20). Die Amplitude der Ströme der beiden Mutanten lag dabei jedoch deutlich unter dem Niveau des *AtSLAC1/AtOST1*-Paares. Während *AtSLAC1* zusammen mit *AtOST1* Ströme von -39 μ A vermittelte, konnten für *SmSLAC1* F469A nur Ströme von -9 μ A gemessen werden. Die Mutante *SmSLAC3* F321A vermittelte sogar nur Ströme in Höhe von -4 μ A. Im Gegensatz zu den Phenylalaninmutanten von *KnSLAC1* und *MpSLAC1* zeigte sich für die beiden *SmSLAC*-Porenmutanten jedoch keine konstitutive Aktivität in den Mutanten. Ströme ließen sich mit den beiden *SmSLAC*-Porenmutanten nur in Koexpression mit einer aktivierenden Kinase wie *AtOST1* messen.

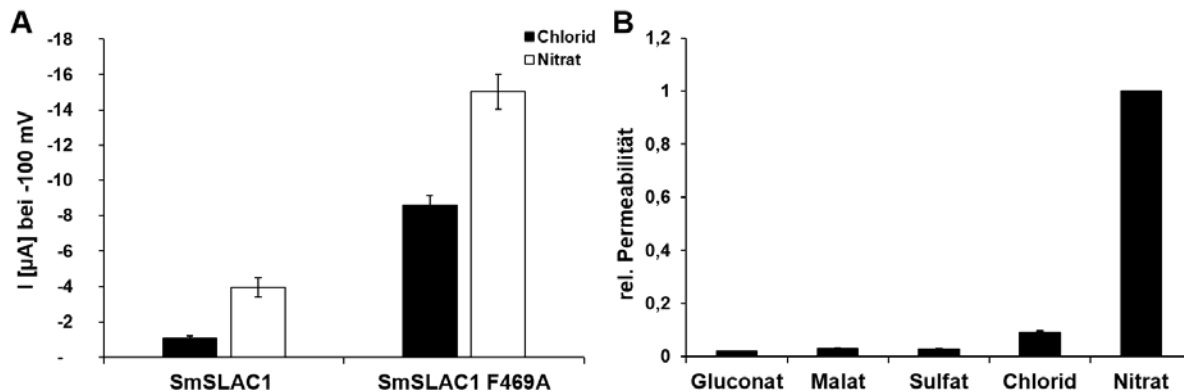


Abbildung 3-21: *SmSLAC1* ist ein nitratselektiver S-Typ-Kanal

A) Bei der Untersuchung der Mutante *SmSLAC1* F469A ließen sich in Nitrat-basierten Lösungen deutlich höhere Ströme als in Chlorid-Lösung messen. Betrachtet man die Anionenströme des *SmSLAC1*-Wildtyp zeigt sich ebenfalls ein deutlich erhöhter Strom in Nitrat-Lösung. Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme bei -100 mV in 100 mM Cl⁻/NO₃⁻-Lösung **B)** Die Selektivität des *SmSLAC1* WT wurde auf unterschiedliche physiologisch relevante Anionen hin untersucht. Während der Kanal eine hohe Permeabilität für Nitrat zeigte, war die Leitfähigkeit für Chlorid nur sehr gering. Für Gluconat, Malat und Sulfat war der Kanal nicht permeabel. (±SE; n≥5)

Interessanter Weise zeigte sowohl die Phenylalaninmutante als auch der WT von *SmSLAC1* deutlich erhöhte Ströme in Nitrat basierten Lösungen. Mit -4 µA entsprachen die Nitratströme von *SmSLAC1* dem Vierfachen der Chloridströme und auch in der Phenylalaninmutante *SmSLAC1* F469A zeigten sich mit -15 µA Nitratströmen fast eine Verdopplung der Stromamplitude im Vergleich zu Chlorid-basierten Strömen. Bei der Bestimmung der relativen Permeabilität von *SmSLAC1* bestätigte sich die Annahme, dass der Kanal eine hohe Leitfähigkeit für Nitrat, jedoch nur eine sehr geringe Permeabilität für Chloridionen besaß. Wie schon für *KnSLAC1* spricht dies dafür, dass man auch bei *SmSLAC1* von einer deutlichen Bevorzugung von Nitrat als permeierendes Ion sprechen kann.

3.4.2.2 Die S-Typ-Anionenkanäle des Farns *Ceratopteris*

Die Farne schließen die Lücke zwischen den Lycophyten und den Samenpflanzen und weisen wie auch diese beiden Gruppen alle erforderlichen Komponenten für eine homiohydre Lebensweise auf. Durch seine einfache Kultivierbarkeit und die einfache Generierung von Mutanten ist der Farn *Ceratopteris richardii* schon seit Anfang der 80er Jahre eine beliebte Versuchspflanze (Hickok, 1985; Hickok and Warne, 1998).

Die Genomanalyse von *Ceratopteris* wurde von unseren Kooperationspartnern der Arbeitsgruppen T. J. Brodribb und Scott McAdam an der Universität Tasmanien durchgeführt, die uns auch die Kanäle und Kinasen des Farns zur Verfügung stellten. Bei der Analyse der Genomdaten von *Ceratopteris* zeigten sich je zwei orthologe SLAC-Kanäle (*CrSLAC1a* und *CrSLAC1b*) und zwei orthologe OST-Kinasen (*CrOST1a/CrGAIA1* und *CrOST1b/CrPGAI*). Wie schon die orthologen Kanäle aus Algen, Moosen und Lycophyten zuvor, wurden diese Komponenten für die weitere Untersuchung in *Xenopus* Oozyten exprimiert und genauer charakterisiert.

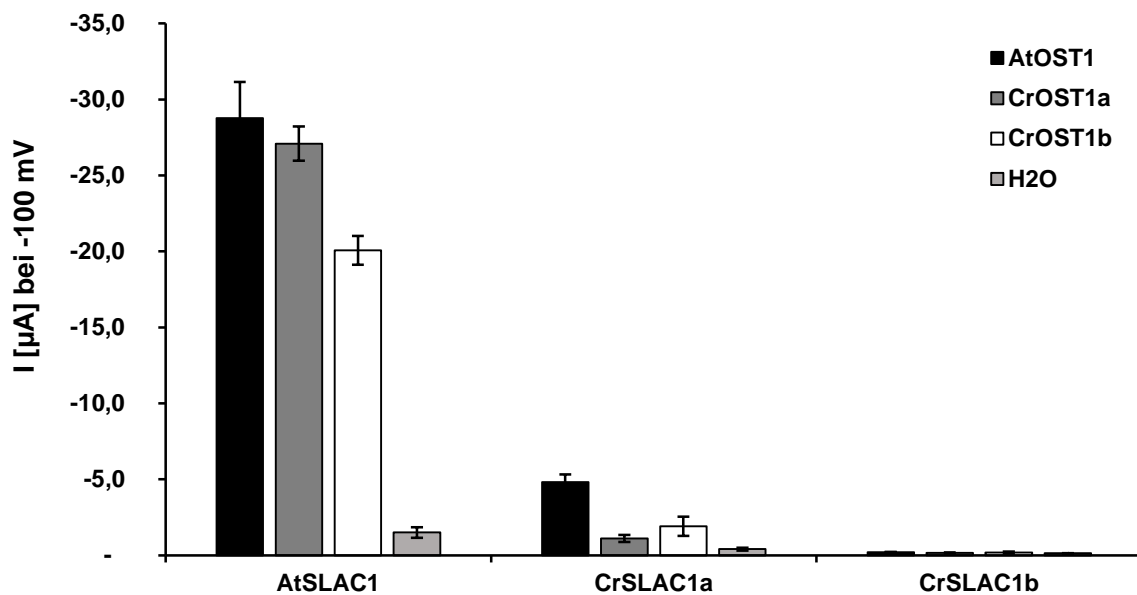


Abbildung 3-22: Charakterisierung der Kanäle *CrSLAC1a/b* aus *Ceratopteris*

Die Koexpression von *AtSLAC1* und den OST1-Kinasen *AtOST1* und *CrOST1a/b* zeigt makroskopische S-Typ-Anionenströme in allen drei OST1-*AtSLAC1*-Kombinationen. Die beiden SLAC-Kanäle aus *Ceratopteris richardii* *CrSLAC1a/b* zeigten weder mit noch ohne OST1 Kinasen makroskopische Ströme. Dargestellt sind die instantanen Ströme bei -100 mV in einer 100 mM NaCl Lösung. (\pm SE; $n \geq 5$)

Die Expression der SLAC-Kanäle und OST1-Kinasen des Farns zeigte ein ähnliches Bild wie bei den bisherigen Versuchspflanzen. Bei der Koexpression von *AtSLAC1* zusammen mit *AtOST1* oder den Kinasen aus *Ceratopteris* *CrOST1a* und *CrOST1b* ließen sich deutliche S-

Typ-Anionenströme messen. In Abwesenheit einer Kinase waren diese *AtSLAC1* vermittelten Ströme verschwunden. Dies zeigt, dass auch die OST1-Kinasen des Farns sowie alle bis dato untersuchten OST1-Kinasen dazu in der Lage waren, den SLAC-Kanal aus *Arabidopsis* zu aktivieren. Die Amplitude der gemessenen *AtSLAC1*-Ströme lag dabei zwischen -20 und -29 μA . Während die Kinasen *AtOST1* und *CrOST1a* zu einer vergleichbaren Aktivierung des Kanals führten, zeigte die Koexpression des Kanals zusammen mit *CrOST1b* eine etwas geringere Stromantwort.

Dagegen führte die Koexpression der beiden SLAC-Kanäle aus *Ceratopteris* zusammen mit *AtOST1* oder den beiden OST1-Kinasen des Farns nur zu geringer messbarer Kanalaktivität. Der Kanal *CrSLAC1a* zeigte zusammen mit *AtOST1* nur geringe S-Typ-Anionenströme mit einer Amplitude von -5 μA . Der Kanal *CrSLAC1b* ließ sich dagegen durch keine der koexprimierten Kinasen aktivieren. Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Messungen der SLAC-Kanäle und OST1Kinasen aus *Ceratopteris*, habe ich auch die Interaktion zwischen den Kanälen und Kinasen untersucht. Dazu wurde die Fluoreszenz der BIFC-Konstrukte mikroskopisch analysiert (Abbildung 5-4 im Anhang). Die BIFC-Analyse ergab, dass sowohl *AtSLAC1* als auch *CrSLAC1a* und *CrSLAC1b* mit *AtOST1* sowie mit *CrOST1a* und *CrOST1b* interagieren.

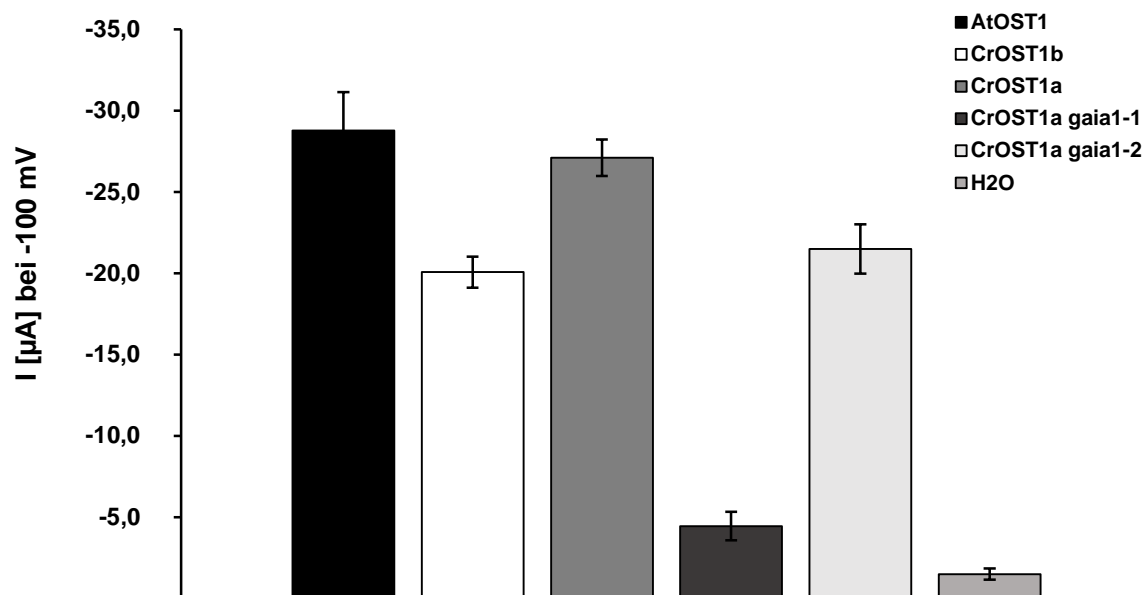


Abbildung 3-23: Vergleich der *CrOST1* Wildtyp Kinasen mit den beiden Mutanten *gaia1-1/2*

Zum Vergleich der beiden Mutanten *gaia1-1* und *gaia1-2* der Kinase *CrOST1a* aus *Ceratopteris* wurden die Kinasen zusammen mit *AtSLAC1* in Oozyten koexprimiert. Die beiden Wildtyp Kinasen *CrOST1a* und *CrOST1b* führen zu einer Aktivierung von *AtSLAC1*. Auch die Mutante *CrOST1a gaia1-2* ist noch dazu in der Lage *AtSLAC1* zu aktivieren, während die Kinasemutante *CrOST1a gaia1-1* den Kanal nicht mehr aktiviert. Dargestellt sind die instantanen Ströme bei -100 mV in einer 100 mM NaCl Lösung. ($\pm\text{SE}$; $n \geq 5$)

Zusätzlich zu den beiden Wildtypformen der Kinasen *CrOST1a* und *CrOST1b* konnte die Arbeitsgruppe in Tasmanien bei der Untersuchung von *Ceratopteris*-Mutanten vier mutierte Pflanzenlinien identifizieren, die im Gen von *CrOST1a* eine Mutation tragen. Identifiziert werden konnten diese Mutanten auf Grund ihres starken Phänotyps in der Sexualentwicklung des Gametophyten der Pflanze. In der Mutante *CrOST1a gaia1-1* führt eine Punktmutation zu dem Aminosäureaustausch R73G. Die Aminosäure befindet sich in einem wichtigen Abschnitt der Kinasedomäne des Proteins, der für die Konformation und die Kinaseaktivität von *CrOST1a* verantwortlich ist. Die Mutante *CrOST1a gaia1-2* entstand durch den Austausch mehrerer Aminosäuren in der ABA-box (Domäne 2) am Ende des CT der Kinase. Dort wurden die letzten drei Aminosäuren SAI der Kinase durch die Aminosäuren RSTEF ersetzt. Die beiden Mutanten zeigten eine Insensitivität auf ABA wodurch die normale Entwicklung der Gametophyten gestört wurde (GAIA = Gametophytes ABA-Insensitive on ACE) (McAdam et al., 2016).

Die ABA-Insensitivität der beiden Mutanten lässt darauf schließen, dass *CrOST1a* eine wichtige Rolle während der Sexualentwicklung der Gametophyten von *Ceratopteris* spielt. Um die Auswirkung der beiden Mutationen auf die Funktionalität der Kinasen bei der Aktivierung von SLAC-Kanälen zu untersuchen, wurden sie zusammen mit *AtSLAC1* und den Wildtyp Kinasen von *Ceratopteris* und *AtOST1* in *Xenopus* Oozyten analysiert (Abbildung 3-24).

Während die beiden Wildtyp-Kinasen *CrOST1a* und *CrOST1b* ebenso wie *AtOST1* den Kanal *AtSLAC1* aktivieren konnten, ließen sich bei der Koexpression der Mutante *CrOST1a gaia1-1* zusammen mit dem Kanal keine S-Typ-Anionenströme mehr messen. Die Mutante *CrOST1a gaia1-2* dagegen war nach wie vor dazu in der Lage den Kanal auf gleichem Niveau zu aktivieren wie die nicht mutierte Kinase. Die gemessenen instantanen Ströme der aktivierten *AtSLAC1*-Kanäle lagen dabei zwischen -20 und -29µA. Die Interaktion der beiden *gaia*-Mutanten mit den *AtSLAC1* und den beiden *CrSLAC*-Kanälen wurde zusätzlich mit Hilfe der BIFC-Analyse untersucht. Während die Mutante *CrOST1a gaia1-2* mit den drei Kanälen nach wie vor interagieren konnte wie die Wildtyp-Kinase, zeigte sich bei der Mutante *CrOST1a gaia1-1* keine BIFC-Fluoreszenz und somit auch keine Interaktion mit den Kanälen (Abbildung 5-4 im Anhang).

Der Wildtyp der Kanäle *CrSLAC1a* und *CrSLAC1b* ließ sich durch die getesteten OST1-Kinasen wenn überhaupt nur in sehr geringem Maß aktivieren. Um die Funktionalität der Kanalproteine zu überprüfen, wurde wiederum das konservierte Phenylalanin in der Pore (Chen et al., 2010) zu einem Alanin mutiert, um die Kanalproteine charakterisieren zu können. Die beiden Kanalmutanten *CrSLAC1a F592A* und *CrSLAC1b F582A* wurden zur weiteren Charakterisierung zusammen mit und ohne *AtOST1* in Oozyten koexprimiert. Bei den Messungen der S-Typ-Anionenströme zeigte sich erneut eine leichte Aktivierung des Wildtypkanals *CrSLAC1a* in Koexpression zusammen mit *AtOST1* mit einer Amplitude von -6

μ A. In der Porenmutante der Kanals *CrSLAC1a* F592A zeigte sich mit Strömen von -19 mV mehr als eine Verdreifachung der Stromamplitude. Damit erreichte der Kanal ca. 50% der Stromintensität des aktivierten *AtSLAC1* Kanals.

Die Mutation in der Pore von *CrSLAC1b* F582A dagegen war nicht dazu in der Lage die Aktivität des Kanalproteins zu erhöhen und es konnten wie im Wildtyp des Kanals keine makroskopischen Ströme gemessen werden. Wie schon die *SmSLAC* Mutanten zeigten weder die Wildtypkanäle *AtSLAC1* und *CrSLAC1a* noch die Phenylalaninmutante *CrSLAC1a* F592A in Abwesenheit einer Kinase eine konstitutive Aktivität, wie sie in den Phenylalaninmutanten von *Klebsormidium* und *Marchantia* zu beobachten war.

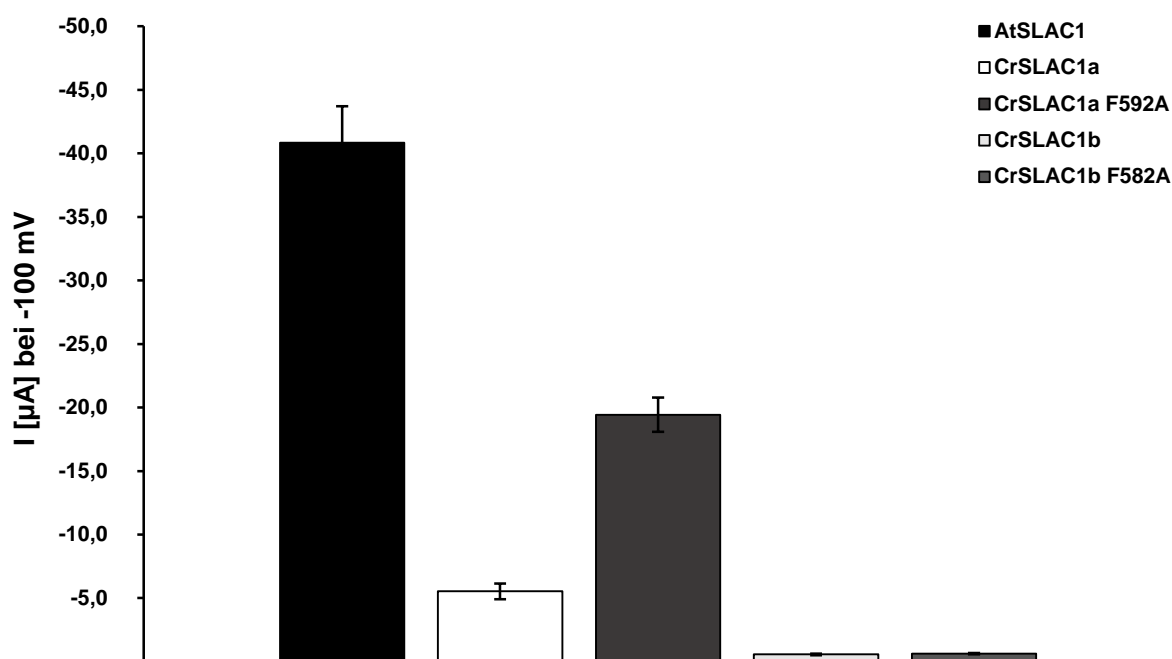


Abbildung 3-24: Untersuchung der Phenylalaninmutanten von *CrSLAC1a/b* aus *Ceratopteris*
Zur Untersuchung der elektrophysiologischen Charakteristika der Kanalproteine aus *Ceratopteris* wurde das für alle untersuchten S-Typ-Anionenkanäle charakteristische Phenylalanin in der Pore mutiert und durch ein Alanin ersetzt. Die Mutanten *CrSLAC1a* F592A und *CrSLAC1b* F582A wurden anschließend zusammen mit der Kinase *AtOST1* in *Xenopus* Oozyten koexprimiert. Die Messungen der instantanen Ströme erfolgte in einer 100 mM NaCl Lösung bei einer Spannung von -100 mV. (\pm SE; $n \geq 5$)

Die Messungen der Phenylalaninmutante *CrSLAC1a* F592A lässt darauf schließen, dass es sich bei *CrSLAC1a* vermutlich um ein funktionelles Kanalprotein handelt. Die N- und C-Termini von *CrSLAC1a* und *CrSLAC1b* sind deutlich länger als die von *AtSLAC1*. Mit 333 und 323 As Länge sind vor Allem ihre N-Termini um fast 150 As länger als der NT von *AtSLAC1*. Betrachtet man die Sequenz der Termini und vergleicht sie mit dem Kanal aus *Arabidopsis*, finden sich in beiden Kanälen von *Ceratopteris* Homologe Sequenzen mit den beiden Serinen S59A und

S120A aus *AtSLAC1*. Auch die in den *PpSLACs* entdeckte konservierte Domäne am Anfang des CT ist in beiden *CrSLACs* bis auf eine Aminosäure konserviert.

Um die Regulation des Kanals genauer zu untersuchen habe ich wie schon für die SLAC-Kanäle aus *Physcomitrella* oder *Selaginella* Chimären aus *CrSLAC1a* mit den Termini von *AtSLAC1* kloniert. Die Chimäre *CrSLAC1a-AtCT*, deren CT durch den Terminus von *AtSLAC1* ausgetauscht wurde, zeigte keine deutliche Veränderung im Verhalten des Kanals. Die N-terminale Mutante *AtNT-CrSLAC1a* mit dem NT des *Arabidopsis* Kanals zeigte eine deutliche Erhöhung der Anionenströme im Vergleich zum Wildtyp *CrSLAC1a*. Während sich für *CrSLAC1a* nur Ströme mit einer Amplitude von $-6 \mu\text{A}$ messen ließen, zeigte die N-terminale Chimäre mit $-18 \mu\text{A}$ eine Verdreifachung der Stromamplitude. Nur zusammen mit der aktivierenden Kinase *AtOST1* konnten Ströme für die beiden Chimären wie auch die Wildtypkanäle *AtSLAC1* und *CrSLAC1a* gemessen werden.

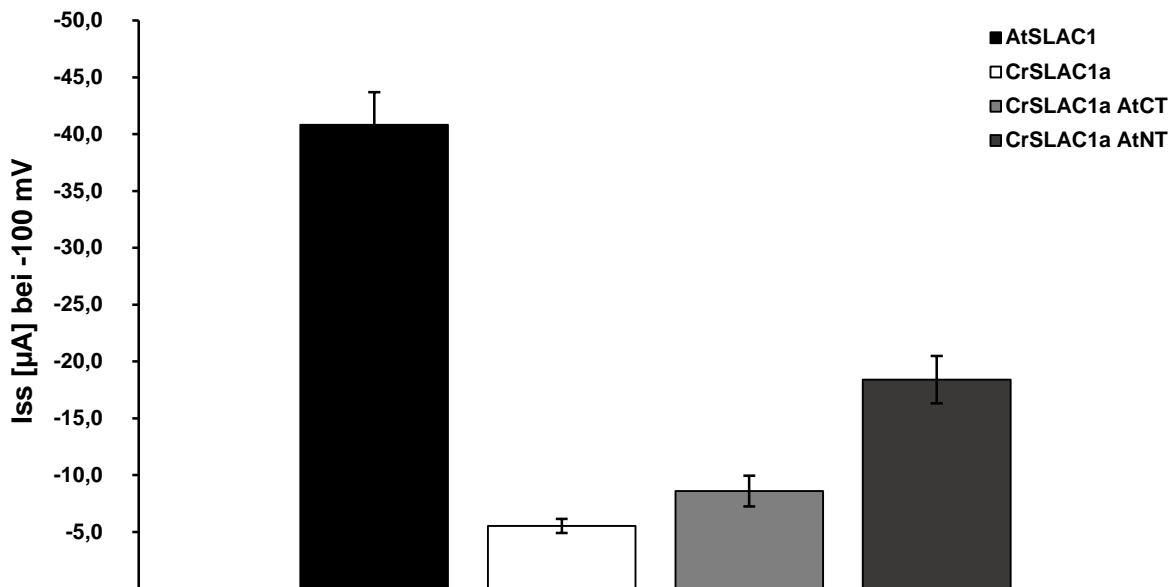


Abbildung 3-25: Die Wirkung der Termini von *AtSLAC1* auf die Aktivität von *CrSLAC1a*

Mit Hilfe von Chimären aus *AtSLAC1* und *CrSLAC1a* wurde die Aktivierbarkeit von *CrSLAC1a* untersucht. In den beiden Mutanten *CrSLAC1a-AtCT* und *AtNT-CrSLAC1a* wurde der Kanal aus *Ceratopteris* mit dem C- oder dem NT von *AtSLAC1* ausgestattet und die Wirkung auf den Kanal in elektrophysiologischen Messungen untersucht. Während der Austausch des CT nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität von *CrSLAC1a* ergab, führte der Austausch der NT zu einer deutlichen Erhöhung der messbaren Anionenströme. Dazu wurden die instantanen Ströme in einer 100 mM NaCl Lösung bei einer Spannung von -100 mV aufgezeichnet. ($\pm\text{SE}$; $n \geq 5$)

4. Diskussion

4.1 Die Entwicklung der OST1 Kinasen im Laufe der pflanzlichen Evolution.

Seitdem die ersten Pflanzen vor ca. 700 bis 470 Mio. J das Meer verließen, um das Land zu besiedeln, war die Kontrolle ihres Wasserhaushalts von essenzieller Bedeutung für ihr Überleben (Gehrig et al., 1996; Kenrick and Crane, 1997; Selosse and Le Tacon, 1998; Raven, 2002). Um sich in terrestrischen Habitaten ausbreiten zu können, mussten sie sich im Laufe von Millionen von Jahren an die sehr unterschiedliche Verfügbarkeit von Wasser in dieser neuen Umgebung anpassen. Dazu entwickelten die Pflanzen Systeme, um ihren Wasserverlust zu minimieren und das verfügbare Wasser möglichst effizient zu nutzen. Die erste entscheidende Anpassung daran war wahrscheinlich die Ausbildung einer abdichtenden Cuticula, die eine unkontrollierte Transpiration verhindert (Edwards D, 1996). Allerdings ist auch der Gasaustausch mit der Atmosphäre für die Pflanzen essenziell, um effektiv Photosynthese betreiben zu können. Die Entwicklung interzellulärer Gasräume, um die Oberfläche des photosynthetischen Gewebes zu erhöhen, war eine notwendige Anpassung, um die Aufnahme von CO₂ zu steigern. Durch die Internalisierung dieser Grenzfläche, konnte der durch Transpiration entstehende Wasserverlust zusätzlich reduziert werden. Allerdings ermöglichten erst die Stomata, die vor ca. 400 Mio. J zum ersten Mal auftauchten, eine effektive Regulation des Gasaustauschs mit der Atmosphäre (Cowan and Farquhar, 1977; Raven, 1977, 2002). Die Regulation der Stomata funktioniert über unterschiedliche hoch komplexe und oft miteinander vernetzte Signalwege. Unterschiedliche Signale führen dabei zum Öffnen und Schließen der Stomata auf Grund diverser Umweltbedingungen. Ein gut untersuchter Signalweg in den Schließzellen ist die ABA-Signalkaskade, die zum Schließen der Stomata in Samenpflanzen führt (Geiger et al., 2009; Geiger et al., 2011).

Ein unersetzbarer Teil der ABA-Signalkette in Schließzellen höherer Pflanzen ist die Proteinkinase OST1. Ein Verlust von OST1 führt zum stärksten bekannten Wasserverlustphänotyp in *Arabidopsis*, so dass diese Mutanten nur bei hoher Luftfeuchtigkeit gehalten werden können (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002). Diese Kinase gehört zur Familie der SnRK2-Kinasen, die neben der Regulation von Anionenkanälen, in vielen unterschiedlichen Prozessen in pflanzlichen Zellen eine essenzielle Rolle spielen (Hrabak et al., 2003). Das OST1 Gen wurde in *Arabidopsis thaliana* im Jahr 2002 als eine ABAK (**A**BA **a**ctivated **p**rotein **k**inase) identifiziert und konnte in Verlustmutanten als Teil der ABA Signalkette identifiziert werden (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002). In diesen OST1

Verlustmutanten *ost1-1* und *ost1-2* zeigte sich ein starker Phänotyp in der ABA abhängigen Regulation der Stomata, dem die Kinase auch ihren Namen verdankt (open stomata). Die Kinase wirkt als positiver Regulator des Stomaschlusses, indem sie den S-Typ-Anionenkanal SLAC1 aktiviert (Abbildung 4-1) und damit den Stomaschluss initiiert (Geiger et al., 2009; Maierhofer et al., 2014a). Die ersten Stomata entwickelten sich erst vor ca. 400 Mio. J im kleinen sporophytischen Teil der Horn- und Laubmoose (Paton and Pearce, 1957), jedoch erst ab der Entstehung der Lycophyten vor ca. 360 Mio. J finden sich Stomata im Großteil des Sprosses der Pflanzen. Außer bei der Kontrolle der Stomata spielt ABA auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression von ABA-abhängigen Genen (Abbildung 4-1) (Yoshida et al., 2002). Dieser transkriptionelle Weg der ABA-Signalkaskade ist nicht auf die Stomata beschränkt und könnte daher auch schon vor deren Entstehung eine Rolle in Pflanzen gespielt haben, z.B. bei der Austrocknungstoleranz und Trockenheitsadaptation.

Um die Rolle der OST1-Kinase für die ABA-Signalkaskade im Laufe der pflanzlichen Evolution zu beleuchten, wurde in dieser Arbeit die Funktion von insgesamt 13 OST1-Kinasen beginnend mit der Alge *Klebsormidium nitens*, den Moosen *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens*, dem Lycophyten *Selaginella moellendorffii*, bis hin zum Farn *Ceratopteris richardii* im Vergleich zur Samenpflanze *Arabidopsis thaliana* untersucht. Betrachtet man den Aufbau der unterschiedlichen Kinasen zeigt sich, dass schon die OST1-Kinase der Alge *Klebsormidium* in ihrer Proteinsequenz zu 76% mit der Sequenz von *AtOST1* aus der evolutionsgeschichtlich gesehen sehr jungen Samenpflanze übereinstimmt (Tabelle 3-2). Insgesamt zeigen alle 13 Kinasen eine sehr hohe Homologie zu einander und die ABA-Box am Ende ihrer C-Termini identifiziert sie alle als ABA-abhängige SnRK2-Kinasen (Yoshida et al., 2006), die über dieses Motiv mit PP2C Phosphatasen interagieren können (Abbildung 5-2 im Anhang).

Die elektrophysiologischen Untersuchungen der Kinasen zusammen mit den jeweiligen SLAC-Kanälen als potentiellen Interaktionspartnern zeigten, dass sich die Kinasen auch in der Spezifität ihrer Zielproteine im Laufe der Evolution nicht stark verändert haben. So sind alle 13 OST1-Kinasen aus den sechs verschiedenen Spezies dazu in der Lage den S-Typ-Anionenkanal aus *Arabidopsis*, *AtSLAC1*, zu aktivieren (Abbildung 3-5, 17 und 21). Während diese Interaktion zwischen *AtOST1* und *AtSLAC1* auch schon in anderen Samenpflanzen gezeigt werden konnte, zeigt die Aktivierung des Kanals die starke Konservierung der OST1-Kinasen in Bezug auf ihre Zielproteine. Diese Interaktion lässt sich auch in den BIFC-Interaktionsstudien zwischen *AtSLAC1* mit allen betrachteten OST1-Kinasen von der Alge bis hin zur Samenpflanze beobachten (Abbildung 3-3, Abbildung 5-3 und 4 im Anhang). Die Koexpression der BIFC-Konstrukte der Kinasen mit den jeweiligen SLAC-Kanälen der eigenen Art oder den Kanälen der anderen Versuchspflanzen erzeugte dabei ebenfalls bei den meisten Pärchen ein Fluoreszenzsignal, das sich nicht von der Interaktion der Kanäle mit *AtOST1*

unterschied (Abbildung 3-8, Abbildung 5-3 und 4 im Anhang). Die 13 getesteten OST1-Kinasen scheinen also zu einer Interaktion mit den unterschiedlichen SLAC-Kanälen in der Lage zu sein, allerdings handelt es sich dabei nur in wenigen Fällen um eine funktionelle Interaktion, d.h. die Interaktion resultierte zumeist nicht in einer Aktivierung des Anionenkanals. Bei der Koexpression der unterschiedlichen OST1-Kinasen zusammen mit *AtSLAC1* kam es allerdings bei allen getesteten Kombinationen zu einer messbaren Aktivierung des Kanals durch die Kinasen, also einer funktionellen Interaktion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die OST1-Kinasen im Laufe der Evolution nicht verändert haben, um die S-Typ-Anionenkanäle aktivieren zu können, sondern die Anionenkanäle müssen sich im Laufe der Evolution auf die Kinasen zubewegt haben.

Neben der Aktivierung von *AtSLAC1* durch alle OST1-Kinasen zeigt sich nur in einem weiteren OST1/SLAC-Paar aus dem Moos *Physcomitrella patens* eine funktionelle Interaktion zwischen der Kinase und dem Kanal (Abbildung 3-5). Die Kinase *PpOST1.2* und der Kanal *PpSLAC1* des Laubmooses zeigten sich in den elektrophysiologischen Untersuchungen als funktionelles Kinase/Kanal-Paar. *PpSLAC1* stellt somit neben *AtSLAC1* den einzigen hier untersuchten Wildtyp SLAC1-Kanal dar, der durch eine oder mehrere OST1-Kinasen (*PpOST1.2* und *AtOST1*) aktiviert werden kann (Abbildung 3-5 und 6). Für eine physiologische Relevanz dieser Interaktion zwischen OST1 und SLAC1 ist es allerdings erforderlich, dass die beiden Proteine spezifisch in den Schließzellen exprimiert werden und nicht in dem die Schließzellen umgebenden Gewebe. Nur diese isolierte Expression der beiden Gene in den Schließzellen ermöglicht die spezifische ABA-abhängige Regulation der Stomata über OST1 und SLAC1. Wenn die benachbarten Epidermiszellen und die Schließzellen selbst als Antwort auf Trockenheit gleichzeitig ihren Turgordruck vermindern würden, dann verlören die Schließzellen ihr Widerlager und ein Porenschluss könnte nicht stattfinden. Ob die beiden Proteine *PpOST1.2* und *PpSLAC1* aus dem Moos *Physcomitrella patens* dieses spezifische Expressionsmuster besitzen, ist jedoch noch nicht geklärt. Mit seiner sehr geringen Anzahl an Stomata auf dem kleinen Sporophyten des Laubmooses besitzen die Stomata jedoch auch im Fall einer Regulation durch das identifizierte Kanal/Kinase-Paar wahrscheinlich nur einen sehr geringen Einfluss auf den Wasserhaushalt der gesamten Pflanze (hauptsächlich Gametophyt). Bei der ABA-abhängige Genexpression (Abbildung 4-1 links) handelt es sich um einen konservierten Signalweg, der schon in Moosen gezeigt werden konnte (Richardt et al., 2010; Tougane et al., 2010; Timmerhaus et al., 2011). Die Funktionalität der *Physcomitrella* OST1-Kinasen im ABA-Signalweg in Samenpflanzen konnte schon durch Komplementations-Experimente gezeigt werden (Chater et al., 2011; Ruszala et al., 2011). In den hier durchgeführten Luciferaseassays konnte die starke Konservierung der Rolle der OST1-Kinasen in der Regulation der Expression von ABA-abhängigen Genen bestätigt werden (Abbildung 3-16). Neben der Kinase *PpOST1.2* aus *Physcomitrella* wurden dabei auch die

Kinasen *KnOST1* und *MpOST1.1* aus der Alge *Klebsormidium* und dem Lebermoos *Marchantia* auf ihre Funktionalität bei der Regulation von ABA-abhängigen Genen getestet. Alle drei OST1 Kinasen waren dabei ebenso wie *AtOST1* dazu in der Lage die Expression des Reportergens Luciferase in Abhängigkeit von ABA zu regulieren. Dies zeigt, dass die OST1-Kinasen schon in den Grünalgen noch vor der Entstehung erster richtigen Landpflanzen zur ABA-abhängigen Regulation von Genen in der Lage waren.

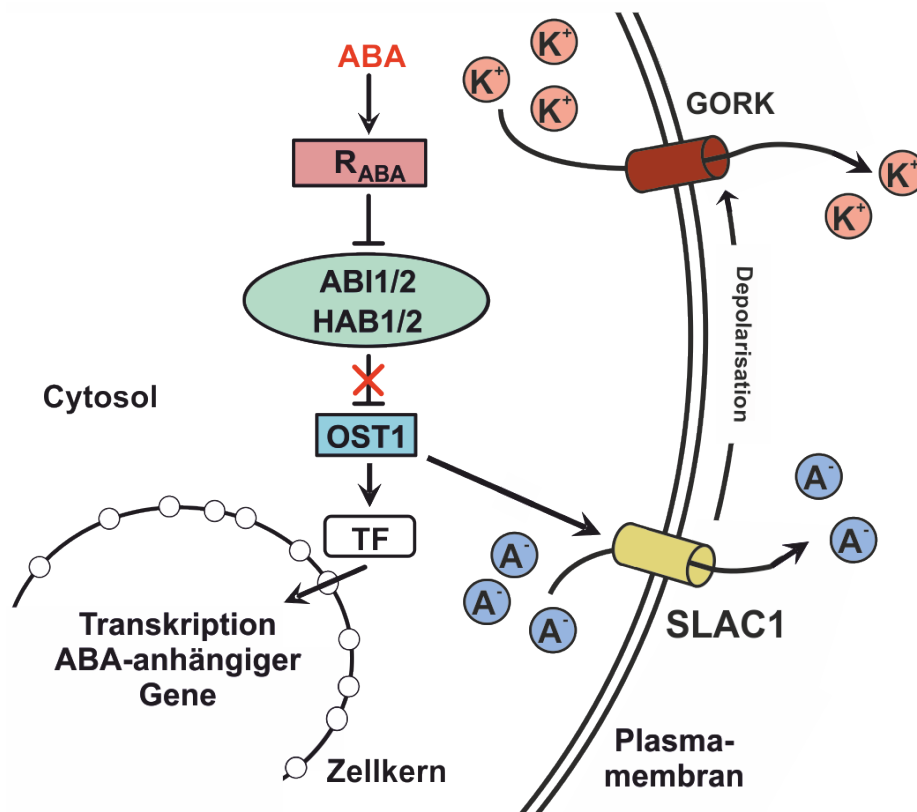


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des ABA-Signalweg in *Arabidopsis thaliana*

Der ABA-Signalweg teilt sich in zwei Äste auf. Über die Modifikation von Transkriptionsfaktoren (TF) kann OST1 die Transkription von ABA-Abhängigen Genen regulieren (=langsamer ABA-Signalweg; unten links) oder in den Samenpflanzen über die direkte Aktivierung von SLAC1 den Stomaschluss einleiten (= schneller ABA-Signalweg; rechts). In Abwesenheit von ABA wird die Aktivität der OST1-Kinase allerdings durch PP2C-Phosphatasen (ABI1/2, HAB1/2) unterdrückt. In Anwesenheit von ABA binden die ABA-Rezeptoren (R_{ABA}) an die Phosphatasen, inhibieren diese und OST1 wird durch eine Autophosphorylierung aktiv.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei diesem über die Regulation der Genexpression funktionierenden langsamen Teil des ABA-Signalwegs (Abbildung 4-1 links) wahrscheinlich um eine hoch konservierte alte Signalkaskade handelt, die noch vor der Entstehung der ersten Embryophyten entstand. Schon die Algen, die begannen den neuen Lebensraum an Land zu erschließen, waren vermutlich als erste pflanzliche Organismen in der Lage, sich mittels ABA-gesteuerter Genexpression an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen

4.2 Die negative Regulation des ABA-Signalwegs

Die Aktivität der OST1-Kinasen unterliegt in den Samenpflanzen einer strengen Kontrolle. Dafür sind vor Allem der Komplex aus ABA-Rezeptoren der PYR/PYL/RCAR-Familie und den PP2C-Phosphatasen (Co-Rezeptoren) verantwortlich, die in Abwesenheit von ABA zusammen als negative Regulatoren der OST1-Kinasen identifiziert werden konnten (Yoshida et al., 2006; Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Soon et al., 2012). In Abwesenheit von ABA binden die Phosphatasen an die ABA-Box der Kinase (Abbildung 5-2 im Anhang) und verhindern damit die Autophosphorylierung der Kinase und unterdrücken so ihre Aktivität (Abbildung 4-1). In *Arabidopsis thaliana* konnte unter anderem die Phosphatase AtABI1 als negativer Regulator von OST1 und SLAC1 identifiziert werden (Yoshida et al., 2006; Geiger et al., 2009; Vlad et al., 2009; Soon et al., 2012).

Hier konnte gezeigt werden, dass schon die Kinase *KnOST1* aus der Grünalge *Klebsormidium* eine ABA-Box für die Interaktion mit Phosphatasen des ABA-Signalwegs besitzt wie auch alle anderen untersuchten OST1-Kinasen (Abbildung 5-2 im Anhang). Die drei Phosphatasen *MpABI1* und *PpABI1a/b* aus den beiden untersuchten Bryophyten, zeigten in *Xenopus* Oozyten schon eine vergleichbare Inhibierung der Kinaseaktivität von OST1 wie die PP2C-Phosphatase *AtABI1* aus *Arabidopsis*. Die Koexpression der Moos-Phosphatasen zusammen mit OST1-Kinasen und *AtSLAC1* zeigte ebenfalls eine deutliche Reduzierung der Aktivität der Kinasen (Abbildung 3-15). Der Vergleich der drei klonierten Phosphatasen aus den Moosen mit der Phosphatase *AtABI1* des ABA-Signalwegs aus *Arabidopsis* zeigt, dass die Proteine der Moose sich deutlich von denen der Samenpflanze unterscheiden (Tabelle 3-3). Doch obwohl die ABI1-Phosphatasen aus *Marchantia* und *Physcomitrella* mit 47 bis 50% identischer Aminosäuresequenz keine sehr starke Homologie zu *AtABI1* besitzen, scheint ihre Funktionalität im heterologen Expressionssystem nahezu identisch zu sein (Abbildung 3-15).

Untersuchungen der Kinetik des Stomaschlusses und der Stomaöffnung in unterschiedlichen Pflanzenarten haben gezeigt, dass die Stomata von Lycophyten und Farnen nicht auf endogenes ABA reagieren (McAdam and Brodribb, 2012). Die beiden hier untersuchten GAIA-Mutanten der Kinase *CrOST1a* aus *Ceratopteris richardii* deuteten darauf hin, dass auch schon in dem Farn die PP2C-Phosphatasen eine wichtige Rolle bei der Regulation der OST1-Kinaseaktivität und damit im ABA-Signalweg spielen. Die beiden Mutanten *gaia1-1* und *gaia1-2* tragen zwei unterschiedliche Mutationen im Gen der OST1-Kinase *CrOST1a*. Beide Mutationen zeigten einen starken ABA-abhängigen Phänotyp in der Sexualentwicklung des Gametophyten des Farns (McAdam et al., 2016). Die Expression der Kinasen zusammen mit *AtSLAC1* zeigte, dass es sich bei der Mutante *CrOST1a gaia1-1* um eine fatale Mutation des Proteins handelt, während die Mutante *CrOST1a gaia1-2* im

heterologen Expressionssystem noch voll funktionsfähig zu sein schien (Abbildung 3-23). Die Mutation der *gaia1-1* Mutante liegt in einem Bereich des Proteins, der für die Kinaseaktivität und die Konformation der Kinase verantwortlich ist (McAdam et al., 2016). Diese mögliche Veränderung in der Konformation oder der Kinaseaktivität erklärt die fatale Auswirkung der Mutation auf die Kinase. Die Mutation der Mutante *gaia1-2* dagegen befindet sich am Ende der ABA-Box des Proteins (Abbildung 5-2 im Anhang). Dadurch ist die Kinase wahrscheinlich nicht mehr dazu in der Lage mit den PP2C-Phosphatasen in *Ceratopteris* zu interagieren und verliert somit ihre ABA-abhängige Regulation. Im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten dagegen bleibt die Kinaseaktivität der Mutante *gaia1-2* durch die Veränderung in der ABA-Box des Proteins jedoch unbeeinträchtigt. Auch wenn die Stomata des Farns noch nicht durch ABA reguliert werden, zeigen die hier untersuchten GAIA Mutanten aber, dass der langsame ABA-Signalweg über die Genexpression bereits eine große Rolle in der Entwicklung des Farns (z.B. Sexualbestimmung) spielt.

4.3 Die SLAC1 Kanäle entwickelten sich im Laufe der Evolution auf die ABA-Signalkaskade zu

Der Kanal SLAC1 gehört zur Familie der S-Typ-Anionenkanäle und spielt eine essenzielle Rolle bei der Regulation der Stomata in Samenpflanzen. SLAC1 wird hier spezifisch in den Schließzellen exprimiert und ist ein Schlüsselement des Stomaschlusses (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008; Geiger et al., 2009). Durch die Aktivierung des S-Typ-Anionenkanals kommt es dabei zu einem Ausstrom von Cl⁻ aus den Schließzellen, was wiederum eine Depolarisation der Plasmamembran nach sich zieht. Durch die Depolarisation der Plasmamembran werden K⁺-Auswärtskanäle aktiviert und es kommt zu einem zusätzlichen Ausstrom von K⁺ aus den Zellen. Der kombinierte Ausstrom von Anionen und Kationen führt durch den fallenden Turgor der Schließzellen schließlich zum Stomaschluss. Während die unterschiedlichen Signalkaskaden, die zur Aktivierung von SLAC1 führen in Samenpflanzen schon ausgiebig erforscht wurden (Mori et al., 2006; Scherzer et al., 2012; Maierhofer et al., 2014a), ist über die genaue Regulation oder die Rolle von SLAC1 in evolutiv älteren Pflanzenfamilien nur wenig bekannt.

Die elf in dieser Arbeit untersuchten SLAC-Kanäle aus sechs verschiedenen Versuchspflanzen unterscheiden sich deutlich stärker voneinander als die untersuchten OST1-Kinasen. Mit einer Homologie der Aminosäuresequenz von nur 32 bis 59% im Vergleich mit *AtSLAC1* (Tabelle 3-1) unterscheiden sich die einzelnen Kanäle deutlich voneinander. Das SLAC1-Kanalprotein kann in drei Abschnitte unterteilt werden: den zytosolischen N-Terminus,

die transmembranen Domänen (bestehend aus zehn Transmembranen Helices) und den zytosolischen C-Terminus (Chen et al., 2010). Von diesen drei Abschnitten zeigen die transmembranen Domänen der Proteine die höchste Homologie zu einander. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die N- und C-Termini nicht nur in ihrer Länge stark voneinander, sondern auch in ihrem Aufbau (Abbildung 4-2).

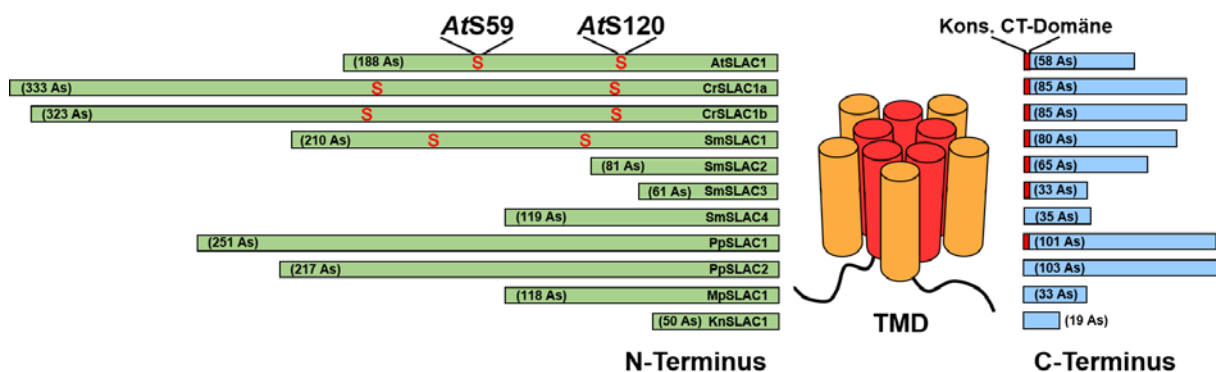


Abbildung 4-2: Struktur der SLAC-Kanäle aus Algen bis hin zu den Samenpflanzen

Das vereinfachte Schema der Struktur der SLAC-Kanäle teilt die Proteine in drei Abschnitte auf. In Grün sieht man die unterschiedlich langen N-Termini der verschiedenen Kanäle, die sich in ihrer Länge stark unterscheiden. Der anschließende Bereich aus zehn Transmembranen (TMD=Transmembrane-Domäne), die in zwei ineinander liegenden Ringen die Pore bilden, stellt den am stärksten konservierten Bereich der Proteine dar. Der blaue C-Terminus der Kanäle zeigt erneut eine starke Varianz zwischen den unterschiedlichen Kanalproteinen. In Rot wurden die konservierten Phosphorylierungsstellen des N-Terminus S59 und S120 aus AtSLAC1 markiert, so wie die konservierte Domäne am Anfang des C-Terminus (maximal eine abweichende As).

Bei der Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften der SLAC-Kanäle zeigte sich, dass AtSLAC1 aus *Arabidopsis* sich durch alle getesteten OST1-Kinasen aktivieren lässt. Außer AtSLAC1 konnte nur der Wildtyp des Kanals PpSLAC1 durch zwei der OST1 Kinasen deutlich aktiviert werden (Abbildung 3-5). Um die Kanalproteine aus *Klebsormidium*, *Marchantia*, *Selaginella* und *Ceratopteris* untersuchen zu können, wurden Mutanten der SLAC-Kanäle auf Basis der im Jahr 2010 in AtSLAC1 entdeckten Mutation des Phenylalanins F450 in der Pore des Kanals in Transmembrane Nummer neun generiert (Abbildung 3-12, 13, 20 und 24) (Chen et al., 2010). In AtSLAC1 sowie dem entfernt verwandten Kanal HtTehA aus dem Bakterium *Haemophilus influenzae* führt die Substitution dieses Phenylalanins durch ein Alanin zu einer konstitutiven Aktivität (Kinase-unabhängigen) der Kanäle.

In allen hier untersuchten Phenylalaninmutanten zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Kanalaktivität. In den beiden Porenmutanten von KnSLAC1 (F318A) und MpSLAC1 (F389A) aus der Alge und dem Lebermoos war eine konstitutive Aktivität der Kanäle nach der Substitution des Phenylalanins durch ein Alanin zu erkennen - vergleichbar zu den Mutanten in AtSLAC1 und HtTehA (Chen et al., 2010). Im Gegensatz dazu können die Mutanten aus *Ceratopteris* und *Selaginella* nur durch die Koexpression zusammen mit einer aktivierenden

Kinase aktiviert werden. Durch die Substitution des Phenylalanins in der Pore wird der Permeationsweg der Kanäle geöffnet. In dem Kanal der Alge oder des Laubmooses scheint dieses Öffnen der Pore für die Aktivierung des Kanals auszureichen. In den Kanälen aus dem Lycophyten und dem Farn dagegen scheint dies alleine nicht auszureichen um die Kanäle zu aktivieren. Die Kontrolle der Kanäle ist vermutlich schon enger mit einer aktivierenden Kinase wie OST1 verknüpft und daher benötigen auch die Phenylalaninmutanten der Kanäle noch eine interagierende Kinase für ihre Aktivierung.

Die Regulation von *AtSLAC1* erfolgt über die Phosphorylierung von speziellen Serinen und Threoninen im N- und C-Terminus des Proteins (Geiger et al., 2009; Geiger et al., 2010). Die in *AtSLAC1* bekannten Phosphorylierungsstellen S59 und S120 im N-Terminus des Kanals (Maierhofer et al., 2014a) sind nur in den N-Termini von drei weiteren SLAC-Kanälen aus *Ceratopteris* (*CrSLAC1a* und *CrSLAC1b*) und *Selaginella* (*SmSLAC1*) zu finden (Abbildung 4-2; Abbildung 5-1). Bei diesen drei Kanälen handelt es sich um die Kanalproteine, in denen die Phenylalaninmutation in der Pore alleine noch nicht für die Aktivierung der Kanäle ausreichte. Durch die Mutation des Phenylalanins wurde die Pore dieser Kanäle zwar vermutlich voraktiviert, jedoch konnten die Kanäle erst durch die Interaktion und die damit einhergehenden Phosphorylierungen in den Termini aktiviert werden. Durch die Interaktion und die Phosphorylierung kommt es vermutlich zu einer Konformationsänderung in der Pore der Kanäle, die zu dessen Öffnung führt. Die Kanäle aus *Klebsormidium* und *Marchantia* dagegen besitzen noch keine regulatorischen Elemente in ihren kurzen Termini und daher führt schon die Mutation in der Pore alleine zu einer Öffnung der Kanäle. Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierungsstellen in den Termini von SLAC1 entscheidend sind für die Regulation ihrer Aktivität durch OST1-Kinasen (Geiger et al., 2009). Diese Form der Regulation entstand vermutlich im Laufe der Evolution der ersten Gefäßpflanzen also mit der Entstehung der Lycophyten (Abbildung 4-4).

Die Charakterisierung der Chimären aus *PpSLAC1* und *AtSLAC1* ist ein weiterer Beweis für die entscheidende Rolle der regulatorischen Elemente in den Termini der SLAC-Kanäle. So zeigen die Chimären, dass die Aktivierbarkeit von *AtSLAC1* mit dem N-Terminus des Kanals auf *PpSLAC1* übertragen werden kann (Abbildung 3-7). Die Regulatorischen Elemente im N-Terminus von *AtSLAC1* sind in der Chimäre dazu in der Lage die Aktivierung des Kanals durch OST1-Kinasen vergleichbar zu *AtSLAC1* zu bewerkstelligen. Vergleicht man die Sequenzen der Termini aller SLAC-Kanäle, so zeigt sich, dass der größte Teil der Termini keinerlei Homologien zu einander aufweisen. An den Chimären und Mutanten aus *PpSLAC2* und *AtSLAC1* erkennt man, dass der N-Terminus jedoch nicht alleine für die Interaktion mit den OST1-Kinasen verantwortlich sein kann. Für eine vollständige Aktivierung von *PpSLAC2* war es nötig den Kanal mit beiden Termini von *AtSLAC1* (*AtNT-PpSLAC2-AtCT*) oder dem NT und der konservierten Domäne im CT auszustatten. Auch im C-Terminus der Kanäle finden sich

regulatorische Domänen, die eine entscheidende Rolle bei deren Aktivierung durch Kinasen spielen. In *AtSLAC1* findet sich am Anfang des C-Terminus eine weitere wichtige Phosphorylierungsstelle, das Threonin T513. In *Arabidopsis* führt eine Substitution dieses Threonins durch ein Aspartat zu einer konstitutiven Aktivität von *AtSLAC1*. Das Aspartat ahmt dabei eine Phosphorylierung des Threonins nach, was zu einer dauerhaften Aktivierung des Kanals führt (Maierhofer et al., 2014a). Beim Vergleich der Sequenz am Anfang der C-Termini der untersuchten SLAC-Kanäle findet sich in den untersuchten Kanälen eine stark konservierte Region direkt vor diesem besagten Threonin (Abbildung 4-3). Sequenzvergleiche von Ingo Dreyer zeigten, dass die Sequenz dieser zehn Aminosäuren langen Domäne in den SLAC-Kanälen von Samenpflanzen stark konserviert ist (Lind et al., 2015). Die Mutation dieser Domäne in der Chimäre *AtNT-PpSLAC2-CT_{MUT}* bestärkte die Vermutung, dass dieses konservierte Element des C-Terminus eine große Bedeutung für die Aktivierung des Kanals durch OST1 besitzt (Abbildung 3-10). Auch ohne das Threonin im Anschluss an die konservierte Domäne ermöglichen die regulatorischen Elemente des *AtN*-Terminus und die konservierte C-terminale Domäne eine funktionelle Interaktion der Chimäre mit allen OST1-Kinasen aus Algen, Moosen und *Arabidopsis*. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion der OST1-Kinasen mit den SLAC-Kanälen nicht nur auf der Phosphorylierung regulatorischer Elemente des N-Terminus beruht, sondern auch der C-Terminus eine entscheidende Rolle für die funktionelle Interaktion des Kinase/Kanal-Paares besitzt.

Im Laufe der pflanzlichen Evolution hat sich *SLAC1* stark verändert. Während sich die konservierte Domäne im CT des Kanals schon recht früh in den Laubmoosen stabilisierte (Abbildung 4-3), entwickelten sich die Phosphorylierungsstellen im NT der *SLAC1*-Kanäle erst in den Gefäßpflanzen ab den Lycophyten (Abbildung 4-4).

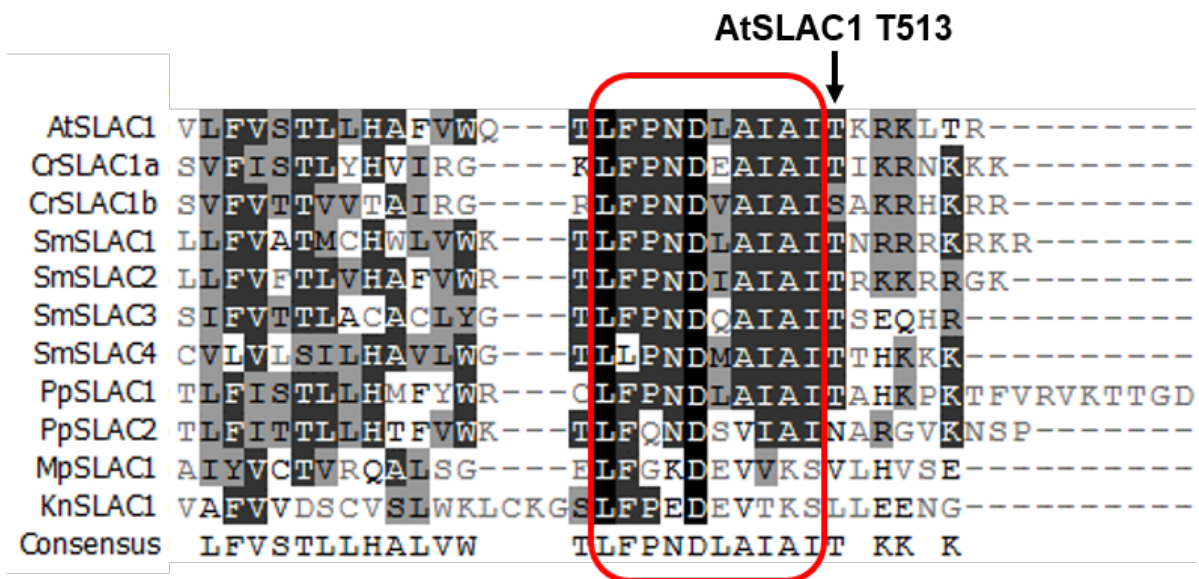


Abbildung 4-3: Vergleich der konservierten Domäne im CT der SLAC-Kanäle

Die konservierte Domäne (rot umrahmt) am Anfang des C-Terminus der SLAC-Kanäle ist ein vor Allem in den Samenpflanzen hoch konservierter Bereich. Vergleicht man die Sequenz der untersuchten SLAC-Kanäle sieht man, dass die Konservierung von unten nach oben tendenziell zunimmt. Während in *KnSLAC1* und *MpSLAC1* die Homologie zu *AtSLAC1* noch sehr gering ausfällt, findet sich in *PpSLAC2* schon eine Homologie von 70% und in *PpSLAC1* eine vollständige Übereinstimmung. Direkt hinter dem konservierten Bereich befindet sich die für *AtSLAC1* wichtige Phosphorylierungsstelle T513, die ebenfalls bereits in *PpSLAC1* auftaucht und sich etabliert.

4.4 *Selaginella* markiert den Scheitelpunkt in der Evolution der S-Typ-Anionenkanäle

Der Moosfarn *Selaginella moellendorffii* ist als Modellpflanze der Lycophyten der erste vollständig sequenzierte Vertreter der Gefäßpflanzen (Kenrick and Crane, 1997). Damit stellt der Lycophyt in dieser Arbeit auch die evolutionär älteste Versuchspflanze mit Stomata in den photosynthetisch-aktiven Blättern dar. Während sich in den Genomen der restlichen verwendeten Versuchspflanzen je nur ein oder zwei SLAC-Kanäle finden, besitzt *Selaginella* vier *SmSLACs*. Die vier SLAC-Kanäle unterscheiden sich stark in ihrem Aufbau und besitzen sehr unterschiedliche Eigenschaften. Während *SmSLAC1* mit einer Länge von 210 (NT) und 80 As (CT) die längsten Termini der vier Kanalproteine besitzt (ähnliche Länge wie *AtSLAC1* Termini), sind die der anderen *SmSLAC*-Kanäle deutlich kleiner. Auch homologe Sequenzen zu den Phosphorylierungsstellen aus dem N-Terminus von *AtSLAC1* finden sich nur in *SmSLAC1* aber nicht in den restlichen *SmSLAC*-Kanälen (Abbildung 4-2).

Der Kanal *SmSLAC1* besitzt bereits die zu *AtSLAC1* orthologen Phosphorylierungsstellen im NT (Abbildung 5-1 im Anhang) sowie die konservierte Domäne im CT des Kanalproteins (Abbildung 4-3). Allerdings zeigt der Kanal einen deutlichen Unterschied zu *AtSLAC1* in seiner Aktivität und seiner Selektivität. Mit *SmSLAC1* ließen sich nur in Nitrat-basierten Lösungen deutliche Anionenströme. Bei der Bestimmung der Selektivität des Kanals zeigte sich, dass der Kanal eine deutliche Präferenz für Nitrat als permeierendes Ion besitzt (Abbildung 3-21). Diese außergewöhnliche Präferenz in der Selektivität des Kanals unterscheidet *SmSLAC1* von einem Großteil der bisher charakterisierten SLAC-Kanäle. Kusumi et al. entdeckten 2012 den SLAC-Kanal aus Reis (*Oryza sativa*) *OsSLAC1*, der auch in der monokotylen Pflanze eine wichtige Rolle beim Stomaschluss spielt (Kusumi et al., 2012). Sun et al. stellte bei der Charakterisierung von *OsSLAC1* drei Jahre später fest, dass der SLAC-Kanal eine starke Selektivität für Nitrat besitzt und ebenfalls durch eine Kinase (*OsSAPK8*) aktiviert wird, die zu *AtOST1* ortholog ist (Sun et al., 2016). Betrachtet man die Stellung der *Selaginella* SLAC1-Kanäle im phylogenetischen Vergleich der SLAC1-Kanäle (Abbildung 3-1) erkennt man, dass sich *SmSLAC1* von allen *SmSLACs* am nächsten zu den Kanälen der Samenpflanzen gruppiert. Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich im Laufe der Evolution der Farne und Samenpflanzen aus diesem Kanal die SLAC-Kanäle der Monokotyledonen mit ihrer Nitratselektivität entwickelten.

Neben *SmSLAC1* zeigte auch der Kanal *SmSLAC2* starke Anionenströme. Eine besondere Eigenschaft lässt *SmSLAC2* dabei aus den restlichen untersuchten SLAC-Kanälen herausstechen. Während die anderen Kanäle des Moosfarns keine oder nur eine sehr geringe Aktivität zeigen, ist *SmSALC2* sogar konstitutiv aktiv, d.h. ohne eine aktivierende Kinase

auskommt. Damit ist SmSLAC2, neben AtSLAC1 und PpSLAC1, der dritte Kanal, der im nativen Zustand funktionell charakterisiert werden konnte. Die konstitutive Aktivität des Kanals ist ABA-unabhängig, da sie auch durch die Koexpression mit einer OST1-Kinase nicht gesteigert werden konnte (Abbildung 3-19). Im Gegensatz zu SmSLAC1, ist SmSLAC2 durch sehr kurzen Termini gekennzeichnet und besitzt keine aus AtSLAC1 bekannten Phosphorylierungsstellen in seinem N-terminus. Im C-Terminus von SmSLAC2 findet sich allerdings die konservierte C-terminale Domäne, die abgesehen von einer veränderten Aminosäure (I398) homolog zur konservierten Sequenz der Samenpflanzen ist (Abbildung 4-3) (Lind et al., 2015). Bei der elektrophysiologischen Untersuchung der Chimären zwischen SmSLAC2 und AtSLAC1 zeigt sich, dass vor Allem der N-Terminus die entscheidende Rolle bei der unterschiedlichen Aktivität der beiden Kanäle spielt. Während der Austausch der C-Termini zwischen den beiden Kanälen zu keiner Veränderung der jeweiligen Kanalaktivität führt, hat der Austausch der N-Termini in den Chimären jedoch einen starken Einfluss auf die Eigenschaften der Kanäle. So konnte die konstitutive Aktivität von SmSLAC2 durch seinen N-Terminus (SmC2-NT) auf SLAC1 aus *Arabidopsis* übertragen werden. Der Austausch in entgegengesetzter Richtung hatte zur Folge, dass SmSLAC2 wiederum nur noch in Kooperation mit OST1 vollständig aktiviert werden konnte.

Der genaue Mechanismus, der dem SmC2-NT ermöglicht den Kanal und die Chimäre konstitutiv zu aktivieren, bleibt jedoch noch unklar. Eine mögliche Hypothese der Regulation der Kanäle durch den N-Terminus stellt das Chain-Ball Modell der Autoinhibierung von Kanalproteinen dar (Zhou et al., 2001). Dabei kann ein beweglicher Teil des Kanales im Zytosol die Pore blockieren und inaktiviert dadurch den Kanal. Wäre ein Teil des N-Terminus von AtSLAC1 für eine solche Inaktivierung des Kanals verantwortlich, könnte eine Konformationsänderung durch die Interaktion mit einer Kinase diese Inaktivierung lösen und den Kanal dadurch aktivieren. Durch den kurzen N-Terminus von SmSLAC2 könnte das blockierende Element fehlen und der Kanal dadurch geöffnet werden. Versuche an AtSLAC1 ohne N-Terminus (unveröffentlichte Daten) zeigen jedoch keine konstitutive Aktivität des Kanals, was das Chain-Ball Modell als alleinige Erklärung der konstitutiven Aktivität durch den SmC2-NT ausschließt.

Die ausgeprägten Unterschiede in ihrem Aufbau und in ihrer Aktivität sprechen dafür, dass sich während der Entstehung der ersten Gefäßpflanzen in Form der Lycophyten die Varianz der S-Typ-Anionenkanäle deutlich erhöht hat. Durch Genduplikationen und die anschließende Veränderung der einzelnen Gene kam es vermutlich zur Entwicklung der unterschiedlichen Eigenschaften dieser Kanäle. So entstand mit SmSLAC2 der erste konstitutiv aktive S-Typ-Kanal und mit SmSLAC1 ein Nitrat selektiver SLAC-Kanal, wie er sich auch in den Monokotyledonen wiederfindet (Sun et al., 2016). Durch die Entstehung unterschiedlicher Varianten der SLAC-Kanäle mit spezifischen Eigenschaften wie einer Nitrataktivierung/-

selektivität (*SmSLAC1*) oder neuer Aktivierungsmöglichkeiten der Kanäle (*SmSLAC2*) erweiterten sich auch die möglichen Anwendungsmöglichkeiten für die S-Typ-Anionenkanäle in den Pflanzen. Vermutlich ermöglichte erst die Entstehung dieser unterschiedlichen Eigenschaften, der Kanalfamilie der SLAC-Kanäle sich zu den Schlüsselementen der Kontrolle der Stomabewegung in den entstehenden Samenpflanzen zu entwickeln (Vahisalu et al., 2008; Geiger et al., 2011; Maierhofer et al., 2014b).

4.5 Evolution des schnellen ABA-Signalwegs zur Kontrolle der Stomata

Um ein Bild der Evolution des schnellen ABA-Signalwegs aus den Schließzellen der Samenpflanzen zu erhalten, muss man die hier gezeigten Ergebnisse als Gesamtbild betrachten. Ein Großteil der Komponenten der ABA-Signalkaskade sind schon in der einfach gebauten Grünalge *Klebsormidium nitens* vorhanden und finden sich auch in allen anderen hier untersuchten Modellpflanzen wieder (Tabelle 3-1 bis 3). In der Filament-bildenden Grünalge sind diese Komponenten allerdings noch nicht für die Regulation der Stomata verantwortlich wie in den Samenpflanzen, da *Klebsormidium* noch keine differenzierten Gewebe bildet. Es stellt sich daher die Frage, wann die einzelnen Komponenten des ABA-Signalwegs sich zu der aus Samenpflanzen bekannten und stark regulierten Signalkaskade zur Stomaregulation in den Schließzellen zusammengefunden haben. Für diese funktionelle Anpassung waren Veränderungen in den Kanälen, Kinasen und Phosphatasen notwendig. Die hier gezeigten Ergebnisse geben unter anderem auch Hinweise darauf, welche Komponenten sich dabei an ihre Rolle in der Signalkette in den Stomata angepasst haben (Abbildung 4-1). Alle 14 untersuchten OST1-Kinasen bis hin zu *KnOST1* aus der Grünalge besitzen bereits die Fähigkeit den SLAC-Kanal *AtSLAC1* aus *Arabidopsis* zu aktivieren. Dabei kann ihre Aktivität wie in den Samenpflanzen durch PP2C-Phosphatasen des ABA-Signalwegs reguliert werden (Abbildung 3-15, Abbildung 4-1) (Vahisalu et al., 2008; Geiger et al., 2009). Außerdem sind sie dazu in der Lage die Expression von Genen ABA-abhängig zu regulieren (Abbildung 3-16). Diese Eigenschaften zusammen mit der hohen Homologie, die man zwischen allen hier bearbeiteten OST1-Kinasen durch die Evolution der Pflanzen sieht (Tabelle 3-2), zeigen, dass sich nicht die OST1-Kinasen an eine funktionelle Interaktion mit den SLAC-Kanälen angepasst haben. Damit bleibt die Frage, wann und wie sich die SLAC-Kanäle verändert haben, um ein Teil dieses hoch konservierten ABA-Signalwegs zu werden.

Betrachtet man den phylogenetischen Baum der SLAC-Kanäle aus den untersuchten Versuchspflanzen, spiegelt dieser Großteils die bisherige Auffassung der Evolution von

Landpflanzen wieder (vgl. Stammbaum der Pflanzen Abbildung 1-1 und den phylogenetischen Baum der SLAC1 Kanäle Abbildung 3-1) (Kenrick and Crane, 1997; Finet et al., 2010; Peterson et al., 2010). Die Veränderungen der SLAC1-Kanäle gingen also vermutlich geradlinig einher mit der Evolution der Landpflanzen. Im phylogenetischen Vergleich der Kanäle lässt sich auch eine Aussage über die Reihenfolge der Entstehung der Bryophyten wiedererkennen. Diese deckt sich auch mit den Untersuchungen der ribosomalen Gene durch Finet et al. und zeigt eine Entstehung der Lebermoose noch vor den restlichen Bryophyten (Finet et al., 2010). Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass sich die Lebermoose im Laufe der Differenzierung der Landpflanzen noch vor den restlichen Bryophyten (Hornmoose und Laubmoose) entwickelte (Wickett et al., 2014). Die Annahme, dass die Lebermoose die ersten Embryophyten waren, spricht damit auch für eine monophyletische Entstehung der Stomata nach den Lebermoosen im Laufe der Entwicklung der Laub- und Hornmoose (Raven, 2002). Dies deckt sich auch mit der schon 1997 von Kenrick und Crane prognostizierten Evolutionsgeschichte der Landpflanzen die seitdem schon oft bestätigt, aber auch in Frage gestellt wurde (Kenrick and Crane, 1997; Finet et al., 2010; Peterson et al., 2010; Magallón et al., 2013).

Ein charakteristischer Unterschied der SLAH1/4-Familie aus *Arabidopsis* zu den restlichen S-Typ-Anionenkanälen sind die sehr kurzen N- und C-Termini der Kanäle (Dreyer et al., 2012). Durch diese kurzen Termini fehlen ihnen eine Vielzahl von essenziellen regulatorischen Domänen, die für die Aktivierung der bekannten SLAC/SLAH-Kanäle erforderlich sind (Geiger et al., 2009; Vahisalu et al., 2010; Geiger et al., 2011; Maierhofer et al., 2014a). Den SLAC-Kanälen von *Klebsormidium* und *Marchantia*, fehlen diese ausgeprägten N- und C-Termini ebenfalls. Die Kanäle der SLAH1/4-Familie aus *Arabidopsis* lassen sich in heterologen Expressionsversuchen nicht durch aktivierende Kinasen anschalten. Untersuchungen der in der Wurzel lokalisierten S-Typ-Anionenkanäle *AtSLAH1* und *AtSLAH3* weisen jedoch darauf hin, dass die Gruppe der SLAH1/4-Kanäle vermutlich modifizierende und/oder regulatorische Eigenschaften besitzen und dadurch die Aktivität andere S-Typ-Anionenkanäle modifizieren kann (Cubero-Font et al., 2016). Im Fall des von Cubero-Font et al. untersuchten *AtSLAH1/3*-Paares konnte gezeigt werden, dass *AtSLAH1* alleine zwar keine Aktivität zeigt, jedoch dazu in der Lage ist *AtSLAH3* zu aktivieren ohne eine zusätzliche aktivierende Kinase (Cubero-Font et al., 2016). Die fehlenden regulatorischen Domänen in den kurzen Termini sind vermutlich auch in den Kanälen der Grünalge und des Lebermooses dafür verantwortlich, dass sich die SLACs nicht durch OST1-Kinasen aktivieren lassen (Abbildung 3-12 und 13).

Der Kanäle der Grünalge und des Lebermooses *KnSLAC1* und *MpSLAC1* zeigen nur eine geringe Homologie zu *AtSLAC1* aus der Samenpflanze. Die Untersuchung ihrer Porenmutanten zeigt aber, dass es sich schon um funktionelle S-Typ-Anionenkanäle handelt. Geht man davon aus, dass sich die Landpflanzen aus einem gemeinsamen Vorfahren aus den Grünalgen entwickelt haben, stellt der Nitrat-selektive Anionenkanal *KnSLAC1* möglicher

Weise den Ursprung der SLAC-Kanäle der Landpflanzen dar. Genau wie der Kanal des Lebermooses wird die Aktivität des Kanals allerdings noch nicht durch Komponenten des ABA-Signalwegs kontrolliert und die Mutation in der Pore alleine scheint auszureichen um die Kanäle zu aktivieren (Abbildung 3-12 und 13). Welche Prozesse zu Aktivierung der Kanäle in der Alge und dem Lebermoos selber führen ist allerdings noch ungeklärt. Da weder *Klebsormidium* noch *Marchantia* über Stomata verfügen, besteht für die Verknüpfung der SLAC-Kanäle mit den OST1 Kinasen in einer ABA-Signalkaskade auch noch keine Notwendigkeit. Dementsprechend besitzen die beiden Kanäle auch nur sehr kurze intrazelluläre Termini ohne Homologie zu den regulatorischen Elementen der SLAC-Kanäle aus Samenpflanzen (Abbildung 4-2 und 3).

Mit dem Auftauchen der ersten Stomata in den Sporophyten der Laubmoose ergab sich auch der Bedarf für einen Kontrollmechanismus der Stomabewegung und damit der SLAC-typ Anionenkanäle. Obwohl die Stomata in *Physcomitrella* nur an einem sehr kleinen Teil des Pflanzenkörpers auftauchen, konnte ich im Laubmoos schon ein funktionelles Paar aus OST1-Kinase und SLAC-Kanal finden (Abbildung 3-6). Die funktionelle Interaktion der beiden Partner in *Physcomitrella* führt aber noch nicht zur vollen Aktivierung von PpSLAC1, wie die weitere Steigerung der Kanalaktivität in den Chimären aus den PpSLACs und AtSLAC1 zeigen. So besitzen PpSLAC1 und PpSLAC2 noch nicht alle nötigen Phosphorylierungs- und Interaktionsstellen in ihren Termini, die für eine funktionelle Interaktion mit allen OST1-Kinasen erforderlich sind (Abbildung 3-7 und 9).

Die SLAC-Kanäle der Lycophyten und Farne als erste Gefäßpflanzen mit ausgeprägten Stomata auf den Blättern, zeigen schon ein anderes Bild bei der Regulation. Zwar lassen sich die Wildtyp-Kanäle aus *Selaginella* und *Ceratopteris* auch kaum durch OST1-Kinasen aktivieren, aber die Porenmutanten von SmSALC1, CrSLAC1a und CrSLAC1b zeigen schon eine ABA-abhängige Regulation. Im Gegensatz zu den Mutanten aus der Alge und dem Moos, zeigen die drei Phenylalaninmutanten nur in Anwesenheit einer OST1-Kinase Aktivität. Die drei Kanäle zeichnen sich auch dadurch aus, dass sie homologe potentielle Phosphorylierungsstellen in ihren N-Termini und die konservierte C-terminale Domäne inklusive der Phosphorylierungsstelle T513 besitzen. Für die Kanäle aus *Selaginella* und *Ceratopteris* reicht die Interaktion mit OST1 alleine noch nicht aus, um die Kanäle zu aktivieren, was bedeutet, dass in den Pflanzen noch ein weiterer Mechanismus zusätzlich zu der OST1-Interaktion an der Aktivierung der Kanalproteine beteiligt sein muss.

Gleichzeitig mit dem Auftauchen der ersten Stomata in den Laubmoosen scheint auch die erste funktionelle Beziehung zwischen OST1 und SLAC1 entstanden zu sein. Dieses Kanal/Kinase-Paar aus *Physcomitrella* ging jedoch wahrscheinlich während der Entstehung der Streptophyten wieder verloren. Die SLAC-Kanäle allerdings passten sich immer weiter an die regulatorischen Komponenten des ABA-Signalwegs an. Dafür entwickelten sich

Phosphorylierungsstellen in den N- und C-Termini der Kanäle sowie die konservierte Domäne am Anfang des CT (Abbildung 4-2 und 3). Diese Kombination aus unterschiedlichen regulatorischen Elementen in den Termini ermöglichte schließlich die effektive Regulation von SLAC1 über den vermutlich schon in den Grünalgen konservierten ABA-Signalweg über OST1 (Abbildung 4-1).

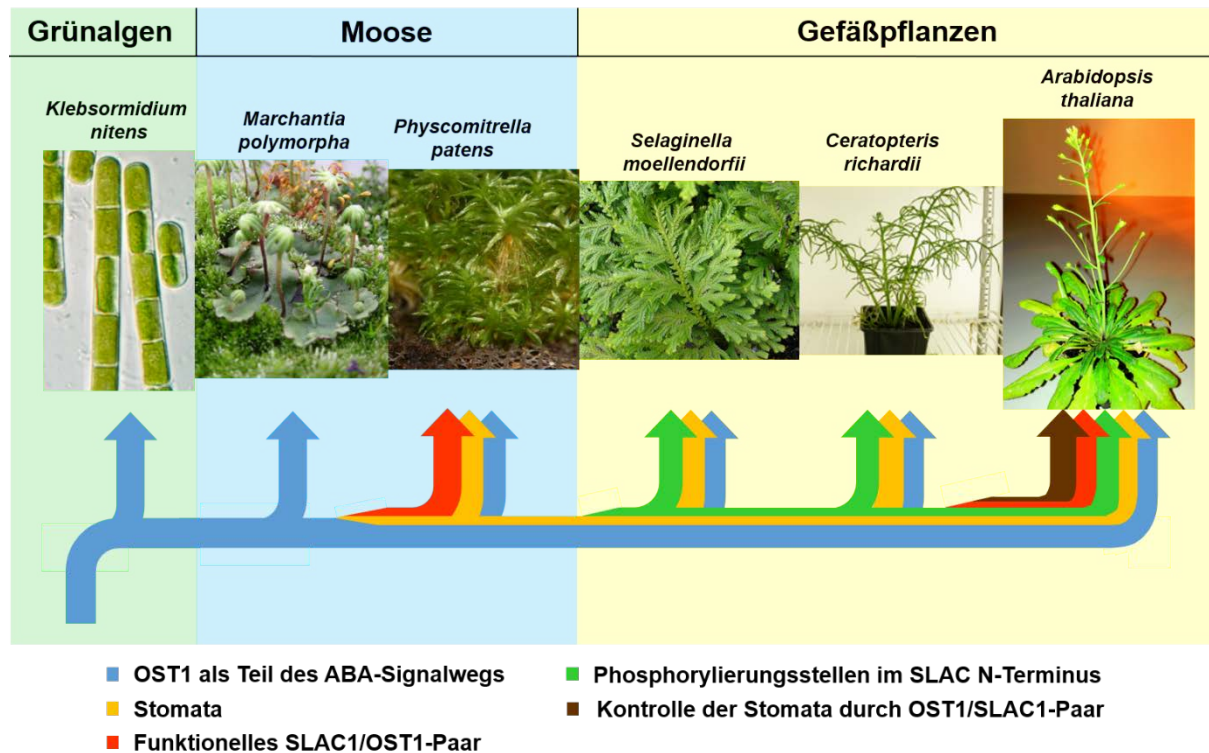


Abbildung 4-4: Entwicklung des schnellen ABA-Signalwegs der Landpflanzen

Im Laufe der Evolution der Landpflanzen von den ersten terrestrisch lebenden Grünalgen (*Klebsormidium*) bis zu den Samenpflanzen (*Arabidopsis*) entwickelten sich neue Eigenschaften in den unterschiedlichen Komponenten des ABA-Signalwegs. An Hand der sechs untersuchten Modellpflanzen sind hier die beschriebenen Neuerungen der einzelnen Pflanzen(-gruppen) zu sehen. Die einzelnen Komponenten der Signalkaskade existieren schon in der vergleichsweise einfachen Grünalge. Sie kommen aber erst in den Schließzellen der Samenpflanzen zusammen und bilden den schnellen ABA-Signalweg, der zum Stomaschluss führt (Bilder: Kn (Mikhailyuk et al., 2015), Mp (Morgner), Cr (Plackett et al., 2015)).

Ob die Exogene Applikation von ABA in Lycophyten und Farnen zum Schließen der Stomata führt, ist ein umstrittenes Thema. In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Stomata des Lycophyten *Selaginella* entweder auf ABA reagieren (Ruszala et al., 2011) oder nicht (Brodribb and McAdam, 2011; McAdam and Brodribb, 2012). Die Ergebnisse der Untersuchungen der Komponenten des schnellen ABA-Signalwegs in dieser Arbeit kann diese Frage noch nicht endgültig klären. Da sich allerdings weder in *Selaginella* noch in *Ceratopteris* ein funktionelles SLAC1/OST1-Paar für die ABA-abhängige Regulation der Stomata findet, sprechen die hier gezeigten Ergebnisse für eine spätere Entstehung der ABA-abhängigen Stomakontrolle. Die endgültige Eingliederung der SLAC-Kanäle in die ABA-Signalkaskade in

Schließzellen scheint sich also erst nach der Abspaltung der Lycophyten und Farne, mit der Entstehung der Samenpflanzen, entwickelt zu haben. Dafür spricht auch, dass zwischen den OST1-Kinasen und den Wildtyp SLAC-Kanälen in *Selaginella* und *Ceratopteris* noch keine funktionelle Interaktion zu beobachten ist (Abbildung 4-4).

5. Anhang

5.1 Messlösungen

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

1x TAE-Puffer (Tris-Aacetat-EDTA-Puffer)

40 mM Tris

40 mM Essigsäure

1 mM Na-EDTA

in ddH₂O

5x DNA-Probenpuffer

50 % Glycerin (w/v)

100 mM EDTA

0,25 % Bromphenolblau (w/v)

0,25 % Xylen Cyanol FF (w/v)

Medien zum Klonieren

LB (Luria-Broth) Ampicillin Kulturmedium

10 g/l NaCl

10 g/l Trypton

5 g/l Yeast Extract

Ampicillin 50 µg/ml

in ddH₂O

LB-Ampicillin-Selektions-Agarplatten

Agar Agar (Applichem / Peqlab) 2 %

in LB Medium autoklaviert;

Ampicillin zugegeben 50 µg/ml

und in Petrischalen gegossen;

Bei 4°C im Kühlraum gelagert.

TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

1 mM EDTA

in ddH₂O

Zusammensetzung der verwendeten Messlösungen:

Messlösungen für die Messung von Gleichgewichtsströmen:

Gluconat Lösung:

100 mM Natrium Gluconat

10 mM MES

1mM Calcium Gluconat

1mM Magnesium Gluconat

pH=5,6 eingestellt mit 1 M Tris-Lösung

in ddH₂O

Chlorit Lösung:

100 mM Natrium Chlorit

10 mM MES

1mM Calcium Gluconat

1mM Magnesium Gluconat

pH=5,6 eingestellt mit 1 M Tris-Lösung

in ddH₂O

Nitrat Lösung:

100 mM Natrium Nitrat

10 mM MES

1mM Calcium Gluconat

1mM Magnesium Gluconat

pH=5,6 eingestellt mit 1 M Tris-Lösung

in ddH₂O

Lösungen für die Messung der Selektivität:

Gluconat Lösung:

50 mM Natrium Gluconat
100 mM Sorbitol
10 mM Tris
1mM Calcium Gluconat
1mM Magnesium Gluconat
pH=7,5 eingestellt mit 1 M MES-Lösung
in ddH₂O

Chlorit Lösung:

50 mM Natrium Chlorit
100 mM Sorbitol
10 mM Tris
1mM Calcium Gluconat
1mM Magnesium Gluconat
pH=7,5 eingestellt mit 1 M MES-Lösung
in ddH₂O

Nitrat Lösung:

50 mM Natrium Nitrat
100 mM Sorbitol
10 mM Tris
1mM Calcium Gluconat
1mM Magnesium Gluconat
pH=7,5 eingestellt mit 1 M MES-Lösung
in ddH₂O

Sulfat Lösung:

50 mM Natrium Sulfat
100 mM Sorbitol
10 mM Tris
1mM Calcium Gluconat
1mM Magnesium Gluconat
pH=7,5 eingestellt mit 1 M MES-Lösung
in ddH₂O

Malat Lösung:

50 mM Natrium Malat

100 mM Sorbitol

10 mM Tris

1mM Calcium Gluconat

1mM Magnesium Gluconat

pH=7,5 eingestellt mit 1 M MES-Lösung

in ddH₂O

5.2 Sequenzvergleich der SLAC-Kanäle und OST1-Kinasen

```

ASLAC1 NT
CSLAC1a NT
CSLAC1b NT
-----MERKCGNAHSTFADINEVEDEAEQEEQC-----CENNNKPFSGNRKQNRKQKQRFRCF
MATEPPLERIESVLLDSETEVPEHLLQPHYLQI--ISSDYSHSGSPSPKVFSAADMLLSDSSPKGPEFVYKSSPESSA--NLPVDDHNSYTCVMSAAEHASQPKSSPHILKSAQKQSWNNLRAPESTSRCGL
MEVYERPEERIBSEVLEDSRHEPLELIG---ISSENYSGIISASLAVNSHS--EIPSPGVDSIECEPADNSK-AAATPEANKTSSNFTGEGKPSADDER---SPHVKSAIKGSDIHRKSGLAERGL

ASLAC1 NT
CSLAC1a NT
CSLAC1b NT
-----RQVSLKTCFSYLNKRESRE-----RDKKSLP--RSGR-----SGGFESGGIINGDERKDFGFRKSLI-SKQIS--LLPSIIEBDEIENSLRTEDEGETKDDGSINENV
SPELIRKVSFASAKCKLNTSSADSVHAYDEYRLIDPLGKSRQKG---REFSQIPIIGSNRHRGFSYSGPVRRCSVVDVLEALREREDDAKANNYSIFRKSRRFKQKTSRQSSAWINIEOKLIDGASYYKASPEQSY
YTELIRKVSFASASHEEPNTRVADGGSLSLHAEHRSPYNRNLEDHSPKSCPKYESQVMEAAASAMNKKETYSGPVRRCSVVDVLEALREREDDAKANNYSIFRKSRRFKQKTSRQSSAWINIEOKLIDGASYYKASPEQSY
-----RQVSLKTCFSYLNKRESRE-----RDKKSLP--RSGR-----SGGFESGGIINGDERKDFGFRKSLI-SKQIS--LLPSIIEBDEIENSLRTEDEGETKDDGSINENV

ASLAC1 NT
CSLAC1a NT
CSLAC1b NT
SAGRYFDALGPELLEVKMEDIKPEKQWPEPLRF
PAGRYFDALGPELLEVKSEELLDVCKMPPLRF
PAGRYFDALGPELLEVKDSEELLEVEQWPEPLRF

ASLAC1 NT
SmsLAC1 NT
SmsLAC4 NT
-----MERKQSNAHSTADINEVEDEAEQEEQEEQENRKGKORPFRGSRQVY--ETGCFSTINRESRETRKSLPSSGHSPGGFTSGG---INGGGRKDFSMFRTKSLIS--KQSS--PSI--RERDIEN-----
MGEDEDMGERS--ASTDLECKMPATTAYSMVGVISERPKNSAMMAAMGANGHNEI--V--LSPSPKSEPEKDPADCKSPNBSI--S--P--PKTSSQDIHRKDEEY--LPTRSK--EKS--RREEQQQQQQQQHHHD
-----ONGAPPPAFETLEI--PAGRFEDALQPELETKDSEELLDKQWPEPLRF-----PTSSNPLFPRGSKSEKQI--L--SK-----

ASLAC1 NT
SmsLAC1 NT
SmsLAC4 NT
-----SIRTEGETKDDSDINENVAGRYFDALGPELLEVKMEDIKPEKQWPEPLRF
FGDHPKQSSKEIHEDHSAQWVAGRYFDALQPELETKDSEELLDKQWPEPLRF
-----ONGAPPPAFETLEI--PAGRFEDALQPELETKDSEELLDKQWPEPLRF

```

Abbildung 5-1: Vergleich des NT von AtSLAC1 mit CrSLAC1a/b und von AtSLAC1 mit SmsLAC1/4

Die Sequenz der SLAC-Kanäle aus *Klebsormidium*, *Marchantia* und *Physcomitrella* unterscheidet sich in ihren N-Termini so stark, dass ein sinnvoller Vergleich mit SLAC1 aus *Arabidopsis* nicht möglich ist. Die Sequenz der N-Termini von *SmsLAC1*, *SmsLAC4*, *CrSLAC1a* und *CrSLAC1b* aus *Selaginella* und *Ceratopteris* dagegen zeigt eine vergleichbare Länge und ähnliche Sequenz, so dass ein Vergleich möglich ist.

Die Sequenzen der beiden SLAC-Kanäle aus *Ceratopteris* ist dabei noch einmal deutlich homologer zueinander und zu *AtSLAC1* als es bei den beiden Kanälen aus *Selaginella* der Fall ist. In Rot wurden die beiden bekannten Phosphorylierungsstellen S59 und S120 aus *AtSLAC1* markiert. Das für die Aktivierung durch *AtOST1* entscheidende S120 ist in beiden *CrSLACs* konserviert, bei den Kanälen aus *Selaginella* jedoch nur in *SmsLAC1* und nicht in *SmsLAC4*.

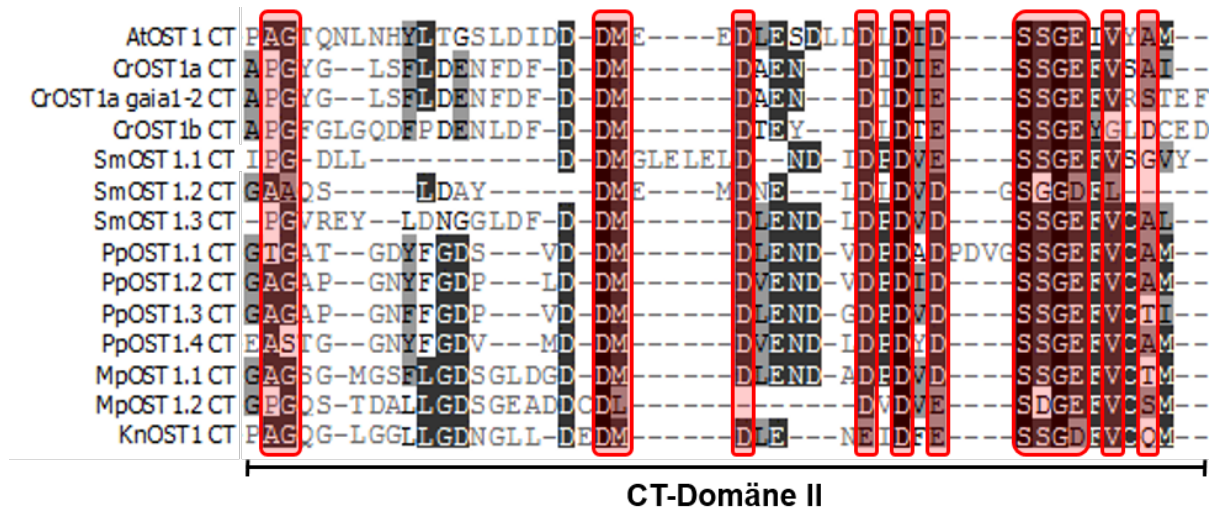


Abbildung 5-2: Vergleich der Sequenz der ABA-Box aller untersuchten OST1-Kinasen

Der letzte Abschnitt des C-Terminus von *AtOST1*, die C-terminale Domäne 2 oder auch als ABA-Box bekannt, ist bekannt als die Region, die für die ABA-abhängige Regulation der Kinase verantwortlich ist. Die rot markierten Aminosäuren spielen eine entscheidende Rolle bei der Interaktion von OST1 mit den PP2C-Phosphatasen (Yoshida et al., 2006). Beim Vergleich der Sequenz der ABA-Box aller untersuchten OST1-Kinasen und der Mutante *gaia1-2* lässt sich eine starke Konservierung der markierten Aminosäuren erkennen, die die Kinasen unter die Kontrolle des ABA-Signalwegs stellen.

5.3 BIFC Analysen

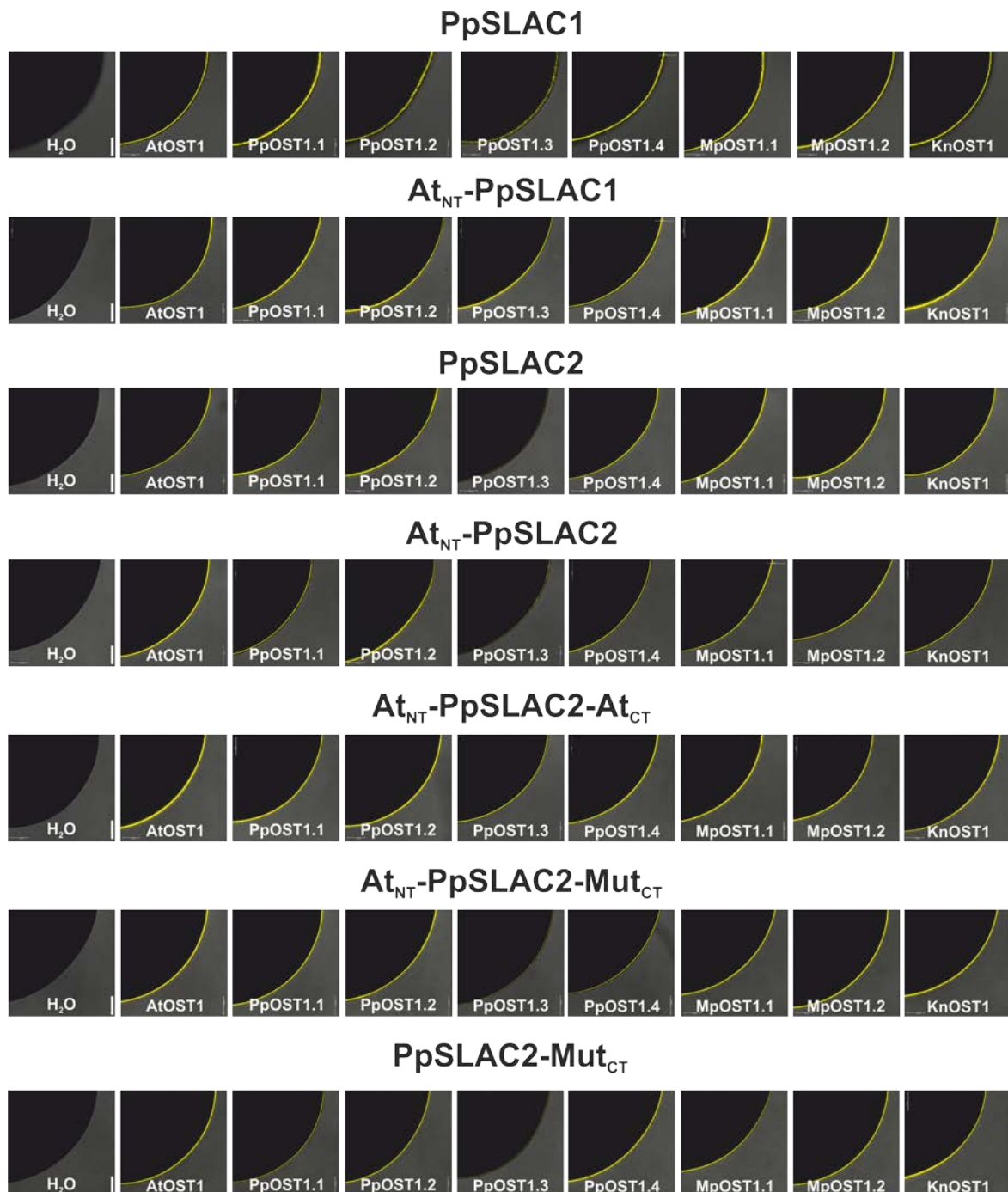


Abbildung 5-3: BIFC-Assay der PpSLAC-Kanäle und Chimären mit den OST1-Kinasen

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen den SLAC-Kanälen aus *Physcomitrella* und den OST1-Kinasen wurden BIFC-Analysen durchgeführt. Bei der Interaktion von Kanal und Kinase entsteht dabei ein funktionelles gelb-fluoreszierendes Protein (YFP), dessen Fluoreszenz die Interaktion signalisiert. Für die Wildtyp-PpSLAC-Kanäle und ihren Chimären mit AtSLAC1 lässt sich eine deutliche Fluoreszenz mit allen getesteten OST1-Kinasen erkennen. Für die Kinase PpOST1.3 fiel die Fluoreszenz in manchen Kombinationen dabei etwas geringer aus. Bei der Negativkontrolle der Kanäle ohne Kinase ist jeweils keine Fluoreszenz zu erkennen. Dargestellt sind repräsentative Zellen. (Skalierungsstrich entspricht 100 μ m).

AtSLAC1



CrSLAC1a



CrSLAC1b

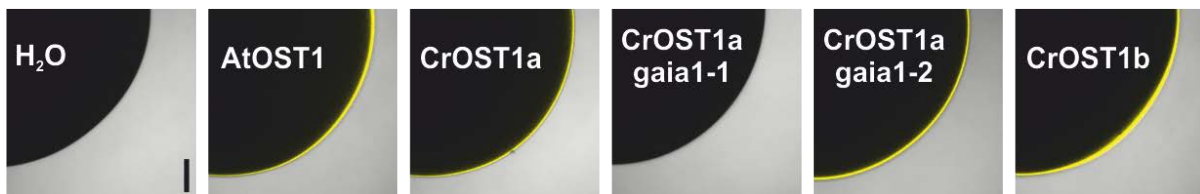


Abbildung 5-4: BIFC-Assay der CrSLAC-Kanäle und CrOST1-Kinasen

Die Interaktion der SLAC-Kanäle und OST1-Kinasen aus *Ceratopteris* wurde mit Hilfe der BIFC-Methode in *Xenopus* Oozyten untersucht. Die Fluoreszenz der an die beiden putativen Interaktionspartner fusionierten YFP-Hälften signalisiert eine Interaktion der beiden Proteine. Während die drei Kanäle alleine keine Fluoreszenz zeigen, erkennt man ein deutliches Signal bei der Koexpression der Kanäle mit den Wildtyp-Kinasen aus *Arabidopsis* und *Ceratopteris*, jedoch keine Fluoreszenz mit der Mutante *CrOST1a gaia1-1*. Dargestellt sind repräsentative Oozyten. (Skalierungsstrich entspricht 100 μ m).

5.4 Literaturverzeichnis

- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., and Hedrich, R.** (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *Febs Lett* **486**, 93-98.
- Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, U., Bock, R., Schulz, B., Harter, K., and Kudla, J.** (2003). The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *Plant J* **36**, 457-470.
- Allagulova, C.R., Gimalov, F.R., Shakirova, F.M., and Vakhitov, V.A.** (2003). The plant dehydrins: Structure and putative functions. *Biochemistry-Moscow+* **68**, 945-951.
- Amborella Genome, P.** (2013). The Amborella genome and the evolution of flowering plants. *Science* **342**, 1241089.
- Amodeo, G., Srivastava, A., and Zeiger, E.** (1992). Vanadate Inhibits Blue Light-Stimulated Swelling of *Vicia* Guard-Cell Protoplasts. *Plant Physiol* **100**, 1567-1570.
- Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J., and Gaber, R.F.** (1992). Functional Expression of a Probable *Arabidopsis*-*Thaliana* Potassium Channel in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *P Natl Acad Sci USA* **89**, 3736-3740.
- Armstrong, F., Leung, J., Grabov, A., Brearley, J., Giraudat, J., and Blatt, M.R.** (1995). Sensitivity to Abscisic-Acid of Guard-Cell K⁺ Channels Is Suppressed by *Abi1-1*, a Mutant *Arabidopsis* Gene Encoding a Putative Protein Phosphatase. *P Natl Acad Sci USA* **92**, 9520-9524.
- Assmann, S.M., Simoncini, L., and Schroeder, J.I.** (1985). Blue-Light Activates Electrogenic Ion Pumping in Guard-Cell Protoplasts of *Vicia-Faba*. *Nature* **318**, 285-287.
- Atallah, N., and Banks, J.** (2016). Unpubliziertes Trinity RNA-seq assembly aus Gewebe des Gametophyten von *Ceratopteris richardii*
- Banks, J.A.** (1997). Sex determination in the fern *Ceratopteris*. *Trends Plant Sci* **2**, 175-180.
- Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Gribskov, M., dePamphilis, C., Albert, V.A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B.A., Ashton, N.W., Axtell, M.J., Barker, E., Barker, M.S., Bennetzen, J.L., Bonawitz, N.D., Chapple, C., Cheng, C.Y., Correa, L.G.G., Dacre, M., DeBarry, J., Dreyer, I., Elias, M., Engstrom, E.M., Estelle, M., Feng, L., Finet, C., Floyd, S.K., Frommer, W.B., Fujita, T., Gramzow, L., Gutensohn, M., Harholt, J., Hattori, M., Heyl, A., Hirai, T., Hiwatashi, Y., Ishikawa, M., Iwata, M., Karol, K.G., Koehler, B., Kolukisaoglu, U., Kubo, M., Kurata, T., Lalonde, S., Li, K.J., Li, Y., Litt, A., Lyons, E., Manning, G., Maruyama, T., Michael, T.P., Mikami, K., Miyazaki, S., Morinaga, S., Murata, T., Mueller-Roeber, B., Nelson, D.R., Obara, M., Oguri, Y., Olmstead, R.G., Onodera, N., Petersen, B.L., Pils, B., Prigge, M., Rensing, S.A., Riano-Pachon, D.M., Roberts, A.W., Sato, Y., Scheller, H.V., Schulz, B., Schulz, C., Shakirov, E.V., Shibagaki, N., Shinohara, N., Shippen, D.E., Sorensen, I., Sotooka, R., Sugimoto, N., Sugita, M., Sumikawa, N., Tanurdzic, M., Theissen, G., Ulvskov, P., Wakazuki, S., Weng, J.K., Willats, W.W.G.T., Wipf, D., Wolf, P.G., Yang, L.X., Zimmer, A.D., Zhu, Q.H., Mitros, T., Hellsten, U., Loque, D., Otiillar, R., Salamov, A., Schmutz, J., Shapiro, H., Lindquist, E., Lucas, S., Rokhsar, D., and Grigoriev, I.V.** (2011). The *Selaginella* Genome Identifies Genetic Changes Associated with the Evolution of Vascular Plants. *Science* **332**, 960-963.
- Barthlott, W., and Neinhuis, C.** (1997). Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* **202**, 1-8.
- Bauer, H., Ache, P., Lautner, S., Fromm, J., Hartung, W., Al-Rasheid, K.A., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kneitz, S., Lachmann, N., Mendel, R.R., Bittner, F., Hetherington, A.M., and Hedrich, R.** (2013). The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Curr Biol* **23**, 53-57.

- Becker, D., Zeilinger, C., Lohse, G., Depta, H., and Hedrich, R.** (1993). Identification and Biochemical-Characterization of the Plasma-Membrane H⁺-Atpase in Guard-Cells of *Vicia-Faba* L. *Planta* **190**, 44-50.
- Becker, D., Hoth, S., Ache, P., Wenkel, S., Roelfsema, M.R.G., Meyerhoff, O., Hartung, W., and Hedrich, R.** (2003). Regulation of the ABA-sensitive *Arabidopsis* potassium channel gene GORK in response to water stress. *Febs Lett* **554**, 119-126.
- Bennett, M.D., Leitch, I.J., Price, H.J., and Johnston, J.S.** (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) Using Flow Cytometry Show Genome Size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25 % Larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative Estimate of ~125 Mb. *Ann Bot-London* **91**, 547-557.
- Blatt, M.R.** (1992). K⁺ Channels of Stomatal Guard-Cells - Characteristics of the Inward Rectifier and Its Control by Ph. *J Gen Physiol* **99**, 615-644.
- Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S.W., Negi, J., Iba, K., Kangasjarvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A.B., Hu, H.H., and Schroeder, J.I.** (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched AB11 PP2C phosphatase action. *P Natl Acad Sci USA* **109**, 10593-10598.
- Brodribb, T.J., and McAdam, S.A.M.** (2011). Passive Origins of Stomatal Control in Vascular Plants. *Science* **331**, 582-585.
- Cai, C.Y., Shu, O.Y., Wang, Y., Fang, Z.J., Rong, J.Y., Geng, L.Y., and Li, X.X.** (1996). An early Silurian vascular plant. *Nature* **379**, 592-592.
- Caine, R.S., Chater, C.C., Kamisugi, Y., Cuming, A.C., Beerling, D.J., Gray, J.E., and Fleming, A.J.** (2016). An ancestral stomatal patterning module revealed in the non-vascular land plant *Physcomitrella patens*. *Development* **143**, 3306-3314.
- Chang, Y., and Graham, S.W.** (2011). Inferring the Higher-Order Phylogeny of Mosses (Bryophyta) and Relatives Using a Large, Multigene Plastid Data Set. *Am J Bot* **98**, 839-849.
- Chasan, R.** (1992). *Ceratopteris* - a Model-Plant for the 90s. *Plant Cell* **4**, 113-115.
- Chater, C., Kamisugi, Y., Movahedi, M., Fleming, A., Cuming, A.C., Gray, J.E., and Beerling, D.J.** (2011). Regulatory Mechanism Controlling Stomatal Behavior Conserved across 400 Million Years of Land Plant Evolution. *Curr Biol* **21**, 1025-1029.
- Chen, P., Sun, Y.F., Kai, W.B., Liang, B., Zhang, Y.S., Zhai, X.W., Jiang, L., Du, Y.W., and Leng, P.** (2016). Interactions of ABA signaling core components (SIPYLs, SIPP2Cs, and SiSnRK2s) in tomato (*Solanum lycopersicon*). *J Plant Physiol* **205**, 67-74.
- Chen, Y., Ji, F.F., Xie, H., Liang, J.S., and Zhang, J.H.** (2006). The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* **140**, 302-310.
- Chen, Y.H., Hu, L., Punta, M., Bruni, R., Hillerich, B., Kloss, B., Rost, B., Love, J., Siegelbaum, S.A., and Hendrickson, W.A.** (2010). Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature* **467**, 1074-U1157.
- Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C., and Sheen, J.** (2002a). Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* **129**, 469-485.
- Cheng, W.H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T., and Sheen, J.** (2002b). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* **14**, 2723-2743.
- Cheong, Y.H., Kim, K.N., Pandey, G.K., Gupta, R., Grant, J.J., and Luan, S.** (2003). CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *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., and Luan, S.** (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant J* **52**, 223-239.
- Christmann, A., Weiler, E.W., Steudle, E., and Grill, E.** (2007). A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J* **52**, 167-174.

- Christmann, A., Hoffmann, T., Teplova, I., Grill, E., and Muller, A.** (2005). Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**, 209-219.
- Church, A.** (1919/1968). *Thalasssiophyta and the Subaerial Transmigration.* (Hafner Publishing Co Ltd).
- Cordle, A.R.** (2012). "Genes involved in asexual sporophyte development in *Ceratopteris richardii* and *Arabidopsis thaliana*." <http://ir.uiowa.edu/etd/4598>. (University of Iowa).
- Cove, D.** (2005). The moss *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Genet* **39**, 339-358.
- Cowan, I.R., and Farquhar, G.D.** (1977). Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. *Symp Soc Exp Biol* **31**, 471-505.
- Cubero-Font, P., Maierhofer, T., Jaslan, J., Rosales, M.A., Espartero, J., Diaz-Rueda, P., Muller, H.M., Hurter, A.L., AL-Rasheid, K.A.S., Marten, I., Hedrich, R., Colmenero-Flores, J.M., and Geiger, D.** (2016). Silent S-Type Anion Channel Subunit SLAH1 Gates SLAH3 Open for Chloride Root-to-Shoot Translocation. *Curr Biol* **26**, 2213-2220.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R.** (2010a). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 651-679.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R.** (2010b). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 651-679.
- D'Angelo, C., Weini, S., Batistic, O., Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Schultke, S., Albrecht, V., Ehlert, B., Schulz, B., Harter, K., Luan, S., Bock, R., and Kudla, J.** (2006). Alternative complex formation of the Ca²⁺-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. *Plant J* **48**, 857-872.
- Deger, A.G., Scherzer, S., Nuhkat, M., Kedzierska, J., Kollist, H., Brosche, M., Unyayar, S., Boudsocq, M., Hedrich, R., and Roelfsema, M.R.G.** (2015). Guard cell SLAC1-type anion channels mediate flagellin-induced stomatal closure. *New Phytologist* **208**, 162-173.
- Demir, F., Horntrich, C., Blachutzik, J.O., Scherzer, S., Reinders, Y., Kierszniowska, S., Schulze, W.X., Harms, G.S., Hedrich, R., Geiger, D., and Kreuzer, I.** (2013). *Arabidopsis* nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8296-8301.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., and Gascuel, O.** (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**, W465-W469.
- Dietrich, P., and Hedrich, R.** (1994). Interconversion of Fast and Slow Gating Modes of Gcac1, a Guard-Cell Anion Channel. *Planta* **195**, 301-304.
- Dietrich, P., and Hedrich, R.** (1998). Anions permeate and gate GCAC1, a voltage-dependent guard cell anion channel. *Plant J* **15**, 479-487.
- Dietrich, P., Sanders, D., and Hedrich, R.** (2001). The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. *J Exp Bot* **52**, 1959-1967.
- Dreyer, I., Gomez-Porrás, J.L., Riaño-Pachón, D.M., Hedrich, R., and Geiger, D.** (2012). Molecular Evolution of Slow and Quick Anion Channels (SLACs and QUACs/ALMTs). *Frontiers in Plant Science* **3**, 263.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., MullerRober, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B., and Hedrich, R.** (1997). Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophys J* **72**, 2143-2150.
- Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R.** (2002). X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 angstrom reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**, 287-294.
- Edwards, D., Kerp, H., and Hass, H.** (1998). Stomata in early land plants: an anatomical and ecophysiological approach. *J Exp Bot* **49**, 255-278.
- Edwards D, A.G., Raven JA.** (1996). *Cuticles of early land plants: a palaeoecophysiological evolution.* (Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, 1–31.).

- Eigenbrode, S.D., and Espelie, K.E.** (1995). Effects of Plant Epicuticular Lipids on Insect Herbivores. *Annu Rev Entomol* **40**, 171-194.
- Eisenach, C., Papanatsiou, M., Hillert, E.K., and Blatt, M.R.** (2014). Clustering of the K⁺ channel GORK of *Arabidopsis* parallels its gating by extracellular K⁺. *Plant J* **78**, 203-214.
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., Ikegami, K., Koiwai, H., Seo, M., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Shinozaki, K., Nakazono, M., Kamiya, Y., Koshiba, T., and Nambara, E.** (2008). Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol* **147**, 1984-1993.
- Fairleygrenot, K.A., and Assmann, S.M.** (1993). Comparison of K⁺-Channel Activation and Deactivation in Guard-Cells from a Dicotyledon (*Vicia-Faba* L) and a Gramineous Monocotyledon (*Zea-Mays*). *Planta* **189**, 410-419.
- Fatt, P., and Ginsborg, B.L.** (1958). The Ionic Requirements for the Production of Action Potentials in Crustacean Muscle Fibres. *J Physiol-London* **142**, 516-543.
- Finet, C., Timme, R.E., Delwiche, C.F., and Marletaz, F.** (2010). Multigene phylogeny of the green lineage reveals the origin and diversification of land plants. *Curr Biol* **20**, 2217-2222.
- Finkel, A.G., and Gage, P.W.** (1985). Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. In *Voltage and patch clamping with microelectrodes* (Baltimore, USA: Williams and Wilkins Co), pp. pp. 47-94.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., and Steber, C.** (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 387-415.
- Fischer, R.A.** (1968). Stomatal Opening - Role of Potassium Uptake by Guard Cells. *Science* **160**, 784-&.
- Fox, S.W.** (1965). Simulated natural experiments in spontaneous organization of morphological units from protenoid. In *The Origins of Prebiological Systems and of Their Molecular Matrices*, S.W. Fox, ed (Academic Press New York and London), pp. 360-382.
- Fox, S.W.** (1980). The Origins of Behavior in Macromolecules and Protocells. *Comp Biochem Phys B* **67**, 423-436.
- Frahm, J.-P.** (2001). *Biologie der Moose*. (Heidelberg - Berlin: Spektrum Akad. Verlag).
- Franks, P.J., Buckley, T.N., Shope, J.C., and Mott, K.A.** (2001). Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe. *Plant Physiol* **125**, 1577-1584.
- Freeman, S.** (2008). Green plants. In *Biological Sciences*, 3rd ed. (San Francisco, CA: Pearson Education).
- Fuglsang, A.T., Borch, J., Bych, K., Jahn, T.P., Roepstorff, P., and Palmgren, M.G.** (2003). The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H⁺-ATPase - Involvement of a region promoting phosphorylation-independent interaction in addition to the phosphorylation-dependent C-terminal end. *J Biol Chem* **278**, 42266-42272.
- Fujii, H., and Zhu, J.K.** (2009). *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *P Natl Acad Sci USA* **106**, 8380-8385.
- Fujii, H., Verslues, P.E., and Zhu, J.K.** (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 485-494.
- Fujii, H., Verslues, P.E., and Zhu, J.K.** (2011). *Arabidopsis* decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *P Natl Acad Sci USA* **108**, 1717-1722.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., and Zhu, J.K.** (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**, 660-U138.
- Gehrig, H., Schussler, A., and Kluge, M.** (1996). Geosiphon pyriforme, a fungus forming endocytobiosis with Nostoc (cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *J Mol Evol* **43**, 71-81.

- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A., Romeis, T., and Hedrich, R.** (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21425-21430.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., Romeis, T., and Hedrich, R.** (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8023-8028.
- Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., Romeis, T., and Hedrich, R.** (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* **4**, ra32.
- Gepstein, S., Jacobs, M., and Taiz, L.** (1982). Inhibition of Stomatal Opening in Vicia-Faba Epidermal Tissue by Vanadate and Abscisic-Acid. *Plant Sci Lett* **28**, 63-72.
- Ghosh, I., Hamilton, A.D., and Regan, L.** (2000). Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein. *J Am Chem Soc* **122**, 5658-5659.
- Glueck, S.M., Gumus, S., Fabian, W.M., and Faber, K.** (2010). Biocatalytic carboxylation. *Chem Soc Rev* **39**, 313-328.
- Grabov, A., Leung, J., Giraudat, J., and Blatt, M.R.** (1997). Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant J* **12**, 203-213.
- Graham, L.E.** (1993). *Origin of Land Plants* (Wiley, New York).
- Gray, J.** (1993). Major Paleozoic Land Plant Evolutionary Bio-Events. *Palaeogeogr Palaeoclimatol* **104**, 153-169.
- Green, M.R., and Sambrook, J.** (2012). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. (Cold Harbor Laboratory Press).
- Gundersen, C.B., and Miledi, R.** (1983). Acetylcholinesterase Activity of *Xenopus-Laevis* Oocytes. *Neuroscience* **10**, 1487-1495.
- Gundersen, C.B., Miledi, R., and Parker, I.** (1983a). Serotonin Receptors Induced by Exogenous Messenger-Rna in *Xenopus* Oocytes. *Proc R Soc Ser B-Bio* **219**, 103-109.
- Gundersen, C.B., Miledi, R., and Parker, I.** (1983b). Voltage-Operated Channels Induced by Foreign Messenger-Rna in *Xenopus* Oocytes. *Proc R Soc Ser B-Bio* **220**, 131-140.
- Guo, F.O., Young, J., and Crawford, N.M.** (2003). The nitrate transporter *AtNRT1.1* (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 107-117.
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., and Marbaix, G.** (1971). Use of Frog Eggs and Oocytes for Study of Messenger Rna and Its Translation in Living Cells. *Nature* **233**, 177-&.
- Harper, J.E., Breton, G., and Harmon, A.** (2004). Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 263-288.
- Harris, M.J., Outlaw, W.H., Mertens, R., and Weiler, E.W.** (1988). Water-Stress-Induced Changes in the Abscisic-Acid Content of Guard-Cells and Other Cells of *Vicia-Faba* L Leaves as Determined by Enzyme-Amplified Immunoassay. *P Natl Acad Sci USA* **85**, 2584-2588.
- Hashimoto, M., Negi, J., Young, J., Israelsson, M., Schroeder, J.I., and Iba, K.** (2006). *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nat Cell Biol* **8**, 391-U352.
- Heath, M.C.** (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**, 321-334.
- Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., and Hedges, S.B.** (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**, 1129-1133.
- Hedrich, R., and Marten, I.** (1993). Malate-Induced Feedback-Regulation of Plasma-Membrane Anion Channels Could Provide a CO₂ Sensor to Guard-Cells. *Embo J* **12**, 897-901.

- Hedrich, R., Busch, H., and Raschke, K.** (1990). Ca-2+ and Nucleotide Dependent Regulation of Voltage Dependent Anion Channels in the Plasma-Membrane of Guard-Cells. *Embo J* **9**, 3889-3892.
- Herzschuh, U., Ni, J., Birks, H.J.B., and Bohner, J.** (2011). Driving forces of mid-Holocene vegetation shifts on the upper Tibetan Plateau, with emphasis on changes in atmospheric CO₂ concentrations. *Quaternary Sci Rev* **30**, 1907-1917.
- Hetherington, A.M., and Woodward, F.I.** (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**, 901-908.
- Hickok, L.G.** (1983). Abscisic-Acid Blocks Antheridiogen-Induced Antheridium Formation in Gametophytes of the Fern *Ceratopteris*. *Can J Bot* **61**, 888-892.
- Hickok, L.G.** (1985). Abscisic-Acid Resistant Mutants in the Fern *Ceratopteris* - Characterization and Genetic-Analysis. *Can J Bot* **63**, 1582-1585.
- Hickok, L.G., and Warne, T.R.** (1998). Tested studies for laboratory teaching Vol. 19 - Laboratory investigations with C-FernTM (*Ceratopteris richardii*). (Karcher S. J. (Ed.)).
- Hickok, L.G., Warne, T.R., and Fribourg, R.S.** (1995). The Biology of the Fern *Ceratopteris* and Its Use as a Model System. *Int J Plant Sci* **156**, 332-345.
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Hohener, B., and Grill, E.** (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *Embo J* **21**, 3029-3038.
- Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci* **12**, 343-351.
- Hoekenga, O.A., Maron, L.G., Pineros, M.A., Cancado, G.M.A., Shaff, J., Kobayashi, Y., Ryan, P.R., Dong, B., Delhaize, E., Sasaki, T., Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Koyama, H., and Kochian, L.V.** (2006). AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci USA* **103**, 9738-9743.
- Holbrook, N.M., Shashidhar, V.R., James, R.A., and Munns, R.** (2002). Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *J Exp Bot* **53**, 1503-1514.
- Holland, H.D.** (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos T R Soc B* **361**, 903-915.
- Holzinger, A., and Karsten, U.** (2013). Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological, and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Holzinger, A., Kaplan, F., Blaas, K., Zechmann, B., Komsic-Buchmann, K., and Becker, B.** (2014). Transcriptomics of Desiccation Tolerance in the Streptophyte Green Alga *Klebsormidium* Reveal a Land Plant-Like Defense Reaction. *Plos One* **9**.
- Hornberg, C., and Weiler, E.W.** (1984). High-affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **310**, 321-324.
- Horstman, A., Tonaco, I.A.N., Boutilier, K., and Immink, R.G.H.** (2014). A Cautionary Note on the Use of Split-YFP/BiFC in Plant Protein-Protein Interaction Studies. *Int J Mol Sci* **15**, 9628-9643.
- Hoshi, T.** (1995). Regulation of Voltage-Dependence of the Kat1 Channel by Intracellular Factors. *J Gen Physiol* **105**, 309-328.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., Simonneau, T., Thibaud, J.B., and Sentenac, H.** (2003a). The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration (vol 100, pg 5549, 2003). *P Natl Acad Sci USA* **100**, 7418-7418.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., Simonneau, T., Thibaud, J.B., and Sentenac, H.** (2003b). The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *P Natl Acad Sci USA* **100**, 5549-5554.

- Hrabak, E.M., Chan, C.W.M., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.K., and Harmon, A.C.** (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* **132**, 666-680.
- Hu, H.H., Boisson-Dernier, A., Israelsson-Nordstrom, M., Bohmer, M., Xue, S.W., Ries, A., Godoski, J., Kuhn, J.M., and Schroeder, J.I.** (2010). Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat Cell Biol* **12**, 87-U234.
- Huang, X., and Miller, W.** (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics* **12**, 337-357.
- Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D., and Schroeder, J.I.** (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* **24**, 1695-1708.
- Hueber, F.M.** (1992). Thoughts on the Early Lycopsids and Zosterophylls. *Ann Mo Bot Gard* **79**, 474-499.
- Ikegami, K., Okamoto, M., Seo, M., and Koshiba, T.** (2009). Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *J Plant Res* **122**, 235-243.
- Ilan, N., Schwartz, A., and Moran, N.** (1996). External protons enhance the activity of the hyperpolarization-activated K channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *J Membrane Biol* **154**, 169-181.
- Imes, D., Mumm, P., Bohm, J., Al-Rasheid, K.A.S., Marten, I., Geiger, D., and Hedrich, R.** (2013). Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* **74**, 372-382.
- Johnson, R.R., Wagner, R.L., Verhey, S.D., and Walker-Simmons, M.K.** (2002). The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol* **130**, 837-846.
- Kagan, M.L., and Sachs, T.** (1991). Development of Immature Stomata - Evidence for Epigenetic Selection of a Spacing Pattern. *Dev Biol* **146**, 100-105.
- Kanaoka, M.M., Pillitteri, L.J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N.L., Takabayashi, J., Zhu, J.K., and Torii, K.U.** (2008). SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation. *Plant Cell* **20**, 1775-1785.
- Kang, J., Hwang, J.U., Lee, M., Kim, Y.Y., Assmann, S.M., Martinoia, E., and Lee, Y.** (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *P Natl Acad Sci USA* **107**, 2355-2360.
- Kangasjarvi, J., Jaspers, P., and Kollist, H.** (2005). Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell Environ* **28**, 1021-1036.
- Kaplan, D.R.** (2001). The science of plant morphology: Definition, history, and role in modern biology. *Am J Bot* **88**, 1711-1741.
- Karol, K.G., McCourt, R.M., Cimino, M.T., and Delwiche, C.F.** (2001). The closest living relatives of land plants. *Science* **294**, 2351-2353.
- Karsten, U., and Holzinger, A.** (2014). Green algae in alpine biological soil crust communities: acclimation strategies against ultraviolet radiation and dehydration. *Biodivers Conserv* **23**, 1845-1858.
- Keller, B.U., Hedrich, R., and Raschke, K.** (1989). Voltage-Dependent Anion Channels in the Plasma-Membrane of Guard-Cells. *Nature* **341**, 450-453.
- Kenrick, P., and Crane, P.R.** (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature* **389**, 33-39.
- Kim, K.N., Cheong, Y.H., Grant, J.J., Pandey, G.K., and Luan, S.** (2003). CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 411-423.

- Kim, T.H., Bohmer, M., Hu, H.H., Nishimura, N., and Schroeder, J.I.** (2010). Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 561-591.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., and Shimazaki, K.** (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656-660.
- Klein, M., Cheng, G., Chung, M., and Tallman, G.** (1996). Effects of turgor potentials of epidermal cells neighbouring guard cells on stomatal opening in detached leaf epidermis and intact leaflets of *Vicia faba* L (faba bean). *Plant Cell Environ* **19**, 1399-1407.
- Knoll, A.H., Niklas, K.J., Gensel, P.G., and Tiffney, B.H.** (1984). Character Diversification and Patterns of Evolution in Early Vascular Plants. *Paleobiology* **10**, 34-47.
- Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T., and Koshiba, T.** (2004). Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**, 1697-1707.
- Konrad, W., Roth-Nebelsick, A., Kerp, H., and Hass, H.** (2000). Transpiration and assimilation of early Devonian land plants with axially symmetric telomes - Simulations on the tissue level. *J Theor Biol* **206**, 91-107.
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., and Shinozaki, K.** (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *P Natl Acad Sci USA* **107**, 2361-2366.
- Kusumi, K., Hirotsuka, S., Kumamaru, T., and Iba, K.** (2012). Increased leaf photosynthesis caused by elevated stomatal conductance in a rice mutant deficient in SLAC1, a guard cell anion channel protein. *J Exp Bot* **63**, 5635-5644.
- Kwak, J.M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V.M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G., and Schroeder, J.I.** (2001). Dominant negative guard cell K⁺ channel mutants reduce inward-rectifying K⁺ currents and light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**, 473-485.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G., and Schroeder, J.I.** (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *Embo J* **22**, 2623-2633.
- Lacombe, B., Pilot, G., Gaymard, F., Sentenac, H., and Thibaud, J.B.** (2000). pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. *Febs Lett* **466**, 351-354.
- Langer, K., Levchenko, V., Fromm, J., Geiger, D., Steinmeyer, R., Lautner, S., Ache, P., and Hedrich, R.** (2004). The poplar K(+) channel KPT1 is associated with K(+) uptake during stomatal opening and bud development. *Plant J* **37**, 828-838.
- Lee, S.B., and Suh, M.C.** (2015). Advances in the understanding of cuticular waxes in *Arabidopsis thaliana* and crop species. *Plant Cell Rep* **34**, 557-572.
- Lee, S.C., Lan, W., Buchanan, B.B., and Luan, S.** (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21419-21424.
- Lee, S.C., Lan, W.Z., Kim, B.G., Li, L.G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Lu, G.H., Buchanan, B.B., and Luan, S.** (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *P Natl Acad Sci USA* **104**, 15959-15964.
- Lefoulon, C., Boeglin, M., Moreau, B., Very, A.A., Szponarski, W., Dauzat, M., Michard, E., Gaillard, I., and Chereil, I.** (2016). The *Arabidopsis* AtPP2CA Protein Phosphatase Inhibits the GORK K⁺ Efflux Channel and Exerts a Dominant Suppressive Effect on Phosphomimetic-activating Mutations. *J Biol Chem* **291**, 6521-6533.
- Leung, J., Bouvierdurand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Chedford, F., and Giraudat, J.** (1994). *Arabidopsis* ABA Response Gene *Abi1* - Features of a Calcium-Modulated Protein Phosphatase. *Science* **264**, 1448-1452.
- Levchenko, V., Konrad, K.R., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., and Hedrich, R.** (2005). Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4203-4208.

- Li, J.X., and Assmann, S.M.** (1996). An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean. *Plant Cell* **8**, 2359-2368.
- Lind, C., Dreyer, I., Lopez-Sanjurjo, E.J., von Meyer, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., Lang, D., Zhao, Y., Kreuzer, I., Al-Rasheid, K.A.S., Ronne, H., Reski, R., Zhu, J.K., Geiger, D., and Hedrich, R.** (2015). Stomatal Guard Cells Co-opted an Ancient ABA-Dependent Desiccation Survival System to Regulate Stomatal Closure. *Curr Biol* **25**, 928-935.
- Linder, B., and Raschke, K.** (1992). A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *Febs Lett* **313**, 27-30.
- Linne von Berg, K.H., Hoef-Emden, K., Marin, B., and Melkonian, M.** (2004). *Der Kosmos-Algenführer: Die wichtigsten Süßwasser-algen im Mikroskop.* (Kosmos).
- Little, C.H.A., and Eidt, D.C.** (1968). Effect of Abscisic Acid on Budbreak and Transpiration in Woody Species. *Nature* **220**, 498-&.
- Lokhorst, G.M.** (1996). *Comparative Taxonomic Studies on the Genus Klebsormidium (Charophyceae) in Europe - Cryptogamic studies.* (Stuttgart ; Jena ; New York: Gustav Fischer Verlag).
- Lüttge, U., Kluge, M., and Thiel, G.** (2010). *Botanik - Die umfassende Biologie der Pflanzen.* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E.** (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* **324**, 1064-1068.
- MacAlister, C.A., Ohashi-Ito, K., and Bergmann, D.C.** (2007). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* **445**, 537-540.
- MacRobbie, E.A.C.** (1987). Ionic Relations of Guard Cells. In *Stomatal Function*, E. Zeiger, G.D. Farquhar, and I.R. Cowan, eds (Stanford, California, USA: Stanford University Press), pp. 125-162.
- MacRobbie, E.A.C.** (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philos T Roy Soc B* **353**, 1475-1488.
- MacRobbie, E.A.C.** (2006). Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells. *P Natl Acad Sci USA* **103**, 1135-1140.
- Magallón, S., Hilu, K.W., and Quandt, D.** (2013). Land plant evolutionary timeline: Gene effects are secondary to fossil constraints in relaxed clock estimation of age and substitution rates. *Am J Bot.*
- Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, J.N., Lind, C., Bauer, H., Hashimoto, K., Al-Rasheid, K.A.S., Luan, S., Kudla, J., Geiger, D., and Hedrich, R.** (2014a). Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Science Signaling* **7**.
- Maierhofer, T., Lind, C., Huttli, S., Scherzer, S., Papenfuss, M., Simon, J., Al-Rasheid, K.A.S., Ache, P., Rennenberg, H., Hedrich, R., Muller, T.D., and Geiger, D.** (2014b). A Single-Pore Residue Renders the Arabidopsis Root Anion Channel SLAH2 Highly Nitrate Selective. *Plant Cell* **26**, 2554-2567.
- Marletaz, F., Martin, E., Perez, Y., Papillon, D., Caubit, X., Lowe, C.J., Freeman, B., Fasano, L., Dossat, C., Wincker, P., Weissenbach, J., and Le Parco, Y.** (2006). Chaetognath phylogenomics: a protostome with deuterostome-like development. *Curr Biol* **16**, R577-578.
- McAdam, S.A., and Brodribb, T.J.** (2012). Fern and lycophyte guard cells do not respond to endogenous abscisic acid. *Plant Cell* **24**, 1510-1521.
- McAdam, S.A.M., Brodribb, T.J., Banks, J.A., Hedrich, R., Atallah, N.M., Cai, C., Geringer, M.A., Lind, C., Nichols, D.S., Stachowski, K., Geiger, D., and Susmilch, F.C.** (2016). Abscisic acid controlled sex before transpiration in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*
- McAinsh, M.R., Brownlee, C., and Hetherington, A.M.** (1990). Abscisic Acid-Induced Elevation of Guard-Cell Cytosolic Ca²⁺ Precedes Stomatal Closure. *Nature* **343**, 186-188.

- McAinsh, M.R., Brownlee, C., and Hetherington, A.M.** (1992). Visualizing Changes in Cytosolic-Free Ca²⁺ during the Response of Stomatal Guard-Cells to Abscisic-Acid. *Plant Cell* **4**, 1113-1122.
- McFadden, G.I.** (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J Phycol* **37**, 951-959.
- Melcher, K., Zhou, X.E., and Xu, H.E.** (2010a). Thirsty plants and beyond: structural mechanisms of abscisic acid perception and signaling. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 722-729.
- Melcher, K., Xu, Y., Ng, L.M., Zhou, X.E., Soon, F.F., Chinnusamy, V., Suino-Powell, K.M., Kovach, A., Tham, F.S., Cutler, S.R., Li, J., Yong, E.L., Zhu, J.K., and Xu, H.E.** (2010b). Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1102-1108.
- Melcher, K., Ng, L.M., Zhou, X.E., Soon, F.F., Xu, Y., Suino-Powell, K.M., Park, S.Y., Weiner, J.J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J., Wang, Y., Peterson, F.C., Jensen, D.R., Yong, E.L., Volkman, B.F., Cutler, S.R., Zhu, J.K., and Xu, H.E.** (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**, 602-608.
- Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., Vavasseur, A., Genty, B., Boivin, K., Muller, A., Giraudat, M., and Leung, J.** (2007). Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *Embo J* **26**, 3216-3226.
- Meyer, K., Leube, M.P., and Grill, E.** (1994). A Protein Phosphatase 2c Involved in ABA Signal-Transduction in Arabidopsis-Thaliana. *Science* **264**, 1452-1455.
- Meyer, S., Lauterbach, C., Niedermeier, M., Barth, I., Sjolund, R.D., and Sauer, N.** (2004). Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. *Plant Physiol* **134**, 684-693.
- Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K.A.S., Geiger, D., Marten, I., Martinoia, E., and Hedrich, R.** (2010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *Plant J* **63**, 1054-1062.
- Mikhailyuk, T., Glaser, K., Holzinger, A., and Karsten, U.** (2015). Biodiversity of Klebsormidium (Streptophyta) from Alpine Biological Soil Crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy). *J Phycol* **51**, 750-767.
- Milborrow, B.V., and Lee, H.S.** (1998). Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid. VI - Carotenoids and ABA are formed by the 'non-mevalonate' triose-pyruvate pathway in chloroplasts. *Aust J Plant Physiol* **25**, 507-512.
- Mittelheuser, C.J., and VanStevenink, R.F.M.** (1969). Stomatal Closure and Inhibition of Transpiration Induced by (Rs)-Abscisic Acid. *Nature* **221**, 281-&.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**, 405-410.
- Moar, V.A., Gurdon, J.B., Lane, C.D., and Marbaix, G.** (1971). Translational Capacity of Living Frog Eggs and Oocytes, as Judged by Messenger Rna Injection. *J Mol Biol* **61**, 93-&.
- Morgner, M.** *Marchantia polymorpha.*, C.C. license, ed (Link: commons.wikimedia.org/wiki/User:Morgner).
- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y.Z., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriack, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M., and Schroeder, J.I.** (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure. *Plos Biol* **4**, 1749-1762.
- Mumm, P., Imes, D., Martinoia, E., Al-Rasheid, K.A.S., Geiger, D., Marten, I., and Hedrich, R.** (2013). C-Terminus-Mediated Voltage Gating of Arabidopsis Guard Cell Anion Channel QUAC1. *Mol Plant* **6**, 1550-1563.
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., and Giraudat, J.** (2002). Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**, 3089-3099.

- Nambara, E., and Marion-Poll, A.** (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 165-185.
- Negi, J., Hashimoto, M., and Iba, K.** (2005). Characterization of CO₂-insensitive Arabidopsis mutant *cdi3*. *Plant Cell Physiol* **46**, S176-S176.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., and Iba, K.** (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* **452**, 483-U413.
- Nishimura, N., Yoshida, T., Kitahata, N., Asami, T., Shinozaki, K., and Hirayama, T.** (2007). ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J* **50**, 935-949.
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A.S., Rambo, R.P., Hitomi, C., Cutler, S.R., Schroeder, J.I., and Getzoff, E.D.** (2009). Structural Mechanism of Abscisic Acid Binding and Signaling by Dimeric PYR1. *Science* **326**, 1373-1379.
- Nour-Eldin, H.H., Geu-Flores, F., and Halkier, B.A.** (2010). USER cloning and USER fusion: the ideal cloning techniques for small and big laboratories. *Methods Mol Biol* **643**, 185-200.
- Nour-Eldin, H.H., Hansen, B.G., Norholm, M.H.H., Jensen, J.K., and Halkier, B.A.** (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Research* **34**.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., and Welin, B.V.** (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **45**, 263-279.
- Ogawa, T.** (1981). Blue-Light Response of Stomata with Starch-Containing (Vicia-Faba) and Starch-Deficient (Allium-Cepa) Guard-Cells under Background Illumination with Red-Light. *Plant Sci Lett* **22**, 103-108.
- Ogawa, T., Ishikawa, H., Shimada, K., and Shibata, K.** (1978). Synergistic Action of Red and Blue-Light and Action Spectra for Malate Formation in Guard Cells of Vicia-Faba L. *Planta* **142**, 61-65.
- Pandey, G.K., Grant, J.J., Cheong, Y.H., Kim, B.G., Li, L.G., and Luan, S.** (2008). Calcineurin-B-like protein CBL9 interacts with target kinase CIPK3 in the regulation of ABA response in seed germination. *Mol Plant* **1**, 238-248.
- Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Kim, K.N., Grant, J.J., Li, L.G., Hung, W., D'Angelo, C., Weinl, S., Kudla, J., and Luan, S.** (2004). The calcium sensor calcineurin B-Like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 1912-1924.
- Pandey, S., Nelson, D.C., and Assmann, S.M.** (2009). Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Abscisic Acid Receptors in Arabidopsis. *Cell* **136**, 136-148.
- Pandey, S., Chen, J.G., Jones, A.M., and Assmann, S.M.** (2006). G-protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development. *Plant Physiol* **141**, 243-256.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F., and Cutler, S.R.** (2009). Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* **324**, 1068-1071.
- Paton, J.A., and Pearce, J.V.** (1957). The Occurrence, Structure and Functions of the Stomata in British Bryophytes. *Transactions of the British Bryological Society* **3**, 228-259.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.
- Peterson, K.M., Rychel, A.L., and Torii, K.U.** (2010). Out of the mouths of plants: the molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *Plant Cell* **22**, 296-306.

- Pillitteri, L.J., Sloan, D.B., Bogenschutz, N.L., and Torii, K.U.** (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* **445**, 501-505.
- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Cherel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.B., and Sentenac, H.** (2001). Guard cell inward K⁺ channel activity in Arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *J Biol Chem* **276**, 3215-3221.
- Plackett, A.R.G., Rabinowitsch, E.H., and Langdale, J.A.** (2015). Protocol: genetic transformation of the fern *Ceratopteris richardii* through microparticle bombardment. *Plant Methods* **11**.
- Pluis, J.L.A.** (1993). The Role of Algae in the Spontaneous Stabilization of Blowouts. (University of Amsterdam).
- Pontier, D., Balague, C., and Roby, D.** (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Cr Acad Sci Iii-Vie* **321**, 721-734.
- Pryer, K.M., Schneider, H., Smith, A.R., Cranfill, R., Wolf, P.G., Hunt, J.S., and Sipes, S.D.** (2001). Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. *Nature* **409**, 618-622.
- Qiu, Y.-L., Cho, Y., Cox, J.C., and Palmer, J.D.** (1998). The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature* **394**, 671-674.
- Qiu, Y.L., Li, L.B., Wang, B., Xue, J.Y., Hendry, T.A., Li, R.Q., Brown, J.W., Liu, Y., Hudson, G.T., and Chen, Z.D.** (2010). Angiosperm phylogeny inferred from sequences of four mitochondrial genes. *J Syst Evol* **48**, 391-425.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A., and Grill, E.** (2010). ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* **15**, 395-401.
- Raschke, K.** (2003). Alternation of the slow with the quick anion conductance in whole guard cells effected by external malate. *Planta* **217**, 651-657.
- Raschke, K., and Humble, G.D.** (1973). No Uptake of Anions Required by Opening Stomata of *Vicia-Faba* - Guard Cells Release Hydrogen-Ions. *Planta* **115**, 47-57.
- Raschke, K., and Schnabl, H.** (1978). Availability of Chloride Affects Balance between Potassium-Chloride and Potassium Malate in Guard Cells of *Vicia-Faba* L. *Plant Physiol* **62**, 84-87.
- Raven, J.A.** (1977). The Evolution of Vascular Land Plants in Relation to Supracellular Transport Processes. (Elsevier Ltd.).
- Raven, J.A.** (1993). The Evolution of Vascular Plants in Relation to Quantitative Functioning of Dead Water-Conducting Cells and Stomata. *Biol Rev* **68**, 337-363.
- Raven, J.A.** (2002). Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist* **153**, 371-386.
- Raven JA, E.D.** (2001). Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *J Exp Bot* **52**, 381-401.
- Raven, P., Evert, R.F., and Eichhorn, S.E.** (2006). *Biologie der Pflanzen*. (De Gruyter).
- Raymond, A., and Metz, C.** (1995). Laurussian Land-Plant Diversity during the Silurian and Devonian - Mass Extinction, Sampling Bias, or Both. *Paleobiology* **21**, 74-91.
- Reddy, A.R., and Das, V.S.R.** (1986). Stomatal Movement and Sucrose Uptake by Guard-Cell Protoplasts of *Commelina-Benghalensis* L. *Plant Cell Physiol* **27**, 1565-1570.
- Reicosky, D.A., and Hanover, J.W.** (1978). Physiological-Effects of Surface Waxes .1. Light Reflectance for Glaucous and Non-Glaucous *Picea-Pungens*. *Plant Physiol* **62**, 101-104.
- Remy, W., Gensel, P.G., and Hass, H.** (1993). The Gametophyte Generation of Some Early Devonian Land Plants. *Int J Plant Sci* **154**, 35-58.
- Renzaglia, K.S., Duff, R.J., Nickrent, D.L., and Garbary, D.J.** (2000). Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny. *Philos T Roy Soc B* **355**, 769-793.
- Richardt, S., Timmerhaus, G., Lang, D., Qudeimat, E., Correa, L.G., Reski, R., Rensing, S.A., and Frank, W.** (2010). Microarray analysis of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionarily conserved transcriptional regulation of salt stress and abscisic acid signalling. *Plant Mol Biol* **72**, 27-45.
- Riederer, M., and Schreiber, L.** (2001). Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J Exp Bot* **52**, 2023-2032.

- Ritte, G., Rosenfeld, J., Rohrig, K., and Raschke, K.** (1999). Rates of sugar uptake by guard cell protoplasts of *Pisum sativum* L. related to the solute requirement for stomatal opening. *Plant Physiol* **121**, 647-655.
- Rodriguez, P.L., Benning, G., and Grill, E.** (1998). ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Febs Lett* **421**, 185-190.
- Roelfsema, M.R., Levchenko, V., and Hedrich, R.** (2004). ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J* **37**, 578-588.
- Roelfsema, M.R.G., and Prins, H.B.A.** (1997). Ion channels in guard cells of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Planta* **202**, 18-27.
- Roelfsema, M.R.G., and Prins, H.B.A.** (1998). The membrane potential of *Arabidopsis thaliana* guard cells; depolarizations induced by apoplastic acidification. *Planta* **205**, 100-112.
- Roelfsema, M.R.G., and Hedrich, R.** (2005). In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist* **167**, 665-691.
- Ruhfel, B.R., Gitzendanner, M.A., Soltis, P.S., Soltis, D.E., and Burleigh, J.G.** (2014). From algae to angiosperms-inferring the phylogeny of green plants (Viridiplantae) from 360 plastid genomes. *Bmc Evol Biol* **14**.
- Ruszala, E.M., Beerling, D.J., Franks, P.J., Chater, C., Casson, S.A., Gray, J.E., and Hetherington, A.M.** (2011). Land Plants Acquired Active Stomatal Control Early in Their Evolutionary History. *Curr Biol* **21**, 1030-1035.
- Saez, A., Apostolova, N., Gonzalez-Guzman, M., Gonzalez-Garcia, M.P., Nicolas, C., Lorenzo, O., and Rodriguez, P.L.** (2004). Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* **37**, 354-369.
- Saji, S., Bathula, S., Kubo, A., Tamaoki, M., Kanna, M., Aono, M., Nakajima, N., Nakaji, T., Takeda, T., Asayama, M., and Saji, H.** (2008). Disruption of a gene encoding C(4)-dicarboxylate transporter-like protein increases ozone sensitivity through deregulation of the stomatal response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **49**, 2-10.
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.Y., Marquez, J.A., Cutler, S.R., and Rodriguez, P.L.** (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* **60**, 575-588.
- Sasaki, T., Mori, I.C., Furuichi, T., Munemasa, S., Toyooka, K., Matsuoka, K., Murata, Y., and Yamamoto, Y.** (2010). Closing Plant Stomata Requires a Homolog of an Aluminum-Activated Malate Transporter. *Plant Cell Physiol* **51**, 354-365.
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., and Uozumi, N.** (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. *Biochem J* **424**, 439-448.
- Scherzer, S., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A.S., Geiger, D., and Hedrich, R.** (2012). Multiple Calcium-Dependent Kinases Modulate ABA-Activated Guard Cell Anion Channels. *Mol Plant* **5**, 1409-1412.
- Schmidt, C., and Schroeder, J.I.** (1994). Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma-Membrane of Guard-Cells - Large Nitrate Permeability. *Plant Physiol* **106**, 383-391.
- Schmidt, C., Schelle, I., Liao, Y.J., and Schroeder, J.I.** (1995). Strong Regulation of Slow Anion Channels and Abscisic-Acid Signaling in Guard-Cells by Phosphorylation and Dephosphorylation Events. *P Natl Acad Sci USA* **92**, 9535-9539.
- Schönherr, J., and Ziegler, H.** (1975). Hydrophobic Cuticular Ledges Prevent Water Entering Air Pores of Liverwort Thalli. *Planta* **124**, 51-60.
- Schopf, J.W.** (1993). Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* **260**, 640-646.
- Schroeder, J.I.** (1988). K⁺ Transport-Properties of K⁺ Channels in the Plasma-Membrane of *Vicia-Faba* Guard-Cells. *J Gen Physiol* **92**, 667-683.

- Schroeder, J.I., and Hagiwara, S.** (1989). Cytosolic Calcium Regulates Ion Channels in the Plasma-Membrane of Vicia-Faba Guard-Cells. *Nature* **338**, 427-430.
- Schroeder, J.I., and Keller, B.U.** (1992). Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5025-5029.
- Schroeder, J.I., Hedrich, R., and Fernandez, J.M.** (1984). Potassium-Selective Single Channels in Guard-Cell Protoplasts of Vicia-Faba. *Nature* **312**, 361-362.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., and Allen, G.J.** (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* **410**, 327-330.
- Schwartz, R., and Dayhoff, M.** (1978). Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science* **199**, 395-403.
- Schweighofer, A., Hirt, H., and Meskiene, L.** (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* **9**, 236-243.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., and Shinozaki, K.** (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 296-302.
- Selosse, M.A., and Le Tacon, F.** (1998). The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends Ecol Evol* **13**, 15-20.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.M., Gaymard, F., and Grignon, C.** (1992). Cloning and Expression in Yeast of a Plant Potassium-Ion Transport-System. *Science* **256**, 663-665.
- Seo, M., and Koshiba, T.** (2011). Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *J Plant Res* **124**, 501-507.
- Shaw, A.J., Szovenyi, P., and Shaw, B.** (2011). Bryophyte Diversity and Evolution: Windows into the Early Evolution of Land Plants. *Am J Bot* **98**, 352-369.
- Sheen, J.** (1998). Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *P Natl Acad Sci USA* **95**, 975-980.
- 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., Fan, R.C., Xu, Y.H., and Zhang, D.P.** (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**, 823-826.
- Shimazaki, K., Iino, M., and Zeiger, E.** (1986). Blue Light-Dependent Proton Extrusion by Guard-Cell Protoplasts of Vicia-Faba. *Nature* **319**, 324-326.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi, K.** (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotech* **7**, 161-167.
- Shope, J.C., and Mott, K.A.** (2006). Membrane trafficking and osmotically induced volume changes in guard cells. *J Exp Bot* **57**, 4123-4131.
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H.C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S., and Kwak, J.M.** (2009). Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *Febs Lett* **583**, 2982-2986.
- Smith, A.R., Pryer, K.M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., and Wolf, P.G.** (2006). A classification for extant ferns. *Taxon* **55**, 705-731.
- Solovchenko, A., and Merzlyak, M.** (2003). Optical properties and contribution of cuticle to UV protection in plants: experiments with apple fruit. *Photoch Photobio Sci* **2**, 861-866.
- Soon, F.F., Ng, L.M., Zhou, X.E., West, G.M., Kovach, A., Tan, M.H.E., Suino-Powell, K.M., He, Y.Z., Xu, Y., Chalmers, M.J., Brunzelle, J.S., Zhang, H.M., Yang, H.Y., Jiang, H.L., Li, J., Yong, E.L., Cutler, S., Zhu, J.K., Griffin, P.R., Melcher, K., and Xu, H.E.** (2012). Molecular Mimicry Regulates ABA Signaling by SnRK2 Kinases and PP2C Phosphatases. *Science* **335**, 85-88.
- Stadler, R., Buttner, M., Ache, P., Hedrich, R., Ivashikina, N., Melzer, M., Shearson, S.M., Smith, S.M., and Sauer, N.** (2003). Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of Arabidopsis. *Plant Physiol* **133**, 528-537.
- Sun, S.J., Qi, G.N., Gao, Q.F., Wang, H.Q., Yao, F.Y., Hussain, J., and Wang, Y.F.** (2016). Protein kinase OsSAPK8 functions as an essential activator of S-type anion channel OsSLAC1, which is nitrate-selective in rice. *Planta* **243**, 489-500.
- Szostkiewicz, I., Richter, K., Kepka, M., Demmel, S., Ma, Y., Korte, A., Assaad, F.F., Christmann, A., and Grill, E.** (2010). Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J* **61**, 25-35.

- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., Palme, K., and Hedrich, R.** (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *P Natl Acad Sci USA* **98**, 2917-2921.
- Taiz, L., and Zeiger, E.** (2014). *Plant Physiology and Development*. (Sinauer Associates).
- Takemiya, A., Yamauchi, S., Yano, T., Ariyoshi, C., and Shimazaki, K.** (2013). Identification of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Which Mediates Blue Light Signaling for Stomatal Opening. *Plant Cell Physiol* **54**, 24-35.
- Talbott, L.D., and Zeiger, E.** (1998). The role of sucrose in guard cell osmoregulation. *J Exp Bot* **49**, 329-337.
- Tallman, G., and Zeiger, E.** (1988). Light Quality and Osmoregulation in Vicia Guard-Cells - Evidence for Involvement of 3 Metabolic Pathways. *Plant Physiol* **88**, 887-895.
- Tan, B.C., Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L.J., Li, Q.B., Cline, K., and McCarty, D.R.** (2003). Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* **35**, 44-56.
- Taylor, D.E., Hou, Y.F., Turner, R.J., and Weiner, J.H.** (1994). Location of a Potassium Tellurite Resistance Operon (Teha Tehb) within the Terminus of Escherichia-Coli K-12. *J Bacteriol* **176**, 2740-2742.
- Taylor, W.A.** (1995). Spores in Earliest Land Plants. *Nature* **373**, 391-392.
- The-Arabidopsis-Genome-Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408**, 796-815.
- Thiel, G., and Blatt, M.R.** (1991). The Mechanism of Ion Permeation through K⁺-Channels of Stomatal Guard-Cells - Voltage-Dependent Block by Na⁺. *J Plant Physiol* **138**, 326-334.
- Thomine, S., and Barbier-Brygoo, H.** (2010). STRUCTURAL BIOLOGY A peep through anion channels. *Nature* **467**, 1058-1059.
- Timmerhaus, G., Hanke, S.T., Buchta, K., and Rensing, S.A.** (2011). Prediction and validation of promoters involved in the abscisic acid response in Physcomitrella patens. *Mol Plant* **4**, 713-729.
- Torsethagen, G., Pell, E.J., and Assmann, S.M.** (1999). Ozone inhibits guard cell K⁺ channels implicated in stomatal opening. *P Natl Acad Sci USA* **96**, 13577-13582.
- Tougane, K., Komatsu, K., Bhyan, S.B., Sakata, Y., Ishizaki, K., Yamato, K.T., Kohchi, T., and Takezawa, D.** (2010). Evolutionarily Conserved Regulatory Mechanisms of Abscisic Acid Signaling in Land Plants: Characterization of ABSCISIC ACID INSENSITIVE1-Like Type 2C Protein Phosphatase in the Liverwort Marchantia polymorpha. *Plant Physiol* **152**, 1529-1543.
- Turmel, M., Pombert, J., x, Fran, xe, ois, Charlebois, P., Otis, C., and Lemieux, C.** (2007). The Green Algal Ancestry of Land Plants as Revealed by the Chloroplast Genome. *Int J Plant Sci* **168**, 679-689.
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* **51**, 1821-1839.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *P Natl Acad Sci USA* **106**, 17588-17593.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.F., Nishimura, N., Chan, W.Y., Valerio, G., Lamminmaki, A., Brosche, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J.I., and Kangasjarvi, J.** (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**, 487-U415.
- Vahisalu, T., Puzorjova, I., Brosche, M., Valk, E., Lepiku, M., Moldau, H., Pechter, P., Wang, Y.S., Lindgren, O., Salojarvi, J., Loog, M., Kangasjarvi, J., and Kollist, H.** (2010). Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* **62**, 442-453.
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P.L., Lauriere, C., and Merlot, S.** (2009). Protein Phosphatases 2C

- Regulate the Activation of the Snf1-Related Kinase OST1 by Abscisic Acid in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 3170-3184.
- Wang, L., Wan, R.J., Shi, Y.H., and Xue, S.W.** (2016). Hydrogen Sulfide Activates S-Type Anion Channel via OST1 and Ca²⁺ Modules. *Mol Plant* **9**, 489-491.
- Wettstein, V.D.F.v.** (1928). Über plasmatische Vererbung und über das Zusammenwirken von Genen und Plasma (Berl Dtsch Bot Ges).
- Wickett, N.J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M.S., Burleigh, J.G., Gitzendanner, M.A., Ruhfel, B.R., Wafula, E., Der, J.P., Graham, S.W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Miles, N.W., Rothfels, C.J., Pokorny, L., Shaw, A.J., DeGironimo, L., Stevenson, D.W., Surek, B., Villarreal, J.C., Roure, B., Philippe, H., dePamphilis, C.W., Chen, T., Deyholos, M.K., Baucom, R.S., Kutchan, T.M., Augustin, M.M., Wang, J., Zhang, Y., Tian, Z.J., Yan, Z.X., Wu, X.L., Sun, X., Wong, G.K.S., and Leebens-Mack, J.** (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *P Natl Acad Sci USA* **111**, E4859-E4868.
- Wilkinson, S., and Davies, W.J.** (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* **25**, 195-210.
- Wille, A.C., and Lucas, W.J.** (1984). Ultrastructural and Histochemical-Studies on Guard-Cells. *Planta* **160**, 129-142.
- Wong, S.C., Cowan, I.R., and Farquhar, G.D.** (1979). Stomatal Conductance Correlates with Photosynthetic Capacity. *Nature* **282**, 424-426.
- Woodward, F.I.** (1998). Do plants really need stomata? *J Exp Bot* **49**, 471-480.
- Wu, H., Sharpe, P.J.H., and Spence, R.D.** (1985). Stomatal Mechanics .3. Geometric Interpretation of the Mechanical Advantage. *Plant Cell Environ* **8**, 269-274.
- Xue, S., Hu, H., Ries, A., Merilo, E., Kollist, H., and Schroeder, J.I.** (2011). Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO₂ signal transduction in guard cell. *Embo J* **30**, 1645-1658.
- Yang, F.W., and Feng, X.Q.** (2015). Abscisic acid biosynthesis and catabolism and their regulation roles in fruit ripening. *Phyton-Int J Exp Bot* **84**, 444-453.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K.** (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *J Biol Chem* **281**, 5310-5318.
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R., and Shinozaki, K.** (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **43**, 1473-1483.
- Zeevaert, J.A.D., and Creelman, R.A.** (1988). Metabolism and Physiology of Abscisic-Acid. *Annu Rev Plant Phys* **39**, 439-473.
- Zeiger, E., and Hepler, P.K.** (1977). Light and Stomatal Function - Blue-Light Stimulates Swelling of Guard Cell Protoplasts. *Science* **196**, 887-889.
- Zeiger, E., Assmann, S.M., and Meidner, H.** (1983). The Photobiology of Paphiopedilum Stomata: Opening under Blue but Not Red Light. *Plant Physiol* **72**, 101-101.
- Zhao, Y., Chan, Z.L., Xing, L., Liu, X.D., Hou, Y.J., Chinnusamy, V., Wang, P.C., Duan, C.G., and Zhu, J.K.** (2013). The unique mode of action of a divergent member of the ABA-receptor protein family in ABA and stress signaling. *Cell Res* **23**, 1380-1395.
- Zhou, M., Morais-Cabral, J.H., Mann, S., and MacKinnon, R.** (2001). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* **411**, 657-661.
- Zhu, S.Y., Yu, X.C., Wang, X.J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.C., Shang, Y., Du, S.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Xu, Y.H., Zhang, X.Y., and Zhang, D.P.** (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 3019-3036.

5.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die Evolution der Landpflanzen	4
Abbildung 1-2: Entwicklung der Stomata im Laufe der Evolution von Landpflanzen ...	11
Abbildung 1-3: Der ABA-Signalweg in Schließzellen von Samenpflanzen.....	23
Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines DEVC Messplatzes	54
Abbildung 2-2: Spannungsprotokoll eines Testpulses und des Standardmessprotokolls	56
Abbildung 2-3: Stromantwort von AtSLAC1 auf das Standard-Spannungsprotokoll....	58
Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der split-YFP/BIFC-Methode	62
Abbildung 3-1: Phylogenetische Einordnung der untersuchten SLAC1-Kanäle	76
Abbildung 3-2: Phylogenetische Einordnung der untersuchten OST1-Kinasen.....	78
Abbildung 3-3: Split-YFP (BIFC) Analyse der SLAC-Kanäle mit AtOST1.....	81
Abbildung 3-4: Elektrophysiologische Charakterisierung von AtSLAC1	82
Abbildung 3-5: Koexpression der SLAC1 und OST1 Kinasen aus Algen und Moosen in Oozyten	83
Abbildung 3-6: Charakterisierung des SLAC1-Kanals <i>PpSLAC1</i> aus <i>Physcomitrella patens</i>	84
Abbildung 3-7: Chimären aus AtSLAC1 und <i>PpSLAC1</i> führen zu einem voll funktionellen Kanal	85
Abbildung 3-8: BIFC-Interaktion von <i>PpSLAC1</i> und AtNT- <i>PpSLAC1</i> mit OST1-Kinasen	86
Abbildung 3-9: <i>PpSLAC2</i> benötigt beide Termini von AtSLAC1 für eine volle Funktionalität.....	87
Abbildung 3-10: Die konservierte Domäne am Anfang des SLAC C-Terminus.....	90
Abbildung 3-11: Vergleich der Transmembrane 9 der SLAC-Kanäle.....	91
Abbildung 3-12: Charakterisierung des Kanals <i>MpSLAC1</i> aus <i>Marchantia polymorpha</i>	92
Abbildung 3-13: Charakterisierung des Kanals <i>KnSLAC1</i> aus <i>Klebsormidium nitens</i>	93
Abbildung 3-14: Vergleich der C-terminalen Domäne 2 der OST1-Kinasen	94
Abbildung 3-15 Regulation der Aktivität der OST1-Kinasen durch ABI1-Phosphatasen	95
Abbildung 3-16: Funktionalität der OSTs aus Algen und Moosen im langsamen ABA-Signalweg	97

Abbildung 3-17: Charakterisierung der SLAC-Kanäle und OST1-Kinasen aus <i>Selaginella</i>	99
Abbildung 3-18: Charakterisierung des konstitutiv aktiven Kanals <i>SmSLAC2</i> aus <i>Selaginella</i>	100
Abbildung 3-19: Regulatorische Domänen im konstitutiv aktiven Kanal <i>SmSLAC2</i>	101
Abbildung 3-20: Phenylalaninmutanten der Kanäle <i>SmSLAC1</i> und <i>SmSLAC3</i> aus <i>Selaginella</i>	103
Abbildung 3-21: <i>SmSLAC1</i> ist ein nitratselektiver S-Typ-Kanal	104
Abbildung 3-22: Charakterisierung der Kanäle <i>CrSLAC1a/b</i> aus <i>Ceratopteris</i>	105
Abbildung 3-23: Vergleich der <i>CrOST1</i> Wildtyp Kinasen mit den beiden Mutanten <i>gaia1-1/2</i>	106
Abbildung 3-24: Untersuchung der Phenylalaninmutanten von <i>CrSLAC1a/b</i> aus <i>Ceratopteris</i>	108
Abbildung 3-25: Die Wirkung der Termini von <i>AtSLAC1</i> auf die Aktivität von <i>CrSLAC1a</i>	109
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des ABA-Signalweg in <i>Arabidopsis thaliana</i>	113
Abbildung 4-2: Struktur der SLAC-Kanäle aus Algen bis hin zu den Samenpflanzen	116
Abbildung 4-3: Vergleich der konservierten Domäne im CT der SLAC-Kanäle	119
Abbildung 4-4: Entwicklung des schnellen ABA-Signalwegs der Landpflanzen	125
Abbildung 5-1: Vergleich des NT von <i>AtSLAC1</i> mit <i>CrSLAC1a/b</i> und von <i>AtSLAC1</i> mit <i>SmSLAC1/4</i>	131
Abbildung 5-2: Vergleich der Sequenz der ABA-Box aller untersuchten OST1-Kinasen	132
Abbildung 5-3: BIFC-Assay der <i>PpSLAC</i>-Kanäle und Chimären mit den OST1-Kinasen	133
Abbildung 5-4: BIFC-Assay der <i>CrSLAC</i>-Kanäle und <i>CrOST1</i>-Kinasen	134

6. Lebenslauf und Publikationsliste

6.1 Lebenslauf

6.2 Publikationsliste

Maierhofer, T.*, **Lind, C.***, Huttl, S.*, Scherzer, S., Papenfuss, M., Simon, J., Al-Rasheid, K.A.S., Ache, P., Rennenberg, H., Hedrich, R., Müller, T.D., und Geiger, D. (2014). „A Single-Pore Residue Renders the *Arabidopsis* Root Anion Channel SLAH2 Highly Nitrate Selective.” Plant Cell **26**, 2554-2567.

Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, J.N., **Lind, C.**, Bauer, H., Hashimoto, K., Al-Rasheid, K.A.S., Luan, S., Kudla, J., Geiger, D., und Hedrich, R. (2014). „Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid.” Science Signaling **7**.

Lind, C.*, Dreyer, I.*, Lopez-Sanjurjo, E.J., von Meyer, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., Lang, D., Zhao, Y., Kreuzer, I., Al-Rasheid, K.A.S., Ronne, H., Reski, R., Zhu, J.K., Geiger, D., und Hedrich, R. (2015). “Stomatal Guard Cells Co-opted an Ancient ABA-Dependent Desiccation Survival System to Regulate Stomatal Closure.” Curr Biol **25**, 928-935.

McAdam, S.A.M., Brodribb, T.J., Banks, J.A., Hedrich, R., Atallah, N.M., Cai, C., Geringer, M.A., **Lind, C.**, Nichols, D.S., Stachowski, K., Geiger, D., and Susmilch, F.C. (2016). “Abscisic acid controlled sex before transpiration in vascular plants.” Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)

* Autoren sind gleichberechtigt

7. Eidesstattliche Erklärung und Danksagung

7.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

Würzburg, den 16.11.2016

.....

Christof Lind

7.2 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation und während dessen unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt daher:

Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich dafür, dass er mir ermöglicht hat an dieser interessanten Thematik zu forschen und für seine Betreuung dieser Doktorarbeit. Besonders dankbar bin ich für die richtungsweisenden Gespräche und Vorschläge im Lauf meiner Forschungsarbeit.

Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für die Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dietmar Geiger für seine Betreuung und Unterstützung über die gesamte Dauer meiner Arbeit. Dabei möchte ich mich besonders für die gute Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe und seine stete Hilfsbereitschaft in Rat und Tat bedanken, die die Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit erst möglich gemacht hat.

Den Kollaborationspartnern, aus der Arbeitsgruppe von Ralf Reski an der Universität Freiburg (*Klebsormidium* und *Physcomitrella*), der Arbeitsgruppe von Takayuki Kohchi an der Universität von Kyoto (*Marchantia*) und der Arbeitsgruppe von Scott McAdam und Tim Brodribb an der Universität von Tasmanien in Hobart (*Ceratopteris*), die die Proben und die Sequenzen der Gene des ABA-Signalwegs bereitstellten.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Botanik I - Pflanzenphysiologie und Biophysik für die tolle Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft. Vor allem möchte ich hier bei meinen Kollegen der AG Geiger bedanken, die sowohl während als auch außerhalb der Arbeit eine große Unterstützung für mich waren und deren Freundschaft mich hoffentlich auch in Zukunft begleiten wird.

Allen Freunden, die mich schon vor aber auch während dieser Arbeit unterstützt haben und mich hoffentlich auch auf meinem zukünftigen Weg begleiten werden.

Michael Andreas Geringer, der mich im Laufe seiner Masterarbeit bei den Messungen in *Selaginella* und *Ceratopteris* unterstützt hat.

Enrique López, der einige Vorarbeit in der Klonierung der Komponenten des ABA-Signalwegs in Algen und Moosen geleistet hat, im Laufe seiner Arbeit hier am Lehrstuhl für Botanik I.

Meiner Familie, mit meinen Eltern und meiner Oma, die mich immer voll und ganz unterstützt haben und schon seit ich denken kann hinter mir standen und mein Leben sehr bereichern.

Danke für eure uneingeschränkte Unterstützung.