

Untersuchungen und Simulationen zur Koordination der  
Ionenflüsse bei der Schließzellbewegung in *Vicia faba* und  
*Arabidopsis thaliana*

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

Vorgelegt von

**Ralf Steinmeyer**

aus

Hannover

Würzburg 2005

Untersuchungen und Simulationen zur Koordination der  
Ionenflüsse bei der Schließzellbewegung in *Vicia faba* und  
*Arabidopsis thaliana*

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

Vorgelegt von

**Ralf Steinmeyer**

aus

Hannover

Würzburg 2005

Eingereicht am: 10.08.2005

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Müller

Gutachter: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. G. S. Harms

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Regulation der Stomaweite . . . . .	6
1.2	Mechanismus der Stomabewegung . . . . .	9
1.3	Zielsetzung . . . . .	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Pflanzenmaterial und Anzucht . . . . .	12
2.2	Messung der Stomaöffnung . . . . .	12
2.2.1	Stomaöffnung der KAT1::En-1 Mutante . . . . .	13
2.3	Zuckeraufnahme . . . . .	13
2.3.1	Möglicher Transportweg der Zuckeraufnahme . . . . .	14
2.4	Elektrophysiologische Messungen . . . . .	15
2.4.1	Vorzeichenkonvention . . . . .	15
2.4.2	Doppel-Elektroden-Spannungsklemmtechnik . . . . .	16
2.4.3	Messaufbau . . . . .	17
2.4.4	Reaktion auf Licht . . . . .	19
2.4.5	Messprotokoll . . . . .	19
2.5	Theorie zu Ionenkanälen . . . . .	19
2.5.1	Schaltkinetik der Kanäle . . . . .	22
2.6	Computergestützte Modellierung . . . . .	22
2.6.1	Kaliumkanäle . . . . .	23
2.6.2	Die H <sup>+</sup> -ATPase . . . . .	23
2.6.3	Anionentransporter . . . . .	24
2.6.4	Transporterparameter und deren Variation . . . . .	25
2.6.5	Weitere Komponenten des Modells . . . . .	27
2.6.6	Anfangsbedingungen . . . . .	28
2.6.7	Verlauf der Simulation . . . . .	30
2.7	Indikatorfarbstoffe . . . . .	33
2.8	Beladung intakter Schließzellen . . . . .	35
2.8.1	Beladung mit niedrigem pH-Wert . . . . .	37
2.8.2	Beladung als Ester . . . . .	37
2.9	Injektion von Farbstoff . . . . .	38

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Stomaöffnung in <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	40
3.2	Zuckeraufnahme . . . . .	41
3.3	Elektrophysiologische Messungen . . . . .	42
3.3.1	Reaktion auf Licht . . . . .	43
3.4	Modell zur Schließzellsimulation . . . . .	46
3.4.1	Stabiler Zustand geschlossener Stomata . . . . .	47
3.4.2	Simulation der Stomaöffnung . . . . .	47
3.4.3	Simulation des Stomaschluss . . . . .	55
3.4.4	Spannungsunabhängiger Kaliumkanal . . . . .	59
3.5	Indikatorfarbstoffe . . . . .	62
3.6	Injektion . . . . .	63
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
4.1	Welcher Ionenfluss ist zur Stomaöffnung notwendig? . . . . .	66
4.2	Kalium-Transporter in der Schließzellmembran . . . . .	67
4.3	Anionische und nichtionische Osmotika . . . . .	68
4.3.1	Zucker . . . . .	68
4.3.2	Malat . . . . .	69
4.4	Elektrophysiologische Messungen an Zellen im intakten Blatt . . . . .	70
4.5	Simulierte Ionenflüsse zur Stomabewegung . . . . .	71
4.5.1	Aktivierung der H <sup>+</sup> -ATPase . . . . .	71
4.5.2	Bedeutung des H <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> -Symporters . . . . .	72
4.5.3	Bedeutung des Anionenkanals . . . . .	73
4.6	Kinetiken der Stomabewegung . . . . .	74
4.7	Möglichkeiten weiterer in vivo Messungen . . . . .	76
4.8	Ausblick . . . . .	76
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>82</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>

# 1 Einleitung

Jedes Leben benötigt zum Aufrechterhalten seiner Lebensvorgänge Energie, die im Falle von Pflanzen durch Photosynthese aus dem Sonnenlicht gewonnen wird. Neben der Energie aus dem Licht benötigt die Pflanze für diesen Vorgang Wasser und Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), die Energie wird schließlich in Form von Zucker bzw. dem allgemeinen zellulären Energiespeicher Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert. Landpflanzen stehen vor dem Problem, sich einerseits vor dem Austrocknen durch übermäßige Verdunstung schützen, andererseits aber  $\text{CO}_2$  für die Energiegewinnung aufnehmen zu müssen. Zur Verminderung der Verdunstung entwickelten Blattpflanzen eine weitgehend wasserundurchlässige Schutzschicht, die Kutikula. Da diese Schicht jedoch auch für Gase eine starke Barriere darstellt, führte die Entwicklung ebenso zu Öffnungen in der Kutikula, den Spaltöffnungen oder Stomata. Je zwei spezialisierte Zellen, die Schließzellen, in der Epidermis der Pflanze bilden zwischen sich diese mikroskopischen regulierbaren Atemöffnungen. Sie führen in substomatäre Höhlen, von denen aus sich das zugeführte Kohlendioxid gut durch Hohlräume der Schwamm- und Palisadenzellen im Blatt verteilen kann und zu allen photosynthetisch aktiven Zellen gelangt. Die spezielle Struktur der Zellwand der Schließzellen lässt bei Anschwellen der Zellen zwischen ihnen eine Öffnung entstehen, die bei geringerem Innendruck und Volumen geschlossen ist. Die Änderung des Zellinndruckes (Turgor) und Volumens beruht auf der Aufnahme und Abgabe von Wasser, die wiederum entsprechend dem Gradienten des Wasserpotentials erfolgen. Letztlich erfordert die Steuerung des Turgors also den gerichteten Fluss von osmotisch aktiven Substanzen, wie Ionen, Zucker oder Aminosäuren, über die Plasmamembran der Zelle.

## 1.1 Regulation der Stomaweite

Stomata liegen in der äußersten Zellschicht, der Epidermis der Blätter und sind aufgrund ihrer Morphologie leicht von anderen Zellen zu separieren. Die Untersuchung des Mechanismus der Stomabewegung begann daher bereits früh im 19. Jahrhundert (Von Möhl, 1856; Sachs, 1887). Diese frühen Untersuchungen beschäftigten sich mit der Bedeutung der Spaltöffnungen für die Pflanze, ihrer Morphologie und Reizen, die eine Änderung bewirkten. In späteren Arbeiten gab es zunächst noch Untersuchungen der Struktur-Funktions-Beziehung der ganzen Zellen (Allaway und Milthorpe, 1976), später wurden die Untersuchungen stärker spezialisiert, so untersucht (Outlaw, 1987) noch den Kohlenstoffmetabolismus der Stomata, (Humble und Raschke, 1971) sowie (Outlaw und Lowry, 1977) die qualitativen und quantitativen Zusammenhänge von Stomaöffnung und Kaliumtransport bzw. organischen Säuren. Mit der Nutzung der Patch-Clamp Technik an

Schließzellprotoplasten wurden die Transportproteine für Kalium, Chlorid und Protonen separat und losgelöst aus dem System des ganzen Blattes untersucht (Schroeder et al., 1984; Keller et al., 1989; Hedrich et al., 1990; Lohse und Hedrich, 1992).

Wegen Ihrer Bedeutung für das Wachstum der Pflanze in Abhängigkeit von Licht und Wasserversorgung und damit auch für potentielle Ernteerträge bei Nutzpflanzen stellen Stomata auch heute ein bedeutendes Forschungsziel dar. Weiterhin haben die starke Spezialisierung, leichte Isolierbarkeit von anderen Zellen und das Fehlen von Plasmodesmata, also direkten Verbindungen zu benachbarten Zellen sie zu einem hervorragenden System zur Untersuchung von Ionenströmen gemacht. Dank dieser Besonderheiten sind wesentliche Teile des Mechanismus der Stomabewegung bekannt.

Während eine hohe Photosyntheseleistung und damit hohe Aufnahme von  $\text{CO}_2$  einen Vorteil für die Pflanze darstellt, ist der Wasserverlust durch Verdunstung in der Regel nachteilig. Die Weite der Spaltöffnungen sollte also bei verschiedenen Umweltbedingungen, wie Sonneneinstrahlung, Temperatur, Kohlendioxidgehalt der Luft, Windgeschwindigkeit, Wasserverfügbarkeit aus dem Boden und Luftfeuchte ein Minimum an Wasserverlust pro Kohlendioxidaufnahme erreichen (Cowan, 1977; Kearns und Assmann, 1993). Dieses Optimum kann sich zwischen verschiedenen Pflanzen und Standorten unterscheiden (Thomas et al., 1999), was sich z. B. im jeweiligen Verhältnis von Änderung der Stomaweite zu einer äußeren Änderung der Luftfeuchte zeigt (Franks und Farquhar, 1999). Außerdem unterliegen die absoluten Reaktionen längerfristiger Regulation, was sich z. B. daran zeigt, dass Pflanzen aus Klimakammern (mit reguliertem  $\text{CO}_2$ -Gehalt) empfindlicher auf Änderungen der Kohlendioxidkonzentration reagieren, als solche aus Gewächshäusern. Wird die Steuerung der Schließzellen vereinfachend als Regelung mit dem Ziel möglichst hoher  $\text{CO}_2$ -Fixierung bei möglichst geringem Wasserverlust betrachtet, ergibt sich, dass

- Stomata geöffnet sein sollten, wenn Licht zur Photosynthese vorhanden ist, um  $\text{CO}_2$  aufnehmen zu können, umgekehrt im Dunklen die Stomata geschlossen sein sollten, um Wasserverlust zu vermeiden (Linsbauer, 1916; Zeiger und Hepler, 1977)
- eine hohe ambiente  $\text{CO}_2$ -Konzentration es erlaubt, die Stomaöffnung gering zu halten, da geringere Luftmengen für die gleiche Photosyntheserate ausreichen (Assmann, 1999)
- bei Wassermangel der Pflanze die Stomata geschlossen bleiben sollten (Davies und Zhang, 1991).

Weiterhin gibt es für die Photosynthesereaktion limitierende Faktoren. Ist Licht im Überschuss vorhanden, setzt die in der Zelle vorhandene  $\text{CO}_2$ -Konzentration eine obere Grenze, ist dagegen  $\text{CO}_2$  im Überschuss vorhanden, so setzt die eingestrahlte Lichtmenge die obere Grenze der Photosynthese. Im ersten Fall sollten die Stomata möglichst weit geöffnet werden, um eine hohe Aufnahmerate von  $\text{CO}_2$  aus der Luft zu gewährleisten, im zweiten Falle wäre eine geringere Stomaöffnung ausreichend. Setzt man als

„Ziel“ der Pflanze nicht allein das Wachstum, das auf Energiegewinnung basiert, sondern grundlegender das Überleben, so kommt beim ersten Fall die Notwendigkeit hinzu, den Wasserverlust zu minimieren. Gerade bei starker Sonneneinstrahlung und damit hoher Temperatur ist auch der Wasserverlust über die Stomata besonders groß. Diese Einflüsse sind auch beobachtet worden.

Ein einfaches Modell der Stomata im Regelkreis zeigt Abb. 1.1. Die Transpirationsrate  $E$  wird dabei durch die Leitfähigkeit der Stomata  $g_{sw}$  und die Differenz des Wasserdampfdruckes zwischen Blatt und umgebender Luft  $\Delta p_{H_2O}$  bestimmt:  $E \approx g_{sw} \cdot \Delta p_{H_2O}$ . Das gleiche gilt für die  $CO_2$ -Aufnahme  $A$ , die Differenz des  $CO_2$ -Partialdruckes und die entsprechende Leitfähigkeit  $g_{sc}$ :  $A \approx g_{sc} \cdot \Delta p_{CO_2}$ . Die Leitfähigkeiten sind im wesentlichen proportional zur permeablen Grenzfläche zwischen Blatt und Umgebung, also zur Öffnungsfläche der Spaltöffnungen. Die lokalen Differenzen der Partialdrücke hängt allerdings im Gleichgewichtszustand wieder von der jeweiligen Leitfähigkeit ab.

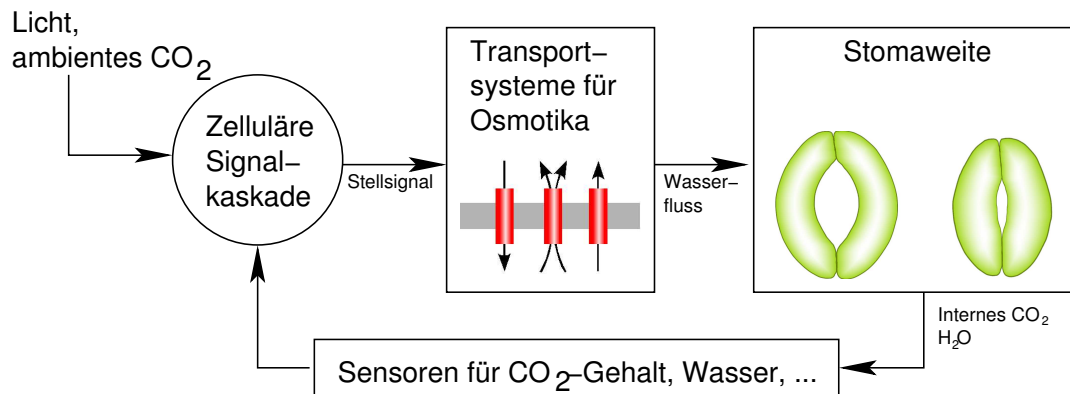


Abbildung 1.1: Das Schließzellensystem im Regelkreis.

Wesentlicher Bestandteil eines stabilen Regelkreises sind negative Rückkopplungen. Wenn also z. B. der Wasserverlust sehr hoch wird, sollte dem Grund dafür, also der großen Stomaöffnung, entgegen gewirkt werden. Im Gegensatz zum klassischen technischen Regelkreis kann zwischen Messeinrichtung, Vergleichler und Regler nicht klar unterschieden werden. Der Grund dafür ist die enge Vernetzung der zellulären Signalwege miteinander. Bei der Betrachtung des Schließzellensystems als Regelkreis stellt sich auch ein zentrales Problem der Regelungstechnik: die Stabilität des Systems. Ein idealer Regelkreis sollte für alle auftretenden Umgebungsgrößen einen stabilen Gleichgewichtszustand besitzen und auf eine Änderung der Eingangsgrößen instantan und ohne Überschwingen reagieren. Allerdings würde dies unendlich schnelle Sensoren und Regler bedingen und auch eine exakt auf die Änderung abgestimmte Reaktion. Ein realer Regelkreis wird sich daher entweder dem neuen Gleichgewicht nur langsam annähern oder Überschwingen, d. h. eine zu starke Korrektur erzeugen und so später wieder in die entgegengesetzte Richtung korrigieren.



## 1.2 Mechanismus der Stomabewegung

Die Sensorwege, die zur Regulation der Stomaweite beitragen, können sehr unterschiedlich sein. Beispielsweise gibt es viele Hinweise darauf, dass die Signalwege zur Reaktion auf  $\text{CO}_2$  und auf Licht weitgehend voneinander unabhängig sind. In Sukkulente n öffnen die Stomata z. B. während der Nacht, um eine Erhöhte Verdunstung bei Sonneneinstrahlung zu verhindern, während sie in anderen Pflanzen im Dunklen gewöhnlich geschlossen bleiben, jedoch durch komplett  $\text{CO}_2$ -freie Luft zur teilweisen Öffnung angeregt werden können. Für ihre Funktion müssen Schließzellen sowohl für  $\text{CO}_2$  als auch für Licht empfindliche Sensoren besitzen. Weiterhin reagieren sie auf das bei Trockenstress produzierte Hormon Abscisinsäure ABA mit Stomaschluss, während das Wachstumshormon Auxin und das Pilztoxin Fusicoccin die Öffnung begünstigen.

Während also die Wege vom Sensor für Umgebungsbedingungen über die Signalkaskade unterschiedlich sein kann, zeigt der Mechanismus der Stomabewegung starke Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Pflanzengattungen. Untersuchungen des Gehalts an Osmotika in Schließzellen ließen erkennen, dass einer der wichtigsten Stoffe, die bei der Stomabewegung transportiert werden, Kalium ist. (Humble und Raschke, 1971; Turner, 1973; Allaway und Hsiao, 1973) Mit Hilfe der Patch-Clamp Technik wurden in Protoplasten von Schließzellen spannungsabhängige kaliumleitfähige Ionenkanäle entdeckt (Schroeder et al., 1984). Zusammen mit diesen existieren in der Plasmamembran der Schließzellen noch Anionenkanäle (Keller et al., 1989) und ein Protonentransporter (Lohse und Hedrich, 1992), mit dessen Hilfe unter Ausnutzung der Energie aus der Spaltung von Adenosintriphosphat in Adenosindiphosphat und Phosphat Protonen gegen einen Gradienten aus der Zelle heraus transportiert werden können. Zusammen scheinen dies die wichtigsten Transportwege zu sein, die zur Stomabewegung beitragen. Da ihre Aktivitäten sowohl von der elektrischen Potentialdifferenz über die Membran als auch von internen und externen Ionenkonzentrationen abhängt, sind sie stark miteinander verknüpft.

In verschiedenen untersuchten Pflanzen zeigen die Transportwege einige Unterschiede, jedoch auch auffallende Gemeinsamkeiten. Spannungsabhängige einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle wurden z. B. in *Vicia faba*, *Nicotiana tabaccum*, *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*, verglichen. Die Spannungsschwelle zur Aktivierung liegt bei allen Spezies zwischen -20 und -50 mV. Anhand der Leitfähigkeit der Einzelkanäle sowie der Kinetik der Änderung nach einem Spannungssprung lassen sich die Kanäle jedoch deutlich unterscheiden. Wesentlich für die Stomaöffnung sind zunächst die Aktivierungsspannung der Kanäle sowie die Anzahl der Kanäle in der Zelle, also der Ionenfluss pro Zellvolumen.

Da Schließzellen elektrisch sowohl von den sie umgebenden anderen Zelltypen als auch voneinander isoliert sind, konnten sie elektrophysiologisch nicht nur als isolierte Protoplasten, sondern auch in Epidermisstreifen untersucht werden (Blatt, 1987, 1988, 1990). Bei dieser Technik bleibt die Zellwand und auch das Zytosol weitgehend erhalten, es entfällt dagegen die Möglichkeit, die zytosolische Ionenzusammensetzung zu kontrollieren.

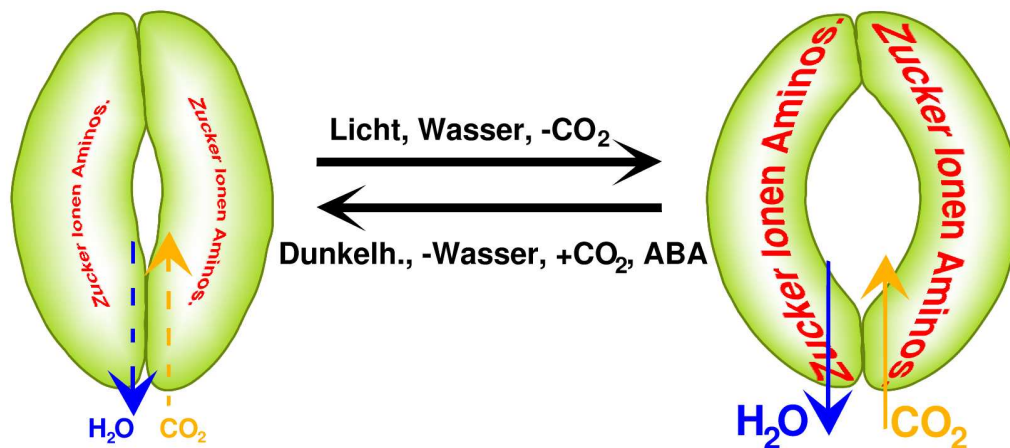


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Stomabewegung mit den dafür notwendigen Änderungen im osmotischen Gehalt der Schließzellen (ABA = Abscissinsäure).

Häufig in der Stomaöffnung bzw. Verdunstung beobachtete Oszillationen (Cowan, 1972; Kaiser und Kappen, 2001) könnten in der limitierten Reaktionsgeschwindigkeit auf geänderte Bedingungen begründet sein. Für die Beobachtung, dass Stomata nicht auf der gesamten Blattfläche die gleiche Öffnungsweite zeigen, sondern in einzelnen „Flecken“ abweichendes Verhalten zeigen (patchiness, Beyschlag und Eckstein, 1998, Mott und Buckley, 1998) könnte auf Probleme in der Regulation des „Stellsystems“, also des Turgordruckes hindeuten (Buckley und Mott, 2000).

### 1.3 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Funktion der Schließzellen genauer beschrieben werden. Dabei geht es weniger um die detaillierte Untersuchung einzelner für die Schließzellbewegung notwendiger Komponenten, sondern um die Integration dieser Komponenten zu einem Modell der Schließzelle in ihrer Umgebung, dem intakten Blatt. Eine qualitative Zusammenfassung mit ähnlicher Zielsetzung ist von W. Outlaw (2003) veröffentlicht worden. Während dort die verschiedenen Signalwege aufgezeigt und diskutiert werden, wird hier der quantitative Zusammenhang zwischen den verschiedenen Transportwegen untersucht. Zu diesem Zweck werden einige Methoden der Untersuchung in dieser Umgebung aufgezeigt. Die Ergebnisse dieser Messungen sowie die bereits bekannten Eigenschaften der Membrantransporter gehen in eine Computersimulation ein, die auf der Basis dieser Parameter ein Arbeitsmodell der Schließzelle ergibt.

Die Regelung der Stomabewegung wurde in Bezug auf die instantane Änderung der Umgebungsbedingungen betrachtet. Die Änderungen des Membranpotentials und der Konzentrationen von wichtigen Ionen in der Umgebung der Schließzellen wurde gemessen.

sen bzw. der Literatur entnommen. Auf der Basis dieser Daten wurde ermittelt, in welcher Phase der Stomabewegung welche Ionenflüsse vorkommen bzw. in welcher Relation zueinander sie vorkommen müssen. Es gibt dabei jeweils eine stabile Phase vor der Änderung (also offene oder geschlossene Stomata), das Einleiten, eine dynamische stabile Phase und das Beenden der Änderung, und am Ende wieder eine stabile Phase.

Die in der Vergangenheit gewonnenen Erkenntnisse über einzelne für die Stomabewegung notwendige Transportwege, über Stomamechanik und Zusammensetzung des apoplastischen Milieus wurden in dieser Simulation zusammengeführt mit dem Ziel ein Arbeitsmodell der Schließzelle im intakten Blatt zu erhalten. In den Untersuchungen einzelner Bestandteile der Schließzellfunktion wird gewöhnlich versucht, fast alle Parameter konstant zu halten, während einzelne kontrolliert verändert werden. Der Blick auf das Gesamtsystem erlaubt es zu bestimmen, wo noch für die Erklärung der Funktion wichtige Messungen fehlen. Die Simulation kann als Grundlage für neue Thesen über die Bedeutung verschiedener Teile der Schließzellfunktion dienen, die dann mit den modernen Methoden der Biologie getestet werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

Diese Arbeit untersucht das Verhalten von Schließzelle der Ackerbohne *Vicia faba* L. cv. Grünkernige Hangdown (Gebag, Hannover) sowie der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia (Col-0) im intakten Blatt bzw. im abgezogenen Epidermisstreifen.

Pflanzen von *Vicia faba* wurden im Gewächshaus bei zusätzlicher Beleuchtung von 8:00 bis 18:00 Uhr angezogen. Die Beleuchtungsintensität betrug hierfür  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durch Pflanzlampen (Osram Nitraphot). Blätter dieser Pflanzen wurden im 4 bis 6-Blatt Stadium, ca. 2 bis 3 Wochen nach Aussaat mit einer scharfen Rasierklinge abgetrennt. Dabei wurde darauf geachtet, die Schnittfläche nicht trocken werden zu lassen. Für die elektrophysiologischen Messungen an intakten Pflanzen wurden ganze Pflanzen im 6-Blatt Stadium direkt vor Beginn der Messungen aus dem Gewächshaus ins Labor gebracht und dort wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben behandelt.

*Arabidopsis thaliana* wurde im Gewächshaus unter Kurztag-Bedingungen angezogen. Hierfür wurden die Pflanzen während einer Periode von 16 h abgedunkelt und während der restlichen Zeit von 8 h zusätzlich zum Tageslicht mit einer Intensität von  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  künstlich beleuchtet. Von 6 bis 8 Wochen alten Pflanzen wurden mit einer scharfen Klinge Blätter abgetrennt und sofort in Wasser überführt.

### 2.2 Messung der Stomaöffnung im Epidermisstreifen

Zur Untersuchung der Stomaöffnung wurden am Ende der nächtlichen Dunkelperiode Blätter von *Arabidopsis thaliana* geerntet und unter schwachem Rotlicht (Intensität  $< 10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ ) Streifen der adaxialen Epidermis vom Mesophyll abgezogen. Das Abziehen erfolgte unter einem Tropfen destillierten Wassers, um ein auch nur kurzfristiges Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Die Streifen wurden sofort entweder in eine Waschlösung oder die Inkubationslösung überführt. Um eventuelle Verdünnung durch den am Epidermisstreifen haftenden Tropfen gering zu halten, hatte die die jeweils neue Lösung ein Volumen von mindestens 5 ml.

Die Epidermisstreifen wurden für 3 h unter verschiedenen Bedingungen inkubiert ( $V=5$  ml) und schließlich mit Silikonklebstoff auf Deckgläsern fixiert, die als Boden in Teflongefäße eingeklebt waren. In diese Gefäße wurde je 1 ml der jeweiligen Inkubationslösung gegeben. An einem inversen Mikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss, Göttingen) wurden nun innerhalb von maximal 3 min Bilder der Epidermisstreifen aufgenommen,

um daran die Größe der Stomaöffnung zu bestimmen. Die Länge und Weite der Pore wurden jeweils zwischen den Innenseiten der die Öffnung begrenzenden Kutikularleisten gemessen.

### 2.2.1 Stomaöffnung der KAT1::En-1 Mutante unter verschiedenen Ionenkonzentrationen

Als primärer einwärts gleichrichtender Kaliumkanal der Schließzelle wurde in *Arabidopsis thaliana* KAT1 (Kaliumkanal aus *Arabidopsis thaliana*) identifiziert (Anderson et al., 1992; Nakamura et al., 1995). Zur Untersuchung, wie das Öffnungsverhalten der Schließzellen von diesem Kanal abhängt, stand eine Mutante zur Verfügung, in der durch Einfügen einer En-1 Insertion in das Genom der Kanal nicht mehr funktionell gebildet wurde (Szyroki et al., 2001). Die Schließzellöffnung dieser Pflanzen (KAT1::En-1) wurde mit der des Wildtyps (Ökotyp Col-0) verglichen.

Die abgezogenen Epidermisstreifen wurden für 1 min in einer Lösung mit 10 mM 2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure (MES)/Bis-Tris-Propan (BTP), pH 4.5 ohne Kalium gewaschen, um Ionen aus dem apoplastischen Raum weitgehend zu entfernen. Danach wurden sie in die Messlösungen überführt und bis zur Messung im Dunklen oder unter  $400 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  weißem Licht aus einer Halogenlampe (HLX Xenophot 15 V/150 W, Osram) aufbewahrt. Die Messlösungen enthielten 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 5 mM MES/BTP (pH 5.6) sowie KCl in den Konzentrationen 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0 und 100,0 mM.

## 2.3 Zuckeraufnahme durch Schließzellen von *Arabidopsis thaliana*

Neben Kalium ist Zucker ein Osmotikum, das für die Stomaregulation wesentlich sein kann (Talbot und Zeiger, 1998; Ritte et al., 1999). Zur Untersuchung der Aufnahme von Zucker stand ein fluoreszierendes Derivat der D-Glukose zur Verfügung (Yamada et al., 2000), 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-Glukose (2-NBDG).

Für die Experimente wurden Epidermisstreifen abgezogen wie oben beschrieben, für 1 min in einer Waschlösung gewaschen und dann für 3 h in den verschiedenen Lösungen inkubiert. Der Anteil der fluoreszenzmarkierten Schließzellen auf einer begrenzten Fläche wurde an einem Laser-Scanning Mikroskop (LSM410, Carl Zeiss, Göttingen) bestimmt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte durch einen Argon-Ionenlaser bei 488 nm, die Fluoreszenz wurde durch einen Bandpass-Filter (510–560 nm) selektiert, was dem Maximum des Emissionsspektrums entspricht (Abb.: 2.1). Die Empfindlichkeit des Detektors wurde jeweils so eingestellt, dass die stets im Bereich der Epidermiszellen vorhandene Autofluoreszenz etwa 10 % der maximalen Aussteuerung erreichte. Da durch unbekannte Dicke der Kleberschicht und der Schichtdicken der abgezogenen Epidermisstreifen

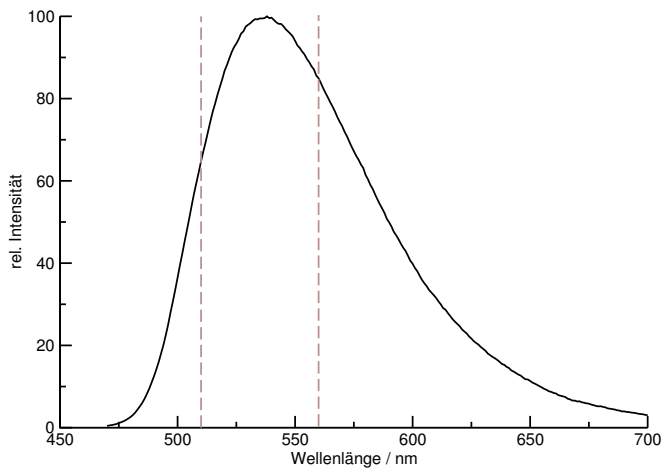


Abbildung 2.1: Fluoreszenz-Emissionsspektrum von NBD nach den Daten von Richard P. Haugland (2002), die gestrichelten Linien sind die Eckwellenlängen des benutzten Bandpassfilters (510–560 nm)

eine exakte Quantifizierung der aufgenommenen Menge an 2-NBDG nicht möglich war, wurden alle Schließzellen als deutlich gefärbt eingeordnet, deren Fluoreszenzintensität mindestens das Doppelte der im Hintergrund festgestellten betrug.

Als Standard wurden die Epidermisstreifen belichtet ( $400 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oder abgedunkelt in 10 mM MES/BTP, pH 5.0, 0,25 mM 2-NBDG und 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$  für 90 min inkubiert. In weiteren Experimenten wurden dem Medium 5 und 50 mM D-Glukose zugegeben, um die Aufnahme des 2-NBDG im Licht in Konkurrenz zur

Glukose zu bestimmen. Weiterhin wurde durch 25 mM Na-Vanadat, einen Hemmer der  $\text{H}^+$ -ATPase, untersucht, ob die Zuckeraufnahme an das aktive Protonentransportsystem gekoppelt ist. Alternativ wurden 5 oder 10  $\mu\text{M}$  CCCP (Carbonylcyanid-*m*-Chlorophenylhydrazon), ein protonenselektives Ionophor) zugegeben, um die Abhängigkeit von einem bestehenden Protonengradienten über die Plasmamembran zu testen.

### 2.3.1 Möglicher Transportweg der Zuckeraufnahme

Wenn Zucker unter bestimmten Bedingungen als Osmotikum für die Stomaöffnung genutzt wird, muss er auch über kontrollierbare Transportwege in die Zelle aufgenommen werden. In *Arabidopsis thaliana* ist ein möglicher Weg *AtSTP1*, das aufgrund seiner Homologie zum  $\text{H}^+$ /Hexose-Kotransporter der Grünalge *Chlorella kessleri* gefunden und sowohl in Hefe (*Schizosaccharomyces pombe*) als auch in Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* exprimiert und charakterisiert wurde (Sauer et al., 1990; Boorer et al., 1992). In Hefe erlaubt dieser Transporter die Akkumulation von Glukose bis zum 10-fachen der extrazellulären Konzentration. Diese Aufnahme wird durch den CCCP inhibiert, durch Ethanol verstärkt. Bei der Expression in Oocyten konnte gezeigt werden, dass die Glukoseaufnahme bei steigendem externem pH-Wert deutlich abnimmt. Auch eine Spezifität für D-Glukose, D-Xylose, D-Mannose, 2-Deoxyglukose und 3-O-methyl-D-Glukose (ein nicht metabolisierbares Glukosederivat) über andere Zucker konnte in Oocyten gezeigt werden (Boorer et al., 1994). Zusammen deutet das darauf hin, dass dieses Protein auch in *Arabidopsis* Glukose transportiert.

Da zusätzlich gezeigt wurde, dass *AtSTP1* in Blättern, (Sauer et al., 1990) bzw. laut

Büttner und Sauer (2000) genauer in Schließzellen exprimiert wird, sollte mit Pflanzen der Mutante *stp1*, in denen *AtSTP1* nicht funktionell exprimiert wird, getestet werden, wie diese sich in der Aufnahme von 2-NBDG in Schließzellen vom Wildtyp unterscheiden. Die Versuche zum Vergleich der Aufnahme von 2-NBDG im Licht und Dunklen, sowie in Konkurrenz mit D-Glukose wurden daher auch mit dieser Mutante durchgeführt.

	Dunkel		Licht				
			+ Glukose		+ CCCP		+ NaVan
WT (Col-0)	Std	Std	5 mM	50 mM	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	25 mM
<i>stp1</i>	Std	Std	5 mM	50 mM	–	–	–

Tabelle 2.1: Bedingungen, unter denen die Zuckeraufnahme in Schließzellen getestet wurde. (Std = Standardbedingungen: 10 mM MES/BTP, pH 5.0, 0,25 mM 2-NBDG, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ ); – = nicht getestet

## 2.4 Elektrophysiologische Messungen an Schließzellen im intakten Blatt

Die Membran einer Zelle ist aus einer Doppelschicht von Phospholipiden aufgebaut, die für geladene Moleküle zunächst fast undurchdringlich ist. Sie besitzt daher einen hohen elektrischen Widerstand ( $R \approx 10^8 \Omega\text{cm}^2$ , Fisher und Stoeckenius, 1982). Da sich auf beiden Seiten der Membran relativ gut leitende Elektrolytlösungen befinden, zeigt das System den typischen schichtweisen Leiter-Isolator-Leiter Aufbau eines elektrischen Kondensators, dessen Kapazität  $C$  proportional zur Membranfläche  $A$  ist ( $C = C_m \cdot A$ ). Als Proportionalitätsfaktor wurde für biologische Membranen die spezifische Kapazität von  $C_m = 1 \mu\text{F cm}^{-2}$  bestimmt (Hamill et al., 1981) und für viele verschiedene Zellsysteme bestätigt. Ein Ladungstransport durch die Membran ist also stets mit einer Änderung der Spannung über die Membran verbunden.

Durch die Einlagerung von für geladene Moleküle permeablen Proteinen in die Membran sinkt deren elektrischer Widerstand auf Werte von  $R_M \approx 10^3 \Omega\text{cm}^2$ . Da dies um den Faktor  $10^5$  unter dem der reinen Lipiddoppelschicht liegt, kann deren Leitfähigkeit im Vergleich zu der der Membranproteine vernachlässigt werden. Eine Untersuchung der Leitfähigkeit der Membran ergibt in guter Näherung die der darin eingelagerten (Transport-)Proteine.

### 2.4.1 Vorzeichenkonvention

Als Membranspannung  $U_M$  wird stets die Potentialdifferenz zwischen dem Zytosol und dem extrazellulären Raum bezeichnet wobei letzteres als Null definiert wird ( $U_M =$





Um diese Schwierigkeit zu umgehen, werden zwei Pipetten benutzt, wobei durch eine kein Strom fließt und damit die Membranspannung bestimmt werden kann. Durch die zweite wird ein Strom appliziert, der bewirkt, dass die gewünschte Potentialdifferenz erreicht wird. Die Größe des Stromes wird durch die Differenz aus Sollspannung  $U_{\text{Soll}}$  und gemessener Membranspannung  $U_M$  bestimmt. Ein Prinzipschaltbild dieser im Detail von Finkel und Gage (1985) beschriebenen Methode zeigt Abb. 2.2. Da der Einstich von zwei Elektroden in eine kleine Zelle technisch sehr schwierig ist, werden die beiden Elektroden durch die Verbindung von zwei Kapillaren zu einer Spitze zusammengebracht. Die Öffnungen der beiden Kapillaren müssen für die vollständige Funktion dieses Prinzips getrennt sein. Anderenfalls flösse der applizierte Strom durch den Widerstand der gemeinsamen Spitze von Strom- und Spannungselektrode und würde die Spannungsmessung verfälschen. Dies kann durch Referenzmessungen in wässriger Lösung, d. h. ohne in eine Zelle einzustechen, überprüft werden. Eine Änderung des Angelegten Stromes darf keine Änderung der gemessenen Spannung zur Folge haben.

### 2.4.3 Messaufbau

Der Messaufbau bestand aus einem aufrechten Mikroskop (Axioskop 2FS, Zeiss, Göttingen) inklusive Lichtquelle (HAL 12 V/100 W, Zeiss) auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Am Mikroskop war ein Mikromanipulator (Typ 5171, Eppendorf) für die Bewegung der Einstichpipetten verbunden mit einem Piezo-Steller (P-280.30, Physik Instrumente) für die axiale Bewegung montiert. Dieser Teil des Messapparates befand sich zur Abschirmung gegenüber äußeren elektrischen Einflüssen in einem geerdeten Faradaykäfig. Zusätzlich waren alle leitenden Komponenten in diesem Käfig ebenfalls geerdet. Alle weiteren elektrischen Geräte befanden sich außerhalb des Faradaykäfigs und lediglich die notwendigen Leitungen von den Messköpfen zum Zwei-Elektroden Verstärker (VF-102, Bio-Logic) führten aus dem Käfig heraus. Das verstärkte Signal wurde durch einen 8-pol Tiefpass-Besselfilter (Typ 902, Frequency Devices) mit einer Grenzfrequenz von 300 Hz gefiltert und durch einen 16Bit Analog-Digital Wandler (ITC-16, Instrutech) an den Computer (Apple Macintosh) geleitet. Die Datenspeicherung erfolgte mit der Software „Pulse“ (HEKA, Lambrecht), mit deren Hilfe auch die Steuerspannungen über den Digital-Analog Wandler des ITC-16 für den Messverstärker erzeugt wurden. Der komplette Aufbau ist in Abb. 2.3 auf der nächsten Seite skizziert.

Um das Schließzellverhalten in möglichst natürlicher Umgebung untersuchen zu können, wurde eine intakte Pflanze von *Vicia faba* direkt neben dem Mikroskop platziert. Ein Blatt dieser Pflanze wurde mittels doppelseitigem Klebeband (Tesa) mit der Oberseite nach unten auf eine leicht gewölbte Plexiglasplatte geklebt. Die Beobachtung erfolgte durch ein Objektiv (Achroplan 40×/0.8 W, Zeiss), wobei als Immersionsflüssigkeit eine Lösung aus 50 mM KCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MES/BTP (pH 6.5) eingesetzt wurde, in die auch die Referenzelektrode eintauchte. Nach der Fixierung des Blattes wurde für mindestens 30 min abgewartet, bis die Schließzellen eine leichte Öffnung zeigten und das Blatt ab diesem Zeitpunkt während des gesamten Experiments mit einem gleich-

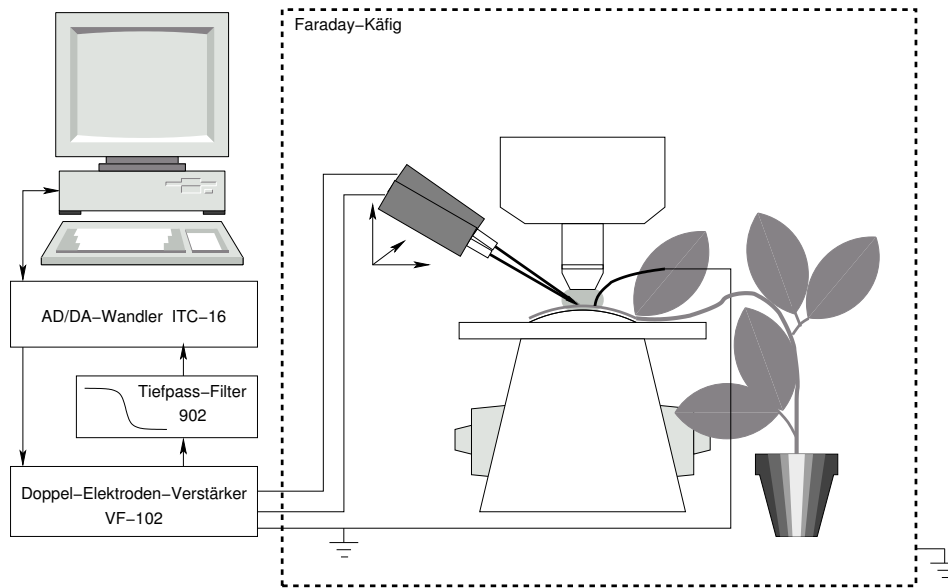


Abbildung 2.3: Der Aufbau für die Zweielektroden-Spannungsklemmtechnik an Schließzellen im intakten Blatt.

mäßigen Strom von  $\text{CO}_2$ -freier Luft gegen Schwankungen der  $\text{CO}_2$ -Konzentration der umgebenden Luft abgeschirmt.

### Mikropipetten und Elektroden

Für den elektrischen Zugang zu einzelnen Schließzellen wurden zwei Glaskapillaren (GC100F-10, Clark Electromedical Instruments) in der Mitte erhitzt und an einem vertikalen Elektrodenziehgerät (L/M-3P-A, List Medical Electronic, Darmstadt, Deutschland) um  $360^\circ$  miteinander verdreht. In zwei Zügen, zunächst am gleichen Ziehgerät, dann an einem horizontalen Pipettenziehgerät (P-2000, Sutter Instrument Co.), wurden die beiden verdrehten Kapillaren zu Spitzen ausgezogen und abschließend die stumpfen Enden der beiden Kapillaren bei kurzer Erhitzung über einer offenen Flamme um ca. 1,5 cm auseinandergebogen. Beide Kapillaren wurden dann blasenfrei mit 300 mM KCl gefüllt, die gerade Kapillare in einem Pipettenhalter fixiert und beide Kapillaren über Silber/Silberchloridelektroden an die Messköpfe des Zwei-Elektroden Verstärkers angeschlossen. Bei der zur Seite gebogenen Kapillare wurde durch Eintauchen des Endes in eine weitere Plexiglasröhre eine elektrisch leitende, aber mechanisch bewegliche Verbindung hergestellt. Als Referenzelektrode diente eine Silber/Silberchloridelektrode gefertigt aus einem chlorierten Silberdraht, der in einem Kunststoffschlauch, gefüllt mit 1 M KCl und verschlossen mit einem Pfropfen aus 0,1 % Agar montiert war.

### 2.4.4 Reaktion der Schließzellen auf Licht

Die unter dem Mikroskop fixierten Blätter wurden während der Messung durch den Kondensator des Mikroskops mit weißem oder rotem Licht beleuchtet (Tab. 2.2). Die bestrahlte Blattfläche war ein Kreis mit etwa 2 cm Durchmesser. Als weißes Licht wird hier das ungefilterte, als rotes Licht das durch einen Langpass-Filter mit einer Kantenwellenlänge von 610 nm (RD610, Schott) gefilterte Licht der Mikroskopbeleuchtung bezeichnet. Zusätzlich konnte durch das Objektiv blaues Licht auf einen Bereich des Blattes mit dem Durchmesser von etwa 0,3 mm geleitet werden. Die Wellenlänge dieses Lichts wurde durch einen Gittermonochromator (Polychrom 1, T.I.L.L. Photonics) auf 470 nm mit einer Bandbreite von 12 nm eingestellt. Die Lichtintensitäten sind in Tabelle 2.2 angegeben.

Lichtqualität	Intensität [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	
	adaxial	abaxial
weiß	98	4,4
rot	55	1,5
blau		200

Tabelle 2.2: Beleuchtungsintensitäten der Blätter von *Vicia faba* während der elektro-physiologischen Messungen am intakten Blatt.

### 2.4.5 Messprotokoll für Membranpotential und Strom-Spannungskennlinien

Zunächst wurde die Transmembranspannung ohne durch die Pipette fließenden Strom bestimmt. Nachdem sich dieses freie Membranpotential nach dem Einstich stabilisiert hatte, wurde in gleichen Zeitabständen in den Spannungsklemm-Modus umgeschaltet, in dem die Membranspannung vorgegeben und der hierfür durch die Pipette und somit über die Membran fließende Strom gemessen wurde. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde die Membran für 2 s auf Spannungen zwischen -200 mV und 40 mV geklemmt. Dieses Spannungsprotokoll sowie die Stromantwort zeigt Abb. 2.4. Der Mittelwert des Stromes während der letzten 10 ms wurde schließlich als Gleichgewichtsstrom  $I_{GG}$  für die Strom-Spannungskennlinie eingesetzt.

## 2.5 Theorie zu Ionenkanälen

Ionenkanäle sind in Zellmembranen verankerte Proteine, die den Durchgang bestimmter Ionen durch die Membran ermöglichen können. Ein solches Protein kann sich entspre-

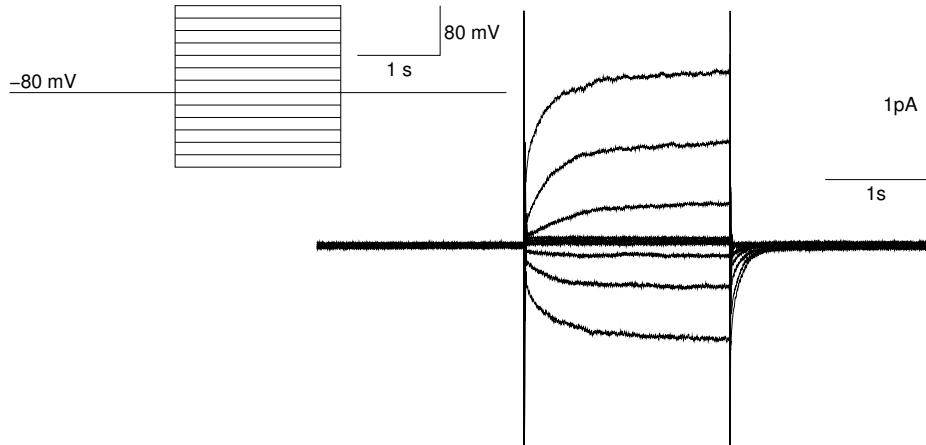


Abbildung 2.4: Spannungsprotokoll und zugehörige Stromspuren bei der Messung der Strom-Spannungskennlinie der Schließzellmembran.

chend seiner Konformation in verschiedenen leitenden und nicht leitenden Zuständen befinden. Im einfachsten Fall eines Kanals mit einem leitenden (offen) und einem nicht-leitenden (geschlossen) Zustand mit den zugehörigen Energien  $G_o$  und  $G_g$  ergibt sich aus der Boltzmann-Statistik für das Verhältnis der Besetzungswahrscheinlichkeiten  $p_o$  zu  $p_g$  im Gleichgewicht:

$$\frac{p_o}{p_g} = e^{-\frac{G_o - G_g}{k \cdot T}} \quad (2.1)$$

Dabei sind  $k$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die absolute Temperatur des Systems. Die freie Energie eines Zustandes kann durch Bindung von verschiedenen Effektoren auf beiden Seiten der Membran beeinflusst sein. Im Falle eines spannungsabhängigen Kanals ändert sie sich durch die elektrische Potentialdifferenz zwischen den beiden Seiten der Membran. Die Differenz der beiden Energien in einem spannungsabhängigen Zweizustands-Modell wird in guter Näherung als linear abhängig von der Membranspannung angenommen (Sigworth, 1994; Perozo et al., 1993)

$$\Delta G(U) = G_o(U) - G_g(U) = \Delta G(0) + q \cdot U \quad (2.2)$$

Der Proportionalitätsfaktor  $q$  kann als Produkt aus der Ladung angesehen werden, die bei der Konformationsänderung durch das elektrische Feld in der Membran bewegt wird, multipliziert mit dem Bruchteil des Feldes, durch das sie bewegt wird.

Da die Spannungsdifferenz  $U$  in den meisten Berechnungen mit einem Faktor  $F/(RT)$  multipliziert auftritt, wird in den folgenden Gleichungen die reduzierte Spannung

$$u = \frac{F}{RT} \cdot U \quad (2.3)$$

verwendet. Dabei sind  $F$  die Faraday-Konstante und  $R$  die allgemeine Gaskonstante wodurch  $u$  dimensionslos ist. In dem betrachteten Kanal mit nur zwei möglichen Zuständen gilt  $p_o + p_g = 1$ , womit sich die Offenwahrscheinlichkeit  $p_o$  aus den Gleichungen 2.1 und 2.2 ergibt als:

$$p_o(u) = \frac{1}{1 + e^{\frac{\Delta G(u)}{kT}}} \quad (2.4)$$

$$= \frac{1}{1 + e^{\frac{q}{kT} \cdot \left( \frac{\Delta G(0)}{q} + \frac{kT}{e_0} \cdot u \right)}} \\ = \frac{1}{1 + e^{-z_g \cdot (u_{1/2} - u)}} \quad (2.5)$$

In dieser Boltzmann-Funktion hat  $\Delta G(0)/q$  die Dimension einer Spannung und für  $U = -\Delta G(0)/q$  folgt  $p_o = 1/2$ , weshalb dieser Wert als halbmaximale Aktivierungsspannung bezeichnet und im weiteren  $u_{1/2} := -\Delta G(0)/q \cdot F/(RT)$  benutzt wird. Die Steigung der Funktion und damit der Spannungsbereich zwischen  $p_o \approx 0$  und  $p_o \approx 1$  wird durch den dimensionslosen Faktor  $z_g$  (für ‚gating charge‘, die Anzahl der Elementarladungen  $e_0$ , approx  $e_0$  Elementarladung;  $1,6022 \cdot 10^{-19}$  C) bestimmt, der an die Stelle von  $q$  aus Gleichung 2.2 tritt.

Mit der Offenwahrscheinlichkeit und einer Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals  $g_X$  ergibt sich die Gesamtleitfähigkeit durch diesen Kanaltyp aus der Anzahl der Kanäle  $n$  pro Membranfläche und dieser Fläche  $A$ :

$$G_X(u) = P_o(u) \cdot g_X \cdot n \cdot A \quad (2.6)$$

Der Gesamtstrom einer Ionensorte durch ein Kanalensemble kann durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (Goldman, 1943) beschrieben werden:

$$I_X(u) = P_o(u) \cdot g_{0,X} \cdot n \cdot A \cdot z_X \cdot u \cdot \frac{c_{X,i} \cdot e^{z_X u} - c_{X,e}}{e^{z_X u} - 1} \quad (2.7)$$

Dabei sind  $z_X$  die Ladungszahl des Ions  $X$  und  $g_{0,X}$  die für die interne ( $i$ ) und externe ( $e$ ) Konzentration  $c_{X,i} = c_{X,e} = 1$  bestimmte Einzelkanalleitfähigkeit. Diese Gleichung beruht auf den folgenden Voraussetzungen:

- Die Ionen beeinflussen sich nicht gegenseitig bei der Diffusion durch die Membran.
- Das elektrische Feld in der Membran ist konstant und homogen.
- Es herrscht ein dynamisches Gleichgewicht, d. h. der Fluss über die Membran ist zeitlich konstant.

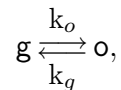
Diese Voraussetzungen sind nicht immer erfüllt, ergeben jedoch eine gute Näherung für die tatsächlichen Verhältnisse (Jaffe, 1974; Syganow und von Kitzing, 1999). Das Gleichgewichts-Membranpotential ist das Potential, bei dem kein Nettostrom fließt und ergibt sich aus der Umformung von Gl. 2.7 als:

$$V_M = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{\sum P_a \cdot c_{a,e} + \sum P_k \cdot c_{k,i}}{\sum P_a \cdot c_{a,i} + \sum P_k \cdot c_{k,e}} \quad (2.8)$$

wobei der Index a für Anionen und k für Kationen steht.

### 2.5.1 Schaltkinetik der Kanäle

Nach einer Zustandsänderung erfolgt der Übergang zu einem neuen Gleichgewichtszustand nicht instantan, sondern entsprechend der Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Zuständen. Wenn für  $k_o$  die Übergangswahrscheinlichkeit zum offenen o und  $k_g$  die zum geschlossenen Zustand g ist:



dann folgen nach instantaner Änderung der Bedingungen die Besetzungswahrscheinlichkeiten einer Exponentialfunktion mit einer Zeitkonstanten  $\tau$  von

$$\tau = \frac{1}{k_o + k_g}$$

Entsprechend folgen die Besetzungswahrscheinlichkeiten schnellen Änderungen der äußeren Bedingungen mit einer Verzögerung. Erfolgen die Änderungen jedoch langsam im Vergleich zu  $\tau$ , so wird sich keine signifikante Differenz zwischen dem aktuellen und dem Gleichgewichtszustand ergeben.

Die Zeitkonstanten der aus *Vicia faba* bekannten Kanäle liegen bei max. 100 ms für den einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal (Dietrich et al., 1998), 450 ms für den auswärts gleichrichtenden Kaliumkanal (Blatt und Grabov, 1997). Die  $H^+$ -ATPase und der schnelle (R-typ) Anionenkanal aktivieren annähernd instantan (Lohse und Hedrich, 1992; Dietrich und Hedrich, 1998; Keller et al., 1989). Lediglich der langsame (S-typ) Anionenkanal hat bei der Deaktivierung eine deutlich langsamere Kinetik mit einer Zeitkonstanten von über 10 Sekunden (Linder und Raschke, 1992; Schroeder und Hagiwara, 1989).

## 2.6 Computergestützte Modellierung des Schließzellverhaltens

Die der Stomabewegung zugrunde liegende Aufnahme und Abgabe von Kalium und Chlorid erfolgt über Kanalproteine, deren biophysikalische Eigenschaften gut bekannt sind. Angetrieben werden die Vorgänge von der  $H^+$ -ATPase, die unter Spaltung von ATP Protonen entgegen dem elektrochemischen Gradienten über die Plasmamembran transportiert und dadurch ein vom Gleichgewichtszustand abweichendes Membranpotential bewirken kann. Es wurde eine Computersimulation erstellt, die anhand der Transportercharakteristiken Stomaöffnung und -schluss sowie längere Phasen mit konstanten Zuständen (offen und geschlossen) nachbildet.

### 2.6.1 Kaliumkanäle

Für die Aufnahme und Abgabe von Kalium sind zwei separate Kanäle in der Schließzellmembran von *Vicia faba* gefunden worden, ein einwärts und ein auswärts gleichrichtender Kaliumkanal ( $K_{in}$  und  $K_{out}$ , Schroeder et al. (1984); Schroeder (1988)). Die gleichrichtende Wirkung entsteht durch erhöhte Offenwahrscheinlichkeit bei Hyper- bzw. Depolarisation der Zellmembran, wie sie in Abb. 2.6 auf Seite 26 links dargestellt ist. Hieraus ergeben sich die prinzipiellen Strom-Spannungs-Kennlinien in Abb. 2.6 rechts. Die Eigenschaften der beiden Kanäle sind durch Patch-Clamp Messungen an Protoplasten sowie durch Einstich-Messungen in Epidermisstreifen untersucht worden (Lemtiri-Chlieh, 1996; Blatt und Gradmann, 1997; Schroeder, 1988; Blatt, 1988; Dietrich et al., 1998; Grabov und Blatt, 1997; Hedrich und Dietrich, 1996; Ilan et al., 1996).

Als Parameter wurden bei 150 bzw. 30 mM interner bzw. externer Kaliumkonzentration  $U_{1/2} = -164$  mV und  $z_g = 1,4$  für den einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal beschrieben (Dietrich et al., 1998). Messungen von Ilan et al. (1996) ergeben mit  $U_{1/2} = -146$  bis  $157$  mV für verschiedene externe pH-Werte (von 4.4 bis 8.1) und  $z_g = 1,5$  sehr ähnliche Werte. Für den auswärts gleichrichtenden Kaliumkanal beschreibt Lemtiri-Chlieh (1996)  $U_{1/2} \approx -6$  bis  $17$  mV,  $z_g \approx 0,95$  bis  $1,14$  jeweils bei  $[K^+_i] = 100$  bis  $200$  mM (die externe Kaliumkonzentration ist größer als  $10$  mM), während Blatt und Gradmann (1997) für verschiedene externe Kaliumkonzentrationen von  $0,1$  bis  $30$  mM  $U_{1/2}$  zwischen  $-130$  und  $-4$  mV ( $-26$  mV bei  $[K^+_e]$  von  $10$  mM) finden, wobei aber die interne Kaliumkonzentration nicht kontrolliert werden konnte.

### 2.6.2 Die $H^+$ -ATPase

Voraussetzung für die Aufnahme von Kalium durch den einwärts gleichrichtenden Kanal ist eine Hyperpolarisation der Plasmamembran, die durch die Aktivität einer membrangebundenen  $H^+$ -ATPase erreicht wird. Dieses Protein transportiert mit der Energie der Spaltung von ATP Protonen gegen den elektrochemischen Gradienten aus der Zelle heraus. Dieser Export von Protonen wird von Raschke und Humble (1973) dazu herangezogen, die lichtinduzierte Stomaöffnung trotz fehlender Anionenaufnahme zu erklären, da er ausreicht, bei der gemessenen Akkumulation von Kalium die Elektroneutralität zu gewährleisten. Die elektrischen Eigenschaften der  $H^+$ -ATPase wurden von Lohse und Hedrich (1992) sowie Taylor und Assmann (2001) bestimmt. Der Strom in Abhängigkeit von der Membranspannung wird von beiden über einen weiten Bereich als annähernd linear beschrieben. Während die Messungen von Taylor und Assmann (2001) bei  $-150$  mV enden, findet sich bei Lohse und Hedrich (1992) negativ von  $-120$  bis  $-150$  mV eine spannungsabhängige Änderung der Steigung der Strom-Spannungskennlinie, also der „Leitfähigkeit“ der Pumpe. Für das Modell wurde daher die Summe aus einer konstanten und einer gemäß Boltzmann-Funktion von der Spannung abhängigen Leitfähigkeit gebildet:

$$I_{ATPase}(u) = I_{max} \cdot \left( \frac{u_M}{r} + \frac{1}{1 + e^{d \cdot (u_{1/2} - u_M)}} \right) \quad (2.9)$$

Eine Anpassung der Parameter mittels eines Marquardt-Levenberg Algorithmus ergibt  $r = 70$ ,  $d = 0,8$  und  $u_{1/2} = -7,128$ . Den prinzipiellen Stromverlauf in Abhängigkeit von der Membranspannung zeigt Abb. 2.5. Blaublicht aktiviert die  $H^+$ -ATPase in Schließzellprotoplasten (Assmann et al., 1985), über einen Signalweg, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

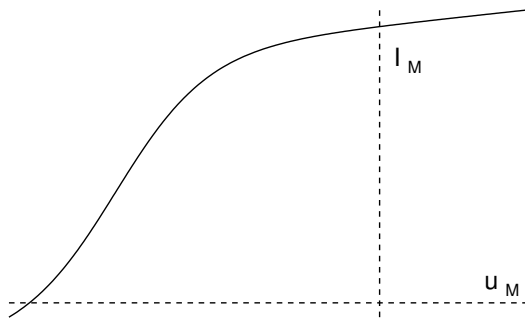


Abbildung 2.5: Stromverlauf der  $H^+$ -ATPase nach Gl. 2.9

Ein Schritt dieser Aktivierung ist die Phosphorylierung der  $H^+$ -ATPase nach Blaublichtgabe (Kinoshita und Shimazaki, 2001), wobei 14-3-3 Proteine eine bedeutende Rolle spielen (Emi et al., 2001), während zytosolisches Calcium die Pumpe mit einer Halbwertskonzentration von  $0,3 \mu M$  inhibiert (Kinoshita et al., 1995). Da die Zusammensetzung des Zytosols durch Patch-Clamp Experimente verändert wird, wodurch eventuell regulatorische Elemente fehlen, ist es möglich, dass der tatsächliche Maximalstrom deutlich über dem von Lohse und Hedrich (1992) und

Taylor und Assmann (2001) beschriebenen liegt. Eine solche Variante mit einem maximalen Pumpstrom von  $100 \text{ pA}$  wird ebenfalls berücksichtigt.

### 2.6.3 Anionentransporter

Als weitere Transportproteine existieren in der Plasmamembran von Schließzellen für Anionen permeable Kanäle. Es werden entsprechend der (De-)Aktivierungskinetik schnelle (R-Typ für rapid) und langsame (S-Typ für slow) Anionenkanäle unterschieden. Da sie sich in der Spannungsabhängigkeit ihrer Gleichgewichtsströme nur wenig unterscheiden (vergleiche Hedrich und Jeromin (1992) und Linder und Raschke (1992)) wird im Modell nur ein Anionenkanaltyp berücksichtigt, dessen Parameter von dem biophysikalisch gut charakterisierten R-Typ-Kanal GCAC-1, untersucht z. B. von Kolb et al. (1995); Dietrich und Hedrich (1998); Schulz-Lessdorf et al. (1996), übernommen werden. ( $U_{1/2} = -55 \text{ mV}$ ,  $z_g = -2,1$ ) Seine Offenwahrscheinlichkeit wird durch Depolarisation der Plasmamembran erhöht (Abb. 2.6 c, links). Somit ermöglicht der Kanal bei den vorherrschenden Konzentrations- und Potentialbedingungen im intakten Blatt einen Efflux von Chloridionen (Abb. 2.6 c, rechts), womit sich auch die Zunahme der Chloridaktivität im apoplastischen Raum nahe der Schließzelle (Felle et al., 2000) erklären lässt.

Da diese Zunahme während des Stomaschlusses auftritt und ein erhöhter Chloridgehalt in Schließzellen geöffneter gegenüber denen geschlossener Stomata gefunden wurde (Humble und Raschke, 1971; Raschke und Schnabl, 1978), legt das nahe, dass die Anionenkanäle beim Stomaschluss von Bedeutung sind. Dies wird auch durch ihre Aktivierung unter Bedingungen bestärkt, die den Stomaschluss auslösen.

Wenn Chloridionen beim Stomaschluss aus der Zelle exportiert werden, muss für das



erreichen erhöhter Konzentrationen bei geöffneten Stomata auch ein Transportmechanismus für die Aufnahme von Chlorid existieren. In der Grünalge *Chara* wurde ein Kotransporter für Chlorid und Protonen beobachtet und das Transportverhältnis als  $2\text{H}^+/1\text{Cl}^-$  bestimmt (Beilby und Walker, 1981; Sanders und Hansen, 1981; Sanders, 1984). Trotzdem er in Schließzellen bisher nicht elektrophysiologisch nachgewiesen werden konnte wird er weithin als Aufnahmeweg für Chlorid akzeptiert, da der Protonengradient einen Chloridinflux in die hyperpolarisierte Zelle auf diesem Weg zulässt. Der Strom durch diesen Transporter wird für das Modell durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$I_{Sy}([H]_{i,e}, [Cl]_{i,e}) = G_0 \cdot \left( u_M + \left( 2 \cdot \ln \left( \frac{[H]_i}{[H]_e} \right) + \ln \left( \frac{[Cl]_i}{[Cl]_e} \right) \right) \right) \quad (2.10)$$

wobei  $G_0$  die Leitfähigkeit des Transporters angibt und in Form einer Boltzmann-Funktion von  $u$  abhängt. Die Gleichung beschreibt also einen ‚Kanal‘, dessen Umkehrpotential von den Konzentrationen und der Anzahl der beiden in gleichzeitig transportierten Ionen abhängt ( $u_{rev} = -2 \cdot \ln([H]_i/[H]_e) - \ln([Cl]_i/[Cl]_e)$ ) (Sanders, 1988). Den prinzipiellen Verlauf der Leitfähigkeit und des Stromes für diesen Transporter zeigt Abb 2.6. Seine maximale Leitfähigkeit und das halbmaximale Aktivierungspotential bleiben als veränderliche Parameter für die Simulation.

Kanal	Modulation von	
	$u_{1/2}$	$g_{max}$
$K_{in}$	negativer mit abnehmendem $\text{pH}_{ext}$	wächst mit zunehmendem $\text{pH}_{ext}$
$K_{out}$	negativer mit zunehmendem $[K]_{int}$ positiver mit zunehmender $[K]_{ext}$	steigt mit abnehmendem $\text{pH}$
Anionenkanal		steigt mit zunehmendem $\text{Cl}(e)$

Tabelle 2.3: Modulation der Kanalparameter auf Grund verschiedener interner und externer Faktoren.

### 2.6.4 Transporterparameter und deren Variation

Die drei verschiedenen Kanaltypen wurden mit konstanter „gating charge“ ( $z_g$  in Gl. 2.5) angenommen, die -1,4 für  $K_{in}$ , 1,2 für  $K_{out}$  und -2,1 für den Anionenkanal betrug. Die halbmaximalen Aktivierungsspannungen von  $K_{in}$ ,  $K_{out}$  und Anionenkanal wurden in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren verändert, die in Tabelle 2.3 dargestellt sind.

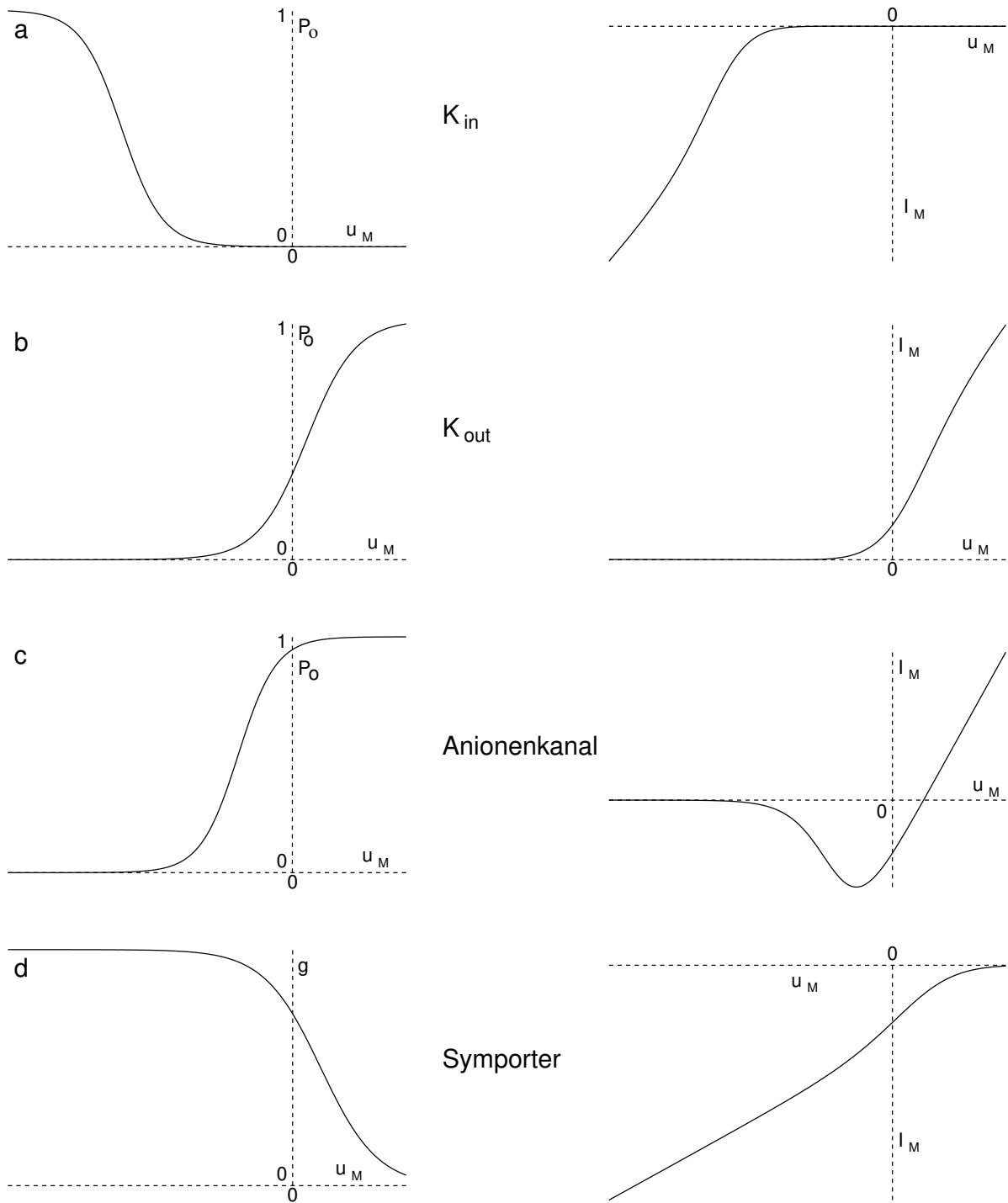


Abbildung 2.6: Prinzipielle Verläufe der Offenwahrscheinlichkeiten (a–c, links) bzw. Leitfähigkeit (d, links) und Ströme (rechts) in Abhängigkeit vom Membranpotential durch die Ionentransporter im Modell.

Die Abhängigkeiten vom pH werden in dem Bereich der im Modell auftritt, als linear angenommen, während die Kaliumabhängigkeit des  $K_{\text{out}}$  durch die Gleichung

$$- 4,573 \cdot e^{-0,32 \cdot [K]_e} - 0,0025 \cdot ([K]_i - 50,0) \quad (2.11)$$

beschrieben wird, in die Konzentrationen in mM eingesetzt werden (Blatt, 1992; Ilan et al., 1996). Zur Simulation von Öffnung, Schließen und stabilen Phasen wurden die maximalen Ströme bzw. Leitfähigkeiten der Transportproteine gemäß der folgenden Gleichung zeitabhängig verändert.

$$G(t) = G_0 + \frac{G_1}{1 + e^{s_0 \cdot (t_0 - t)}} + \frac{G_2}{1 + e^{s_1 \cdot (t_1 - t)}} \quad (2.12)$$

Die maximale Leitfähigkeit  $G_{\text{max}}$  kann so, wie in Abb. 2.7 gezeigt, von einem Startwert  $G_0$  zum Zeitpunkt  $t_0$  auf den neuen Wert  $G_0 + G_1$  verändert werden und zur Zeit  $t_1$  weiter auf einen Wert  $G_0 + G_1 + G_2$ . Die Geschwindigkeit der Änderung kann dabei mit den Parametern  $s_0$  und  $s_1$  angepasst werden.

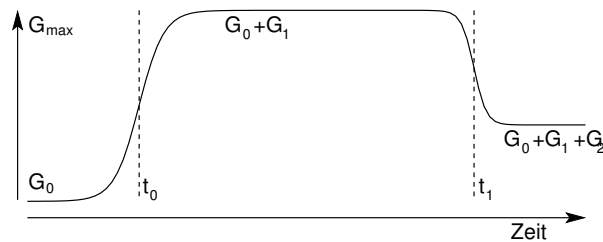


Abbildung 2.7: Zeitlicher Verlauf der maximalen Leitfähigkeit eines Kanals bzw. maximalen Aktivität der  $H^+$ -ATPase.

### 2.6.5 Weitere Komponenten des Modells

Für die Simulation wurden drei getrennte Volumina angenommen. Die Zelle, der sie direkt umgebende „innere“ und der die weitere Umgebung umfassende „äußere“ apoplastische Raum. Das Volumenverhältnis dieser drei Räume wurden am Start auf  $1:3\frac{1}{2}:500$  festgelegt, wobei die apoplastischen Volumina konstant, das Zellvolumen dagegen variabel gehalten wurde. Die relative Größe dieser Räume zueinander ergab sich aus ersten Tests, in denen zur Stomaöffnung approximiert konstante Kalium- und Protonenflüsse und deren Einfluss auf die entsprechenden Konzentrationen im zellnahen apoplastischen Raum simuliert wurden. Die Größe der Flüsse ergab sich aus den Literaturdaten der zytosolischen Kaliumkonzentrationen für geschlossene und geöffnete Stomata sowie einer Dauer der Öffnung von 60 min.

Das Zellvolumen wurde während der Simulation durch die Aufnahme und Abgabe von Wasser geändert, dessen Fluss dem Gradienten des Wasserpotentials über die Membran folgend in die Simulation einging. Die Bewegung der Ionen über die Membran

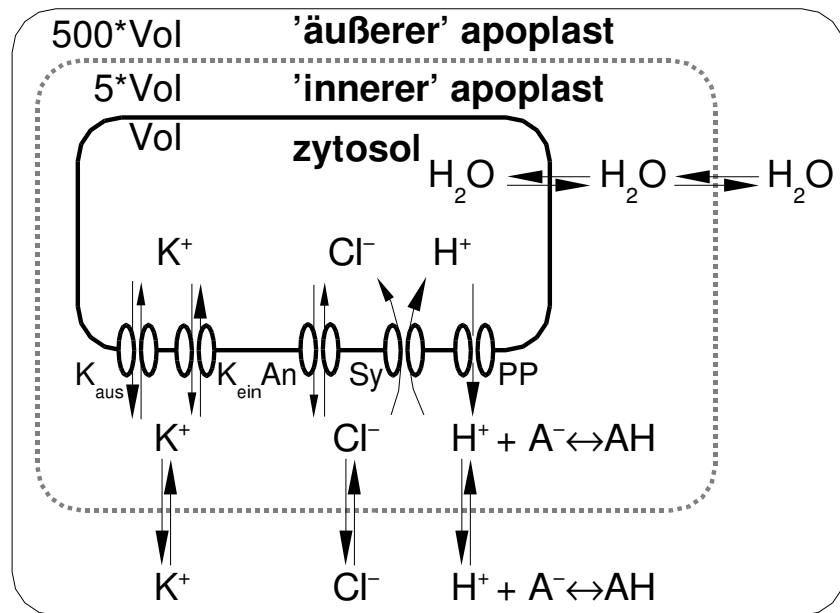


Abbildung 2.8: Modell für die Simulation der Stomabewegung

wurde nach Gl. 2.7 für die verschiedenen Ionensorten berechnet, während für die Diffusion zwischen den beiden apoplastischen Räumen freie Diffusion angenommen wurde. Zusätzlich wurden Protonen im Apoplasten durch ein Säure-Base Gleichgewicht gepuffert  $\text{H}^+ + \text{A}^- \rightleftharpoons \text{AH}$ . Als Gesamtbild mit den beteiligten Volumina, Puffersystemen und Transportproteinen ergibt sich das Modell nach Abb. 2.8.

Weiterhin wird in der Simulation davon ausgegangen, dass  $n$ , die Anzahl der Kanäle bzw. Transporter pro Membranfläche konstant bleibt, während sich die Membranfläche bei der Volumenänderung der Schließzelle ändert. Diese Annahme wird gestützt durch die Untersuchungen von Homann und Thiel (2002), die gezeigt haben, dass dies bei der Zunahme der Membranfläche durch Verschmelzung intrazellulärer Vesikel mit der Plasmamembran zumindest bei Kaliumkanälen zutrifft. Weiter haben Shope et al. (2003) mit membrangebundenen Fluoreszenzfarbstoffen in intakten Schließzellen nachgewiesen, dass auch die Volumenabnahme mit Internalisierung von Membranvesikeln verbunden ist.

### 2.6.6 Bestimmung der Anfangsbedingungen für die Simulation

In den Simulationsläufen wurden nun die maximalen Leitfähigkeiten der Kanäle sowie der maximale Strom durch die  $\text{H}^+$ -ATPase und die Geschwindigkeit der Übergänge zwischen verschiedenen Werten dieser Parameter variiert. So sollte ein Übergang von einem stabilen offenen oder geschlossenen Zustand der Schließzelle zum Schließen oder Öffnen und wieder stabilem geschlossenen oder offenen Zustand erreicht wer-

den. Ziel war es dabei, Zellvolumen und Turgor, die interne Kalium- und Chloridkonzentration für geöffnete bzw. geschlossene Stomata, den Verlauf der apoplastischen Konzentrationsverläufe und des Membranpotentials möglichst nah an den Literaturangaben zu erzielen. Da die Zeiträume für das Öffnen und Schließen deutlich über 10 min betragen, und ein Nettostrom von 1 pA in 0,1 s die Membranspannung je nach

Param	geschlossen		geöffnet	
	int	ext	int	ext
[K] / mM	80	20	480	4,0
[Cl] / mM	20	5	100	5,0
P / MPa	0,3		2,5	
Vol / pl	6,0		6,0	

Tabelle 2.4: Konzentrationen, Druck und Volumen für das Schließzellsystem bei geöffnetem und geschlossenem Stoma. Diese Werte wurden als Anfangsbedingungen für die Simulation angenommen.

Membrankapazität um 5–10 mV verschieben würde, wird davon ausgegangen, dass alle Transportvorgänge in ihrer Summe elektroneutral erfolgen müssen, d. h.  $\sum I = 0$ . Als Werte für Konzentrationen, Turgor und Zellvolumen werden für die Schließzellen geschlossener bzw. geöffneter Stomata gemäß Literaturangaben Allaway und Hsiao (1973); Humble und Raschke (1971); Franks et al. (1998, 2001); Felle et al. (2000) angenommen, die allerdings eine große Variation zeigen. Die Anfangsbedingungen und nach der Stomabewegung zu erreichende Endwerte wurden gemäß Tab. 2.6.6

angenommen und liegen damit im Bereich der publizierten Ergebnisse. Der Zeitraum für Öffnung und Schließen beträgt bei *Vicia* zwischen 30 und 120 min, in intakten Blättern bzw. Pflanzen je nach Umgebungsbedingungen.

Der zeitliche Verlauf dieser Parameter ergibt sich aus den im Folgenden dargestellten Differentialgleichungen, in denen  $D_X$  die Diffusionskonstante des Ions X in den apoplastischen Räumen (e1 und e2) angibt,  $P_{H_2O}$  die Permeabilität der Plasmamembran für Wasser und  $V_{H_2O}$  das spezifische Volumen von Wasser ( $18,0 \text{ cm}^3/\text{mol}$ ) unter Normbedingungen. Der Zusammenhang zwischen Zellvolumen und Turgor wurde nach den Darstellungen von Franks et al. (2001) modelliert. Der Faktor  $\epsilon$  ist ein Elastizitätsmodul für die die Schließzelle umgebende Struktur. Es müsste hier nicht allein die Zellwand eingehen, sondern auch der sich ändernde Gewebedruck der Epidermiszellen, weshalb ein konstantes  $\epsilon$  nicht zwingend ist, den Zusammenhang jedoch bei der gefundenen Variabilität zwischen verschiedenen Schließzellen ausreichend annähert.

$$d[X]_i = -dt \cdot \frac{I_X}{z_x \cdot F \cdot V_i} \quad (2.13)$$

$$d[X]_{e1} = dt \cdot \left( \frac{I_X}{z_x \cdot F \cdot V_e} - D_X \cdot ([X]_{e1} - [X]_{e2}) \right) \quad (2.14)$$

$$d[X]_{e2} = dt \cdot D_X \cdot ([X]_{e1} - [X]_{e2}) \quad (2.15)$$

Setze die Startparameter ( $[X]_{i,e}$ , $\text{pH}_{i,e}$ , Vol., P, ...)	
Setze Membranpotential $u_M = 0$	
Wiederhole	Setze $u_{\text{alt}} = u_M$
	Bestimme Transporter-Parameter für $u_M$
	Berechne $u_M$ aus $I_{\text{ges}}(u_M) = 0$
bis	$ u_{\text{alt}} - u_M  < d$
Stabile Startwerte erreicht, beginne Simulation	

Abbildung 2.9: Ablaufplan des Programms für die Ermittlung stabiler Startwerte

$$dV_i = -dt \cdot P_{H_2O} \cdot V_{H_2O} \left( \sum_X [X]_e - \sum_X [X]_i + \frac{P}{R \cdot T} \right) \quad (2.16)$$

$$P = P \cdot \epsilon \cdot \frac{\Delta V}{V} \quad (2.17)$$

Für das zunächst angenommene Gleichgewicht wurden iterativ zu den gegebenen Ionenkonzentrationen und einem daraus nach Gleichung 2.8 berechneten Membranpotential die Leitfähigkeiten für die verschiedenen Ionen bestimmt. Nun wurde wieder das Membranpotential bestimmt und wenn es sich von dem im letzten Schritt unterschied, wieder mit der Bestimmung der spannungsabhängigen Leitfähigkeiten fortgefahren (Abb. 2.9). Blieb das Membranpotential bei dieser Routine annähernd konstant (Änderung gegen vorige Berechnung  $< 0.05$  mV), dann wurde mit den so ermittelten Startwerten fortgefahren, indem die Gleichungen 2.13 bis 2.17 mit einem Ein-Schritt-Algorithmus iterativ gelöst wurden, da wegen der Variabilität der Parameter eine exakte analytische Lösung des Systems unmöglich ist.

### 2.6.7 Verlauf der Simulation

Aus den am Start gefundenden Bedingungen wurde zu einem Zeitschritt bei gegebenen Konzentrationen die Potentialdifferenz über die Plasmamembran berechnet, für die gilt  $I_M(u_M) = 0$  und für diese die Ionenflüsse über die Membran bestimmt. Gleichzeitig wurden die Flüsse von Wasser auf Grund des Gradienten des Wasserpotentials über die Membran und der Ionen für die freie Diffusion zwischen innerem und äußerem apoplastischen Raum bestimmt. Auf Basis dieser Daten wurden nun die Konzentrationen, das Zellvolumen und der Turgor neu bestimmt. Da die Leitfähigkeit bzw. Aktivität der

Transportproteine von den verschiedenen Konzentrationen abhängen, wurden sie neu berechnet und mit den geänderten Werten begann nun wieder der Schritt zur Bestimmung von  $u_M$  (Abb. 2.10). Membranspannung, Konzentrationen, Ströme der beteiligten Ionen, Volumen und Turgor wurden protokolliert und soweit vorhanden, mit gemessenen Werten verglichen. Wurde eine Lösung gefunden, die die Literaturangaben gut annäherte, so wurde sie mit zwei weiteren Schrittweiten in der Simulation auf numerische Stabilität überprüft.

Berechne stabile Startparameter	
Wiederhole	Berechne Leitfähigkeiten der einzelnen Kanäle
	Berechne Aktivität der H <sup>+</sup> -ATPase
	Berechne Ströme der einzelnen Ionen
	Berechne Diffusionsflüsse der Ionen
	Berechne Wasserfluss
	Berechne neue Konzentrationen nach Änderung aller Konzentrationen sowie des Zellvolumens und -druckes
	Berechne neues Membranpotential aus $\Sigma I(u) = 0$
	Ändere max. Aktivität der Transporter nach Vorgabe
bis Zeit für Simulationsende erreicht	

Abbildung 2.10: Ablaufplan des Programms zur Schließzellsimulation. Die erste Zeile verweist auf den in Abb. 2.9 beschriebenen Ablauf.

Die in Teil 2.5 beschriebene Kinetik des Überganges zwischen verschiedenen Offenwahrscheinlichkeiten eines Kanals besitzt Zeitkonstanten im Bereich von einigen Sekunden für den Anionenkanal, Millisekunden für die Kaliumkanäle bzw. deutlich darunter für die H<sup>+</sup>-ATPase. Dies ist deutlich schneller, als die im intakten Blatt beobachteten Änderungen des Membranpotential es (Roelfsema et al., 2001b; Roelfsema und Hedrich, 2002) und der Ionenkonzentrationen (Felle et al., 2000), weshalb die Kanalkinetik vernachlässigt wurde. Da für den H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Symporter keine Daten zur Kinetik des Schaltverhaltens bekannt sind, wurde auch dieser als instantan schaltend berechnet. Damit sind Oszillationen des Membranpotentials aufgrund der Kinetik der Transporter ausgeschlossen. Die von Kaiser und Kappen (2001) beschriebenen langsamen Oszillationen könnten, da sie auch in verschiedenen benachbarten Stomata synchronisiert auftreten, auf Schwankungen des Gewebedruckes im Blatt bzw. Änderung anderer Umgebungsparameter zurückzuführen sein. Dieser Faktor wurde im Modell nicht berücksichtigt, allerdings haben die Oszillationen auch eine Frequenz von weniger als 2 h<sup>-1</sup> und liegen

damit im Bereich eines Öffnungs- oder Schließvorgangs. Es bleibt lediglich die Möglichkeit, dass Änderungen der Ionenkonzentrationen die Transporterleitfähigkeiten so ändern, dass Oszillationen im Membranpotential auftreten. Dieser Prozess ist allerdings deutlich langsamer, als die oben genannten Zeitkonstanten der Transporterkinetik.

### Optimierung der Parameter

Zum Auffinden optimal an die gemessenen Daten angepasster Verläufe wurden zum einen die simulierten Ergebnisse mit den Messergebnissen verglichen, die Auswirkung von gezielten Parameteränderungen getestet und wieder verglichen, bis eine zufrieden stellende Anpassung erreicht war. Diese Methode ist allerdings zeitaufwendig und erlaubt nur vergleichsweise wenige Parametersätze zu testen. Trotzdem wurden gute Übereinstimmungen erreicht.

Um viele verschiedene Parametersätze testen zu können, musste eine automatisierte Methode gefunden werden. Hierfür wird zunächst ein Bewertungskriterium dafür benötigt, wie gut die Simulation die Messwerte annähert, eine sogenannte Qualitätsfunktion. In diesem Fall wurde die  $\chi^2$ -Abweichung zwischen simulierten und gemessenen Daten berechnet:

$$\chi^2 = \sum_{i=1..N} \frac{(y_{mess,i} - y_{sim,i})^2}{y_{mess,i}^2}$$

Für die internen Konzentrationen wurden ebenfalls  $\chi^2$  bestimmt, allerdings begrenzt auf konstante Konzentrationen vor dem simulierten Sprung in Lichtintensität und 1 h danach bis zum Ende der Simulation. Für diese Abweichungen wurde dann mit einer Evolutionären Strategie ein Minimum gesucht. Das Vorgehen ist dabei, mit einer Gruppe von Parametersätzen zu starten, die Simulation mit allen durchzuführen und die Ergebnisse mittels der quadratischen Abweichung von den Messwerten zu bewerten. Sortiert nach der Qualitätsfunktion wurden dann die erfolgreichsten Ansätze ausgewählt und aus je zwei zufällig ausgewählten ein neuer generiert. Hierfür wurden die Parameterwerte der beiden genommen, und jeweils aus dem aufgespannten Intervall ein zufälliger neuer Wert gewählt. Ein weiterer Anteil für die nächste Serie oder "Generation" wurde durch zufällige Änderung (Mutation) einzelner Parameterwerte erzeugt.

Die Simulation wird nun wieder mit den entstandenen neuen Parametersätzen durchgeführt und der Algorithmus so lange wiederholt, bis die Änderung von  $\chi^2$  von Generation zu Generation sehr klein wird. Die Selektion der Parametersätze der Folgegeneration erfolgt nach der Größe von  $\chi^2$ , es werden also jeweils die besten Simulationen ausgewählt um fortzufahren.



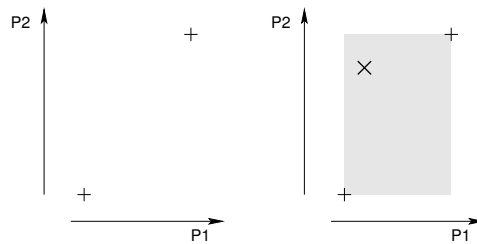


Abbildung 2.11: Finden neuer Parameter im evolutionären Algorithmus. Die beiden alten (+) Parametersätze spannen einen Raum auf, in dem der neue (x) Parametersatz zufällig positioniert wird.

## 2.7 Indikatorfarbstoffe zur Bestimmung intrazellulärer Ionenkonzentrationen

Die Beladung von lebenden Zellen mit Indikatorfarbstoffen erlaubt es, die Änderung zytosolischer Faktoren unter physiologischen Bedingungen zu verfolgen. Es existieren verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, die ihre spektralen Eigenschaften auf Grund der Bindung von Protonen oder Calciumionen ändern. Die einfachste Änderung ist die der Quantenausbeute der Fluoreszenz. Bei entsprechenden Farbstoffen resultiert die Bindung oder Komplexbildung mit dem zu detektierenden Ion bei gleich bleibender Anregungsintensität in einer geänderten Emissionsintensität. Allerdings ist die gemessene Emissionsintensität auch von der Konzentration des Farbstoffes in seiner aktiven Form und von weiteren Faktoren, wie der Abschwächung des anregenden oder emittierten Lichts durch andere Stoffe abhängig. Die Messung der Fluoreszenzänderung ermöglicht Rückschlüsse auf die Ionenkonzentration nur, wenn andere Gründe für die Intensitätsänderung mit Sicherheit ausgeschlossen werden können. Alle bekannten Fluoreszenzfarbstoffe gehen durch die Belichtung zum Teil in einen stabilen nicht fluoreszierenden Zustand über bzw. zerfallen zu nicht fluoreszierenden Stoffen. Dieser Vorgang wird „Bleichen“ genannt und kann bei bekannter Beleuchtungsintensität theoretisch exakt berechnet werden, denn der Anteil des Farbstoffes  $F$ , der in die inaktive Form übergeht, hängt im wesentlichen von einer Stoffkonstanten  $k$  und der Beleuchtungsintensität  $I$  ab:

$$\frac{\partial F / \partial t}{F} = k \cdot I$$

Der hieraus resultierende zeitliche Verlauf der Intensität wird durch eine exponentielle Abnahme beschrieben und ließe sich durch entsprechende Kontrollmessungen bestimmen. Damit könnten tatsächliche Messkurven korrigiert werden, um die durch andere Effekte hervorgerufenen Änderungen zu bestimmen. Allerdings sind bei biologischen Präparaten die Veränderungen der optischen Eigenschaften in der Umgebung des Messpunktes nie exakt vorhersagbar. Insbesondere im Epidermisstreifen oder intakten Blatt, wo die Zellwand eine der am stärksten beeinflussenden Schichten ist, wäre eine starke

Variabilität zu erwarten. Daher beschränkt sich die Möglichkeit der Ein-Wellenlängen-Farbstoffe auf die qualitative Bestimmung von Konzentrationsänderungen.

Eine zweite Gruppe bilden so genannte Zwei-Wellenlängen-Farbstoffe. Moleküle, an die ein oder mehrere entsprechende Ionen gebunden sind, zeigen dabei gegenüber Molekülen ohne diese Bindung ein in der Wellenlänge deutlich verschobenes Maximum in ihrem Spektrum. Diese Verschiebung kann entweder im Anregungs- oder im Emissionsspektrum auftreten. Entsprechend muss die Messung durch die wechselweise Anregung mit Licht zweier verschiedener Wellenlängen und Messung der Fluoreszenz bei einer festen Wellenlänge oder durch Anregung mit einer festen Wellenlänge und Messung der Fluoreszenzintensität bei zwei verschiedenen Wellenlängen erfolgen. Letzteres kann durch den Einsatz eines dichroitischen Farberteilers, der das emittierte Licht wellenlängenselektiv reflektiert oder passieren lässt, und zweier Detektoren gleichzeitig erfolgen. Bei der Messung mit zwei Anregungswellenlängen sind stets zwei aufeinander folgende Fluoreszenzanregungen nötig, die Fluoreszenzintensität kann mit dem gleichen Detektor bestimmt werden. Da die Messung mit dem vorhandenen LSM 410 erfolgen sollte, das keine Möglichkeit zur Anregung mit UV-Licht bietet, Doppel-Anregungs-Farbstoffe jedoch nur mit Anregungsmaxima im diesem Bereich erhältlich sind, wurden nur Doppel-Emissions-Farbstoffe für die Versuche genutzt und werden im Folgenden genauer beschrieben.

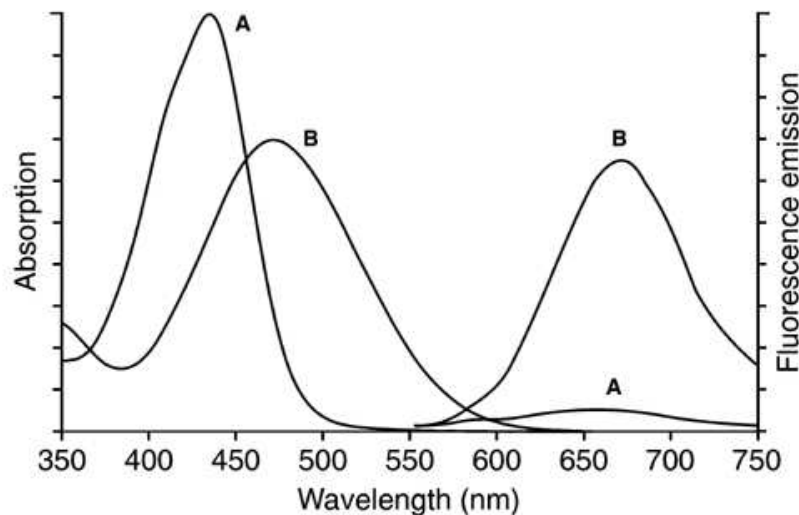


Abbildung 2.12: Spektrum von fura red als Beispiel eines Calcium-Indikatorfarbstoffes.

Mit gebundenem Calcium (A) ist die Fluoreszenzemission deutlich geringer als für den Farbstoff ohne Calcium (B) (aus Richard P. Haugland (2002)).

Reagiert der Fluoreszenzfarbstoff FF mit dem Ion X zu dem Komplex FF-X:  $FF + X$

$\Rightarrow$  FF-X, dann gilt gemäß Massenwirkungsgesetz:

$$K \cdot [X] = \frac{[\text{FF-X}]}{[\text{FF}]}$$

Wobei K die Dissoziationskonstante für FF und X ist. Hat FF bei der Wellenlänge  $\lambda_0$  die Quanteneffizienz  $\phi_0$  und FF-X bei der Wellenlänge  $\lambda_1$  die Quanteneffizienz  $\phi_1$ , dann gilt, da die Emissionsintensität  $I_E$  proportional zur Stoffkonzentration und zur Anregungsintensität  $I_A$  ist:

$$\begin{aligned} \frac{I_{E,\lambda_1}}{I_{E,\lambda_0}} &= \frac{[\text{FF-X}] \cdot \phi_1}{[\text{FF}] \cdot \phi_0} \\ &= [X] \cdot K \cdot \frac{\phi_1}{\phi_0} \end{aligned}$$

Unter der Annahme, dass die Quanteneffizienzen konstant sind oder zumindest ihr Verhältnis zueinander konstant bleibt, ist das Verhältnis der Intensitäten an den beiden Wellenlängen ein direktes Maß für die freie Ionenkonzentration [X].

Allerdings werden viele Farbstoffe in ihrem Bindungsverhalten oder Spektrum durch Protonen oder andere Ionen verändert. So können Änderungen des pH-Wertes eine Veränderung des Intensitätsverhältnis oder der Dissoziationskonstante bewirken, oder der Farbstoff zeigt ähnliche Bindungseigenschaften zu anderen Ionen, z. B.  $\text{Mg}^{2+}$  statt  $\text{Ca}^{2+}$  (Baker et al., 1994; Hyrc et al., 2000).

## 2.8 Beladung intakter Schließzellen mit Kalzium-Indikatorfarbstoffen

Da die Untersuchungen am Laser-Scanning-Mikroskop LSM 410 (Zeiss) durchgeführt werden sollten, das nicht mit einem Laser für ultraviolettes Licht (UV) ausgestattet war, musste auf Farbstoffe zurückgegriffen werden, die mit sichtbarem (blauem) Licht anregbar sind. Es wurde mit fluo-3, Fura-Red, Oregon Green BAPTA 488 und Ca-Green gearbeitet (alle Molecular Probes, USA). Ziel der Beladung sollte es sein, die Zellen möglichst unverletzt untersuchen zu können, z. B. einen Vergleich der Konzentrationsverläufe nach einem äußeren Reiz mit und ohne gleichzeitigen Einstich für elektrophysiologische Messungen vorzunehmen. Der Farbstoff muss hierzu durch die intakte Plasmamembran in die Zelle gelangen. Da die Farbstoffmoleküle komplexe Moleküle mit mehreren aromatischen Ringen und hohem Molekulargewicht sind (fluo-3: 854,7 g/mol, fura red 808,98 g/mol, Oregon Green BAPTA 488: 1114,28 g/mol, Ca-Green: 1147,19 g/mol) gleichzeitig aber auch mehrfach geladen sind, kann dies nur durch spezielle Behandlung ermöglicht werden.

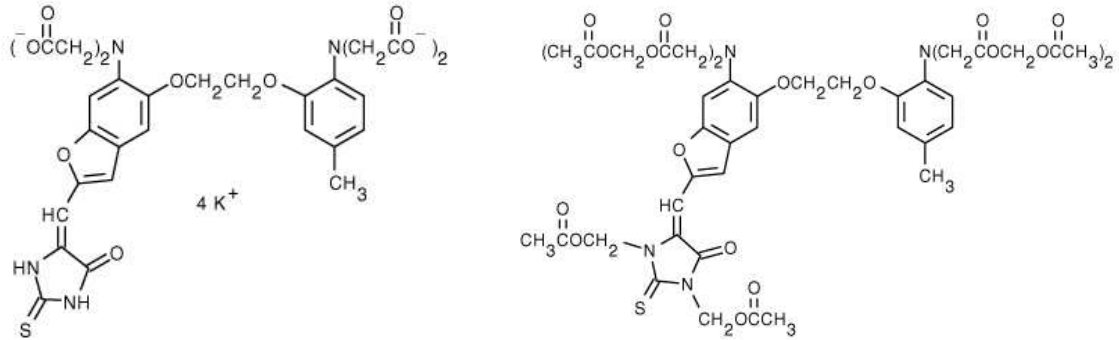


Abbildung 2.13: Struktur des Calcium-Fluoreszenzfarbstoffes fura red, links als Kaliumsalz, rechts als acetyloxy-methyl ester.

Farbstoff	$\lambda_{\max,ex}$	$\lambda_{\max,em}$	$\lambda_{ex}$	$\lambda_{FT}$	$\lambda_{Em.filt}$
fluo-3	506	526	488 o. 514	488	515–565
fura red	506	529	488 o. 514	515–565	
Oregon Green BAPTA 488	494	523	488	488	515–565
Ca-Green	506	531	488 o. 514	488	515–565

Tabelle 2.5: Verwendete Farbstoffe, Spektrale Eigenschaften und verwendete Anregungswellenlänge und Emissionsfilter (Wellenlängen:  $\lambda_{\max,ex}$  und  $\lambda_{\max,em}$  - des Anregungs- und Emissionsmaximums,  $\lambda_{ex}$  - der verwendete Anregungswellenlänge,  $\lambda_{Em.filt}$  - des verwendeten Emissionsfilters) und  $\lambda_{FT}$  Mittenwellenlänge des verwendeten dichroitischen Farberteilers.

### 2.8.1 Beladung mit niedrigem pH-Wert

Da die benutzten Farbstoffe als Anionen vorliegen, kann in sauren Lösungsmitteln das Gleichgewicht zu einer protonierten Form verschoben werden. Ein solches protoniertes und damit neutrales Farbstoffmolekül sollte die hydrophobe Membran leichter durchqueren und in der Zelle wegen des alkalischeren Mediums als geladenes Ion ‚gefangen‘ sein. In einigen Pflanzen und Zelltypen wurde diese Methode bereits als erfolgreich beschrieben. Für diese Versuche wurden neben der Standardlösung mit pH 5.6 auch solche mit den pH-Werten 5.3, 5.0, 4.7 und 4.4 für die Inkubation eingesetzt. Niedrigere pH-Werte konnten nicht getestet werden, da der Anteil der nicht-vitalen Schließzellen stark zunahm (> 25%), weshalb es auch fraglich wurde, ob die restlichen noch als unbeschädigt angesehen werden könnten.

Die abgezogenen Epidermisstreifen wurden in diesen Lösungen für 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 5 h und 14 h abgedunkelt oder bei einer Beleuchtungsintensität von 200  $\mu\text{mol/s m}^2$  inkubiert.

### 2.8.2 Beladung als Ester

Für viele der Farbstoffe gibt es auch Acetoxymethylester, die für verschiedene tierische Zell-Typen als membranpermeabel beschrieben wurden und im Zytosol durch zelleigene Esterasen in ihre aktive Form überführt werden (Tsien, 1981). In pflanzlichen Zellen ist diese Methode allerdings problematisch, vermutlich da apoplastische Esterasen die Farbstoffe spalten und so bereits extrazellulär ihre membranimpermeable Form vorliegt (Cork, 1986). Verschiedene Methoden, wie die Inkubation pflanzlicher Gewebe bei 30° C (Read et al., 1992) brachten keinen einheitlichen Erfolg (Callaham und Hepler, 1991). Ein Ansatz war die Beladung bei niedrigen Temperaturen, die in Wurzelzellen von Weizen erfolgreich durchgeführt wurde (Zhang et al., 1998; Ma et al., 2002). Durch gegenüber der Zimmertemperatur verminderte Inkubationstemperatur soll die Aktivität im Apoplasten vorhandener Esterasen vermindert werden. Dadurch würde verhindert, dass die Farbstoff-Ester bereits extrazellulär in membranimpermeable Formen gespalten werden. Es könnte sich zunächst ein Konzentrationsgleichgewicht einstellen, ehe bei wieder erhöhter Temperatur die Spaltung erfolgt und eine für die Messung ausreichende Konzentration in der Zelle vorliegt. Diese Methode sollte für Schließzellen unter verschiedenen Bedingungen getestet werden.

Für diese Versuche wurden Epidermisstreifen in Standard-Inkubationslösung für verschiedene Zeiträume zwischen 15 min und 24 h abgedunkelt im Kühlschrank bei 4° C und danach für 30, 60 oder 120 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Epidermisstreifen wurden nach der Inkubation in Standardlösung gewaschen und mit Silikonklebstoff auf dem Boden des Mess-Schälchens fixiert, das dann mit 300–500  $\mu\text{l}$  Standardlösung gefüllt wurde. Mit jeweils passender Laser-Wellenlänge und Emissionsfiltern wurde danach die Fluoreszenz der verwendeten Farbstoffe detektiert.

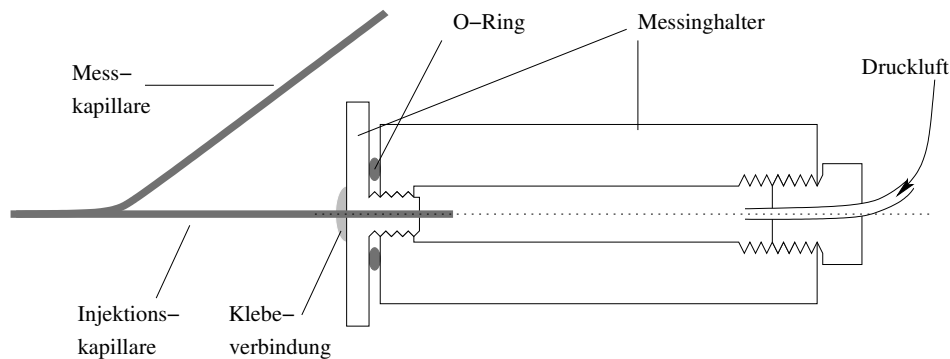


Abbildung 2.14: Skizze der Pipettenhalterung für Druckinjektion mit gleichzeitiger elektrophysiologischer Messung

## 2.9 Injektion von Farbstoff in Schließzellen im intakten Blatt

Eine weitere Möglichkeit, eine Zelle mit Farbstoff zu beladen, ist die Mikroinjektion. Sie wurde z. B. von de Ruijter et al. (1998) für Wurzelhaarzellen verwendet. Es wird, ähnlich wie in der Elektrophysiologie mit einer zur Spitze ausgezogenen Glaskapillare in die Zelle eingestochen. Die Kapillare ist mit einer Farbstofflösung gefüllt, von der ein kleines Volumen durch Anlegen eines Drucks in die Zelle injiziert wird. Allerdings sind für Schließzellen besonders hohe Turgordrücke zu erwarten, außerdem sollten an den Zellen zusätzlich elektrophysiologische Messungen durchgeführt werden. Um hierfür nicht erneut einstechen zu müssen, wurden die Versuche wieder mit verdrehten Doppelkapillaren durchgeführt, von denen eine mit Farbstofflösung gefüllt war. Diese Kapillare wurde in eine Messinghalterung eingeklebt, über die Druckluft aus einer Gasflasche zugeführt werden konnte (Abb. 2.14). Vor dem Einstich wurde der Druck auf etwa 0,5 MPa eingestellt und nach dem Einstich langsam erhöht, bis der Farbstoff in der Zelle sichtbar war. Es konnte ein maximaler Druck von 2,8 MPa appliziert werden. Die zweite Kapillare wurde wie bei den elektrophysiologischen Messungen auch, mit KCl-Lösung gefüllt und über eine Agar-Brücke und Ag/AgCl-Elektrode mit dem Messkopf eines Verstärkers verbunden.

Um die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes beobachten zu können, wurde die Halterung des Blattes gegenüber Abschnitt 2.4 auf Seite 15 für ein inverses Mikroskop verändert. Das Blatt wurde mit der Oberseite nach oben unter eine leicht schräg montierte Plexiglasplatte geklebt. Somit ist die Unterseite dem Objektiv zugewandt und zwischen Objektiv und Blatt wird die Einstichkapillare bewegt (Fig. 2.15).

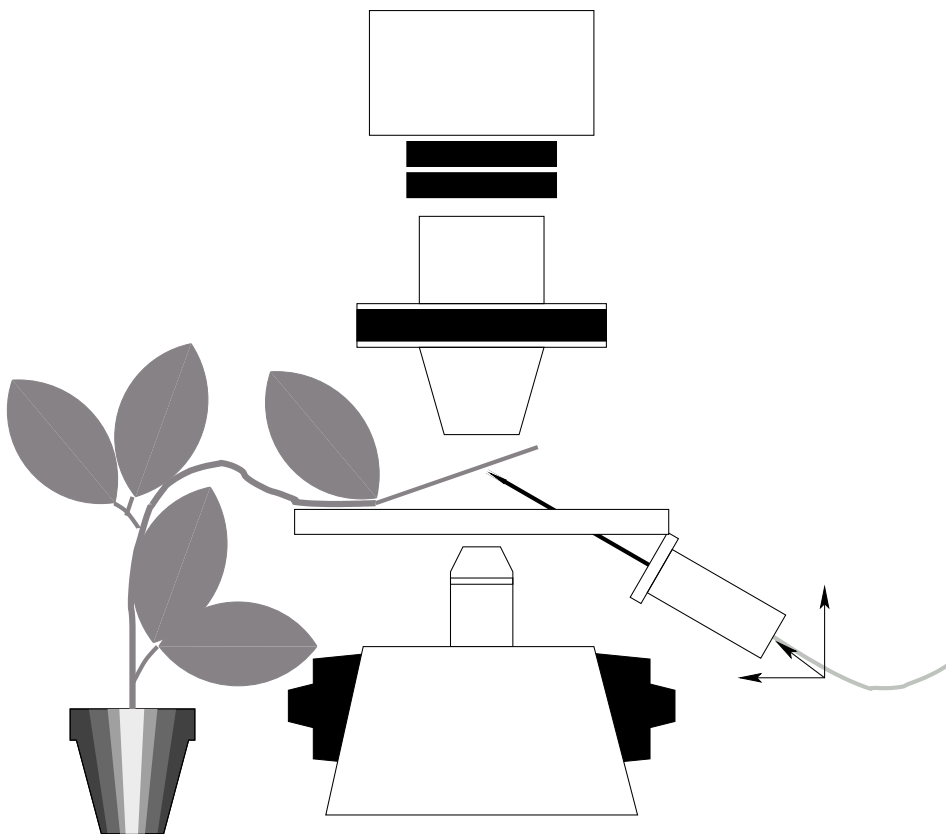


Abbildung 2.15: Skizze des Aufbaus zur Druckinjektion von Farbstoffen in Zellen im intakten Blatt mit gleichzeitiger elektrophysiologischer Messung.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Stomaöffnung in *Arabidopsis thaliana*

Bei den Öffnungsversuchen wurde die Weite der Stomata abgezogener Epidermisstreifen nach 90 min Inkubation in Dunkelheit oder Licht in verschiedenen Lösungen bestimmt, und die Mutante ohne den einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanal KAT1 (KAT1::En-1) mit dem Wildtyp verglichen. Wie erwartet wurde ein deutlicher Unterschied der mittleren Öffnungsweite zwischen im Dunklen und im Licht inkubierten Streifen ermittelt. Der Vergleich der Stomaweiten zwischen der KAT1::En-1 Mutante und dem Wildtyp ergab jedoch bei den beiden verwendeten pH-Werten von 6.5 und 4.5 bei keiner Kaliumkonzentration (zwischen 0,1 und 100 mM) einen signifikanten Unterschied. Auch der Austausch von Kalium durch Natrium in der Inkubationslösung bewirkten keine abweichende Öffnungsweite zwischen Wildtyp und Mutante (Abb. 3.1).

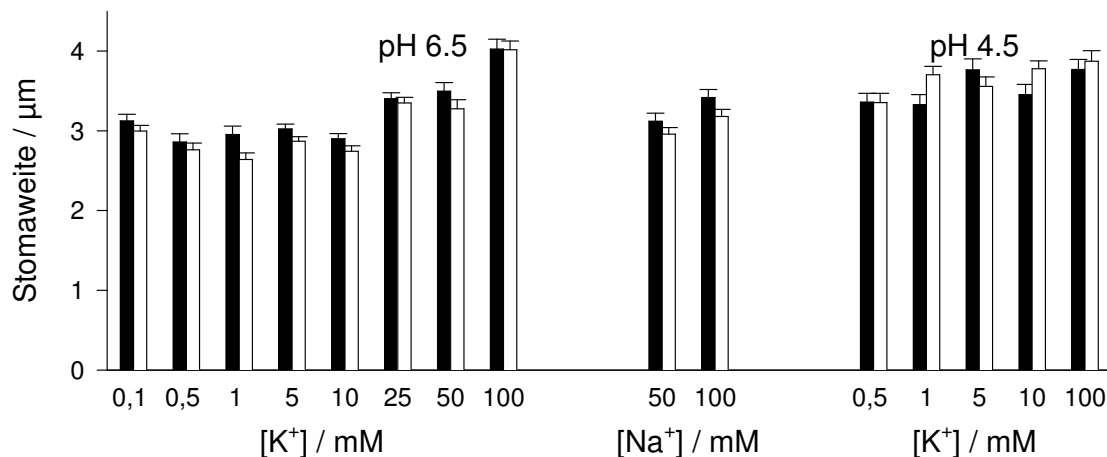


Abbildung 3.1: Vergleich der Öffnungsweiten der Stomata von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (ungefüllte Balken) und KAT1::En-1 (gefüllte Balken) Pflanzen. Links und Mitte bei pH 6.5, rechts bei pH 4.5

Die Anzahl der gemessenen Stomata lag zwischen 81 und 201 für die verschiedenen Bedingungen. Die Hypothese einer Abweichung zwischen Wildtyp und KAT1::En-1 wurde jeweils mit einem t-Test geprüft und musste bei einer Grenze von 5% Irrtumswahrscheinlichkeit für alle Vergleiche verworfen werden.



[K <sup>+</sup> ]	Weite (µm)			Weite/Länge			N	
	Wildtyp	kat1	P	Wildtyp	kat1	P	WT	kat1
0,1	3,13±0,08	3,00±0,07	0,24	0,37±0,01	0,38±0,01	0,68	150	149
0,5	2,86±0,10	2,76±0,08	0,46	0,38±0,01	0,35±0,01	0,14	86	82
1	2,95±0,10	2,64±0,08	0,07	0,38±0,01	0,33±0,01	0,08	92	81
5	3,02±0,06	2,87±0,06	0,06	0,38±0,01	0,37±0,01	0,32	179	201
10	2,90±0,06	2,74±0,07	0,09	0,38±0,01	0,36±0,01	0,14	158	138
25	3,40±0,07	3,35±0,07	0,60	0,41±0,01	0,40±0,01	0,30	174	168
50	3,50±0,11	3,28±0,12	0,17	0,43±0,02	0,42±0,01	0,42	89	95
100	4,03±0,12	4,02±0,11	0,95	0,51±0,01	0,53±0,02	0,31	87	110

Tabelle 3.1: Vergleich der gemessenen Stomaweiten zwischen Wildtyp (WT) und KAT1::En-1 Mutante (kat1) bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen (in mM)

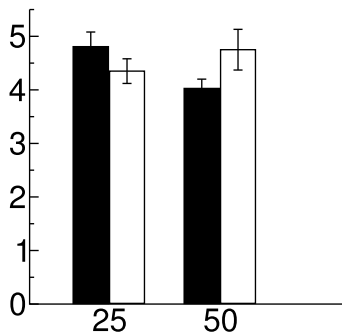


Abbildung 3.2: Stoma-Öffnungsweiten in *Arabidopsis thaliana* nach 6-stündiger Inkubation in 10 µM Fusicoccin.

Zusätzlich zur lichtinduzierten Öffnung wurde auch die durch Fusicoccin erzeugte Stomaöffnung getestet. Hierzu wurde der Lösung 10 µM Fusicoccin zugegeben und die Stomaweite nach 6 h Inkubation bestimmt. Auch diese Öffnung zeigt keine signifikanten (t-test mit Signifikanzschwelle von 5%) Unterschiede zwischen Wildtyp und der KAT1::En-1 Mutante (Abb. 3.2). Dass Fusicoccin – wie auch in der Literatur beschrieben – ein stärkerer Öffnungsinduktor ist, als Weißlicht, zeigt sich auch in der hier gemessenen größeren Öffnungsweite im Vergleich zur lichtinduzierten Öffnung unter verschiedenen Bedingungen (Turner und Graniti, 1969; Assmann und Schwartz, 1992; Squire und Mansfield, 1974).

## 3.2 Zuckeraufnahme

Das D-Glukose Derivat 2-NBDG wurde im Licht und auch im Dunklen von einem hohen Prozentsatz der Schließzellen aufgenommen, was durch die Fluoreszenz des Moleküls in der Schließzelle eindeutig nachweisbar war (Abb. 3.3). Abb 3.4 gibt einen Überblick über den Anteil von Schließzellen, in denen die Fluoreszenz gegenüber dem Hintergrund deutlich erhöht war für verschiedene Bedingungen. Berücksichtigt wurden hierbei nur die Zellen, die durch Öffnungsweite und/oder Zytoplasmaströmung als vital erkennbar waren.

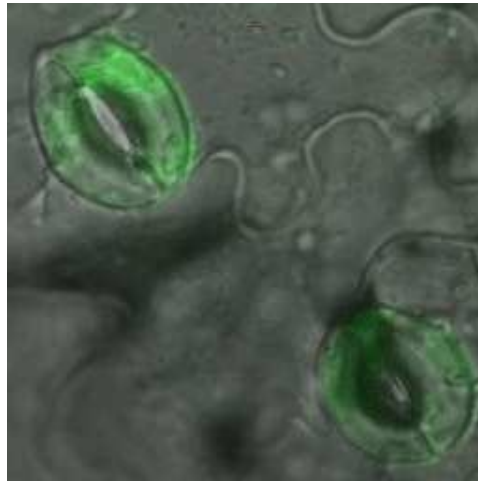


Abbildung 3.3: Schließzelle nach 3 h Inkubation in 2-NBDG im Licht. Die Fluoreszenz des Glukosederivats 2-NBDG ist in grün dem Durchlichtbild überlagert.

Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Färbung im Dunkeln gegenüber belichteten Epidermistreifen sowie im Licht durch Konkurrenz zu reiner Glukose bei einer Konzentration von 50 mM. Auch die Mutante, in der ein Zuckertransporter (STP1) nicht funktionell ist, zeigt gegenüber dem Wildtyp einen deutlich geringeren Anteil an Aufnahme von 2-NBDG. Dieser Rückgang beträgt zwischen 30 % bei Konkurrenz zu 5mM Glukose und 77 % in Dunkelheit. Zusammen zeigt dies, dass STP1 am Transport der Glukose in die Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* beteiligt ist und dass die Zuckeraufnahme lichtabhängig erfolgt. CCCP, das den Protonengradienten über die Membran zerstört, vermindert den Anteil der markierten Zellen deutlich. Das zeigt, dass durch einen Protonengradienten wie erwartet der Glukosetransport über die Plasmamembran gefördert wird. Vanadat, das die  $H^+$ -ATPase hemmt, hat dagegen keinen signifikanten Effekt. Der existierende Protonengradient zwischen Inkubationslösung mit pH 5.0 und dem Zytosol könnte allerdings einen hinreichenden Transport der Glukose in die Zellen ermöglichen. Schon der reine Konzentrationsunterschied der Protonen sollte bei einem 1:1 Transportverhältnis detektierbare Farbstoffkonzentrationen im Zytosol ergeben. Zusätzlich ist der pH-Wert im Zellinneren gepuffert, so dass der Gradient erst bei Sättigung des Puffersystems wegfällt.

### 3.3 Elektrophysiologische Messungen

Nach einem erfolgten Einstich in Schließzellen von *Vicia faba* zeigte sich sofort eine Depolarisation, der dann eine Repolarisation der Zelle folgte. Diese Repolarisation erfolgte zu verschiedenen Membranpotentialen, die im Wesentlichen in drei Gruppen eingeteilt werden konnten: hyperpolarisiert, depolarisiert und weit depolarisiert. Die weit depola-

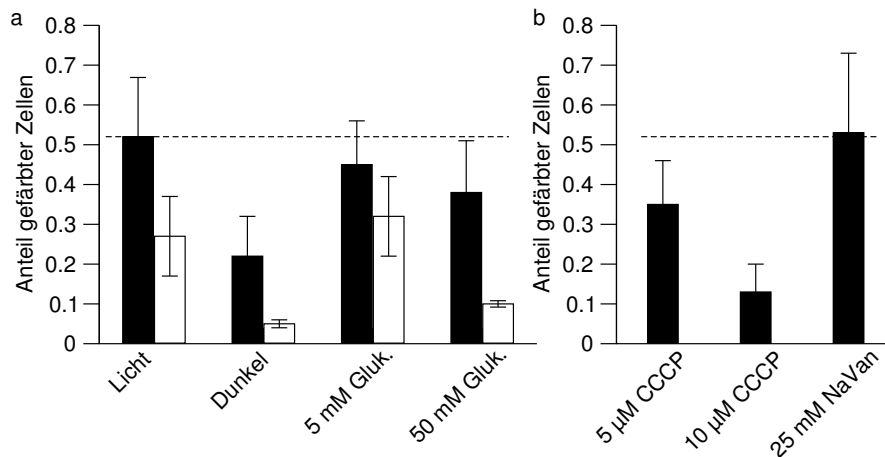


Abbildung 3.4: Aufnahme von 2-NBDG, einem fluoreszierenden Glukosederivat unter verschiedenen Bedingungen. Gezeigt wird der Anteil der gefärbten unter allen vitalen Schließzellen nach 1,5 h im Licht (außer 'Dunkel'). Die schwarzen Balken zeigen den Wildtyp, in (a) die weißen die *stp1*-Mutante, die in (b) nicht gemessen wurde.

risierten Zellen mit Membranpotentialen positiv von  $-15$  mV reagierten nicht mehr auf Änderungen der Beleuchtung. Von den depolarisierten Zellen reagierten einige auf weißes Licht durch Hyperpolarisation, während alle hyperpolarisierten Zellen auf den ersten Licht-Dunkel Übergang mit Depolarisierung reagierten.

### 3.3.1 Reaktion der Schließzellen auf Licht/Dunkel Wechsel

Beispiele der Reaktion einer Zelle beim Übergang von Licht zu Dunkel zeigt Abb. 3.5, für den umgekehrten Übergang Abb. 3.6 auf der nächsten Seite. Diese Übergänge zwischen depolarisiertem Zustand im Dunklen und hyperpolarisiertem im Licht konnten an der gleichen Zelle auch mehrfach wiederholt werden.

Die Strom-Spannungskennlinie wurde in Abständen von 3 min während der Experimente aufgenommen. An diesen Stellen ist die Aufzeichnung des freien Membranpotentials unterbrochen, da in den Spannungsklemm-Modus gewechselt wurde. Typische Beispiele dieser Stromspuren zeigt Abb. 3.7(a). Die sich daraus ergebenden Kennlinien zeigt Abb. 3.7(b), in denen die charakteristischen Einwärts- und Auswärtsströme negativ von  $-80$  mV bzw. positiv von  $-40$  mV sichtbar sind, die durch die entsprechend gleichrichtenden Kaliumkanäle bestimmt werden.

In Abb. 3.7(b) ist auch zu erkennen, dass die Strom-Spannungskennlinie für die Zelle im Dunkeln gegenüber der im Licht im Wesentlichen in negativer Richtung entlang der Ordinate verschoben ist um etwa  $30$ – $40$  pA. Die Nullstellen der Kurven stimmen mit den jeweils gemessenen freien Membranpotentialen überein. Dies zeigt sich gut bei der relativen Änderung des Stromes im Bereich des Plateaus, in dem sowohl einwärts als

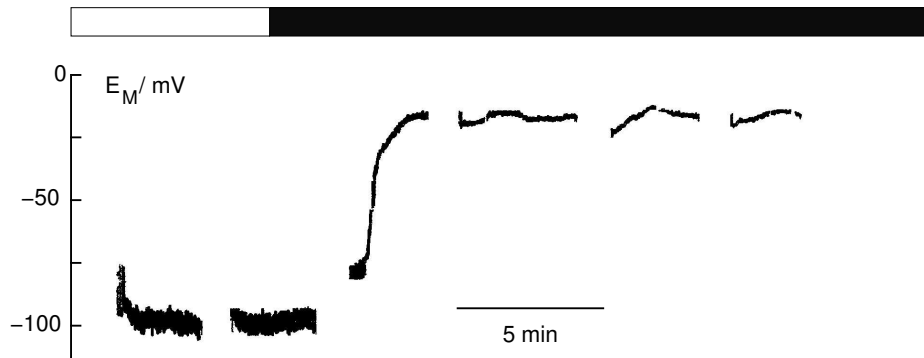


Abbildung 3.5: Membranpotential einer Schließzelle beim Übergang vom Licht ins Dunkle.

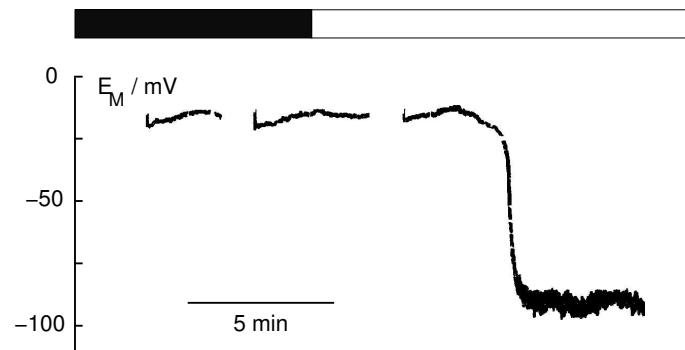


Abbildung 3.6: Membranpotential einer Schließzelle beim Übergang vom Dunklen ins Licht.

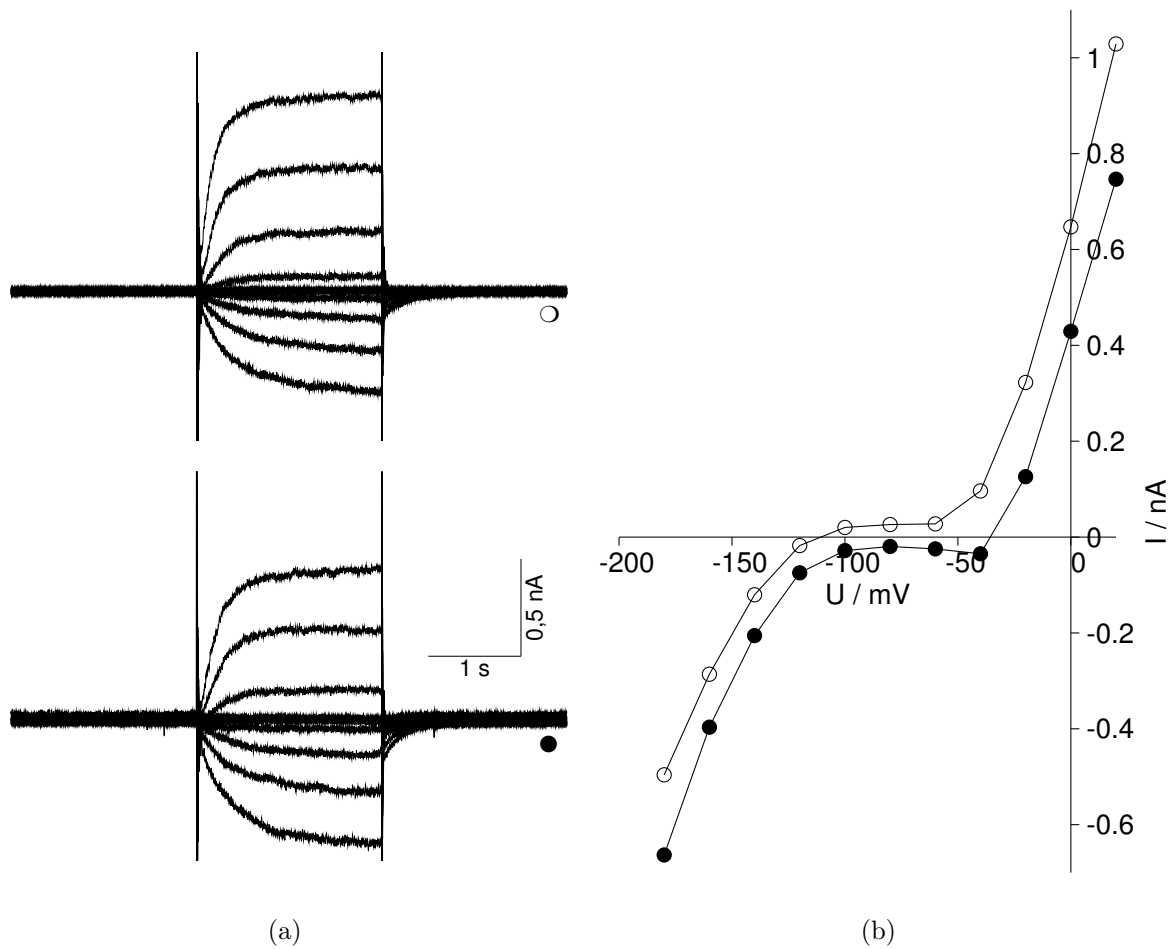


Abbildung 3.7: Typische Stromspuren (a) und Strom-Spannungskennlinien (b) für eine Schließzelle, aufgenommen im intakten Blatt, bei den ungefüllten Kreisen im Licht, bei den gefüllten 10 min nach Ausschalten des Lichts.

auch auswärts gleichrichtende Kaliumkanäle eine geringe Offenwahrscheinlichkeit haben. Die zeitliche Änderung beim Dunkel-Licht Übergang ist in Abb. 3.8 dargestellt. Die Ströme relativ zu dem am Zeitpunkt des Belichtungswechsels verlaufen bei -60 und -40 mV gleichartig und lassen sich mit einem Sigmoiden Übergang von negativem zu positivem Strom beschreiben.

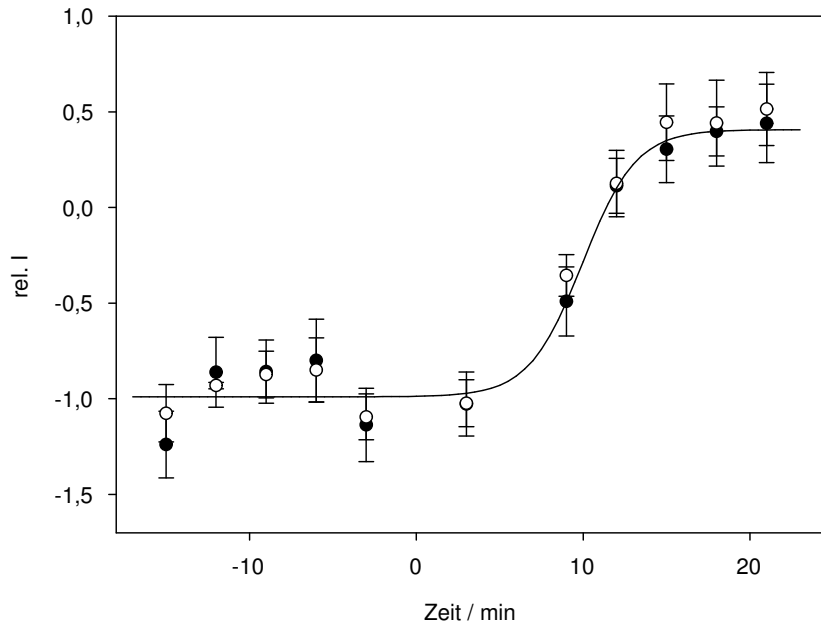


Abbildung 3.8: Verlauf des Stromes nach einem Dunkel-Licht Übergang im Bereich des Plateaus der Strom-Spannung-Kennlinie. Die auf den Belichtungswechsel normierten Ströme können mit einem sigmoiden Verlauf vom negativen zum positiven Bereich beschrieben werden, wobei die halbe Änderung ca. 9 min nach diesem Zeitpunkt erfolgt ist. (Offene Symbole: -40, geschlossene -60 mV)

### 3.4 Modell zur Schließzellsimulation

Mit dem mathematisch-physikalischen Modell zur Simulation der Ionentransporter wurden Parameter gefunden, die zunächst einen Zustand mit über lange Zeiträume stabilen internen Ionenkonzentrationen, gefolgt von Influx oder Efflux und abschließend wieder stabilen Konzentrationen ergaben. Vorgegeben wurden hierfür das Volumen der Schließzelle, die in offenen und geschlossenen Stomata herrschenden Konzentrationen von Kalium und Chlorid (Allaway und Hsiao, 1973; Humble und Raschke, 1971; Outlaw und Lowry, 1977) sowie der Turgor (Franks et al., 1998, 2001). Da die Angaben für die letzten allerdings eine starke Variabilität zeigen, wurden hier mittlere Werte eingesetzt. Die

interne Kaliumkonzentration kann zusätzlich aus dem Umkehrpotential der Messungen im intakten Blatt bestimmt werden, da durch die Messlösung die apoplastische Konzentration vorgegeben ist. Der Wert ist jedoch nur als Abschätzung zu verstehen, da nicht bekannt ist, ob nahe der Schließzelle exakt die Konzentration aus der Messlösung herrscht, oder ob sie durch andere Faktoren beeinflusst wird.

### 3.4.1 Stabiler Zustand geschlossener Stomata

Für einen geschlossenen Stomakomplex wurden zunächst niedrige interne Kalium- und Chloridkonzentrationen von 80 mM bzw. 20 mM angenommen. Bei geringen Aktivitäten der  $H^+$ -ATPase und des  $H^+/Cl^-$ -Symporters stellt sich ein Gleichgewicht bei  $E_M \approx E_K$  ein. Gleichzeitig herrscht ein Gleichgewicht der Protonen- und Chloridströme durch  $H^+$ -ATPase und  $H^+/Cl^-$ -Symporter bzw.  $H^+/Cl^-$ -Symporter und Anionenkanal. Der Verlauf der Ströme durch die verschiedenen Transporter und Kanäle ist in Abb. 3.9(a) auf der nächsten Seite dargestellt. Es fließt weder ein Netto-Gesamtstrom, noch Nettoströme der einzelnen beteiligten Ionensorten:

$$\begin{aligned} I_{Pu} &= -2 \cdot I_{Sy} \\ I_{An} &= I_{Sy} \\ I_{K^+} &= 0 \end{aligned} \tag{3.1}$$

### 3.4.2 Simulation der Stomaöffnung

Für die Stomaöffnung müssen sich Aktivitäten der Transportproteine so ändern, dass ein Netto-Einstrom von  $K^+$  und  $Cl^-$  erfolgt. Dieser Fluss muss aufrecht erhalten werden, bis ausreichend Osmotikum aufgenommen wurde, um den Turgor zu erhöhen und den geöffneten Zustand zu erreichen. Danach müssen die Nettoströme wieder verschwinden. Hier ist zu prüfen, ob dieser Zustand automatisch entsteht, oder erneut Änderungen der Transporteraktivität erfordert.

#### Start der Stomaöffnung

Zur Einleitung der Stomaöffnung wird nun die  $H^+$ -ATPase gegenüber den anderen Transportern aktiviert. Der angenommene Strom von ca. 35 pA ergibt sich aus dem Vergleich der Strom-Spannungskennlinien zwischen Licht und Dunkel (Abb. 3.7). Dadurch wird die Plasmamembran hyperpolarisiert,  $E_M < E_K$  und es beginnt ein KaliumEinstrom. Durch die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit des Anionenkanals bewirkt die Hyperpolarisation gleichzeitig einen geringeren Chlorid-Efflux durch diesen Kanal. Der vom  $H^+/Cl^-$ -Symporter getragene Chlorid-Influx wird dagegen größer, so dass  $K^+$  und  $Cl^-$  zusammen eine Erhöhung der Osmolarität des Zytosols bewirken. Die IV-Kurven für die so eingeleitete Stomaöffnung zeigt Abb. 3.9(b).

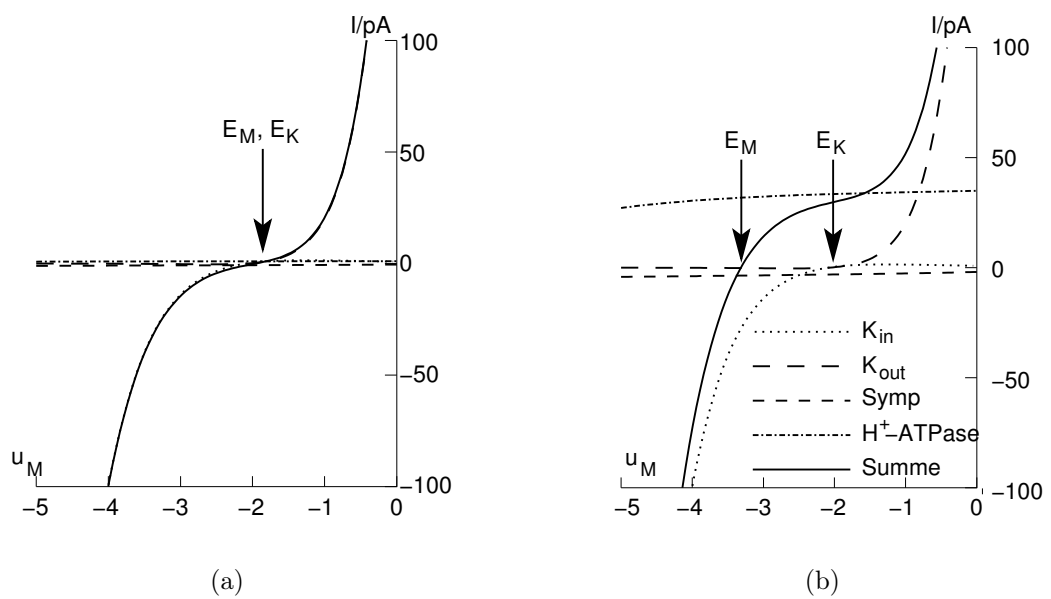


Abbildung 3.9: Ströme durch die verschiedenen Transporter links für ein geschlossenes Stoma mit niedrigen Ionenkonzentrationen und rechts die Öffnung des Stomas. Die Membranspannung ist ins negative verschoben, so dass  $K^+$  und  $Cl^-$  aufgenommen werden.



### Öffnungsphase

Solange die  $H^+$ -ATPase aktiv bleibt, wird ein permanenter Protonenausstrom erzeugt, der durch andere Ströme kompensiert wird. Dies sind Einwärtsströme von Kalium und Chlorid, die bei der erreichten hyperpolarisierten Membran durch die entsprechenden einwärts gleichrichtenden Kanäle dem elektrochemischen Gradienten folgend fließen.

### Beenden der Stomaöffnung

Bei zur Öffnung der Stomata erhöhter Aktivität der  $H^+$ -ATPase setzt sich die Aufnahme von Kalium, Chlorid und damit auch Wasser fort, bis das Umkehrpotential von  $K^+$  das der  $H^+$ -ATPase erreicht. Letzteres liegt nach Lohse und Hedrich (1992) zwischen -150 und -240 mV, womit sich bei den von Felle et al. (2000) gemessenen apoplastischen Kaliumaktivitäten von ca. 3 mM eine zelluläre Aktivität von 0,95 bis zu 30 M ergäbe. Ein simulierter Verlauf bei permanent aktivierter Protonenpumpe ist in Abb. 3.10 gezeigt. Hier steigt die interne Kaliumkonzentration nur bis etwa 800 mM, da in der Simulation die apoplastische Konzentration über diesen Zeitraum langsam weiter absinkt bis unter 0,1 mM. Trotz weiter Streuung bleiben alle bisherigen Messungen deutlich unter

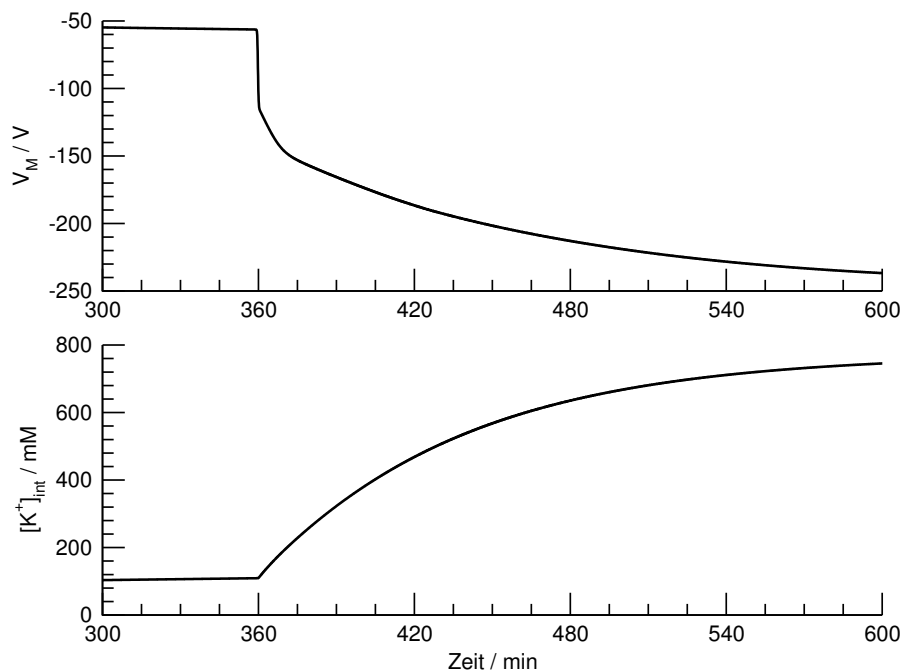


Abbildung 3.10: Verlauf des Membranpotentials und der internen Kaliumkonzentration bei permanent aktivierter  $H^+$ -ATPase. Die Hyperpolarisation erfolgt deutlich stärker als in Pflanzen gemessen, auch die Kaliumkonzentration erhöht sich stärker als Messwerte es belegen.

diesem Wert, die  $H^+$ -ATPase muss also wieder deaktiviert werden. Hierfür ist bisher kein

Modell vorgeschlagen worden, theoretische Möglichkeiten für das Auslösen der Deaktivierung sind aber der Turgordruck, oder die internen Ionenkonzentrationen. Eine Alternative zur Deaktivierung der  $H^+$ -ATPase ist der Export positiver Ionen bei Erreichen des geöffneten Zustandes, wofür aber keiner der beschriebenen Transportwege geeignet wäre. Im vorgestellten Modell wurde daher die Deaktivierung der Protonenpumpe durch Kopplung an die interne  $K^+$ -Konzentration und an den Turgor getestet. Es wurde jeweils der Maximalstrom mit einer Boltzmann-Funktion mit halbmaximaler Deaktivierung bei  $[K^+]_{int} = 500 \text{ mM}$  bzw.  $P = 18 \text{ bar}$  bis auf Null gesenkt (Abb. 3.11). Das Ergebnis beider

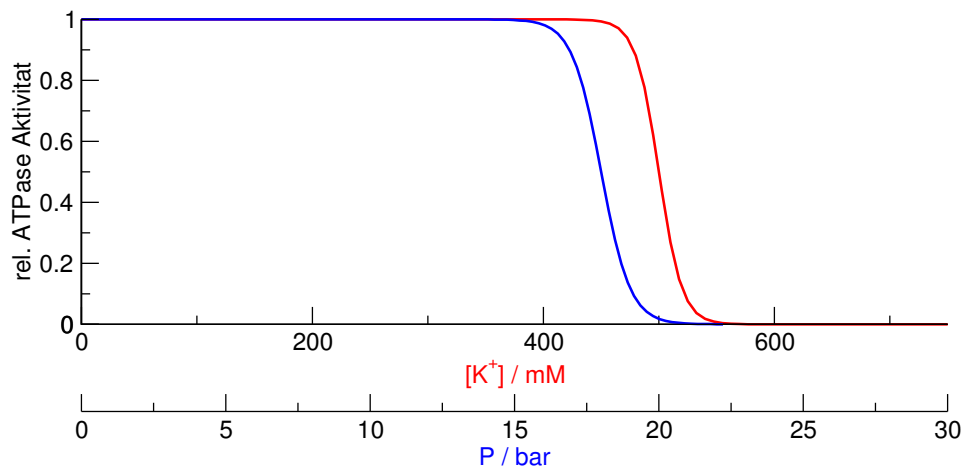


Abbildung 3.11: Relative Aktivität der  $H^+$ -ATPase zur Deaktivierung bei Erreichen eines Schwellwertes der Kaliumkonzentration (rot) oder des Turgors (blau). Die Kurven sind Boltzmann-Verteilungen mit Halbmaximalen von 500 mM bzw. 18 bar.

Variante ist, dass sich bei Deaktivierung der  $H^+$ -ATPase alle Werte auf neuem Niveau stabilisieren. Da sich die internen und externen Chlorid- und Kaliumkonzentrationen und damit sowohl deren Gleichgewichtsspannungen als auch die Ströme bei gleicher Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle geändert haben, werden die Gleichgewichtsbedingungen nach Gl. 3.1 bei einem geänderten Membranpotential erreicht.

### Relative Größe der Ionenströme bei der Stomaöffnung

Die Verhältnisse der Ionenströme zueinander sind aufgrund bekannter Messungen sowie theoretischer Überlegungen auf einen bestimmten Bereich begrenzt. Wäre der Pumpstrom genau gleich dem Kalium-Einstrom, könnte kein Chlorid aufgenommen werden. Da in diesem Spannungsbereich  $I_{An}$  und  $I_{Sy}$  das gleiche Vorzeichen haben, müsste gelten  $I_{An} = I_{Sy} = 0$ , d. h. es fände keine Aufnahme von Chlorid statt. Dagegen spricht die beobachtete Abgabe von  $Cl^-$  beim Stomaschluss, das zu einem anderen Zeitpunkt aufgenommen werden muss. Das andere Extrem wäre ein Gleichgewicht mit  $I_{Pu} = -I_{Sy}$ , während  $I_{An} = I_{K^+} = 0$  gilt. Dieser Fall ist auszuschließen, da alle Beobachtungen einen

hyperpolarisationsaktivierten Kaliumkanal zeigen und da aufgrund des Protonentransports statt der beobachteten Ansäuerung des Apoplasten eine Alkalisierung aufträte. Bereits ein Gleichgewicht mit  $I_{Sy} = I_{K^+}$  und  $I_{Pu} = I_{K^+} + I_{Sy}$  würde zwar bei  $I_{An} = 0$  den theoretischen Anforderungen von  $K^+$  und  $Cl^-$ -Aufnahme bei gleichzeitiger Elektroneutralität genügen, aber Netto keine Protonen im Apoplasten anreichern und somit früheren Beobachtungen widersprechen (Felle et al., 2000; Kinoshita et al., 1995; Mühling et al., 1995; Mühling und Läuchli, 2000).

Die beobachtete Zunahme der zellulären Konzentration von  $Cl^-$  ist deutlich geringer, als die von  $K^+$ . Das dynamische Gleichgewicht stellt sich also ein mit den Bedingungen:

$$\begin{aligned} I_{ges} &= 0 \\ I_{Pu} &\approx -I_{K^+} - I_{Sy} \\ I_{An} &\ll I_{Sy} \end{aligned} \quad (3.2)$$

Unter diesen Voraussetzungen ergeben sich Konzentrationsverläufe für  $Cl^-$  und  $K^+$ , wie sie in Abb. 3.12 gezeigt werden. Erkennbar sind die deutliche Hyperpolarisation, die parallel zur Aktivierung der  $H^+$ -ATPase erfolgt. Als Folge steigen die interne Kaliumkonzentration stark und interne Chloridkonzentration geringer an, bis die  $H^+$ -ATPase wieder einen geringeren Protonenefflux erzeugt. Im hier gezeigten Verlauf geschieht das bei Erreichen eines festgelegten Turgors (siehe Abb. 3.11). Da in der Schließzelle osmotisch aktive Substanzen akkumuliert werden, und Wasser dem geänderten Gradienten des Wasserpotentials folgend in die Zelle diffundiert, steigen auch Volumen und Turgor der Zelle. Dies zeigt Abb. 3.12 unten.

Wird kein anderer Parameter verändert, dann bestimmt allein das Maß der Aktivierung der  $H^+$ -ATPase die Stärke der Hyperpolarisation. Das neue Gleichgewicht stellt sich stets ein, wenn die Zunahme im Pumpstrom durch die hyperpolarisationsbedingte Zunahme der Ströme durch  $K_{in}$  und den  $H^+/Cl^-$ -Symporter kompensiert wird. Der Strom der  $H^+$ -ATPase bestimmt auch die Geschwindigkeit der Ionenaufnahme und damit der Stomaöffnung. Wird z. B. angenommen, dass wegen des Fehlens zytosolischer Faktoren in den Experimenten von Lohse und Hedrich (1992) die  $H^+$ -ATPase im ungestörten System einen Strom von bis zu 100 pA pro Zelle erzeugen kann, dann folgt aus der stärkeren Hyperpolarisation ein größerer Kalium-Einstrom, so dass der Anstieg des Turgors statt in ca. 2 h bereits in etwa 40 Minuten stattfindet. Da auch der  $H^+/Cl^-$ -Symporter bei Hyperpolarisation aktiviert, nimmt bei diesen Annahmen auch der Chlorid-Einstrom zu, die insgesamt aufgenommene Menge beider Ionensorten bleibt jedoch etwa gleich, da auch hier die Aktivität der ATPase bei Erreichen eines Turgors von 18 bar wieder reduziert wird. Die Verläufe der Potentiale, Konzentrationen, Druck und Volumen zeigt Abb. 3.13.

### Vergleich des simulierten Öffnens mit gemessenen Daten

Die Übereinstimmung der Start- und Endwerte von Turgor sowie  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Konzentration mit Literaturdaten war Bedingung für das Akzeptieren einer Simulation als

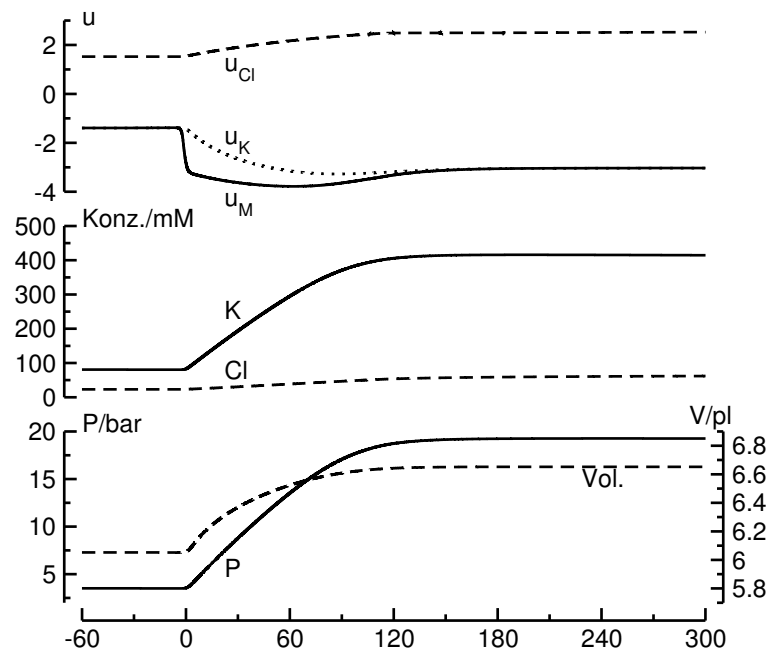


Abbildung 3.12: Verlauf des Membranpotentials  $u_M$  und der Umkehrpotentiale  $u_K$  und  $u_{Cl}$  (oben), der internen Konzentrationen von  $K^+$  und  $Cl^-$  (mitte) sowie von Druck und Volumen (unten) der Schließzelle während der simulierten Stomaöffnung.

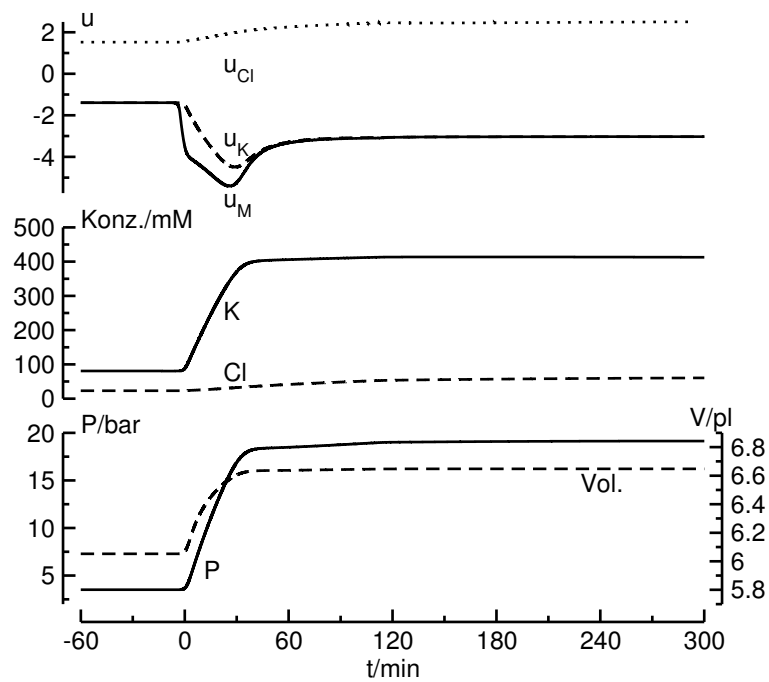


Abbildung 3.13: Verlauf des Membranpotentials, der internen Konzentrationen von  $K^+$  und  $Cl^-$  sowie des Turgors der Schließzelle während der simulierten Stomaöffnung bei auf bis zu 100 pA erhöhtem Maximalstrom der  $H^+$ -ATPase.

sinnvolle Lösung. In Abschnitt 3.3 wurde der Verlauf des Membranpotentials von Schließzellen im intakten Blatt beim Übergang von Dunkelheit ins Licht bei geringer ambienster  $\text{CO}_2$ -Konzentration gezeigt. Diese Bedingungen entsprechen einem Öffnungsreiz, wie es mehrfach in Versuchen zum Gaswechsel gezeigt wurden.

Verschiedene Geschwindigkeiten der Hyperpolarisation, wie sie unter gleichen Versuchsbedingungen auftraten konnten mit dem Modell gut nachgestellt werden. Die beiden Kurven in Abb. 3.14(a) zeigen Messungen des Membranpotentials beim Dunkel-Licht Übergang und einen simulierten Verlauf. Die unterschiedlichen Kinetiken der Hyperpolarisation lassen sich durch verschiedene Geschwindigkeiten der Aktivierung der  $\text{H}^+$ -ATPase erreichen, wie sie in 3.14(b) gezeigt sind. Verschiebungen entlang der Ordinate und die Stärke der initialen Hyperpolarisation können durch Änderungen des Pumpstromes der  $\text{H}^+$ -ATPase erreicht werden.

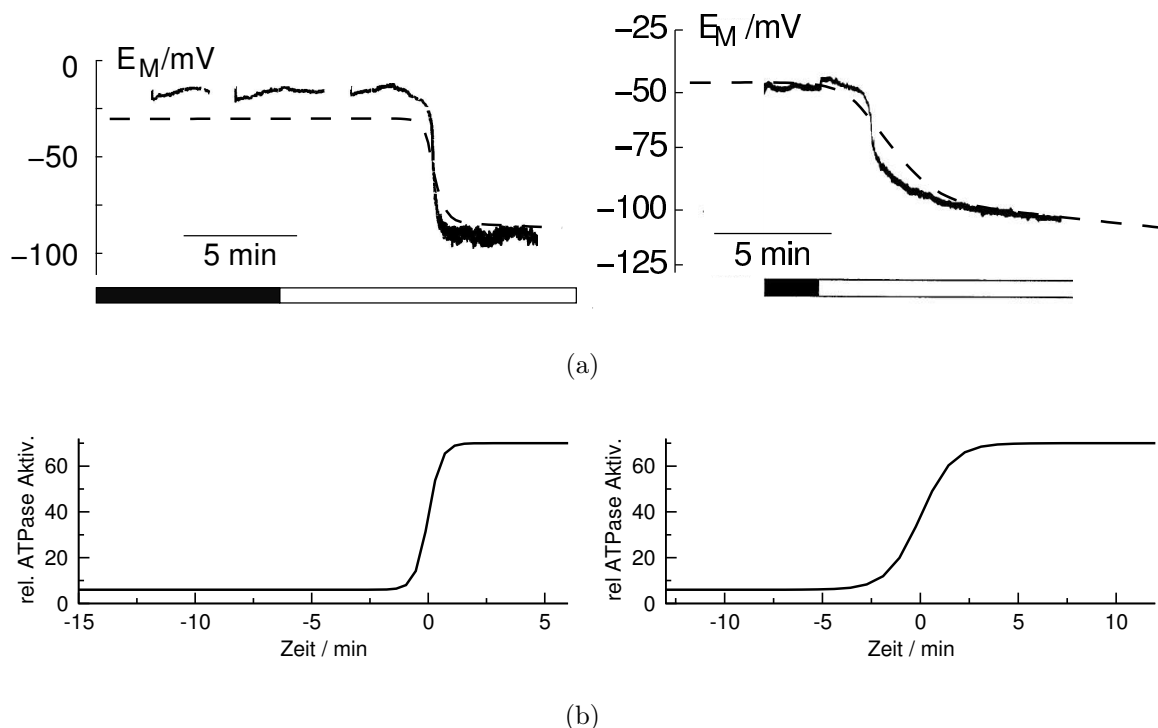


Abbildung 3.14: a) Vergleich der Membranpotentiale aus Messungen (durchgezogene Kurve) nach Dunkel-Hell-Übergang im intakten Blatt mit der Simulation für die Stomaöffnung (gestrichelte Linie). Links Messung nach Kap. 2.4, rechts aus Abb. 3(b) aus Roelfsema et al., 2001b. b) Verlauf der Aktivität der  $\text{H}^+$ -ATPase, die die entsprechenden Hyperpolarisationen in der Simulation bewirken.

Wurde die automatisierte Anpassung mit evolutionärem Algorithmus genutzt, so wur-

de aus den vorgegebenen Parametersätzen in wenigen Generationen eine deutliche Verbesserung der Qualitätsfunktion erreicht. Die Tatsache, dass sich dieser Wert auch im Verlaufe mehrerer weiterer Generationen nicht mehr verbessert, deutet darauf hin, dass tatsächlich ein Optimum gefunden wurde. Mehrfache Durchläufe ergaben ähnliche Verläufe mit ähnlichem Endwert.

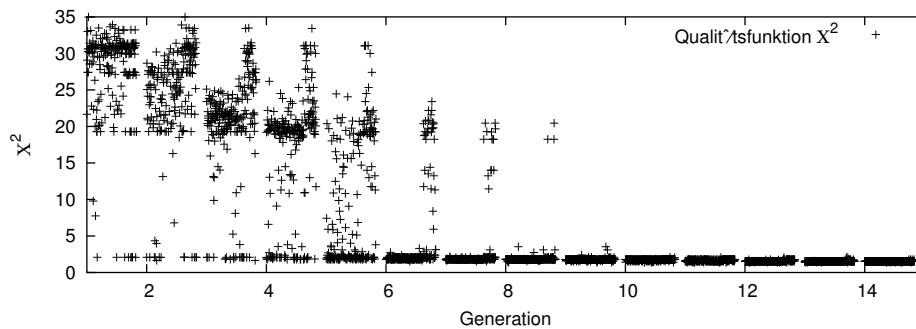


Abbildung 3.15: Verlauf der Qualitätsfunktion mit fortlaufenden Generationen während der Optimierung der Parametersätze mit evolutionärem Algorithmus.

### 3.4.3 Simulation des Stomaschluss

Im Gegensatz zu den niedrigen internen Konzentrationen bei geschlossenem Stomakomplex müssen die Ionenkonzentrationen bei geöffnetem Stoma deutlich höher sein. Franks et al. (2001) beschreiben eine Erhöhung des Turgors von Schließzellen um 20 MPa, was einer Erhöhung der Osmolarität des Zell-Lumens um etwa 2 Osmol entspricht, wenn die externe Osmolarität relativ konstant bleibt. Verschiedene Autoren beschreiben eine Erhöhung von  $[K^+]_{\text{int}}$  von ca. 100 mM auf 500 mM, (Allaway und Hsiao, 1973; Humble und Raschke, 1971; Outlaw und Lowry, 1977) die aber für diese Änderungen nicht ausreicht. Im hier vorgestellten Modell wird aufgrund der beschriebenen geringen Änderungen von  $[K^+]_{\text{int}}$  davon ausgegangen, dass der Rest der Erhöhung der Osmolarität durch organische Substanzen wie Malat<sup>2-</sup> (Apfelsäure,  $C_4H_4O_5^{2-}$ ) und Zucker bewirkt wird (Outlaw et al., 2002).

Das Membranpotential liegt zunächst wieder bei einem Wert, der ein Gleichgewicht zwischen den Flüssen von  $Cl^-$  durch den  $H^+/Cl^-$ -Symporter und den Anionenkanal sowie den Flüssen von  $H^+$  durch die  $H^+$ -ATPase und den  $H^+/Cl^-$ -Symporter ergibt. Dieser Wert muss beim Umkehrpotential von  $K^+$  liegen, da für dieses Ion nur passive Transportvorgänge bekannt sind. Ein solcher Gleichgewichtszustand ist in Abb. 3.16(a) gezeigt.

#### Relation der Ionenströme beim Stomaschluss

Die nach Stomaschluss induzierenden Reizen beobachtete Depolarisation kann durch Erhöhung der maximalen Leitfähigkeit des Anionenkanals bei gleichzeitiger Verminderung

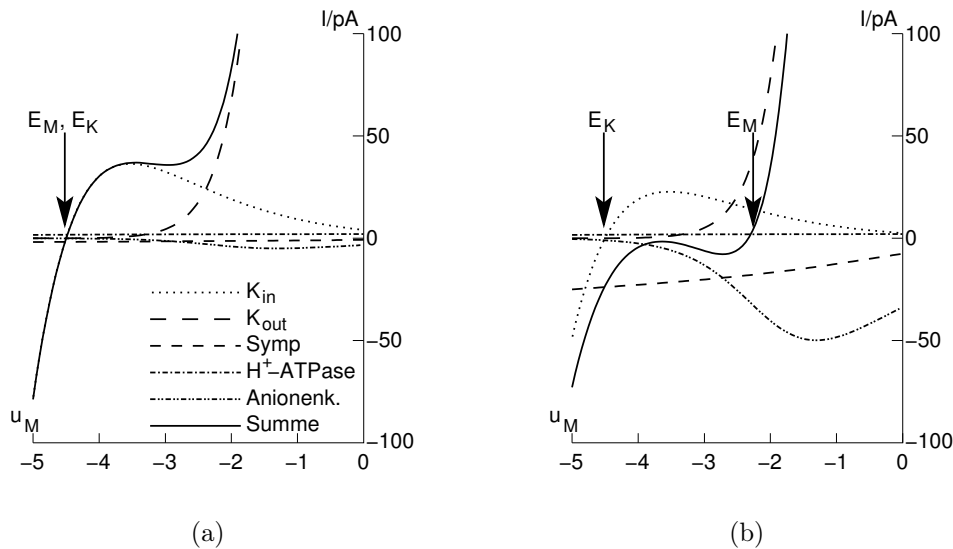


Abbildung 3.16: Ströme durch die verschiedenen Transporter, links für ein offenes Stoma mit hohen Ionenkonzentrationen und rechts das Schließen des Stomas. Die Membranspannung ist ins Positive verschoben, so dass  $K^+$  und  $Cl^-$  exportiert werden.

der Aktivität der  $H^+$ -ATPase erreicht werden. Im einfachsten Fall würde  $I_{Sy} = I_{Pu} = 0$  und  $I_{An} = -I_{K^+}$ . Dieser Zustand kann jedoch nur dann lange genug andauern, um den Stomaschluss zu bewirken, wenn neben den geringen aufgenommenen Mengen  $Cl^-$  auch  $Malat^{2-}$  abgegeben würde. Da die Permeabilität der Anionenkanäle für  $Malat^{2-}$  deutlich unter der für  $Cl^-$  liegt (Verhältnis von 0.1 bis 0.24; Schmidt und Schroeder, 1994; Hedrich und Marten, 1993), wäre für einen signifikanten Malatstrom aber ein sehr hoher Malatgradient oder eine noch deutlich größere Chloridleitfähigkeit des Anionenkanals nötig. Fließt nur Chlorid, dann kommt der Strom durch den Anionenkanal zum Erliegen bevor auch die zelluläre Kaliumkonzentration genügend abgenommen hat, um den Stomaschluss zu bewirken. Bleibt jedoch der  $H^+/Cl^-$ -Symporter weiterhin aktiv, dann wird bei Vernachlässigung von  $I_{Pu}$  der Efflux von Chlorid nach kurzer Zeit durch dessen Influx durch den Symport kompensiert und es gilt  $I_{An} + I_{Sy} \approx -I_{K^+}$  und  $I_{Pu} \approx 0$ .

Für den Stomaschluss müssen also der Anionenkanal und der  $H^+/Cl^-$ -Symporter aktiviert werden, wodurch sich im dynamischen Gleichgewicht ein Chloridkreislauf ergibt. Gleichzeitig deaktiviert der  $K_{in}$ , wodurch sich das Membranpotential deutlich verschiebt. Beim neuen Gleichgewicht fließen nun Kalium und wenig Chlorid aus der Schließzelle heraus, während gleichzeitig Protonen durch den  $H^+/Cl^-$ -Symporter in die Zelle hinein fließen. Die Strom-Spannung-Kennlinie zum Stomaschluss ist in Abb. 3.16(b) dargestellt.



### Vergleich des simulierten Öffnens mit gemessenen Daten

Der Vergleich mit den Daten aus den elektrophysiologischen Messungen zeigt wieder bei entsprechender Parameterwahl eine gute Übereinstimmung (Abb. 3.17). Die Geschwindigkeit der Depolarisation kann durch die Parameter variiert und so sowohl schnellen als auch langsamen Übergängen angepasst werden. Um die unterschiedlichen Kinetiken gut anzunähern, ist in diesem Fall eine genaue Abstimmung der Aktivität der verschiedenen am Ionenfluss beteiligten Transportproteine notwendig. Den größten Anteil hat in diesem Fall aber der Anionenkanal, ohne den die Depolarisierung nicht eingeleitet werden könnte. In der Strom-Spannungs-Kennlinie fällt jedoch eine geringere Aktivierung des Anionenkanals wegen des vorherrschenden Kaliumexportes wenig auf.

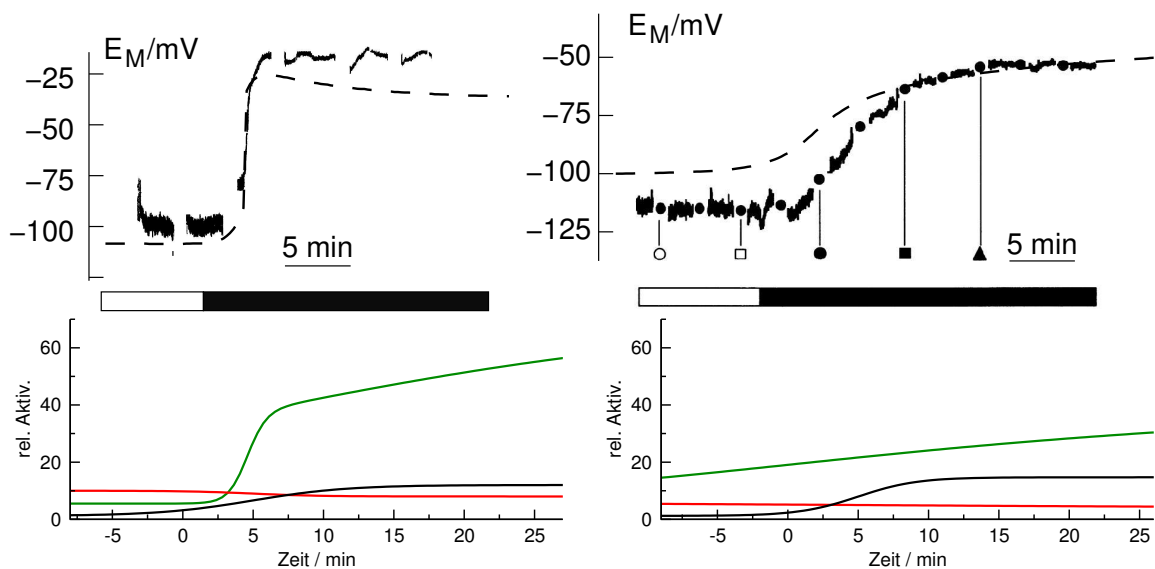


Abbildung 3.17: Vergleich des Membranpotentialverlaufs aus Messungen (durchgezogene Kurve) mit der Simulation für den Stomaschluss (gestrichelte Linie). Links Messung nach Kap. 2.4, rechts aus Abb. 5 (a) aus Roelfsema et al., 2001b. Im unteren Teil sind die Aktivierungen des Anionenkanals (grün), die Deaktivierung der  $H^+$ -ATPase (rot) und die Aktivierung des Symporters (schwarz) gezeigt, die zu diesen Verläufen der Membranspannung führen.

Zum Stomaschluss stehen auch Literaturdaten über die externen Aktivitäten von  $K^+$  und  $Cl^-$  sowie über den pH zur Verfügung (Felle et al., 2000; Mühling und Läuchli, 2000). Ein Vergleich der Simulation mit den Messergebnissen zeigt Abweichungen besonders in der absoluten Lage der Kurven (Abb. 3.18). Dies resultiert aus den gegebenen Anfangsbedingungen. Roelfsema et al. (2001b) finden im intakten Blatt ein Umkehrpotential für Kalium von  $E_K \approx -50$  mV. Bei der von Felle et al. (2000) angegebenen externen Kaliumaktivität von etwa 3,1 mM entspräche das zytosolisch nur 22 mM, was deutlich

niedriger ist, als gemessen wurde (Outlaw und Lowry, 1977). Hier musste für die Simulation ein Mittelwert benutzt werden.

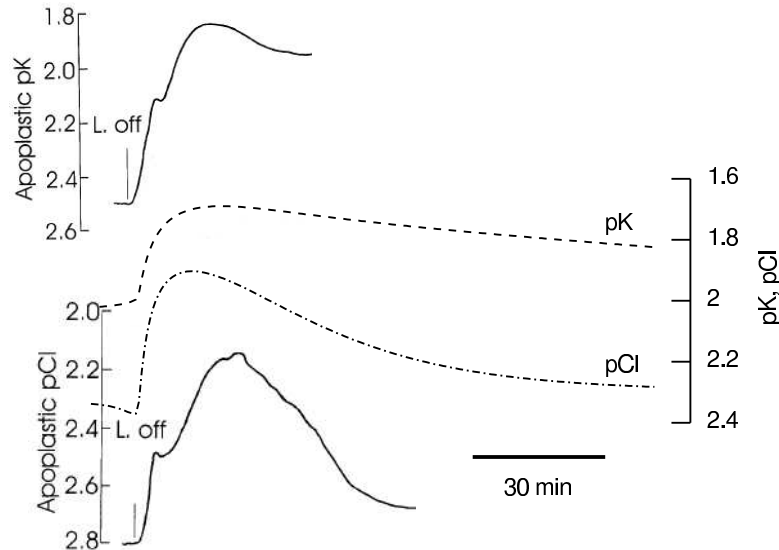


Abbildung 3.18: Apoplastische Konzentrationen von  $K^+$  und  $Cl^-$  im Vergleich zwischen Simulation für den Stomaschluss (mittlere Kurven, Skala rechts) und Messwerten von Felle et al. (2000) (obere und untere Kurven).

Die Verminderung der apoplastischen Chloridkonzentration kann auf zwei verschiedene Arten bewirkt werden. Zum einen kann eine Aufnahme von  $Cl^-$  durch andere Zellen, z. B. im Mesophyll, im Modell durch eine ‚künstliche‘ Reduktion der Chloridmenge mit der Zeit simuliert werden. Andererseits kann während des Schließens nachdem durch den Anionenkanal eine Depolarisation erfolgt ist, der  $H^+/Cl^-$ -Symporter so weit aktiviert werden, dass die Zelle in der Summe nur noch sehr langsam  $Cl^-$  verliert. Die zytosolische Chloridkonzentration wird so deutlich über der apoplastischen gehalten, die Depolarisation der Plasmamembran bleibt bestehen und es findet ein permanenter Kaliumefflux statt. Durch den Kotransport des  $H^+/Cl^-$ -Symporters steigt im Modell der apoplastische pH deutlich an (Abb. 3.19), was auch in Messungen von Felle et al. (2000) und Mühling et al. (1995) bestätigt wird.

Die Optimierung der Parameter durch den evolutionären Algorithmus ergab eine verbesserte Anpassung der Simulations- an die Messwerte, jedoch kein geändertes Zusammenwirken der beteiligten Transportsysteme. Auch hier wurden die besten Ergebnisse erzielt, wenn der Anionentransporter auch während des Stomaschlusses aktiviert und somit ein Chloridkreislauf bewirkt wird. Den Vergleich der gemessenen mit den simulierten Werten im Apoplasten zeigt die folgende Abbildung 3.20. Es war mit keiner der Methoden möglich, gleichzeitig den Verlauf des Membranpotentials und der extrazellulären Ionenkonzentrationen anzupassen. Eine mögliche Erklärung ist die Variabilität der

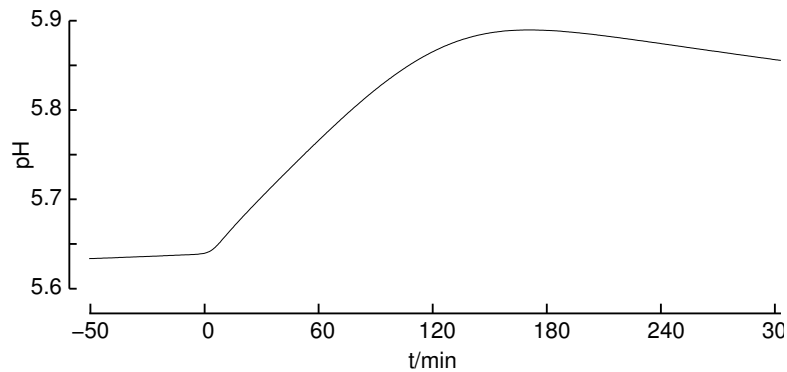


Abbildung 3.19: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes im Apoplasten beim simulierten Stomaschluss.

Parameter, die nicht an der gleichen Zelle gemessen wurden. Die einzelnen Parametersätze unterscheiden sich allerdings für die Anpassungen nur um wenige Prozent, auch die grundsätzlichen Relationen bleiben erhalten.

Insgesamt wird die leicht N-förmige IV-Kurve für das Öffnen bzw. Schließen hauptsächlich parallel zur I-Achse verschoben. Dies wird deutlich, wenn die vier Kurven über einen größeren Bereich dieser Achse betrachtet werden (Abb. 3.21).

#### 3.4.4 Ersetzen der einwärts- und auswärtsgerichteten Kaliumkanäle durch einen spannungsunabhängigen

Zum Vergleich mit den Ergebnissen zur Stomaöffnung an der *kat1::En* Mutante von *Arabidopsis thaliana*, wurde der einwärtsgerichtete Kaliumkanal aus dem Modell entfernt. Als Resultat konnte bei Aktivierung der  $H^+$ -ATPase kein  $K^+$ -Influx mehr auftreten, stattdessen hyperpolarisierte die Zelle im Modell so stark ( $\approx -300$  mV), bis der Strom der  $H^+$ -ATPase durch den des  $H^+/Cl^-$ -Symporter kompensiert und dadurch  $Cl^-$  aufgenommen wurde. Da die dabei aufgenommene Menge von 400 mM  $Cl^-$  deutlich über den Verschiedenen Literaturdaten liegt, wurde eine andere Möglichkeit zur Aufnahme osmotisch aktiver Substanz angenommen. Zum einen könnte es sich um Zucker handeln, dessen Aufnahme biophysikalisch noch nicht so gut beschrieben ist und die daher nicht ins Modell aufgenommen werden konnte. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass  $K^+$  durch einen spannungsunabhängigen,  $K^+$ -selektiven Kanal wie AKT2/3 aufgenommen wird. Wird ein solcher Kanal in das Modell ohne  $K_{in}$  eingesetzt, so ändert sich zwar die Kinetik der Kaliumaufnahme und der Verlauf des Membranpotentials, bei ähnlicher Leitfähigkeit ist die Zelle jedoch in der Lage, in ähnlicher Zeit die zum Öffnen benötigte Menge  $K^+$  aufzunehmen (Abb. 3.4.4).

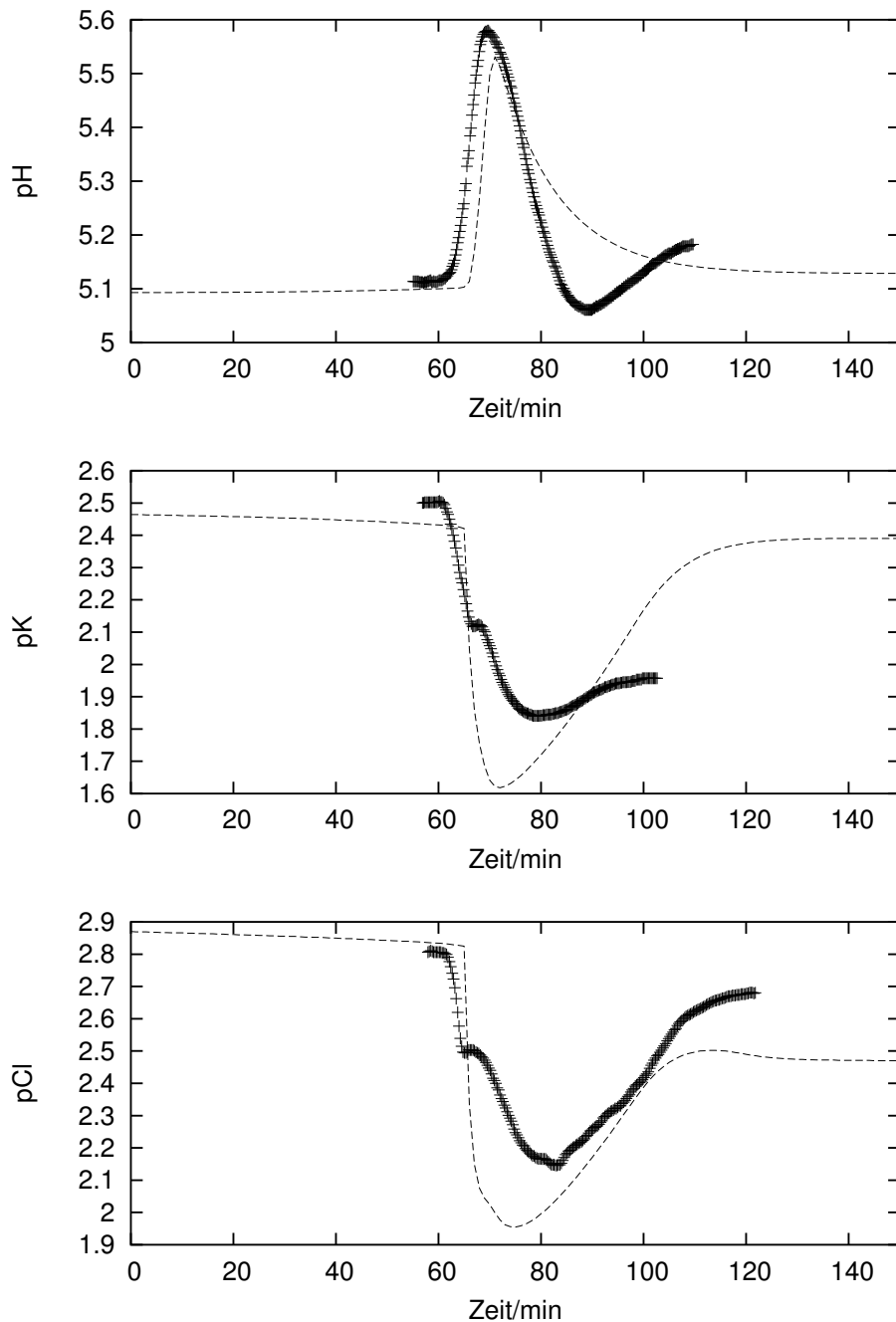


Abbildung 3.20: Vergleich von Messung und Simulation für Chlorid- und Kaliumkonzentration sowie pH-Wert im Apoplasten während des Stomaschluss (Symbole repräsentieren Messungen nach Felle et al. (2000), Linien das Ergebnis der Simulation. Die Parameter der Simulation wurden mit einem evolutionären Algorithmus an die gemessenen Konzentrationsverläufe angepasst.

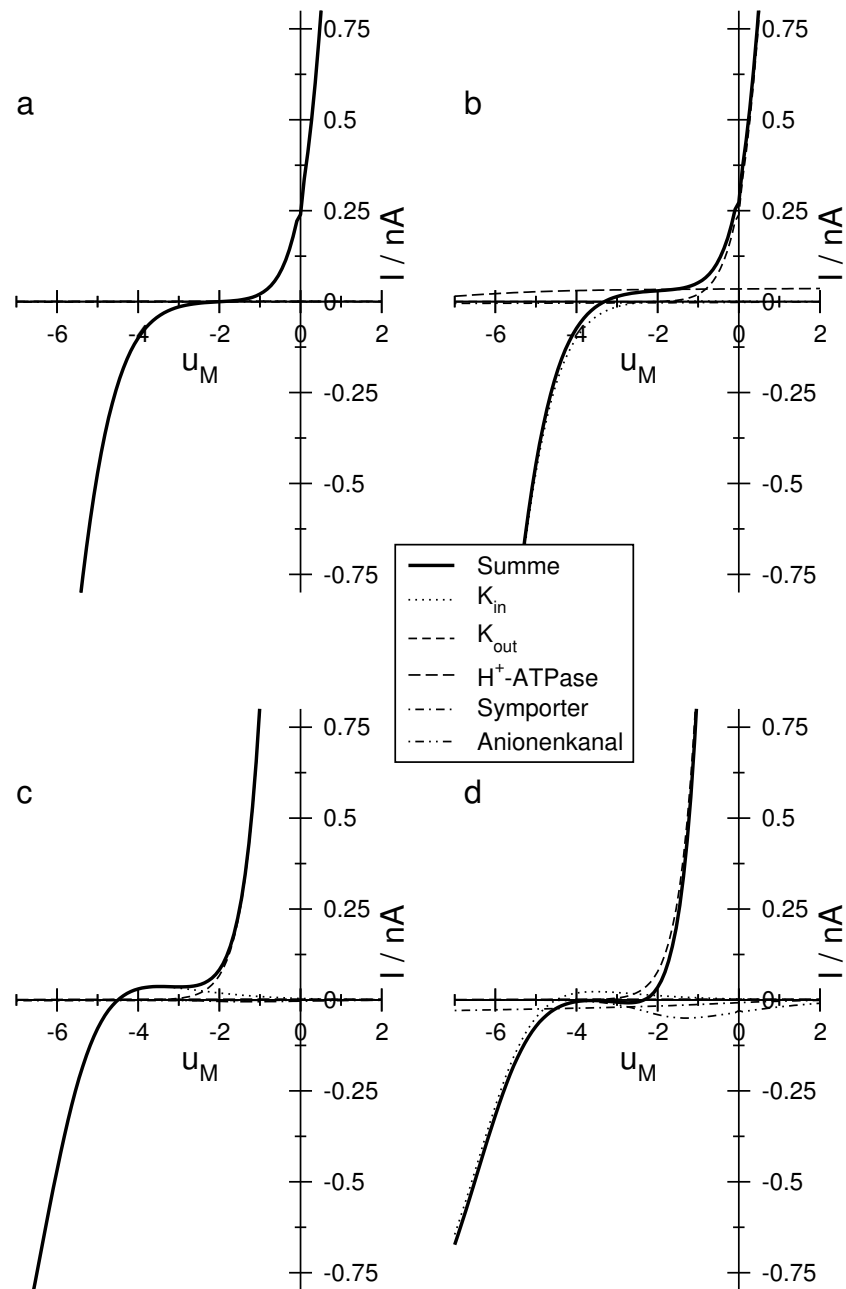


Abbildung 3.21: Übersicht über die Ströme durch die verschiedenen Ionentransporter in verschiedenen Zuständen der Schließzelle. (a) stabil, geschlossen (b) öffnend (c) stabil, geöffnet und (d) schließend.

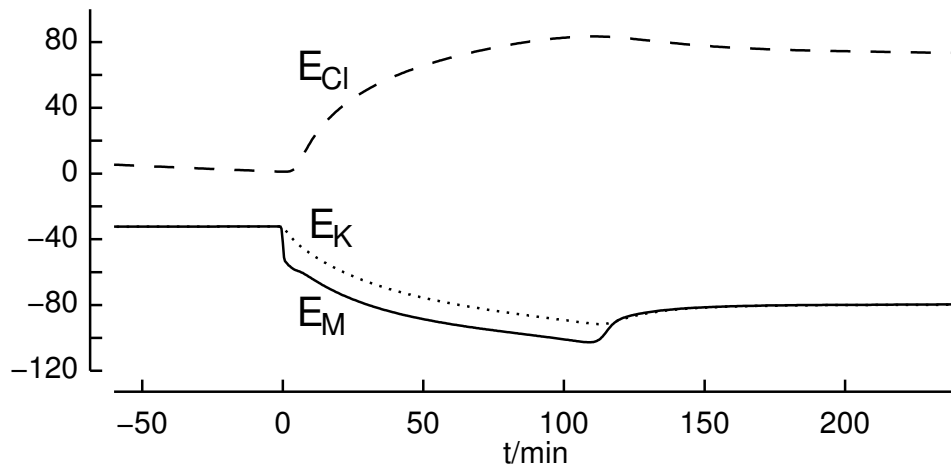


Abbildung 3.22: Membranpotential  $E_M$ , sowie Umkehrpotentiale für Kalium ( $E_K$ ) und Chlorid ( $E_{Cl}$ ) bei der simulierten Stomaöffnung mit einem nicht spannungsabhängigen Kaliumkanal statt der einwärts und auswärts gleichrichtenden.

### 3.5 Indikatorfarbstoffe

Da es für die Verbesserung des Modells von Vorteil wäre, auch die internen Ionenkonzentrationen während der Stomabewegung messen zu können, wurde versucht, die intakten Schließzellen im Epidermisstreifen mit Calcium-Indikatorfarbstoffen zu beladen.

Die Farbstoffe ließen sich jedoch durch keine der untersuchten Methoden in messbaren Konzentrationen in Schließzellen von *Vicia faba* laden. Alle Beladungsversuche mit den Salzen der Farbstoffe ergaben eindeutige Fluoreszenzfärbung des Zellwandbereiches in den Epidermisstreifen sowie der Kutikularleisten der Schließzellen. Der Versuch bei niedrigeren pH des Inkubationsmediums eine verbesserte Aufnahme zu erreichen, da ein größerer Anteil des jeweiligen Farbstoffes in neutraler Form vorliegen sollte, scheiterte.

Einige Beispiele als Ergebnis verschiedener Inkubationsprotokolle zeigt Abb. 3.23.

Auch der Einsatz der veresterten Form der Farbstoffe ergab entsprechende Färbungen, die jedoch erheblich schwächer waren, als die durch den reinen Farbstoff bewirkten. Offensichtlich wurden auch diese in vielen Säugetierzellen als membranpermeabel beschriebenen Farbstoffe nicht in messbarer Menge aufgenommen.

Da auch in der Literatur im gesamten Zeitraum trotz des erheblichen Interesses an der Messung von Calciumkonzentrationen in Schließzellen nur ein Artikel zu finden ist, der die nichtinvasive Beladung von Zellen mit Ca-Indikatorfarbstoff beschreibt, ist davon auszugehen, dass durch die beschriebenen Methoden tatsächlich keine zur Messung ausreichenden Farbstoffkonzentrationen in die Schließzellen gelangen.

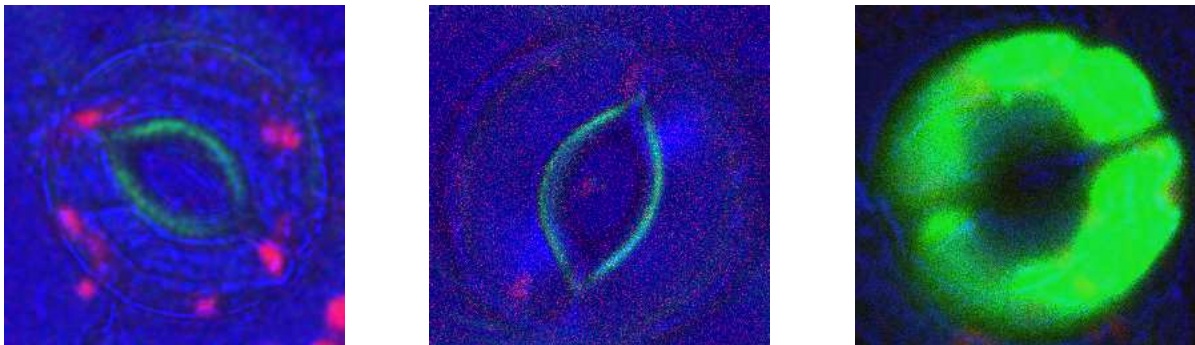


Abbildung 3.23: Aufnahme verschiedener Farbstoffe in Schließzellen von *Vicia faba* im Epidermisstreifen. Links Beladung mit Ca-Green Acetoxymethyl-Ester bei 4°C, in der Mitte Beladung mit fluo-3 bei pH 4.5. Zum Vergleich rechts eine erfolgreiche Beladung mit dem pH-sensitiven Farbstoff SNARF.

### 3.6 Injektion

Mit der beschriebenen Methode war es möglich, in Schließzellen im intakten Blatt einzustechen, einen Farbstoff zu injizieren und mit der selben Doppelpipette Membranpotentiale zu messen. Hierfür musste der an der Pipette applizierte Druck auf 2 bis 3 MPa gebracht werden. Bei dem getesteten System führte das zu mechanischen Problemen, da sich die Pipette beim Erhöhen des Druckes bewegte. In Folge ging häufig die Abdichtung der Membran zur Pipette verloren, was zu einem großen Leckstrom oder dem Verlust des Turgors und Zerstörung der Zelle führte. Der Effekt der Bewegung konnte minimiert werden, indem ein geringer Teil des Druckes (0,3 bis 0,5 MPa) bereits vor dem Einstich appliziert wurde und die weitere Erhöhung möglichst langsam (etwa innerhalb von 2 min erfolgte). Ein Beispiel einer erfolgreichen Beladung mit der Druckinjektion zeigt Abb. 3.24.

Gleichzeitig mit dem Einstich für die Injektion konnte über die zweite Pipette auch das Membranpotential gemessen werden. Diese Messungen ergaben die gleichen Werte, wie beim Doppelektroden-Einstich. Da der Farbstoff eine Anregungswellenlänge von 488 nm, erhielten die gemessenen Zellen Pulse von Blaulicht, eine dauerhafte Depolarisation wurde daher nur mit ABA als Schließreiz getestet. Hier reagierten vorher hyperpolarisierte Zellen mit ähnlicher Depolarisierung, wie auf den Licht-Dunkel Übergang. Beispielmessungen des Membranpotentials zeigt Abb. 3.25.

Mit einem geeigneten Verstärker für die diskontinuierliche Spannungsklemm-Technik wäre es sogar möglich, Spannungsprotokolle zu applizieren und so Strom-Spannungskennlinien der Zellmembran zu messen. Der vorhandene Verstärker konnte die Membranspannung jedoch nur unzureichend auf das vorgegebene Potential bringen (Roelfsema et al., 2001a). Bei größeren Strömen über die Zellmembran zeigte sich, dass die in kurzen Pulsen applizierten Pipettenströme zum Erreichen der Membransollspannung nicht ausreichten. Der Grund ist vermutlich eine nicht vollständig kom-

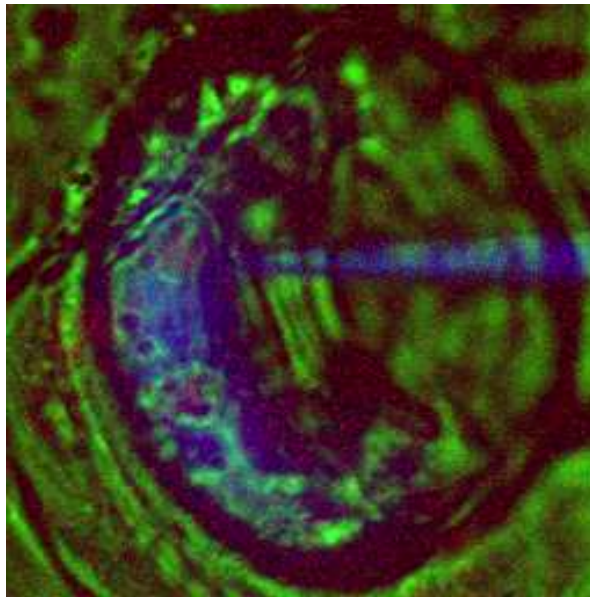


Abbildung 3.24: Einzelne Schließzelle, die zum Test mit Lucifer Yellow durch Druckinjektion beladen wurde. In grün das Durchlichtbild, in blau die Fluoreszenz von Lucifer Yellow und in rot die Autofluoreszenz der Chloroplasten.

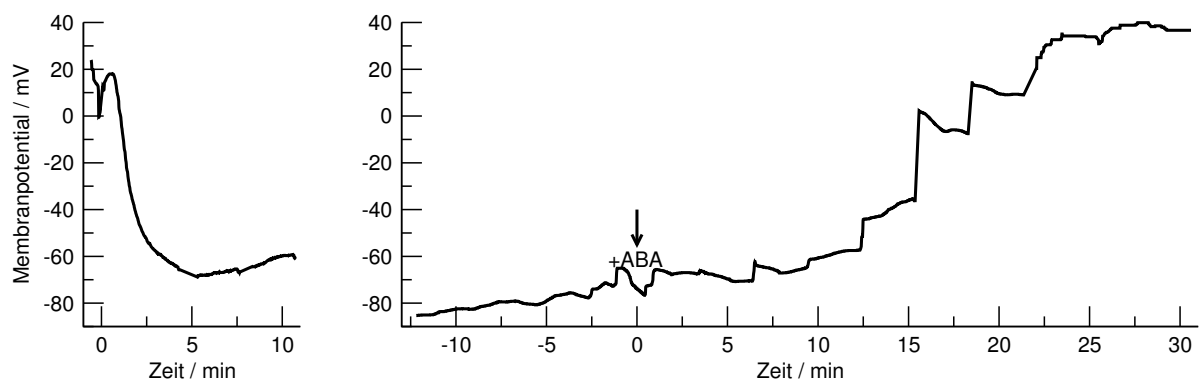


Abbildung 3.25: Verlauf des Membranpotentials einer Schließzelle, in die Lucifer Yellow über eine der beiden Kapillaren injiziert wurde. Links ist direkt auf den Einstich die Stabilisierung bei hyperpolarisierter Membran zu erkennen, rechts nach Gabe von ABA über den Stengel depolarisierte die Membran.



pensierbare Kapazität der Pipette. Daher wurde diese Möglichkeit nicht weiter verfolgt. Über eine Dreifachelektrode könnten diese Untersuchungen jedoch in Zukunft durchgeführt werden.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Aspekte des Transports osmotisch aktiver Substanzen und ihr Zusammenwirken bei der Schließzellbewegung zu untersuchen. Aus den gewonnenen Ergebnissen und bereits bekannten Eigenschaften von Transportproteinen in der Plasmamembran von Schließzellen sollte ein schlüssiges Modell erstellt werden, das anhand der Ionenbewegung durch Transportproteine die für die Stomabewegung notwendige Volumen- und Turgoränderung der Schließzelle beschreibt. Die gewonnenen Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten in Zusammenhang zu den Resultaten Anderer diskutiert.

### 4.1 Welcher Ionenfluss ist zur Stomaöffnung notwendig?

Zur Schließzellbewegung nutzen Pflanzen Änderungen der Osmolarität des Zytosols und der Vakuole, aus denen eine Änderung des Turgordruckes folgt. Hauptsächliches Osmotikum ist Kalium als Kation, gemeinsam mit Malat oder Chlorid als Anionen. Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle in der Plasmamembran der Schließzellen sind für viele Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Vicia faba*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*) nachgewiesen und seit einigen Jahren elektrophysiologisch gut charakterisiert.

Der Zeitraum für die Stomaöffnung beträgt in Gaswechsellmessungen an *Arabidopsis thaliana* und *Vicia faba* etwa 1 h bei Licht und CO<sub>2</sub>-freier Luft als Öffnungsreiz. Nach Messungen von (Allaway und Hsiao 1973; Humble und Raschke 1971; Outlaw und Lowry 1977) steigt bei *Vicia faba* bei der Öffnung der K<sup>+</sup>-Gehalt der Schließzellen von unter 100 mM auf 400–500 mM, also um 400 mM. Bei einem Zellvolumen von 6 pl ist das eine Menge K<sup>+</sup> von 2,4 pmol, also ist ein Kaliumstrom von etwa 65 pA über die Membran notwendig. Die Einstichmessungen am intakten Blatt ergaben eine Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie von 35 pA und damit einen Einstrom in etwa gleicher Größe, was rechnerisch einer Stomaöffnung in etwa 1:50 h entspricht. Da die Lichtintensität bei diesen Versuchen geringer war als in Gaswechsellexperimenten und dem Blatt nicht komplett CO<sub>2</sub>-freie Luft zugeführt wurde, ist es möglich, dass nicht die maximale Öffnungsgeschwindigkeit erreicht wurde.

Zusätzlich zeigen Ergebnisse von Ilan et al. (1995) eine Abhängigkeit der Leitfähigkeit der beiden Kaliumkanäle von der Temperatur. Auch Messungen der Öffnungs- und Schließkinetik in ganzen Blättern zeigen eine solche Abhängigkeit. Im betrachteten Bereich von 10 bis 30 °C erhöht sich die Geschwindigkeit der Stomabewegung mit steigender

Temperatur (Messungen S. Neimanis, pers. Komm.). Dies zeigt, dass die Kinetik dieser Bewegung einer Regulation unterliegt und über einen weiten Bereich variieren kann.

Aus grundsätzlichen Überlegungen zur Steuerung des Öffnungsvorgangs ergibt sich, dass weder Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik, noch die genaue Strom-Spannungskennlinie der Ionenkanäle den Öffnungsvorgang stark beeinflussen müssen. Zur Aufnahme von Kalium in die Zelle muss entweder ein aktiver Kaliumtransport stattfinden, Kalium mit Hilfe des Gradienten eines anderen Stoffes transportiert werden (Kotransport), oder das Membranpotential negativer als  $E_K$  werden. Gemessen wurde als Reaktion auf Öffnung bewirkende Reize (Licht, verminderter  $\text{CO}_2$  Gehalt in der Umgebungsluft) eine Verschiebung des Membranpotentials auf etwa  $-110$  mV womit bis zu einem Verhältnis der  $\text{K}^+$ -Konzentrationen (zytosolisch:apoplastisch) von 75:1 eine passive Aufnahme erfolgen kann. Ein aktiver Transporter für Kalium wurde dagegen in Schließzellen noch nicht beobachtet. Der Ionenfluss über die Membran muss – abgesehen von kurzzeitigem Laden und Entladen der Membran als Kondensator – stets ladungsneutral erfolgen. Für jedes aufgenommene  $\text{K}^+$ -Ion wird entweder ein  $\text{Cl}^-$ -Ion aufgenommen, oder ein Proton aus der Zelle heraustransportiert. Bei den beobachteten Konzentrationsverhältnissen für Chlorid ist  $E_{\text{Cl}}$  stets positiv, was bei geöffneten Kanäle zu einem Efflux führen würde. Die bekannten Chloridkanäle sind außerdem im Spannungsbereich negativ von  $-100$  mV kaum aktiv, so dass der Kaliumstrom nahezu vollständig durch den Protonenstrom kompensiert werden muss:

$$I_{\text{H}^+} + I_{\text{K}^+} = 0$$

## 4.2 Kalium-Transporter in der Schließzellmembran

Bei *Arabidopsis* ist der einwärts gleichrichtende Kaliumkanal (KAT1) auch molekularbiologisch beschrieben. Die Insertion eines En-1 Konstruktes in das Genom des KAT1 unterbricht das Ablesen der RNA an dieser Stelle und somit die Produktion des funktionellen Kanals. Experimente mit dieser Mutante zeigten jedoch, dass durch die Entfernung des primären Einwärtstransporters für Kalium die Schließzellfunktion nicht beeinträchtigt wurde. Die Ergebnisse aus den Messungen der Stomaweite werden unterstützt durch Untersuchungen des Gaswechsels der *Kat1::En-1* Mutante (Szyroki et al., 2001). Daher stellt sich die Frage, welche Bedeutung der Kaliumstrom für die Stomaöffnung besitzt.

Wenn zur Stomaöffnung zunächst die  $\text{H}^+$ -ATPase einen auswärts gerichteten Strom erzeugt, also Protonen aus der Schließzelle heraus transportiert werden, dann verschiebt sich ohne weitere Ionenflüsse das Membranpotential ins negative. Diese Verschiebung erfolgt bis entweder die Umkehrspannung der  $\text{H}^+$ -ATPase erreicht ist, oder ein anderer Transportweg den erzeugten Strom kompensiert, also z. B. der einwärts gerichtete Strom der  $\text{K}^+$ -Ionen den gleichen Betrag besitzt (abzüglich der Ströme in diesem Spannungsbereich aktiver weiterer Ionenkanäle). Die Strom-Spannungskennlinie des  $\text{K}^+$ -Kanals wird bei gegebener Kennlinie der  $\text{H}^+$ -ATPase lediglich bestimmen, bei welcher Spannung sich das Gleichgewicht einstellt. Die Pumpleistung der  $\text{H}^+$ -ATPase bestimmt somit auch

den Fluss für Kalium, solange andere Kanäle vernachlässigt werden können, was die bisherigen elektrophysiologischen Untersuchungen an Schließzellen für den hyperpolarisierten Zustand der Zellen nahelegen. Ein Kaliumkanal, der die Stomaöffnung auf Grund eines Einstroms von  $K^+$  ermöglicht, muss also lediglich bei Spannungen negativ von  $E_K$  leitfähig sein. Damit sich ein Gleichgewicht der Ströme von Protonen und Kaliumionen einstellen kann, muss der Kaliumstrom mit stärkerer Hyperpolarisation dem Betrag nach ansteigen oder konstant bleiben.

In Einstichmessungen an Epidermisstreifen wurden auch weiterhin einwärts gerichtete Ströme gefunden, die in ihrer Aktivierungskinetik sowie in der Strom-Spannungskennlinie dem KAT1 sehr ähneln. Dies deutet darauf hin, dass verschiedene ähnliche Kanäle wie KAT2, AKT1 oder AKT2/3, bei Ausfall eines anderen dessen Funktion übernehmen können. Da die Menge an mRNA dieser Kanäle in der *Kat1::En-1* Mutante gegenüber dem Wildtyp jedoch nicht signifikant erhöht ist, scheint es sich hier um einen regulatorischen Effekt zu handeln.

## 4.3 Anionische und nichtionische Osmotika

Da die gemessene Erhöhung der Kaliumkonzentration in der Schließzelle allein nicht ausreicht, die Erhöhung des Turgors zu bewirken, müssen auch weitere Osmotika im Cytosol akkumuliert werden. Weiterhin werden sie z. T. als Alternativen zum Kalium betrachtet.

### 4.3.1 Zucker

Eine Alternative zu Kalium als wichtigstem Osmotikum könnten Zucker darstellen. Ritte et al. (1999) haben für *Pisum sativum* L. gezeigt, dass im Licht Glukose, Fruktose und Saccharose von Schließzellen aufgenommen werden. Eine Akkumulation von Saccharose in belichteten Schließzellen wurde auch schon für *Vicia faba* gezeigt (Outlaw, 1995). Outlaw und De Vlieghere-He (2001) bestimmten einen Unterschied im Saccharosegehalt von 400 fmol pro Schließzellpaar zwischen Dunkelheit und maximaler Öffnung im Tagesgang. Allerdings wird das Maximum erst etwa 5 h nach Beginn der Beleuchtung erreicht, reicht also nicht aus, um die schnelle Öffnung der Stomata zu erklären, die sowohl in *Vicia faba* als auch in *Arabidopsis thaliana* beobachtet wurde. Auch Ritte et al. (1999) bestimmten Raten der Zuckeraufnahme von bis zu 19 fmol/h, was eine Öffnungszeit von mehreren Stunden ergäbe, da zum Aufbau des Turgors auf Basis von osmotischen Gradienten die gleichen Mengen aufgenommen werden müssten, wie an  $K^+$ . Insgesamt bleibt die beschriebene Zuckeraufnahme von einigen hundert fmol in mehreren Stunden bis zu  $0,62 \text{ pmol} \cdot \text{h}^{-1}$  (Outlaw (2003),  $1250 \text{ fmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Schließzellpaar}^{-1}$ ) deutlich unter der Akkumulation von Kalium von über 2 pmol in etwa einer Stunde und kann daher nur als ergänzendes Osmotikum angesehen werden.

Der Aufnahmeweg für Zucker könnte ein Kotransporter für Zucker und Protonen sein,

wie er mit AtSTP1 in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen wurde (Sauer et al., 1990). Darauf weisen auch die Experimente von Ritte et al. (1999) mit  $^{14}\text{C}$  markierter Saccharose hin. Dieser Kotransporter ist nach Büttner et al. (2000) und Büttner und Sauer (2000) in Schließzellen lokalisiert. Elektrophysiologisch wurde er bisher nur im heterologen Expressionssystem der Oocyten von *Xenopus laevis* beschrieben (Boorer et al., 1992, 1994). Hier zeigte sich, dass, wie für einen Kotransport mit Protonen zu erwarten, die Aufnahme von Zucker vom pH-Wert des externen Mediums abhängig ist. Der zuckerabhängige Strom durch diesen Transporter nimmt etwa linear mit stärkerer Hyperpolarisation der Plasmamembran zu. Auch dieser Transportweg wäre von der  $\text{H}^+$ -ATPase abhängig, da durch sie der notwendigen  $\text{H}^+$ - und Potential-Gradienten über die Plasmamembran aufgebaut werden kann. Ebenfalls müsste auch für diesen Aufnahmeweg von Osmotika gelten, dass im Gleichgewicht für jedes von der Protonenpumpe exportierte  $\text{H}^+$ , eines über den Kotransporter wieder in die Zelle importiert wird. Somit wäre auch hier der limitierende Faktor neben dem im Blatt vorhandenen Zucker (Outlaw und De Vlieghere-He, 2001), der Strom über die  $\text{H}^+$ -ATPase. Ferner bleibt noch ein Metabolisierungsschritt oder die Suche nach einem weiteren Zuckertransportweg, da – zumindest in Oocyten – der Transport von Saccharose durch AtSTP1 nicht nachweisbar ist (Boorer et al., 1994), während die Akkumulation von Zuckern vor allem für diesen Zucker gezeigt wurde (Outlaw und De Vlieghere-He, 2001). Allerdings könnten sich unter den verschiedenen pflanzlichen Zuckertransportern geeignete befinden, oder die Art des aufgenommenen Zuckers könnte zwischen verschiedenen Spezies variieren.

Wenn auch der Zuckertransport alleine nicht ausreicht um die Stomaöffnung in gleichem Umfang aufrecht zu erhalten, wie im Wildtyp, kann doch vermutet werden, dass eine Kombination aus Zuckeraufnahme und größerem Strom über alternative Kaliumtransportwege die Stomafunktion zu einem sehr großen Teil aufrecht erhalten kann, wenn der primäre Kaliumtransportweg gestört ist. Auf Basis der von verschiedenen Autoren beschriebenen Unterschiede im  $\text{K}^+$ -Gehalt der Schließzellen zwischen geschlossenen und geöffneten Stomata ist auch weiterhin davon auszugehen, dass in Wildtyp-Pflanzen, die nicht unter extremem Mangel an Kalium kultiviert werden, der Kaliumstrom durch die bekannten, einwärts gleichrichtenden Kanäle den überwiegenden Teil der zur Stomaöffnung notwendigen Anreicherung an Osmotika im Symplasten ermöglicht.

### 4.3.2 Malat

Als zweiwertiges Anion kommt Malat als zusätzliches Ion zum  $\text{Cl}^-$  mit osmotischer Wirksamkeit in Betracht. Raschke und Schnabl (1978) haben an Epidermisstreifen gezeigt, dass bei Stomaöffnung ohne  $\text{Cl}^-$  in der externen Lösung über 90 %, mit  $\text{Cl}^-$  immer noch 55 % der Ladungen als Malat, der jeweils andere Teil als Chlorid im Cytosol vorliegen. Während des Öffnens der Stomata würde in den Protoplasten Stärke zu Zucker abgebaut, ins Zytosol transportiert und dort weiter zu Malat umgewandelt. Über die Geschwindigkeit dieser Prozesse in der Zelle liegen keine Untersuchungen vor. Das Malat würde dann beim Stomaschluss in den Apoplasten exportiert, wobei es neben dem Ladungsausgleich

zum Kalium und Osmotischen Effekt auch einen regulativen auf den Anionenkanal selbst hat (Dietrich et al., 1998). Messungen über den Verlauf der apoplastischen und cytosolischen Malatkonzentrationen während der Stomabewegung liegen bisher nicht vor, wären aber eine gute Möglichkeit der Überprüfung von dessen Bedeutung.

## 4.4 Elektrophysiologische Messungen an Zellen im intakten Blatt

Die Messungen an Zellen im intakten Blatt sind eine gute Ergänzung zu den bereits seit langem etablierten Einstichmessungen an Epidermisstreifen und zum Patch-Clamp an Zellen mit enzymatisch entfernter Zellwand. Während die Messung im intakten Blatt die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung belässt und die benachbarten Zellen nicht beeinflusst, lässt sie keine Kontrolle der intrazellulären und nur geringe Kontrolle der extrazellulären Lösungszusammensetzung zu. Im Gegensatz dazu fehlen bei der Patch-Clamp Methode die mechanischen und biochemischen Einflüsse der Zellwand und benachbarter Zellen, jedoch können interne und externe Lösungszusammensetzung genau vorgegeben werden. Ein Mittelweg ist durch Messungen an Schließzellen im abgezogenen Epidermisstreifen gegeben, einer Methode, die vor allem von M. Blatt (Blatt, 1987, 1990) verwendet wird. Hier bleibt das Zytosol ebenfalls nahezu unverändert, auch die Einflüsse der Zellwand bleiben erhalten, allerdings kann die extrazelluläre Lösung kontrolliert verändert werden.

Die gemessenen Strom-Spannungskennlinien der Zellmembran besitzen die gleichen Charakteristika wie die aus den beiden anderen Methoden gewonnenen. Es finden sich die typischen hyperpolarisations-aktivierten Kaliumströme mit einer Aktivierungsspannung von etwa  $-150$  mV. Allerdings zeigen die Zellen, die auf Dunkel/Licht-Übergänge mit deutlicher Hyperpolarisation reagieren keine oder nur sehr geringe Aktivität des Anionenkanal. Die Kennlinie für den Gleichgewichtsstrom wird von den  $K_{in}$  und  $K_{out}$  dominiert und ihre Lage bei Hyperpolarisation entlang der Stromachse ins Positive, bei Depolarisation ins Negative verschoben. Das freie Membranpotential liegt dann jeweils an der Nullstelle der Strom-Spannungskennlinie, die resultierenden Ströme für die einzelnen Ionensorten sind recht gering ( $<100$  pA). Wie oben gezeigt, reichen diese Ströme aber für eine Stomaöffnung im Rahmen der im Gaswechsel gemessenen Geschwindigkeiten aus.

Die Verschiebung der Strom-Spannungskennlinie ins Positive bei Belichtung der Schließzellen ist vermutlich auf die  $H^+$ -ATPase zurückzuführen. Der Strom von Protonen aus der Zelle wurde bereits auf verschiedene Arten nachgewiesen. Roelfsema et al. (1998) zeigen mit einer pH-Mikroelektrode in *Arabidopsis thaliana* eine Ansäuerung des Apoplasten, die durch Blaulicht aktiviert wird. Durch Fluoreszenzmessungen mit Fluorescein-isothiocyanat-dextran (FITC-dextran) zeigen Mühlhling und Läubli (2000) den gleichen Effekt für *Vicia faba*.

Die Größe der hierbei gefundenen Protonenflüsse wurde in der im folgenden beschriebenen Simulation als Grundlage für die  $H^+$ -ATPase genommen und als treibende Kraft für die Ionenbewegung bei der Stomaöffnung angenommen.

## 4.5 Simulierte Ionenflüsse zur Stomabewegung

Mit den Simulationen konnte das Zusammenspiel der verschiedenen Transportwege im Schließzellensystem so nachgestellt werden, dass sich neben der Volumen- und Druckänderung auch der Verlauf von Membranpotential und Ionenkonzentrationen in guter Näherung zu den Messungen an vielen verschiedenen Systemen ergab.

Das Modell bestätigt die Überlegungen zu den Ionenflüssen bei der Stomaöffnung. Die Änderung der Aktivität der  $H^+$ -ATPase ergibt direkt eine Änderung des Membranpotentials, solange die anderen Transporter unverändert bleiben. Erst die durch Konzentrationsänderungen erfolgende Änderung der verschiedenen Leitfähigkeiten der beteiligten Kanäle bewirkt eine weitere langsame Verschiebung der Membranspannung. In den elektrophysiologischen Messungen werden diese Änderungen apoplastisch durch die große Flüssigkeitsmenge im Messbereich gepuffert, so dass nach der erfolgten De- oder Hyperpolarisation das gemessene Membranpotential über längere Zeiträume nahezu konstant bleibt. Auch zytosolisch erfolgt ein – wenn auch langsamer – Ausgleich mit der Pipettenlösung, was ebenfalls eine Dämpfung der zu erwartenden Änderungen bewirkt.

### 4.5.1 Aktivierung der $H^+$ -ATPase

Die  $H^+$ -ATPase der Plasmamembran ist wohl für den Öffnungsvorgang der Schließzellen das „antreibende“ Protein. Der durch sie gegen den aktuellen elektrochemischen Gradienten erzeugte Einwärtsstrom muss durch andere Ionenflüsse kompensiert werden, um die zentrale Bedingung der langfristigen Elektroneutralität zu gewährleisten. Weiter wurde im Kapitel 3.4.2 gezeigt, dass sie zum Beenden des Öffnungsvorganges wieder deaktiviert werden muss.

Untersuchungen an Protoplasten von *Vicia faba* haben gezeigt, dass die Aktivierung der  $H^+$ -ATPase durch Blaulicht deutlich und reversibel mit der Phosphorylierung des Proteins korreliert (Kinoshita und Shimazaki, 1999; Emi et al., 2001). Weiterhin bindet ein 14-3-3 Protein an den phosphorelierten C-Terminus der  $H^+$ -ATPase. Diese Regulation erlaubt die sehr kontrollierte Aktivierung der Protonenpumpe, da eine Dephosphorylierung auch den Pumpstrom wieder Verringern kann. Somit besteht sowohl die Möglichkeit, die  $H^+$ -ATPase bei gleicher Blaulichtintensität auf Basis anderer Umgebungsbedingungen nur teilweise zu aktivieren, als auch sie bei Erreichen der Soll-Bedingungen (Stoma entsprechend der aktuellen Lichtintensität, Luftfeuchtigkeit und  $CO_2$ -Konzentration ausreichend geöffnet) wieder zu deaktivieren.

Im Modell wurden für diese Deaktivierung drei verschiedene Mechanismen getestet.

Zum einen die graduelle Deaktivierung bei Erreichen von Schwellwerten des internen Druckes, der durch die Elastizität der Zellwand mit dem Volumen der Schließzelle und damit der Weite der Stomaöffnung zusammenhängt. Als wichtigstes Osmotikum ist auch die Konzentration von Kalium über den osmotischen Druck mit diesen Größen verknüpft und kann daher als Signal zur Deaktivierung dienen. Alternativ wurde die Protonenpumpe nach einer bestimmten Zeit wieder deaktiviert. Diese Methode ist nicht direkt mit dem Erreichen des „Sollzustandes“ der Öffnung verknüpft, allerdings könnte eine Desensibilisierung der aktivierenden Rezeptoren nicht allein zeitabhängig sondern auch von der Stärke der aktivierenden Umgebungsbedingungen bestimmt sein. Desensibilisierungsprozesse nach unterschiedlich langer Aktivierungszeit sind nicht nur für verschiedene, z. B. Glutamat oder adrenerge beta-Rezeptoren (Cash und Subbarao, 1987; Conolly et al., 1976) sowie Phototropismus bekannt (Janoudi und Poff, 1993), sondern wurden auch direkt für die Stomaöffnung nach Blaulicht (Iino et al., 1985) und die Blaulichtantwort der  $H^+$ -ATPase beschrieben (Goh et al., 1995; Taylor und Assmann, 2001). Die Erholung zur normalen Reaktion wird jeweils mit ca. 20–40 min beschrieben, es wird jedoch jeweils mit kurzen Blaulichtpulsen gearbeitet, nicht mit permanentem Licht.

#### 4.5.2 Bedeutung des $H^+$ /Cl $^-$ -Symporters

Der  $H^+$ /Cl $^-$ -Symporter ist zunächst im Modell notwendig und auch schon vorher für die Schließzelle postuliert worden, weil er eine Möglichkeit bietet, bei den während der Stomaöffnung herrschenden Bedingungen, Chlorid aufzunehmen.

Auch für den Stomaschluss ist der  $H^+$ /Cl $^-$ -Symporter allerdings von Bedeutung. Für den Efflux der Ionen müssen diese zunächst nur ihrem Gradienten folgen. Da sowohl für  $K^+$  als auch für  $Cl^-$  bei geöffneten Stomata deutlich höhere Konzentrationen gefunden wurden, als im Apoplasten, reicht das Öffnen der Ionenkanäle bei gleichzeitiger Deaktivierung der  $H^+$ -ATPase aus. Das Membranpotential wird sich entsprechend der Leitfähigkeiten der beiden Kanäle zwischen  $E_K$  und  $E_{Cl}$  einstellen. Als Bedingung für den Efflux gilt allerdings ebenfalls die Elektroneutralität. Da Schließzellen aber geringere Chlorid- als Kaliumkonzentrationen aufweisen, würde der Strom stoppen, sobald das Gleichgewicht für  $Cl^-$  erreicht wäre, wobei je nach Literatur noch ca. 250 mM Kalium in der Zelle verbleiben. Eine mögliche Lösung besteht darin, gleichzeitig einen elektroneutralen, da an einen Protonentransport gekoppelten,

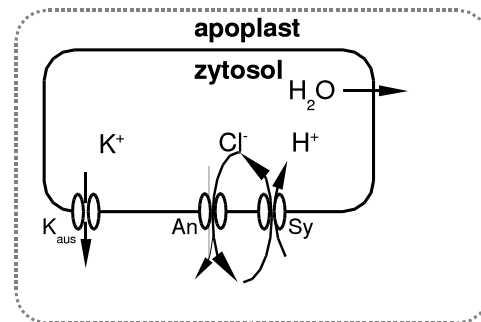


Abbildung 4.1: Vorgeschlagene Ionenflüsse beim Stomaschluss. Kalium fließt aus der Zelle heraus, für Chlorid ergibt sich ein Kreislauf durch Anionenkanal und  $H^+$ -ATPase mit leichtem Überschuss des Effluxes. Gleichzeitig werden Protonen in die Zelle transportiert.



Transport von Chlorid in die Zelle hinein anzunehmen. Dieser Transport erfolgt auf Grund des Protonengradienten ebenfalls mit dem elektrochemischen Potentialgefälle, also ohne hohen Energieaufwand für die Zelle. Gleichzeitig erklärt er die von Felle et al. (2000) gemessene Zunahme des apoplastischen pH-Wertes nahe der Schließzellen während des Stomaschlusses.

Insgesamt besteht das System also aus einem Kaliumausstrom, einem Chloridkreislauf mit geringem Netto-Ausstrom und einem Protoneneinstrom.

### 4.5.3 Bedeutung des Anionenkanals

Anionenkanäle in Schließzellen sind schon lange bekannt (Keller et al., 1989; Hedrich et al., 1990). Im Rahmen der Stomabewegung sorgen sie dafür, dass das während der Öffnungsphase akkumulierte Chlorid beim Stomaschluss wieder in den Apoplasten entlassen wird. Auch Malat, das während der Stomaöffnung in der Schließzelle durch Stärkeabbau entsteht, kann durch diese Kanäle permeieren, jedoch besitzen die Kanäle hierfür eine weit geringere Leitfähigkeit, als für  $\text{Cl}^-$ . (zwischen 1:0.24 nach Schmidt und Schroeder (1994) und 1:0.1 nach Hedrich und Marten (1993)). Für den gleichen Strom wäre also ein entsprechend größerer Malatgradient oder eine größere Leitfähigkeit des Anionenkanal nötig, die dann auch über den Malatgradienten entsprechend der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung 2.8 auf Seite 21 die gleiche Depolarisierung bewirken würde. Der tatsächliche Gradient ist jedoch nicht bekannt, da Malat jedoch ein deutlich größeres Molekül ist als  $\text{K}^+$  oder  $\text{Cl}^-$ , würde es auch weniger schnell aus der direkten Umgebung der Zelle heraus diffundieren, so dass der lokale Gradient und damit auch der Strom sich schnell verringern würden. Outlaw (2003) weist allerdings auf die Bedeutung von Malat als Gegenion zum Kalium hin, da der Abbau von Stärke bis zum Malat zwei Protonen freisetzt und der Prozess somit zum Stabilisieren des cytosolischen pH-Wertes beim  $\text{H}^+$ -Efflux dient.

Das Öffnen dieses Kanals zu Beginn des Stomaschlusses bewirkt auch eine deutliche Verschiebung des Membranpotentials aus dem stark hyperpolarisierten Bereich (Gleichgewichtspotential von  $\text{K}^+$ ) in den depolarisierten Bereich, näher am Gleichgewichtspotential von Chlorid. Diese Verschiebung ergibt einen stabilen Arbeitspunkt für den folgenden andauernden Efflux von Kalium und Chlorid. Das vermutete „recycling“ von Chlorid, das über den Kcotransporter zum Teil wieder in die Zelle gepumpt wird, stellt weiterhin sicher dass die Depolarisation aufrecht erhalten werden kann. Da der cytosolische pH-Wert durch Puffersysteme sehr gut konstant gehalten wird, kann auch davon ausgegangen werden, dass der Gradient der Protonenkonzentration ausreicht, einen Chloridinflux aufrecht zu erhalten.

## 4.6 Kinetiken der Stomabewegung

Die an der Stomabewegung beteiligten Ionenkanäle wurden nicht nur auf ihre Spannungs- und Ionenabhängigkeit im Gleichgewichtszustand, sondern auch in Bezug auf die Kinetik ihrer Reaktion auf instantane Spannungsänderungen untersucht. Diese Untersuchungen brachten viele Einsichten über die Regulation und „Mechanik“ der Kanäle. Die Zeitkonstanten der beobachteten Kinetiken liegen – mit Ausnahme des langsamen Anionenkanals – im Bereich von Millisekunden. Die beobachteten Änderungen im Membranpotential als Reaktion auf eine Änderung der Lichtintensität verlaufen dagegen im Maßstab von Minuten oder einigen 10 Sekunden (s. Abb. 3.5 und 3.6). Der Einfluss der Schaltgeschwindigkeiten von Ionenkanälen ist daher vernachlässigbar.

Im Zusammenhang mit der Stomabewegung sind auch mehrfach Oszillationen beobachtet und diskutiert worden. Dies betrifft sowohl direkte Oszillationen der Stomaweite (Kaiser und Kappen, 2001), als auch von Kalzium als sekundärem Botenstoff (Allen et al., 2001). Auch im freien Membranpotential wurden Oszillationen mit unterschiedlichsten Periodendauern beschrieben. Thiel et al. (1992) und Roelfsema und Prins (1998) beschreiben Oszillationen  $\geq 1$  Hz, während Raschke (2003) Periodendauern  $> 1.5$  min zeigt. Zum Vergleich ist festzustellen, dass die im Gaswechsel Beobachteten Oszillationen der Stomaweiten wiederum Frequenzen von  $2 \text{ h}^{-1}$  aufweisen. Diese Oszillationen sind somit in ihrer Kinetik um einen Faktor  $> 1000$  von den Zeitkonstanten der Reaktion von Ionenkanälen entfernt. Die Grundlage ist vielmehr in der Rückkopplung der langsam auftretenden Änderungen des  $\text{CO}_2$ -Gehalts sowie des Wassergehaltes sowie im entsprechenden Gradienten zwischen Blatt und Umgebung zur Stomabewegung zu suchen. Für diese Interpretation spricht auch, dass die Oszillationen besonders bei geringen Öffnungsweiten auftreten. In diesem Bereich sind die relativen Änderungen der Weite, die durch die gleiche Volumenänderung der Schließzellen auftritt, besonders groß, der Regelkreis müsste also besonders empfindlich reagieren, um ein stabiles Gleichgewicht zu schaffen.

Aus den Messungen und Modellrechnungen ergibt sich, dass sowohl für das Öffnen als auch das Schließen eine anhaltende Änderung des Membranpotentials bzw. als Grundlage davon anhaltende Änderungen der Aktivität der Transportproteine genutzt werden und dass diese Möglichkeit sehr einfach und wegen des folgenden kontinuierlichen Ionen- und Wasserflusses auch schnell im Bezug auf die zu erreichende Änderung ist. Diese einfachen Änderungen im Regelkreis sind für das Öffnen die Aktivierung der  $\text{H}^+$ -ATPase, die dann nach Erreichen der notwendigen Öffnungsweite wieder inaktiviert werden muss. Diesen Teil der Regelung zeigt Abb. 4.2(a). Nur eine regulative Änderung ist also hinreichend, um eine stabile Aufnahme von Ionen zu bewirken. Diese Aufnahme erfolgt über Transportsysteme die über ihre Spannungsabhängigkeit mit der Protonenpumpe gekoppelt sind und daher nicht selbst aktiviert werden müssen.

Der Stomaschluss erfordert mehr Änderungen an Stellgrößen als die Stomaöffnung. Damit das Membranpotential ins Positive verschoben wird, muss die Chlorid gegenüber der Kaliumleitfähigkeit zunehmen. Hierfür werden der Anionenkanal, und  $\text{K}_{\text{out}}$  aktiviert, während  $\text{K}_{\text{in}}$  inaktiviert wird. Um einen ausreichenden Export von Ionen bis zum Sto-

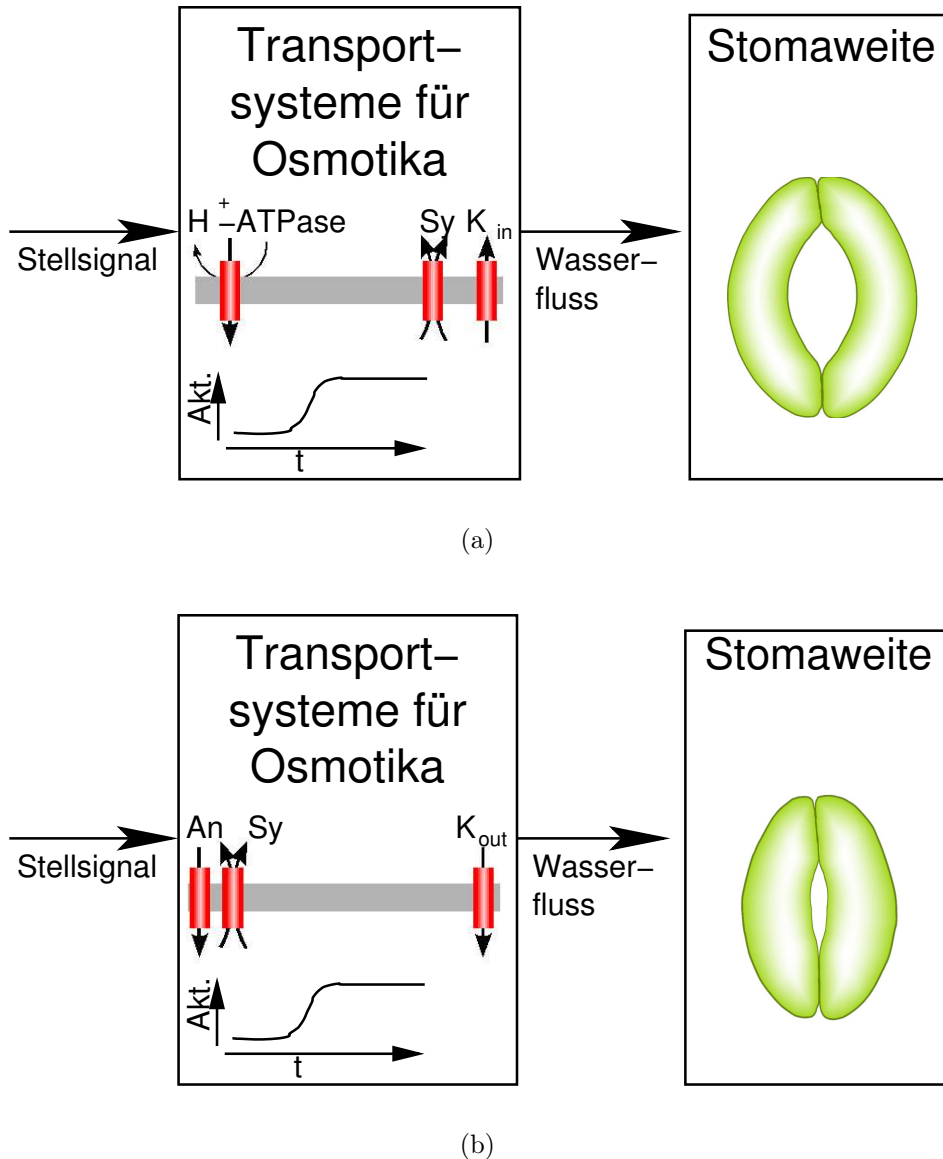


Abbildung 4.2: Zur Stomaöffnung notwendig ist nur die Aktivierung und spätere Inaktivierung der Protonenpumpe (a). Die anderen Transporter (rechts) sind in ihren Eigenschaften daran gekoppelt, so dass der Wasser-Influx erfolgt. Die Stellgrößen, die zum Stomaschluss geändert werden müssen, sind Anionenkanal und  $H^+/Cl^-$ -Symporter, die jeweils aktiviert werden. Weitere an der jeweiligen Stomabewegung beteiligte Transportproteine sind rechts dargestellt, die übrigen weggelassen.

maschluss zu erreichen, wird zusätzlich der  $H^+/Cl^-$ -Symporter aktiviert (Abb. 4.2(b)).

## 4.7 Möglichkeiten weiterer *in vivo* Messungen

Um die Voraussagen der Simulation insbesondere zum Chloridgehalt der Schließzellen während des Stomaschlusses zu überprüfen, wäre eine kontinuierliche Messung dieser Größe in intakten Schließzellen das überzeugendste Mittel. Eine Messung mit Ionenselektiven Mikroelektroden, wie sie von Felle et al. (2000) für den schließzellnahen Apoplasten durchgeführt wurde, ist nur schwer möglich, da diese Elektroden deutlich größer sind, als die für die Elektrophysiologie genutzten Pipetten. Ein Einstich in eine Schließzelle wird diese vermutlich zerstören, außerdem besteht die Gefahr, dass ein Durchstich durch die Zellwand die Ionenselektive Membran der Elektroden beschädigt oder impermeabel macht.

Alternativ könnte die Chloridkonzentration mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt werden, die ähnlich wie die in Kap. 2.7 beschriebenen, mit spektralen Änderungen auf Bindung an Chlorid reagieren. Solche Messungen sind auch für Säugetier-Zellen beschrieben (Woll et al., 1996; Inglefield und Schwartz-Bloom, 1999), es dürften allerdings ähnliche Probleme auftreten, wie bei anderen Ionenselektiven Farbstoffen. Eine weitere Schwierigkeit bei diesen Farbstoffen ist, dass ihr Anregungsmaximum im UV liegt, was häufig zu hohen Intensitäten der Autofluoreszenz führt und so die quantitative Analyse erschwert. In pflanzlichen Zellen wurde die Durchführbarkeit dieser Messungen noch nicht gezeigt.

Eine weitere Möglichkeit der Analyse ist die Extraktion von Schließzell-Zytosol zu bestimmten Zeiten nach einer spezifischen Änderung der Umweltbedingungen. Hierfür könnten mit einer Mikropipette Schließzellen angestochen und quasi ausgesaugt werden, was an einigen Zelltypen bereits verwendet wurde (Tomos et al., 1994; Tomos und Leigh, 1999). Der limitierende Faktor bei diesem Vorgehen ist das Volumen, das pro Zelle nur einige Pikoliter beträgt, aber insgesamt für eine chemische Analyse ausreichen müsste. An den so genommenen Proben sind Analysen wie Kapillarelektrophorese, Bestimmung anorganischer Stoffe durch Röntgen-Mikroanalyse und fluoreszenz basierte Methoden möglich.

## 4.8 Ausblick

Insgesamt hat diese Arbeit mit dem Modell zur Regulation der Iontentransporter bei der Schließzellbewegung die Grundlage gelegt für ein Verständnis der schließzellspezifischen Koordination der verschiedenen Ionenflüsse. Aufbauend auf die verschiedenen Einzelmessungen zur Reaktion einzelner Transporter oder zu apoplastischen Ionenkonzentrationen wurde ein Zusammenhang hergestellt, der es erlaubt, Voraussagen über die Notwendigkeit der Verstärkung oder Abschwächung der Flüsse zum Erreichen eines

neuen Öffnungszustandes zu machen.

Die genaue Charakterisierung der verschiedenen Transportproteine ist die Grundlage dieser Möglichkeiten. Da der Verlauf interner Konzentrationen weder von Kalium noch von Chlorid bekannt sind, die Kanäle jedoch zum Teil von ihnen beeinflusst werden, wären hier zeitlich aufgelöste Messungen von großem Nutzen. Auch für Malat, von dem z. T. vermutet wird, dass es als Anion wesentlich zum osmotischen Druck in den Schließzellen beiträgt, wären sowohl intrazelluläre als auch apoplastische zeitaufgelöste Messungen von großem Nutzen.

Weiter ist die genaue Rolle von Calcium bei der Regulation derzeit nicht völlig klar. Für schnelle Oszillationen, wie sie zum Teil in Protoplasten gemessen wurden, findet sich keine Begründung in der Modellierung der Transporter. Außerdem wurden erhöhte zytosolische Calciumkonzentrationen sowohl beim Stomaschluss (McAinsh et al., 1990; Allen et al., 1999; Webb et al., 1996), als auch bei der Stomaöffnung (Irving et al., 1992) nachgewiesen. Die Einflüsse können also kaum direkt erfolgen, sondern verändern eventuell die Signalkaskade, z. B. über Calcium abhängige Phosphorylierung/Dephosphorylierung. Mehrere aufeinander folgende derartige Schritte könnten eine Abhängigkeit von der Frequenz der Oszillationen begründen, und die spezifische Änderung der Transportereigenschaften wird dann erst am Ende der Signalkette hervorgerufen. Die Abhängigkeiten von solchen Prozessen können erst nach genauerer Aufklärung dieser Zusammenhänge in ein Modell implementiert werden.

Allerdings erlaubt die gezielte Manipulation der Eigenschaften eines Transporters im Modell bereits Voraussagen über die Änderungen der Stomaregulation. Bei Abweichungen zwischen Voraussage und Messung, wie sie bei der Simulation ohne einwärts gerichtenden Kaliumkanal im Vergleich zur *Kat1::En-1* Mutante auftraten, kann gezielt nach Gründen und alternativen Transportwegen für die gleiche oder andere Substanzen gesucht werden. Auch die Folgen des Austauschs eines Transportproteins gegen ein anderes durch gezielte Mutation können so vorausgesagt und überprüft werden, um auf diesem Wege neue Erkenntnisse über diese für die Pflanze essentielle Regulation zu gewinnen. Es steht somit eine erweiterbare Basis zur Verfügung, die zu einem tiefer gehenden Verständnis der Kontrolle der Stomabewegung führen kann.

# 5 Zusammenfassung

## Hintergrund und Ziel

Trotz der bereits lange gut bekannten Funktion der Stomata und der einzelnen, an der Funktion beteiligten Transportproteine, fehlen Funktionsmodelle, die diese schließzellspezifisch in einen Zusammenhang bringen und ihre Koordination untersuchen.

## Ergebnisse

- Der einwärts gleichrichtende Kaliumkanal aus *Arabidopsis thaliana*, KAT1 ist sowohl molekularbiologisch, als auch elektrophysiologisch gut charakterisiert. Ein "ausschalten" dieses Kanals sollte die Stomaöffnung deutlich verlangsamen oder vermindern. Es wurde aber unter verschiedenen Bedingungen, weder mit Licht als Öffnungsreiz, noch mit Fusicoccin, kein Unterschied zwischen Wildtyp und KAT1::En-1 Mutant gefunden.
- Einige Publikationen schlagen Zucker, vornehmlich Glukose als osmotisch aktive Substanz zur Stomaöffnung vor, da im Tagesgang bei längerer Stomaöffnung auch die Zuckerkonzentration zunimmt. Die Zuckeraufnahme wurde mit einem fluoreszierenden Glukose-Derivat gemessen und als Lichtabhängig gefunden. Weiterhin wurde die Aufnahme besonders durch CCCP gehemmt, was auf eine Abhängigkeit von einem Protonengradienten hindeutet.
- Die Aufnahme von Glukose wurde weiterhin mit einer Knockout-Mutante der AtSTP1 Protonen/Zucker-Kotransporters getestet. Die deutliche Verminderung des Anteils der fluoreszierenden Zellen gegenüber dem Wildtyp unter den gleichen Bedingungen zeigt eine Beteiligung dieses Kotransporters an der Glukose-Aufnahme.
- Schließzellen in der intakten Pflanze wurden auf den Verlauf ihres Membranpotentials in CO<sub>2</sub>-freier Luft bei Licht/Dunkel Wechseln untersucht. Ein großer Teil dieser Zellen zeigte eine wiederholbare Hyperpolarisation im Licht und Depolarisation im Dunklen. Als Auslöser dieser Änderung in der Membranspannung wurde hauptsächlich die (In-)Aktivierung eines instantanen positiven Stromes in der Größe von etwa 35 pA festgestellt, vermutlich die H<sup>+</sup>-ATPase.
- Die Abhängigkeiten des Anionenkanals, der einwärts und auswärts gleichrichtenden Kaliumkanäle und der Protonenpumpe von internen und externen Ionenkon-

zentrationen, dem pH-Wert und der Membranspannung wurden in einer biophysikalischen Simulation vereint. Zusammen mit den jeweiligen Leitfähigkeiten und Literaturdaten der Konzentrationsverläufe ergibt sich ein realistisches Modell der Flüsse zur Stomabewegung.

- Aus dem Modell ergeben sich zwei wesentliche Voraussagen für das Zusammenwirken der Transportproteine: 1. Bei der Stomaöffnung muss die  $H^+$ -ATPase zur Beendigung der Öffnung wieder deaktiviert werden, anderenfalls steigt die interne Kaliumkonzentration und das Membranpotential fällt auf Werte, die in Messungen nie gefunden wurden. Eine Desensitisierung der  $H^+$ -ATPase wurde zwar nach Blaulicht-Pulsen bereits gemessen, jedoch nicht bei andauernder Beleuchtung. 2. Der bisher in Schließzellen noch nicht elektrophysiologisch nachgewiesene Protonen/Chlorid Kotransporter zum Import von Chlorid muss nicht nur während der Stomaöffnung aktiv sein, sondern erhält auch eine Rolle beim Stomaschluss. Da die cytosolische Chloridkonzentration deutlich unter der von Kalium liegt, würde die für den Efflux der beiden Ionen nötige Depolarisation bereits enden, wenn die Chloridkonzentration deutlich sinkt, also bevor auch die Konzentration von Kalium soweit abgenommen hätte, dass die Spaltöffnung geschlossen wäre.
- Zur Messung interner Ionenkonzentrationen in intakten Schließzellen wurden verschiedene Methoden der Beladung mit fluoreszierenden Indikatorfarbstoffen getestet. Die Beladung durch niedrigen pH, niedrige Temperatur oder der Farbstoffe als Acetoxymethyl-Ester kann bei Schließzellen von *Vicia faba* als nicht praktikabel angesehen werden. Lediglich eine Detergenz unterstützte Farbstoffbeladung wurde in der Literatur gefunden.
- Zur parallelen Anwendung elektrophysiologischer Messungen und fluoreszenzbasierter Bestimmung von Ionenkonzentrationen wurden eine Technik der Druckinjektion über einen Kanal einer Doppel-Elektrode getestet. Diese Methode erlaubt die Farbstoffinjektion, allerdings hat sich die Spannung-Klemm-Technik mit der für einen einzelnen Kanal einer Einstichelektrode notwendigen gepulsten Technik als nicht praktikabel erwiesen, da die Membranspannung vermutlich aufgrund nicht kompensierbarer Kapazitäten nicht die vorgegebenen Werte erreichte.

## Summary

While the function of stomata as well as of the different proteins involved in ion fluxes across the plasma membrane are well understood, a guard cell specific model for the concerted function and coordination is still missing.

## Results

- KAT1, the inward rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* is well characterised in terms of structure and electrophysiological function. A knock-out mutant of this channel should be restrained in stomatal opening. Nevertheless under different conditions, with light or fusicoccin as opening stimulus, no difference could be found between wild type and KAT1::En-1 mutant plants.
- Glucose is found to accumulate in guard cells during the day when stomata are opened and it is thus suggested to contribute to the osmotical pressure for opening. The uptake of a fluorescent glucose derivative was found to be light dependent and impaired by addition of CCCP which eliminates the proton gradient across the plasma membrane.
- A knock-out mutant of the proton/sugar cotransporter protein AtSTP1 showed a significant reduction of cells showing 2-NBDG fluorescence as compared to the wild type. This shows a prominent contribution of this transporter to the uptake of glucose.
- Changes of the free running membrane potential upon light/dark transitions were measured in guard cells of intact *Vicia faba* plants. A majority of these cells showed repeatable hyperpolarizations in light and depolarizations in darkness. These changes in potential were mainly driven by the (in-)activation of an instantaneous positive current of about 35 mA, most probably the H<sup>+</sup>-ATPase.
- In a biophysical simulation, the dependence of anion channel, inward as well as outward rectifying potassium channels and proton pump on cytosolic and apoplastic ion concentrations, pH and membrane potential were included to build a model of ion fluxes for stomatal movements. Also included were literature values for channel conductance and the kinetics of concentrations during stomatal movements.



- From this model, two main predictions were made for the cooperation of transport proteins in stomatal movements: 1. At the end of the opening phase of stomata, the H<sup>+</sup>-ATPase must be deactivated, since otherwise the cytosolic potassium concentration would rise and the membrane potential would decrease both to values that were never reproduced in measurements. A desensitization of the H<sup>+</sup>-ATPase was already found after pulses of blue light, but never upon permanent white light. 2. The proton/chloride cotransporter not only needs to be active during stoma opening for chloride uptake, but also during closure. Since in guard cells of open stomata, the concentration of potassium is higher than that of chloride, a 1:1 efflux of both ions would soon end the depolarization needed for further potassium efflux. To overcome this, a chloride cycle is suggested, where the cotransporter is active and keeps the net efflux of chloride small.
- Different loading techniques were tested for fluorescent calcium indicator dyes. Incubation at low pH, for the free acid form as well as low temperature for the acetoxymethyl-ester forms of the dyes were shown to be impossible in *Vicia faba* guard cells. During the work on this thesis, one example for a detergent-aided loading of free acid dyes was published.
- For parallel recording of electrophysiological parameters and cytosolic ion concentrations, an injection technique was tested that operates by regulated air pressure on one barrel of a double-barreled pipette. The other barrel was used for measurements of the membrane potential. Experiments with a discontinuous voltage clamp amplifier failed, since the target voltage was not reached probably due to non-compensable, variable pipette capacities.

# A Anhang

# Literaturverzeichnis

- ALLAWAY, W., HSIAO, T. (1973): Preparation of rolled Epidermis of *Vicia Faba* L. so that Stomata are the only viable Cells: Analysis of Guard Cell Potassium by Flame Photometry, *Aust. J. biol. Sci.*, **26**, 309–318.
- ALLAWAY, W. G., MILTHORPE, F. L. (1976): Structure and functioning of stomata, in *Water Deficits and Plant Growth*, KOZLOWSKI, T. T., Hrsg. **IV**, 57–102, Academic Press, New York.
- ALLEN, G., CHU, S., HARRINGTON, C., SCHUMACHER, K., HOFFMAN, T., TANG, Y., GRILL, E., SCHROEDER, J. (2001): A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements, *Nature*, **411**(6841), 1053–1057.
- ALLEN, G., KUCHITSU, K., CHU, S., MURATA, Y., SCHROEDER, J. (1999): Arabidopsis *abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells, *Plant Cell*, **11**(9), 1785–1798.
- ANDERSON, J. A., HUPRIKAR, S. S., KOCHIAN, L. V., LUCAS, W. J., GABER, R. F. (1992): Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3736–3740.
- ASSMANN, S. (1999): The cellular basis of guard cell sensing of rising CO<sub>2</sub>, *Plant, Cell and Environment*, **22**(6), 629–637.
- ASSMANN, S., SCHWARTZ, A. (1992): Synergistic Effect of Light and Fusicoccin on Stomatal Opening - Epidermal Peel and Patch Clamp Experiments, *Plant Physiol.*, **98**(4), 1349–1355.
- ASSMANN, S. M., SIMONICI, L., SCHROEDER, J. I. (1985): Blue-Light activates electrogenic Ion pumping in Guard-Cell Protoplasts of *Vicia faba*, *Nature*, **318**(6043), 285–287.
- BAKER, A., BRANDER, R., SCHREUR, J., CAMACHO, S., WEINER, M. (1994): Protein and Acidosis Alter Calcium-Binding and Fluorescence-Spectra of the Calcium Indicator Indo-1, *Biophys. J.*, **67**(4), 1646–1654.
- BEILBY, J. M., WALKER, N. A. (1981): Chloride transport in Chara. I. Kinetics and current-voltage curves for a probable proton symport, *J. Exp. Bot.*, **32**, 43–54.

- BEYSCHLAG, W., ECKSTEIN, J. (1998): Stomatal patchiness, *Progress in Botany*, **59**, 283–298.
- BLATT, M. (1987): Electrical characteristics of stomatal guard cells: the ionic basis of the membrane potential and the consequence of potassium chloride leakage from microelectrodes, *Planta*.
- BLATT, M. (1988): Potassium-Dependent, Bipolar Gating of K<sup>+</sup> Channels in Guard Cells, *Journal of Membrane Biology*, **102**, 235–246.
- BLATT, M. (1990): Potassium channel currents in intact stomatal guard cells: rapid enhancement by abscisic acid, *Planta*, **180**, 445–455.
- BLATT, M. (1992): K<sup>+</sup> Channels of Stomatal Guard Cells - Characteristics of the Inward Rectifier and Its Control by pH, *Journal of General Physiology*, **99**, 615–644.
- BLATT, M., GRABOV, A. (1997): Signal redundancy, gates and integration in the control of ion channels for stomatal movement, *Journal of Experimental Botany*, **48**, 529–537.
- BLATT, M., GRADMANN, D. (1997): K<sup>+</sup>-sensitive gating of the K<sup>+</sup> outward rectifier in *Vicia* guard cells, *Journal of Membrane Biology*, **158**(3), 241–256.
- BOORER, K. J., FORDE, B. G., LEIGH, R. A., MILLER, A. J. (1992): Functional expression of a plant plasma membrane transporter in *Xenopus* oocytes, *FEBS Lett.*, **302**(2), 166–168.
- BOORER, K. J., LOO, D. D. F., WRIGHT, E. M. (1994): Steady-state and Presteady-state Kinetics of the H<sup>+</sup>/Hexose Cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* Expressed in *Xenopus* Oocytes, *Journal of Biological Chemistry*, **269**(32), 20417–20424.
- BUCKLEY, T., MOTT, K. (2000): Stomatal responses to non-local changes in PFD: evidence for long-distance hydraulic interactions, *Plant, Cell and Environment*.
- BÜTTNER, M., SAUER, N. (2000): Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, **1465**(1-2), 263–274.
- BÜTTNER, M., TRUERNIT, E., BAIER, K., SCHOLZ-STARKE, J., SONTHEIM, M., LAUTERBACH, C., HUSS, V., SAUER, N. (2000): AtSTP3, a green leaf-specific, low affinity monosaccharide-H<sup>+</sup> symporter of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Environ.*, **23**(2), 175–184.
- CALLAHAM, D. A., HEPLER, P. K. (1991): *Cellular Calcium: A Practical Approach*, Kapitel Measurement of free calcium in plant cells, 383–410, Oxford University Press, New York.

- CASH, D., SUBBARAO, K. (1987): Two desensitization processes of GABA receptor from rat brain. Rapid measurements of chloride ion flux using quench-flow techniques., *FEBS Lett*, **217**(1), 129–33.
- CONOLLY, M., GREENACRE, J., SCOFIELD, P. (1976): Dose-dependent desensitization of lymphocyte beta-receptor function after long-term culture with isoprenaline [proceedings]., *Br J Pharmacol*, **58**(3), 448P–449P.
- CORK, R. J. (1986): Problems with the application of quin-2 AM to measuring cytoplasmic free calcium in plant cells., *Plant Cell Environ.*, **9**, 157–160.
- COWAN, I. R. (1972): Oscillations in stomatal conductance and plant functioning associated with stomatal conductance: observations and a model, *Planta*, **106**, 185–219.
- COWAN, I. R. (1977): Stomatal behaviour and environment, *Advances in Botanical Research*, **4**, 117–228.
- DAVIES, W. J., ZHANG, J. (1991): Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**, 55–76.
- DE RUIJTER, N. C. A., ROOK, M. B., BISSELING, T., EMONS, A. M. C. (1998): Lipochito-oligosaccharides re-initiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip, *The Plant Journal*, **13**(3), 341–350.
- DIETRICH, P., DREYER, I., WIESNER, P., HEDRICH, R. (1998): Cation sensitivity and kinetics of guard-cell potassium channels differ among species, *Planta*, **205**, 277–287.
- DIETRICH, P., HEDRICH, R. (1998): Anions permeate and gate GCAC1, a voltage-dependent guard cell anion channel, *Plant Journal*, **15**(4), 479–487.
- EMI, T., KINOSHITA, T., SHIMAZAKI, K. (2001): Specific binding of vf14-3-3a isoform to the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in response to blue light and fusicoccin in guard cells of broad bean, *Plant Physiology*, **125**(2), 1115–1125.
- FELLE, H., HANSTEIN, S., STEINMEYER, R., HEDRICH, R. (2000): Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness, *Plant Journal*, **24**(3), 297–304.
- FINKEL, A. S., GAGE, P. W. (1985): Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes, in *Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes*, SMITH, T. J., LECAR, H., REDMAN, S. J., GAGE, P. W., Hrsg., Williams and Wolkins Co., Baltimore, USA.

- FISHER, K. A., STOECKENIUS, W. (1982): Membran-Modelle, in *Biophysik, 2. Aufl.*, HOPPE, W., LOHMANN, W., MARKL, H., ZIEGLER, H., Hrsg., 426–438, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- FRANKS, P., BUCKLEY, T., SHOPE, J., MOTT, K. (2001): Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe, *Plant Physiology*, **125**(4), 1577–1584.
- FRANKS, P., COWAN, I., FARQUHAR, G. (1998): A study of stomatal mechanics using the cell pressure probe, *Plant, Cell and Environment*, **21**(1), 94–100.
- FRANKS, P. J., FARQUHAR, G. D. (1999): A relationship between humidity response, growth form and photosynthetic operating point in c3 plants, *Plant Cell Environ*, **22**(11), 1337–1337.
- GOH, C., OKU, T., SHIMAZAKI, K. (1995): Properties of Proton Pumping in Response to Blue Light and Fusicoccin in Guard Cell Protoplasts Isolated from Adaxial Epidermis of Vicia Leaves., *Plant Physiol*, **109**(1), 187–194.
- GOLDMAN, D. E. (1943): Potential, impedance and rectification in membranes, *Journal of General Physiology*, **27**, 37–60.
- GRABOV, A., BLATT, M. (1997): Parallel control of the inward-rectifier K<sup>+</sup> channel by cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and pH in Vicia guard cells, *Planta*, **201**(1), 84–95.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., SIGWORTH, F. J. (1981): Improved patch-clamp-techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Archiv*, **391**, 85–100.
- HEDRICH, R., BUSCH, H., RASCHKE, K. (1990): Ca<sup>2+</sup> and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells., *EMBO Journal*, **9**(12), 3889–92.
- HEDRICH, R., DIETRICH, P. (1996): Plant K<sup>+</sup> Channels: Similarity and Diversity, *Botanica Acta*.
- HEDRICH, R., JEROMIN, A. (1992): A new scheme of symbiosis: ligand- and voltage-gated anion channels in plants and animals, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.*, **338**, 31–38.
- HEDRICH, R., MARTEN, I. (1993): Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO<sub>2</sub> sensor to guard cells, *EMBO Journal*, **12**(3), 897–901.

- HOMANN, U., THIEL, G. (2002): The number of K<sup>+</sup> channels in the plasma membrane of guard cell protoplasts changes in parallel with the surface area, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(15), 10215–10220.
- HUMBLE, G., RASCHKE, K. (1971): Stomatal opening qualitatively related to potassium transport. Evidence from electron probe analysis, *Plant Physiology*, **48**, 447–453.
- HYRC, K., BOWNIK, J., GOLDBERG, M. (2000): Ionic selectivity of low-affinity ratiometric calcium indicators: mag-Fura-2, Fura-2FF and BTC, *Cell Calcium*, **27**(2), 75–86.
- IINO, M., OGAWA, T., ZEIGER, E. (1985): Kinetic Properties of the Blue-Light Response of Stomata, *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**(3), 8019–8023.
- ILAN, N., MORAN, N., SCHWARTZ, A. (1995): The Role of Potassium Channels in the Temperature control of Stomatal Aperture, *Plant Physiology*, **108**, 1161–1170.
- ILAN, N., SCHWARTZ, A., MORAN, N. (1996): External Protons Enhance the Activity of the Hyperpolarization-activated K Channels in Guard Cell Protoplasts of *Vicia faba*, *Journal of Membrane Biology*, **154**(2), 169–181.
- INGLEFIELD, J., SCHWARTZ-BLOOM, R. (1999): Fluorescence imaging of changes in intracellular chloride in living brain slices., *Methods*, **18**(2), 197–203.
- IRVING, H. R., GEHRING, C. A., PARISCH, R. W. (1992): Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**(5), 1790–1794.
- JAFFE, L. F. (1974): The Interpretation of Voltage-Concentration Relations, *Journal of theoretical Biology*, **48**, 11–18.
- JANOUDI, A., POFF, K. (1993): Desensitization and recovery of phototropic responsiveness in *Arabidopsis thaliana*., *Plant Physiol*, **101**, 1175–80.
- KAISER, H., KAPPEN, L. (2001): Stomatal oscillations at small apertures: indications for a fundamental insufficiency of stomatal feedback-control inherent in the stomatal turgor mechanism, *Journal of Experimental Botany*, **52**(359), 1303–1313.
- KEARNS, E. V., ASSMANN, S. M. (1993): Update on guard cells: The guard cell-environment connection, *Plant Physiology*, **102**, 711–715.
- KELLER, B. U., HEDRICH, R., RASCHKE, K. (1989): Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells, *Nature*, **341**, 450–453.
- KINOSHITA, T., NISHIMURA, M., SHIMAZAKI, K. (1995): Cytosolic Concentration of Ca<sup>2+</sup> Regulates the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase in Guard Cells of Fava Bean, *Plant Cell*, **7**(8), 1333–1342.

- KINOSHITA, T., SHIMAZAKI, K. (1999): Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells., *EMBO Journal*, **18**(20), 5548–58.
- KINOSHITA, T., SHIMAZAKI, K. (2001): Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in response to fusicoccin, *Plant Cell Physiology*, **42**(4), 424–432.
- KOLB, H., MARTEN, I., HEDRICH, R. (1995): Hodgkin-Huxley Analysis of a GCAC1 Anion Channel in the Plasma Membrane of Guard Cells, *Journal of Membrane Biology*, **146**(3), 273–282.
- LEMTIRI-CHLIEH, F. (1996): Effects of internal K<sup>+</sup> and ABA on the voltage- and time-dependence of the outward K<sup>+</sup>-rectifier in Vicia guard cells, *Journal of Membrane Biology*, **153**(2), 105–116.
- LINDER, B., RASCHKE, K. (1992): A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing., *FEBS Lett.*, **313**(1), 27–30.
- LINSBAUER, K. (1916): Kenntnis der Spaltöffnungsbewegungen, *Flora*, **109**, 100–142, FINDEN!!!
- LOHSE, G., HEDRICH, R. (1992): Characterization of the plasmamembrane H<sup>+</sup> ATPase from Vicia faba guard cells., *Planta*, **188**, 206–214.
- MA, Q., RENGEL, Z., KUO, J. (2002): Aluminium Toxicity in Rye (Secale cereale): Root Growth and Dynamics of Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in Intact Root Tips, *Annals of Botany*, **89**, 241–244.
- MCAINSH, M., BROWNLEE, C., HETHERINGTON, A. (1990): Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca<sup>2+</sup> precedes stomatal closure, *Nature*, **343**, 186–188.
- MOTT, K., BUCKLEY, T. (1998): Stomatal heterogeneity, *Journal of Experimental Botany*, **49**, 407–417.
- MÜHLING, K., LÄUCHLI, A. (2000): Light-induced pH and K<sup>+</sup> changes in the apoplast of intact leaves, *Planta*, **212**, 9–15.
- MÜHLING, K., PLIETH, C., HANSEN, U.-P., SATTELMACHER, B. (1995): Apoplastic pH of intact leaves of Vicia faba as influenced by light, *Journal of Experimental Botany*, **46**(285), 377–382.



- NAKAMURA, R. L., MCKENDREE, W. L., HIRSCH, R. E., SEDBROOK, J. C., GABER, R. F., SUSSMAN, M. R. (1995): Expression of an Arabidopsis Potassium Channel Gene in Guard-Cells, *Plant Physiol.*, **109**(2), 371–374.
- OUTLAW, W. (2003): Integration of cellular and physiological functions of guard cells, *Crit. Rev. Plant Sci.*, **22**(6), 503–529.
- OUTLAW, W., DE VliegHERE-HE, X. (2001): Transpiration rate. An important factor controlling the sucrose content of the guard cell apoplast of broad bean, *Plant Physiology*, **126**(4), 1716–1724.
- OUTLAW, W., DU, Z., MENG, F., AGHORAM, K., RIDDLE, K., CHOLLET, R. (2002): Requirements for activation of the signal-transduction network that leads to regulatory phosphorylation of leaf guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase during fusicoccin-stimulated stomatal opening, *Arch. Biochem. Biophys.*, **407**(1), 63–71.
- OUTLAW, W., LOWRY, O. (1977): Organic acid and potassium accumulation in guard cells during stomatal opening, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**(10), 4434–4438.
- OUTLAW, W. H. J. (1987): An introduction to carbon metabolism in guard cells, in *Stomatal Function*, ZEIGER, E., FARQUHAR, G., COWAN, J., Hrsg., 115–123, Stanford University Press, Stanford.
- OUTLAW, W. H. J. (1995): Sucrose and Stomata: a full circle, in *Carbon Partitioning and Sucrose-Sink Interactions in Plants*, MADORE, M. A., LUCUS, W. J., Hrsg., 56–67, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- PEROZO, E., MACKINNON, R., BEZANILLA, F., STEFANI, E. (1993): Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K<sup>+</sup> channels, *Neuron*, **11**, 353–358.
- RASCHKE, K. (2003): Alternation of the slow with the quick anion conductance in whole guard cells effected by external malate, *Planta*, **217**(4), 651–657.
- RASCHKE, K., 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., SCHNABL, H. (1978): Availability of Chloride Affects the Balance between Potassium Chloride and Potassium Malate in Guard Cells of *Vicia faba* L., *Plant Physiology*, **62**, 84–87.
- READ, N. D., ALLAN, W. T. G., KNIGHT, H., KNIGHT, M. R., MALHO, R., RUSSELL, A., SHACKLOCK, P. S., TREWAVAS, A. J. (1992): Imaging and measurement of cytosolic free calcium in plant and fungal Cells, *Journal of Microscopy*, **166**, 57–86.

- RICHARD P. HAUGLAND (2002): *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Molecular Probes, Inc, 9. Auflage.
- RITTE, G., ROSENFELD, J., ROHRIG, K., RASCHKE, K. (1999): Rates of sugar uptake by guard cell protoplasts of *Pisum sativum* L. related to the solute requirement for stomatal opening, *Plant Physiology*, **121**(2), 647–655.
- ROELFSEMA, M., HEDRICH, R. (2002): Studying guard cells in the intact plant: modulation of stomatal movement by apoplastic factors, *New Phytologist*, **153**(3), 425–431.
- ROELFSEMA, M., PRINS, H. (1998): The membrane potential of *Arabidopsis thaliana* guard cells; depolarizations induced by apoplastic acidification, *Planta*, **205**(1), 100–112.
- ROELFSEMA, M., STAAL, M., PRINS, H. (1998): Blue light-induced apoplastic acidification of *Arabidopsis thaliana* guard cells: Inhibition by ABA is mediated through protein phosphatases, *Physiol. Plant.*, **103**, 466–474.
- ROELFSEMA, M. R. G., STEINMEYER, R., HEDRICH, R. (2001a): Discontinuous single electrode voltage-clamp measurements: assessment of clamp accuracy in *Vicia faba* guard cells, *Journal of Experimental Botany*, **52**(362), 1933–1939.
- ROELFSEMA, M. R. G., STEINMEYER, R., STAAL, M., HEDRICH, R. (2001b): Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane, *Plant Journal*, **26**(1), 1–13.
- SACHS, J. (1887): *Vorlesungen über Pflanzen-Physiologie*, Engelmann, Leipzig, 2 Auflage.
- SANDERS, D. (1984): Gradient-coupled chloride transport in plant cells, in *Chloride Transport Coupling in Biological Membranes and Epithelia*, GERENCSEK, G. A., Hrsg., 62–120, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- SANDERS, D. (1988): Fungi, in *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*, BAKER, D. A., HALL, J. L., Hrsg., 106–165, Longman Scientific & Technical, Burnt Mill.
- SANDERS, D., HANSEN, U.-P. (1981): Mechanism of Cl<sup>-</sup> transport at the plasma membrane of *Chara corallina*: Transinhibition and the determination of H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> binding order from a reaction kinetic model, *J. Membr. Biol.*, **58**, 139–153.
- SAUER, N., FRIEDLÄNDER, K., GRÄML-WICKE, U. (1990): Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*, *EMBO Journal*, **9**(10), 3045–3050.
- SCHMIDT, C., SCHROEDER, J. I. (1994): Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma Membrane of Guard Cells, *Plant Physiol.*, **106**, 383–391.

- SCHROEDER, J. (1988): K<sup>+</sup> Transport Properties of K<sup>+</sup> Channels in the Plasma Membrane of *Vicia faba* Guard Cells, *Journal of General Physiology*, **92**, 667–683.
- SCHROEDER, J. I., HAGIWARA, S. (1989): Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells, *Nature*, **338**, 427–430.
- SCHROEDER, J. I., HEDRICH, R., FERNANDEZ, J. M. (1984): Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*, *Nature*, **312**(5992), 361–362.
- SCHULZ-LESSDORF, B., LOHSE, G., HEDRICH, R. (1996): GCAC1 recognizes the pH gradient across the plasma membrane: A pH-sensitive and ATP-dependent anion channel links guard cell membrane potential to acid and energy metabolism, *Plant Journal*, **10**(6), 993–1004.
- SHOPE, J., DEWALD, D., MOTT, K. (2003): Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization., *Plant Physiol*, **133**(3), 1314–21.
- SIGWORTH, F. J. (1994): Voltage gating of ion channels, *Quart. Rev. o. Biophys*, **27**, 1–40.
- SQUIRE, G. R., MANSFIELD, T. A. (1974): Action of Fusicoccin on Stomatal Guard Cells and Subsidiary Cells, *New Phytol.*, **73**(3), 433–440.
- SYGANOW, A., VON KITZING, E. (1999): (In)validity of the Constant Field and Constant Currents Assumptions in Theories of Ion Transport, *Biophys. J.*, **76**(2), 768–781.
- SZYROKI, A., IVASHIKINA, N., DIETRICH, P., ROELFSEMA, M., ACHE, P., REINTANZ, B., DEEKEN, R., GODDE, M., FELLE, H., STEINMEYER, R., PALME, K., HEDRICH, R. (2001): KAT1 is not essential for stomatal opening, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(5), 2917–2921.
- TALBOTT, L. D., ZEIGER, E. (1998): The role of sucrose in guard cell osmoregulation, *Journal of Experimental Botany*, **49**, 329 – 337.
- TAYLOR, A., ASSMANN, S. (2001): Apparent absence of a redox requirement for blue light activation of pump current in broad bean guard cells, *Plant Physiology*, **125**(1), 329–338.
- THIEL, G., MACROBBIE, E. A. C., BLATT, M. R. (1992): Membrane Transport in Stomatal Guard Cells: The Importance of Voltage Control, *Journal of Membrane Biology*, **126**(1), 1–18.
- THOMAS, D., EAMUS, D., BELL, D. (1999): Optimization theory of stomatal behaviour - II. Stomatal responses of several tree species of north Australia to changes in light, soil and atmospheric water content and temperature, *Journal of Experimental Botany*, **50**(332), 393–400.

- TOMOS, A. D., HINDE, P., RICHARDSON, P., PRITCHARD, J., FRICKE, W. (1994): Microsampling and measurements of solutes in single cells, in *Plant Cell Biology – A Practical Approach*, HARRIS, N., OPARKA, K. J., Hrsg., 297–314, IRL Press, Oxford.
- TOMOS, A. D., LEIGH, R. A. (1999): The Pressure Probe: A Versatile Tool in Plant Cell Physiology, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 447–472.
- TSIEN, R. Y. (1981): A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells, *Nature*, **290**, 527–528.
- TURNER, N. (1973): Action of Fusicoccin on Potassium Balance of Guard Cells of *Phaseolus-Vulgaris*, *Am. J. Bot.*, **60**(7), 717–725.
- TURNER, N., GRANITI, A. (1969): Fusicoccin - A Fungal Toxin that Opens Stomata, *Nature*, **223**(5210), 1070–1071.
- VON MÖHL, H. (1856): Welche Ursachen bewirken die Erweiterung und Verengung der Spaltöffnungen?, *Botanische Zeitung*, **14**, 697–704.
- WEBB, A. A. R., MCAINSH, M. R., MANSFIELD, T. A., HETHERINGTON, A. M. (1996): Carbon dioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium, *Plant Journal*, **9**(3), 297 – 304.
- WOLL, E., GSCHWENTNER, M., FURST, J., HOFER, S., BUEMBERGER, G., JUNGWIRTH, A., FRICK, J., DEETJEN, P., PAULMICHL, M. (1996): Fluorescence-optical measurements of chloride movements in cells using the membrane-permeable dye diHMEQ., *Pflügers Archiv*, **432**(3), 486–93.
- YAMADA, K., NAKATA, M., HORIMOTO, N., SAITO, M., MATSUOKA, H., INAGAKI, N. (2000): Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic beta-cells, *Journal of Biological Chemistry*, **275**(29), 22278–22283.
- ZEIGER, E., HEPLER, P. K. (1977): Light and stomatal function: blue light stimulates swelling of guard cell protoplast, *Science*, **196**, 887–889.
- ZHANG, W.-H., RENGEL, Z., KUO, J. (1998): Determination of intracellular Ca<sup>2+</sup> in cells of intact wheat roots: loading of acetoxymethyl ester of Fluo-3 under low temperature, *The Plant Journal*, **15**(1), 147–151.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Das Schließzellsystem im Regelkreis. . . . .	8
1.2	Schematische Darstellung der Stomabewegung . . . . .	10
2.1	Fluoreszenz-Emissionsspektrum von NBD . . . . .	14
2.2	Prinzip der Spannungsmessung in lebenden Zellen . . . . .	16
2.3	Der Aufbau für die Zweielektroden-Spannungsklemmtechnik . . . . .	18
2.4	Spannungsprotokoll und zugehörige Stromspuren . . . . .	20
2.5	Stromverlauf der H <sup>+</sup> -ATPase . . . . .	24
2.6	Prinzipielle Verläufe der Offenwahrscheinlichkeiten . . . . .	26
2.7	Zeitlicher Verlauf der maximalen Leitfähigkeit bzw. Aktivität . . . . .	27
2.8	Modell für die Simulation der Stomabewegung . . . . .	28
2.9	Ablaufplan des Programms für die Ermittlung stabiler Startwerte . . . . .	30
2.10	Ablaufplan des Programms zur Schließzellsimulation . . . . .	31
2.11	Evolutionärer Algorithmus: Finden neuer Parameter . . . . .	33
2.12	Spektrum von fura red . . . . .	34
2.13	Struktur des Calcium-Fluoreszenzfarbstoffes fura red . . . . .	36
2.14	Pipettenhalterung für Druckinjektion . . . . .	38
2.15	Aufbau zur Druckinjektion von Farbstoffen . . . . .	39
3.1	Vergleich der Öffnungsweiten der Stomata WT - KAT1::En-1 . . . . .	40
3.2	Stoma-Öffnungsweiten in <i>Arabidopsis thaliana</i> in Fusicoccin . . . . .	41
3.3	Schließzelle nach 3 h Inkubation in 2-NBDG im Licht . . . . .	42
3.4	Aufnahme von 2-NBDG unter verschiedenen Bedingungen . . . . .	43
3.5	Membranpotential beim Übergang vom Licht ins Dunkle . . . . .	44
3.6	Membranpotential beim Übergang vom Dunklen ins Licht . . . . .	44
3.7	Typische Stromspuren und Strom-Spannungskennlinien . . . . .	45
3.8	Verlauf des Stromes nach einem Dunkel-Licht Übergang . . . . .	46
3.9	Ströme durch die verschiedenen Transporter . . . . .	48
3.10	Verlauf des Membranpotentials und der internen Kaliumkonzentration . . . . .	49
3.11	Relative Aktivität der H <sup>+</sup> -ATPase . . . . .	50
3.12	Verlauf des Membranpotentials und der Umkehrpotentiale . . . . .	52
3.13	Membranpotential, Ionenkonzentrationen und Turgor bei Stomaöffnung . . . . .	53
3.14	Vergleich von Messung und Simulation . . . . .	54
3.15	Verlauf der Qualitätsfunktion mit fortlaufenden Generationen . . . . .	55

---

3.16	Ströme durch die verschiedenen Transporter . . . . .	56
3.17	Vergleich des von Messung und Simulation beim Stomaschluss . . . . .	57
3.18	Apoplastische Ionenkonzentrationen . . . . .	58
3.19	Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes im Apoplasten . . . . .	59
3.20	Vergleich von Messung und Simulation für apoplastische Messwerte . . . . .	60
3.21	Übersicht über die Ströme durch die verschiedenen Ionentransporter . . . . .	61
3.22	Membranpotential und Umkehrpotentiale bei ohmschen Kaliumkanal . . . . .	62
3.23	Aufnahme verschiedener Farbstoffe in Schließzellen . . . . .	63
3.24	Druckinjizierte Schließzelle . . . . .	64
3.25	Verlauf des Membranpotentials einer druckinjizierten Schließzelle . . . . .	64
4.1	Vorgeschlagene Ionenflüsse beim Stomaschluss . . . . .	72
4.2	Zur Stomabewegung nötige Änderungen von Stellgrößen . . . . .	75

# Abkürzungsverzeichnis

CO <sub>2</sub> .....	Kohlendioxid
Malat <sup>2-</sup> .....	Apfelsäure, C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> <sup>2-</sup>
2-NBDG .....	2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-Glukose
ABA .....	Abscisinsäure
ATP .....	Adenosin-5'-triphosphat
AtSTP1 .....	Arabidopsis thaliana Sugar Transport Protein 1
BTP .....	Bis-Tris-Propan
CCCP .....	Carbonylcyanid- <i>m</i> -Chlorophenylhydrazon
F .....	Faraday-Konstante; 0,64867·10 <sup>4</sup> C mol <sup>-1</sup>
k .....	Boltzmann-Konstante; 1,38066·10 <sup>-23</sup> J K <sup>-1</sup>
KAT1 .....	Kaliumkanal aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
MES .....	2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure
mRNA .....	Boten- (messenger-) Ribonukleinsäure
R .....	allgemeine Gaskonstante; 8,3143 J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>
RNA .....	Ribonukleinsäure
T .....	absolute Temperatur

## Mein Dank

gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Möglichkeit, an dieser interessanten Fragestellung zu arbeiten, sowie für seine Unterstützung und hilfreichen Anregungen und Ideen.

Weiterhin danke ich Dr. Petra Dietrich für die Anleitung in elektrophysiologischen Methoden, Dr. Rob Roelfsema für die Hilfen bei den Einstichmessungen und beiden für Ihre Unterstützung und viele anregende Diskussionen.

Die gesamte Arbeitsgruppe Hedrich hat mit ihrem Zusammenhalt und gegenseitiger Hilfe dafür gesorgt, dass das Arbeitsklima immer gut war.

Stefanie danke ich dafür, dass sie mir immer Rückhalt gegeben und mir geholfen hat, meine Ziele nicht aus den Augen zu verlieren, und meinen Eltern dafür, dass sie immer für mich da waren und mir diesen Weg erst ermöglicht haben.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Ralf Steinmeyer  
Schiestlstraße 13 $\frac{1}{2}$   
97080 Würzburg  
Geb. am 16. August 1969 in Hannover

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

## Schulausbildung

1976–1982 Grundschule, Stadtschule Wunstorf

1982–1984 Orientierungsstufe Nord Wunstorf

1984–1989 Hölty-Gymnasium Wunstorf

1989–1990 Wehrdienst, Munster

## Studium

1990–1992 Grundstudium der Physik in Hannover

1992–1996 Hauptstudium der Physik in Hannover, dabei

1995–1996 Diplomarbeit am Institut für Biophysik

1997 Beginn der Doktorarbeit am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik des Julius-von-Sachs Instituts für Biowissenschaften bei Prof. Dr. R. Hedrich

2002–jetzt Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Rudolf-Virchow-Zentrum, DFG Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe „Molekulare Mikroskopie“ von Prof. Dr. Gregory Harms

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur ganz oder annähernd entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Ich habe bisher noch keinen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Hiermit bewerbe ich mich um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Würzburg, 2005

.....  
Ralf Steinmeyer