

**Änderungen der Membranspannung
und der Osmolarität als Auslöser für
Calciumsignale in Pflanzen – Studien an
Schließzellen von *Nicotiana tabacum*
und *Polypodium vulgare***



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

Vorgelegt von

Lena Johanna Voß

aus Villingen-Schwenningen

Würzburg 2020



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

1. Gutachter: PD Dr. M. Rob G. Roelfsema

2. Gutachter: PD Dr. Ulrich Terpitz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Stomata sind kleine Poren in der Blattoberfläche, die Pflanzen eine Anpassung ihres Wasserhaushalts an sich ändernde Umweltbedingungen ermöglichen. Die Öffnungsweite der Stomata wird durch den Turgordruck der Schließzellen bestimmt, der wiederum durch Ionenflüsse über die Membranen der Zelle reguliert wird. Ein Netzwerk von Signaltransduktionswegen sorgt dafür, dass Pflanzen die Stomabewegungen an die Umgebungsbedingungen anpassen können. Viele molekulare Komponenten dieser Signaltransduktionsketten in Schließzellen von Angiospermen sind inzwischen bekannt und Calcium spielt darin als Signalmolekül eine wichtige Rolle. Weitgehend unbekannt sind dagegen die Mechanismen, die zur Erzeugung von transienten Erhöhungen der Calciumkonzentration führen. Auch die molekularen Grundlagen der Regulierung der Stomaweite in Nicht-Angiospermen-Arten sind bisher nur wenig verstanden. Um zur Aufklärung dieser Fragestellungen beizutragen, wurden in dieser Arbeit Mechanismen zur Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration sowie elektrophysiologische Eigenschaften von Schließzellen untersucht. Der Fokus lag hierbei insbesondere auf der Visualisierung cytosolischer Calciumsignale in Schließzellen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde durch die Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse mittels TEVC (Two Electrode Voltage Clamp) gezielt eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration in einzelnen Schließzellen von *Nicotiana tabacum* ausgelöst. Um die Dynamik der cytosolischen Calciumkonzentration dabei zeitlich und räumlich hoch aufgelöst zu visualisieren, wurde simultan zu den elektrophysiologischen Messungen ein Spinning-Disc-System für konfokale Aufnahmen eingesetzt. Während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse wurde eine transiente Vergrößerung des cytosolischen Volumens beobachtet. Diese lässt sich durch einen osmotisch getriebenen Wasserfluss erklären, der durch die Veränderung der Ionenkonzentration im Cytosol verursacht wird. Diese wiederum wird durch die spannungsabhängige Aktivierung einwärtsgerichteter Kaliumkanäle in der Plasmamembran der Schließzellen und durch den Kompensationsstrom der eingestochenen Mikroelektrode hervorgerufen. Mit Hilfe des calciumsensitiven Farbstoffs Fura-2 konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der freien cytosolischen Calciumkonzentration während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse durch zwei Mechanismen verursacht wird. Der erste Mechanismus ist die Aktivierung hyperpolarisationsaktivierter, calciumpermeabler Kanäle (HACCs) in der Plasmamembran, die schon 1998 von Grabov & Blatt beschrieben wurde. Zusätzlich zu

diesem Mechanismus der Calciumfreisetzung, konnte ein zweiter bislang unbekannter Mechanismus aufgedeckt werden, bei dem Calcium aus intrazellulären Speichern in das Cytosol freigesetzt wird. Dieser Mechanismus hängt mit der oben beschriebenen Vergrößerung des cytosolischen Volumens zusammen und ist wahrscheinlich durch die Änderungen der mechanischen Spannung der Membran bzw. der Osmolarität innerhalb der Zelle bedingt. Diese könnten zu einer Aktivierung mechanosensitiver, calciumpermeabler Kanäle führen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Grundlagen der Regulierung von Stomata in Nicht-Angiospermen. In Schließzellen von *Polypodium vulgare* konnten durch die Anwendung der TEVC-Technik ähnliche spannungsabhängige Ströme über die Plasmamembran gemessen werden wie in Angiospermen. Ebenso wurden durch die Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse an Schließzellen von *Polypodium* und *Asplenium* Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration ausgelöst, die auf die Existenz spannungsabhängiger, calciumpermeabler Kanäle in der Plasmamembran hinweisen. Die Diffusion von Fluoreszenzfarbstoffen in die Nachbarschließzellen nach der iontophoretischen Beladung in *Polypodium*, *Asplenium*, *Ceratopteris* und *Selaginella* zeigte, dass in diesen Arten eine symplastische Verbindung zwischen benachbarten Schließzellen besteht, die an Schließzellen von Angiospermen bisher nicht beobachtet werden konnte. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen von *Polypodium glycyrrhiza* Schließzellen konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung wahrscheinlich durch Plasmodesmata zwischen benachbarten Schließzellen gebildet wird. Durch die Analyse der Calciumdynamik in benachbarten Schließzellen nach hyperpolarisierenden Spannungspulsen stellte sich heraus, dass die Calciumhomöostase trotz symplastischer Verbindung in beiden Schließzellen unabhängig voneinander reguliert zu werden scheint. Im Rahmen der Untersuchungen an Farnschließzellen wurde desweiteren eine Methode zur Applikation von ABA etabliert, die es erlaubt mithilfe von Mikroelektroden das Phytohormon iontophoretisch in den Apoplasten zu laden. Im Gegensatz zu den Schließzellen von *Nicotiana tabacum*, die auf eine so durchgeführte ABA-Applikation mit dem Stomaschluss reagierten, wurde in *Polypodium vulgare* auf diese Weise kein Stomaschluss ausgelöst. Da die ABA-Antwort der Farnstomata aber auch von anderen Faktoren wie Wachstumsbedingungen abhängig ist (Hörak et al., 2017), kann eine ABA-Responsivität in dieser Farnart trotzdem nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde, könnte eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Stomaweite spielen. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wäre die Identifizierung der Kanäle, die an der osmotisch/mechanisch induzierten Calciumfreisetzung aus internen Speichern beteiligt sind,

von großem Interesse. Weiterführende Studien an Schließzellen von Farnen könnten die physiologische Bedeutung der aus Angiospermen bekannten Ionenkanäle für die Stomabewegungen in evolutionär älteren Landpflanzen aufklären und so maßgeblich zum Verständnis der Evolution der Regulierungsmechanismen von Stomata beitragen. Außerdem stellt sich die Frage, welche Rolle die hier gezeigte symplastische Verbindung der Nachbarschließzellen durch Plasmodesmata für die Funktion der Stomata spielt.

Summary

Stomata are small pores in the leaf surface that allow plants to adapt their water balance to changing environmental conditions. The turgor pressure of the guard cells determines the width of the stomatal aperture and is regulated by ion fluxes in or out of the guard cell. A network of different signal transduction pathways is necessary for the adaption of stomatal movements to ambient conditions. Many of these transduction pathways have been described in detail and many of their components have been identified. It is a well known fact that calcium acts as a second messenger in pathways regulating stomatal movements. However, the mechanisms that lead to transient elevations of the cytosolic calcium concentration are largely unknown. The molecular basis of the regulation of stomatal aperture in non-angiosperm species is also poorly understood. In order to gain new insights into these topics, mechanisms of calcium elevation and electrophysiological properties of guard cells were studied, focussing especially on the visualization of the cytosolic calcium concentration in guard cells.

In the first part of this study, the application of hyperpolarizing voltage pulses by means of TEVC (Two Electrode Voltage Clamp) was used to specifically trigger an increase in the cytosolic calcium concentration in individual guard cells in the angiosperm model plant *Nicotiana tabacum*. To visualize the dynamics of the cytosolic calcium concentration with high temporal and spatial resolution, a spinning disc system for confocal imaging was used simultaneously with the electrophysiological recordings. During the application of hyperpolarizing voltage pulses a transient increase in cytosolic volume was observed. This increase can be explained by an osmotically driven water flux caused by changes of the cytosolic ion concentration. These in turn are caused by the voltage-dependent activation of inward rectifying potassium channels in the guard cell plasma membrane and by the compensating current from the impaled microelectrode. Using the calcium-sensitive dye Fura-2, it could be shown that two mechanisms lead to the elevation of the cytosolic calcium concentration during the application of hyperpolarizing voltage pulses. The first mechanism is the activation of hyperpolarization-activated calcium permeable channels (HACCs) in the plasma membrane, which has already been described in 1998 by Grabov & Blatt. In addition to this mechanism of calcium release, a second previously unknown mechanism was discovered in which calcium is released into the cytosol from intracellular stores. This mechanism is related to the increase in cytosolic volume we described above and is probably caused by changes in membrane tension or osmolarity within the

cell. These changes could lead to an activation of mechanosensitive calcium-permeable channels.

The second part of this thesis deals with the molecular basis of the regulation of stomata in non-angiosperms. In guard cells of *Polypodium vulgare* voltage-dependent currents across the plasma membrane similar to those described in angiosperm model plants could be measured using TEVC. Furthermore, the application of hyperpolarizing voltage pulses induced increases in cytosolic calcium concentration in guard cells of *Polypodium* and *Asplenium* indicating the existence of voltage-dependent calcium permeable channels in the plasma membrane. The diffusion of iontophoretically injected fluorescent dyes into the neighboring guard cells in *Polypodium*, *Asplenium*, *Ceratopteris* and *Selaginella* showed that in these species a symplastic connection between neighboring guard cells exists, which could not be observed in guard cells of angiosperms. Electron microscopic images of *Polypodium glycyrrhiza* guard cells showed that this connection is probably formed by plasmodesmata between adjacent guard cells. Analysis of the calcium dynamics in neighboring guard cells after hyperpolarizing voltage pulses revealed that calcium homeostasis seems to be regulated independently in both guard cells despite their symplastic connection. As part of the investigations on guard cells of ferns, a new method for the application of ABA was established, which allows the phytohormone to be charged iontophoretically into the apoplast with the aid of microelectrodes. In contrast to the guard cells of *Nicotiana tabacum*, which reacted with loss of turgor and subsequential stomatal closure to this method of ABA-application, no closure of the stomata could be induced in *Polypodium vulgare* in this way. However, since the ABA response of fern stomata is also dependent on other factors such as growth conditions (Hörak et al., 2017), an ABA-responsiveness in this fern species can still not be completely excluded.

The release of calcium from intracellular stores, as shown in this work, could play an important role for the regulation of stomatal aperture. To clarify this question, the identification of the channels involved in osmotically/mechanically induced calcium release from internal stores would be of great interest. Further studies on fern guard cells could clarify the physiological significance of ion channels known from angiosperms for the stomatal movements in early land plants, and thus contribute significantly to the understanding of the evolution of stomatal regulation. In addition, the question arises as to what role the symplastic connection of the neighboring guard cells through plasmodesmata plays for the function of stomata.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	IV
1 Einleitung	1
1.1 Stomata und die Funktion von Schließzellen	1
1.2 Ionenflüsse und Transportvorgänge bei Stomabewegungen	4
1.2.1 Stomaöffnung	4
1.2.2 Stomaschluss	5
1.2.3 Transport von Kalium bei Stomabewegungen	8
1.2.4 Transport von Anionen in Schließzellen	12
1.3 Der Transport von Calcium in Schließzellen und die Rolle für die Signaltransduktion	16
1.3.1 Calciumtransporter und -kanäle	18
1.3.2 Calciumsignaturen und die Rolle intrazellulärer Calciumspeicher	24
1.3.3 Entschlüsselung der Calciumsignale	26
1.4 ABA-vermittelter Stomaschluss	27
1.5 Evolutionsgeschichte der Stomata	32
1.5.1 Evolutionärer Ursprung von Stomata und Funktionswandel	32
1.5.2 Evolution des ABA-Signaltransduktionsweges in Schließzellen	33
1.6 Zielsetzung	36
2 Material und Methoden	39
2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht	39
2.1.1 <i>Nicotiana tabacum</i>	39
2.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
2.1.3 <i>Polypodium vulgare</i> und <i>Asplenium scolopendrium</i>	40
2.1.4 <i>Ceratopteris richardii</i>	40
2.2 Elektrophysiologische Methoden	40
2.2.1 Einstich in Schließzellen: die TEVC-Technik	40
2.2.2 Vorbereitung der Pflanzen für die Messung	41
2.2.3 Aufbau des Messplatzes	42
2.2.4 Vorbereitung der Elektroden	45

2.2.5	Bad- und Elektrodenlösungen	46
2.2.6	Pulsprotokolle	47
2.2.7	Datenauswertung für elektrophysiologische Messungen	48
2.2.8	Elektroinfusion	48
2.3	Fluoreszenzmikroskopie	49
2.3.1	CARV-Spinning-Disc System	49
2.3.2	Konfokale Fluoreszenzaufnahmen mit Oregon-Green-BAPTA und Lucifer Yellow	50
2.3.3	Fluoreszenzaufnahmen mit Fura-2	51
2.3.4	Weitere Fluoreszenzfarbstoffe und genetisch codierte Fluoreszenz- proteine	52
2.3.5	Beladung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen	52
2.3.6	Verwendete Filterkombinationen	53
2.3.7	Datenauswertung Fluoreszenzmikroskopie	54
2.4	Molekularbiologische Methoden	56
2.4.1	Bakterienstämme und Anzuchtsbedingungen	56
2.4.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	57
2.4.3	Hitzeschock-vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	58
2.4.4	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	59
2.4.5	<i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von <i>A. thaliana</i>	60
2.4.6	<i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von <i>N. tabacum</i>	60
2.4.7	Klonierung mittels USER TM -System	62
3	Ergebnisse	66
3.1	Konfokales Imaging von Tabak-Schließzellen mit dem Spinning-Disc- System	66
3.1.1	Beladung von Schließzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen	66
3.1.2	Mechanisch ausgelöste Änderung der Calciumkonzentration in Tabak-Schließzellen	69
3.2	Die Auswirkungen hyperpolarisierender Spannungspulse auf die cytosolische Calciumkonzentration und auf das Volumen des Cytosols	70
3.2.1	Hyperpolarisierende Spannungspulse führen zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration und zu einer transienten Änderung des cytosolischen Volumens	70
3.2.2	Die Vergrößerung des cytosolischen Volumens ist eine Folge der Strominjektion während der Applikation von hyperpolarisierenden Spannungspulsen	79

3.2.3	Cytosolische Volumenänderungen bewirken einen zusätzlichen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration	90
3.3	Untersuchung elektrophysiologischer und anatomischer Eigenschaften von Farn-Schließzellen	94
3.3.1	Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von Schließzellen in Farnen	94
3.3.2	Elektrophysiologische Charakterisierung der Ströme in Schließzellen von <i>Polypodium vulgare</i> und <i>Asplenium scolopendrium</i>	95
3.3.3	Hyperpolarisationsaktivierte Calciumkanäle in <i>Polypodium</i> und <i>Asplenium</i>	98
3.3.4	Schließzellen in <i>Polypodium</i> und <i>Asplenium</i> sind miteinander verbunden	103
3.3.5	Trotz symplastischer Verbindung werden Calciumsignale in den Schließzellen von <i>Polypodium</i> und <i>Asplenium</i> unabhängig voneinander reguliert	105
3.4	Elektroinfusion als Methode der ABA-Applikation	107
4	Diskussion	110
4.1	Der Einsatz eines Spinning-Disc-Systems eröffnet neue Möglichkeiten für hochaufgelöstes Calcium-Imaging in Schließzellen	110
4.2	Strominjektion führt zu einem osmotisch getriebenen Wassereinstrom ins Cytosol	112
4.2.1	Die Rolle osmotisch getriebener Wasserflüsse	115
4.2.2	Reversibilität der Volumenänderungen nach Beenden der Spannungspulse	117
4.3	Transiente Calciumerhöhungen durch hyperpolarisierende Spannungspulse werden durch zwei Mechanismen verursacht.	118
4.3.1	Was können Änderungen der mechanischen Membranspannung und der Osmolarität bewirken?	121
4.4	Vergleichende Analysen von Schließzellen verschiedener Farnspezies	122
4.4.1	In Farn-Schließzellen sind ähnliche spannungsabhängige Ströme messbar wie in Angiospermen	123
4.4.2	Strominjektion hat keine messbaren Auswirkungen auf das cytosolische Volumen in <i>Polypodium</i>	126
4.4.3	Schließzellen in Farnen sind durch Plasmodesmata symplastisch verbunden	127
4.4.4	Die Calciumhomöostase wird in beiden Schließzellen unabhängig voneinander reguliert	129
4.4.5	Die Rolle von ABA beim Stomaschluss in <i>Polypodium vulgare</i>	129

4.5	Ausblick	130
	Literaturverzeichnis	132
5	Anhang	175
5.1	Ergänzende Abbildungen	175
5.2	Abkürzungsverzeichnis	177
5.3	Publikationsliste	182
	Danksagung	183
	Erklärung	184

1 Einleitung

Pflanzen können als photoautotrophe Lebewesen das Sonnenlicht nutzen, um CO_2 in energiereiche Kohlenstoffverbindungen umzusetzen. Im Gegensatz zu Tieren sind sie deswegen unabhängig von der Aufnahme organischer Kohlenstoffverbindungen. Die Verfügbarkeit von CO_2 ist für Pflanzen dagegen essentiell. Die im Wasser lebenden Vorfahren der Landpflanzen konnten CO_2 sowie benötigte anorganische Nährstoffe direkt aus dem Wasser über die gesamte Oberfläche aufnehmen. Die Erschließung des Landes als Lebensraum durch die Pflanzen war nur durch vielfältige Anpassungen an die terrestrischen Bedingungen möglich. Da das Wasser an Land nur als begrenzte Ressource zur Verfügung steht, mussten Strategien zum Schutz vor Austrocknung und auch zur Nährstoffaufnahme entwickelt werden (Stocker, 1956a). Bei einigen Moosen, die zu den evolutionär ältesten Gruppen der Landpflanzen gehören, erfolgt die Wasseraufnahme über die gesamte Oberfläche. Sie benutzen eine äußere, kapillare Wasserleitung und können durch ihre Wuchsform in gewissem Maße Wasser speichern (Stocker, 1956b). Andere Moose weisen spezielle Strukturen auf, die eine innere Wasserleitung begünstigen und die an Leitgefäße der höheren Pflanzen erinnern. Die ersten Gefäßpflanzen, zu denen die Farne und Bärlappgewächse gehören, besitzen Wurzeln zur Wasseraufnahme und spezielle Leitgefäßstrukturen zur effektiven inneren Wasserleitung (Huber, 1956). Zum Schutz der oberirdischen Pflanzenteile vor Verdunstung dient eine aufgelagerte wasserundurchlässige Schutzschicht, die Cuticula. Diese besteht aus Wachsen, die von Epidermiszellen synthetisiert und abgegeben werden (Sitte et al., 1998). Diese Schutzbarriere verhindert nicht nur die Verdunstung von Wasser, sondern behindert auch die Aufnahme von CO_2 aus der Luft, welche Voraussetzung für die Photosynthese ist. Für die Evolution der Gefäßpflanzen war es also essentiell, den Verdunstungsschutz durch die Cuticula mit einem funktionierenden Gaswechsel zu kombinieren. Das wurde durch die Entwicklung von Stomata ermöglicht.

1.1 Stomata und die Funktion von Schließzellen

Stomata (von griechisch stoma = Mund) oder Spaltöffnungen sind regulierbare Poren, die sich an der Oberfläche oberirdischer Pflanzenteile, vor allem aber an der Blattoberfläche, befinden. Sie werden von spezialisierten Zellen in der Epidermis, den Schließzellen, ge-

bildet. Stomata bestehen aus zwei länglichen, nebeneinanderliegenden Schließzellen, die nur an ihren Enden verbunden sind und den Porus umgeben (Sitte et al., 1998). Dieser stellt die direkte Verbindung zwischen Außenluft und Interzellularräumen in der Pflanze dar. Durch Änderung der Öffnungsweite regeln Stomata den Wasser- und Gashaushalt der Pflanzen. Eine Verkleinerung der Poren begrenzt den Wasserverlust durch Transpiration, gleichzeitig allerdings auch die Aufnahme von CO_2 für die photosynthetische Kohlenstofffixierung (Willmer & Fricker, 1996).

Die Anpassung der Öffnungsweite der Stomata erfolgt als Reaktion auf verschiedene Umweltbedingungen. Licht führt im Allgemeinen zur Öffnung der Stomata, um die photosynthetische CO_2 -Fixierung zu ermöglichen. Im Dunkeln schließen die Stomata, um die Verdunstung von Wasser zu vermindern. Eine Ausnahme hiervon stellen die sogenannten CAM-Pflanzen (Crassulaceen Acid Metabolism) dar, die in sehr trockenen Gebieten wachsen und ihre Stomata nachts öffnen (Kluge & Ting, 2012). Auf Wassermangel reagieren Pflanzen mit einem Schließen der Stomata, um die Verdunstung von Wasser zu verhindern. Eine niedrige CO_2 -Konzentration führt dagegen dazu, dass die Stomata weiter geöffnet werden, um die Photosyntheseleistung aufrecht zu erhalten. Die Öffnungsweite der Stomata stellt für die Pflanze einen Kompromiss zwischen Minimierung des Wasserverlustes und Ermöglichung der CO_2 -Aufnahme zur Photosynthese dar (Willmer & Fricker, 1996). Neben der Regulierung des Wasserhaushalts haben die Stomata eine Schutzfunktion. So führen der Befall mit Bakterien oder Pilzen sowie Schadstoffe in der Luft wie zum Beispiel Ozon dazu, dass die Stomata geschlossen werden (Melotto et al., 2006, Willmer & Fricker, 1996).

Eine Vielzahl von Reizen und Faktoren beeinflusst also die Regulierung der Öffnungsweite der Stomata. Eine detaillierte Übersicht über den Einfluss verschiedener Faktoren ist beispielsweise in Willmer & Fricker, 1996 zu finden. Die verschiedenen Faktoren treten in der Umwelt immer in Kombination miteinander auf. Dabei kann ein Faktor auch die Reaktion auf einen anderen beeinflussen. Eine erhöhte CO_2 -Konzentration verstärkt zum Beispiel die Stomaschlussantwort auf das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) oder auf osmotischen Stress (Leymarie et al., 1999, Chater et al., 2015). Diese Integration verschiedener Faktoren in die Regulierung der Öffnungsweite der Stomata ermöglicht der Pflanze eine genaue Anpassung ihres Gaswechsels und Wasserhaushalts an die herrschenden Umweltbedingungen, erfordert jedoch ein komplexes Signalnetzwerk. Die Pflanze braucht dazu die Möglichkeit, die unterschiedlichen Faktoren wahrzunehmen und sie mit Hilfe von Signaltransduktionsketten weiterzuleiten, damit sie als Antwort in eine angepasste Öffnungsweite der Stomata übersetzt werden können. Auch auf der Ebene der Entwicklung von Stomata erfolgt eine Anpassung an die Umweltbedingungen (zusammengefasst

in Casson & Gray, 2008), sodass der Wasserhaushalt zusätzlich zur angepassten Stomaöffnungsweite auch über die Anzahl der Stomata beeinflusst werden kann.

Mechanistisch gesehen erfolgt die Änderung der Öffnungsweite der Poren über Änderungen im Volumen der Schließzellen. Diese Volumenänderungen werden hydraulisch angetrieben. Dabei führt der Einstrom von Wasser in die Schließzellen zu einer Zunahme des Volumens und des Turgordrucks und dadurch zur Stomaöffnung. Ein Wasserausstrom führt dagegen zur Abnahme des Volumens und des Turgordrucks der Schließzellen und damit zum Stomaschluss (Roelfsema & Hedrich, 2005). Durch spezielle Anpassung der Zellwand der Schließzellen wird durch die Volumenzunahme der Spalt zwischen beiden Zellen vergrößert. Bei den meisten nierenförmigen Schließzellen, die bei vielen Di- und Monokotyledonen vorkommen, ist die Zellwand durch radiär angeordnete Zellulosefibrillen so verstärkt, dass sie sich nur in Längsrichtung ausdehnen kann. Die Länge des Stomaapparates bleibt dabei gleich, wodurch sich die Krümmung der Zelle verstärkt und der Spalt zwischen den Zellen weitet. Bei den für Gräsern typischen hantelförmigen Schließzellen schwellen durch den Wassereinstrom die Enden an. Die mittleren Bereiche der Zellwände sind bei diesem Schließzelltyp verstärkt und werden durch das Anschwellen weiter auseinandergedrückt, was eine Vergrößerung der Pore zur Folge hat (Willmer & Fricker, 1996).

Der Ein- und Ausstrom von Wasser, der die Stomabewegungen bewirkt, wird durch die Aufnahme bzw. Abgabe von Ionen und anderen osmotisch wirksamen Molekülen hervorgerufen. Die Hauptrolle spielt dabei Kalium, das während der Stomaöffnung in den Schließzellen akkumuliert (Fischer, 1968). Um die positive Ladung des Kaliums auszugleichen, spielen die Anionen Chlorid, Malat und eventuell Nitrat eine entscheidende Rolle (Allaway, 1973, Raschke & Schnabl, 1978, Raghavendra, 1980, Guo et al., 2003). Auch eine Akkumulation von Zucker wurde in Zusammenhang mit der Stomaöffnung gebracht (Talbot & Zeiger, 1996, Ritte et al., 1999, Santelia & Lawson, 2016). Viele Transportprozesse und metabolische Prozesse sind notwendig, um den Ionenhaushalt in Schließzellen und damit die Stomabewegungen zu regulieren. Diese werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

1.2 Ionenflüsse und Transportvorgänge bei Stomabewegungen

1.2.1 Stomaöffnung

Voraussetzung für den osmotisch angetriebenen Wassereinstrom in die Schließzellen ist die Aufnahme von Ionen. Da vollentwickelte Schließzellen nicht über Plasmodesmata mit benachbarten Zellen verbunden sind (Wille & Lucas, 1984), erfolgt die Aufnahme der Ionen aus dem Apoplasten (Bowling, 1987). Die aufgenommenen Ionen werden hauptsächlich in der Vakuole der Schließzellen gespeichert (Roelfsema & Hedrich, 2005). Deswegen sind Transportprozesse über zwei Membranen, nämlich die Plasmamembran und die vakuoläre Membran, notwendig. Der Transport von Ionen über eine Membran kann durch Kanäle in Richtung eines elektrochemischen Gradienten erfolgen (passiver Transport) oder auch unter Energieaufwand mittels Transportern aktiv entgegen eines Gradienten bewerkstelligt werden. Die Energie, die für den Transport gegen ein elektrochemisches Gefälle benötigt wird, kann entweder direkt durch die Hydrolyse von ATP oder Pyrophosphat bereitgestellt werden (primär aktiver Transport) oder aus der Kopplung an ein anderes Transportsystem gewonnen werden (sekundär aktiver Transport). Dafür generiert ein primäres Transportsystem einen Ionengradienten, der durch das elektrochemische Potential gespeicherte Energie darstellt. Diese kann genutzt werden um andere Ionenflüsse oder Transportsysteme anzutreiben (Sze et al., 1999). Ein Beispiel dafür sind Cotransporter, wie Protonen-Anionen-Symporter, die einen H^+ -Gradienten nutzen können, um Anionen entgegen ihres elektrochemischen Gradienten zu transportieren. In den Schließzellen stellt die H^+ -ATPase in der Plasmamembran als primäres Transportsystem die treibende Kraft dar, die während der Stomaöffnung den Einstrom von Kalium und anderen Ionen in die Schließzelle ermöglicht (Pandey et al., 2007, Wang et al., 2014, Inoue & Kinoshita, 2017). Durch die Hydrolyse von ATP werden Protonen aus dem Cytosol in den Apoplasten abgegeben, wodurch das Membranpotential der Schließzellen hyperpolarisiert. Durch diese Hyperpolarisierung wird das Membranpotential negativer als das Gleichgewichtspotential von Kalium und spannungsabhängige Kaliumkanäle werden aktiviert, wodurch in den Schließzellen Kaliumionen akkumulieren (Roelfsema & Hedrich, 2005, Pandey et al., 2007). Die Hyperpolarisierung der Plasmamembran durch die H^+ -ATPase ist also Voraussetzung zur Öffnung der Stomata und stellt damit einen wichtigen Regulationspunkt dar. So wirkt Licht, ein zentraler Faktor für die Stomaöffnung, über die Aktivierung der H^+ -ATPase. Mitte der 80er Jahre konnte gezeigt werden, dass Blaulicht in Schließzellprotoplasten von *Vicia faba* einen Protonenausstrom auslöst (Assmann et al.,

1985 und Shimazaki et al., 1986). Auch in intakten *Vicia faba* Pflanzen konnte durch Einstichsmessungen eine durch Blaulicht induzierte Hyperpolarisierung der Plasmamembran belegt werden (Roelfsema et al., 2001). Diese Aktivierung wird über die Blaulichtrezeptoren PHOT1 und PHOT2 vermittelt (Kinoshita et al., 2001). Dabei wird durch die Bindung eines 14-3-3 Proteins an die H⁺-ATPase eine autoinhibitorische Domäne am C-Terminus der H⁺-ATPase gelöst (Emi et al., 2001, Fuglsang et al., 2003). Zusätzlich zu dieser blaulichtabhängigen Aktivierung durch Phototropine führt Licht auch über die Photosynthese zur Aktivierung der H⁺-ATPase. Dabei ist die durch die Photosynthese niedriger werdende CO₂-Konzentration das entscheidende Signal (Roelfsema et al., 2002).

Der durch die Hyperpolarisierung ausgelöste Kaliumeinstrom erfolgt dem elektrochemischen Gradienten nach durch einwärtsgerichtete Kanäle und muss von einer Erhöhung der Anionenkonzentration in der Schließzelle begleitet werden, um die positive Ladung der Kaliumionen auszugleichen. Dabei dienen die Anionen Malat (Outlaw & Lowry, 1977, Allaway, 1973) und je nach Spezies und Verfügbarkeit Chlorid (Penny et al., 1976, Raschke & Schnabl, 1978) und wahrscheinlich auch Nitrat (Raghavendra, 1980, Guo et al., 2003) als Gegenionen (Eisenach & De Angeli, 2017). Malat entsteht dabei in den Schließzellen selbst durch den Abbau von Stärke (Van Kirk & Raschke, 1978, Outlaw & Manchester, 1979), während Chlorid und Nitrat durch sekundär aktiven Transport, wahrscheinlich über H⁺-Anionen-Symporter, in die Schließzelle aufgenommen werden (Guo et al., 2003, Kollist et al., 2014).

Ein Großteil der während der Stomaöffnung aufgenommenen Ionen wird in der Vakuole gespeichert (Roelfsema & Hedrich, 2005), was den weiteren Transport über die vakuoläre Membran erfordert. Die K⁺-Aufnahme erfolgt dort gegen den elektrischen und chemischen Gradienten über Transporter (Kollist et al., 2014) während der Anioneneinstrom dem elektrischen Gradienten folgend durch Kanäle vermittelt wird. Die Energie für die Transportprozesse wird hierbei von V-Typ ATPasen und Pyrophosphatasen bereitgestellt (Eisenach & De Angeli, 2017). Zusammenfassend zeigt Abbildung 1.1 A ein Modell der Transportvorgänge in Schließzellen, die zur Stomaöffnung führen. Der Transport von Kalium und die Rolle der Anionenkanäle werden jeweils in einem späteren Abschnitt detailliert behandelt (Abschnitt 1.2.3 und 1.2.4).

1.2.2 Stomaschluss

Um die Stomata zu schließen, müssen die in den Schließzellen akkumulierten Ionen wieder abgegeben werden. Durch den nachfolgenden Wasserausstrom verkleinert sich das Volumen der Schließzelle und der Turgordruck verringert sich. Tanaka et al. konnten

2007 mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen die Veränderungen der Plasmamembran und der vakuolären Membran während des Stomaschlusses sichtbar machen. Anhand einer 3D-Rekonstruktion konnten sie die Volumenänderung der Schließzellen und der Vakuole sowie die Änderung der Oberflächengrößen berechnen. Für Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* wurde auf diese Weise eine Abnahme des Schließzellvolumens um circa 10 % und des vakuolären Volumens um etwa 20 % bestimmt. Dabei treten Veränderungen an der Oberfläche der Vakuole in Form von intravakuolären Strukturen und Einstülpungen der vakuolären Membran auf, die als Membranreserven für die Vergrößerung der Vakuole bei der Stomaöffnung nötig sind (Gao et al., 2005, Tanaka et al., 2007).

Der Stomaschluss ist durch eine Depolarisierung der Plasmamembran der Schließzellen gekennzeichnet. Bei *Vicia faba* ist beispielsweise eine Änderung des Membranpotentials von -110 mV im geöffneten Zustand auf -50 mV beschrieben worden (Roelfsema & Hedrich, 2005, Roelfsema et al., 2001). Diese Depolarisierung kann durch unterschiedliche Umweltsignale, wie Trockenheit, eine hohe interne CO₂-Konzentration und Dunkelheit, ausgelöst werden (Roelfsema et al., 2001, Roelfsema et al., 2004, Roelfsema et al., 2002, Ishikawa et al., 1983) und wird durch die Aktivierung von Anionenkanälen und die fehlende Aktivierung der H⁺-ATPase verursacht. Nach der Depolarisierung ist das Membranpotential positiver als das Gleichgewichtspotential von Kalium und es kann ein Efflux von Kalium durch spannungsaktivierte Kaliumkanäle in der Plasmamembran erfolgen. Die Transportprozesse, die beim Stomaschluss an der vakuolären Membran stattfinden, sind weniger gut aufgeklärt. Durch die Aktivierung eines Kaliumefflux durch den Kanal TPK1 (Two Pore K⁺, Gobert et al., 2007) könnte es zu einer Depolarisierung der vakuolären Membran kommen, die ihrerseits den Efflux von Anionen aus der Vakuole durch Anionenkanäle wie ALMTs (Aluminum Activated Malate Transporter) ermöglichen würde (Kollist et al., 2014). Da die Vakuolen von Schließzellen für Einstichmessungen nicht zugänglich sind und isolierte Vakuolen aufgrund des fehlenden Cytoplasmas kein Modell für die realistischen Bedingungen während des Stomaschlusses sind, konnte die Depolarisierung der vakuolären Membran beim Stomaschluss bis heute noch nicht gezeigt werden. Die am Stomaschluss beteiligten Transportprozesse über beide Membranen sind in Abbildung 1.1 B zusammenfassend dargestellt.

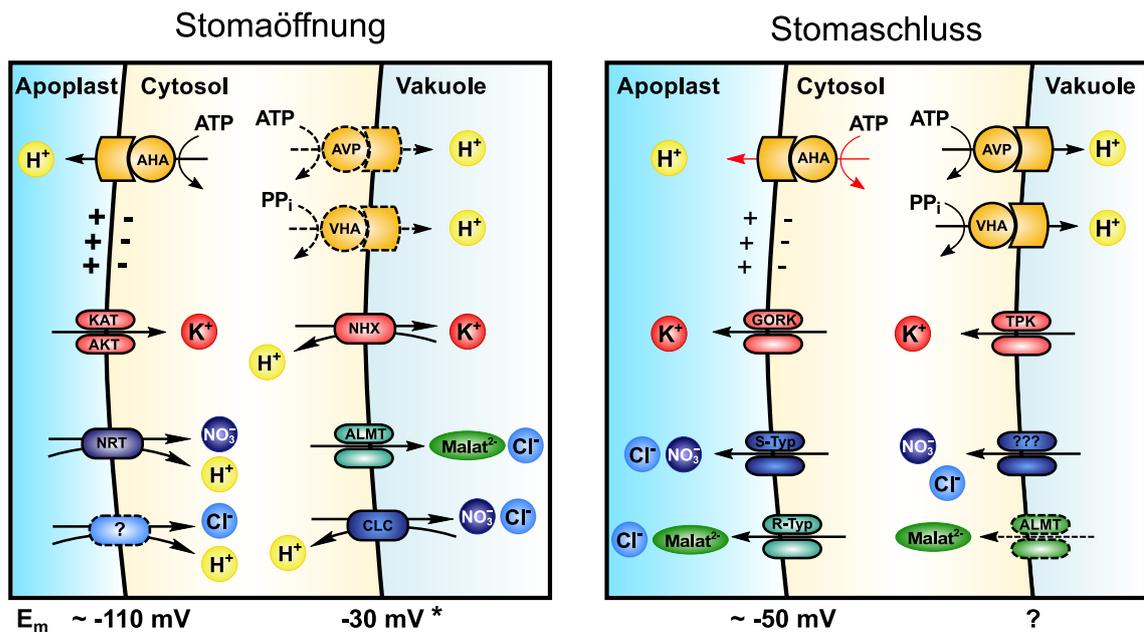


Abb. 1.1: Übersicht über Ionenflüsse und Transportprozesse während der Stomabewegungen. (A): Stomaöffnung. Die Aktivität der H^+ -ATPase wird durch Blaulicht aktiviert (Assmann et al., 1985, Shimazaki et al., 1986) und führt zu einer Hyperpolarisierung der Plasmamembran auf ca. -110 mV (Roelfsema & Hedrich, 2005). Durch das hyperpolarisierte Membranpotential sind einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle aus der Shaker-Familie aktiv, und K^+ kann aufgenommen werden (Schroeder et al., 1987, Roelfsema et al., 2001). In der vakuolären Membran transportieren eine H^+ -ATPase (VHA - vacuolar-type H^+ -ATPase) und eine PPase (AVP - Arabidopsis vacuolar pyrophosphatase) die Protonen aus dem Cytosol in die Vakuole (Eisenach & De Angeli, 2017). Es konnte bisher aber nicht gezeigt werden, dass die Aktivität dieser beiden Protonenpumpen für die Stomaöffnung essentiell ist (Eisenach & De Angeli, 2017). Unter Ausnutzung des Protonengradienten über die vakuoläre Membran wird K^+ von NHX-Transportern in die Vakuole transportiert (Barragán et al., 2012). Anionen werden wahrscheinlich über Anionen-Protonen-Symporter wie z. B. NRTs ins Cytosol transportiert (Kollist et al., 2014, Guo et al., 2003). Die Aufnahme der Anionen in die Vakuole erfolgt über Kanäle wie z. B. ALMT9 (De Angeli et al., 2013) und über Transporter der CLC-Familie (Josier et al., 2010, Wege et al., 2014). (B): Stomaschluss. Der Stomaschluss ist durch eine Depolarisierung der Plasmamembran auf ca. -50 mV gekennzeichnet (Roelfsema & Hedrich, 2005). Diese wird durch die Aktivierung von S-Typ und R-Typ Anionenkanälen und durch die Inhibierung der H^+ -ATPase verursacht (Brault et al., 2004, Roelfsema et al., 2004). Durch das depolarisierte Membranpotential kommt es zur Aktivierung des auswärtsgerichteten K^+ -Kanals GORK (Ache et al., 2000, Hosy et al., 2003, Roelfsema & Hedrich, 2005). Die ATPase und PPase in der vakuolären Membran spielen eine Rolle für die Ansäuerung der Vakuole während des Stomaschlusses (Bak et al., 2013, Eisenach & De Angeli, 2017). Der Transport von K^+ aus der Vakuole könnte über den Kanal TPK1 erfolgen (Kollist et al., 2014, Gobert et al., 2007). Es wird davon ausgegangen, dass die Anionen entlang ihres Konzentrationsgradienten durch Kanäle aus der Vakuole strömen. Der Ausstrom von Malat könnte dabei durch AtALMT6 und/oder ALMT4 vermittelt werden (Meyer et al., 2011, Eisenach et al., 2017). Wie sich das Membranpotential des Tonoplasten während des Stomaschlusses verhält ist umstritten (siehe Eisenach & De Angeli, 2017). * Das Membranpotential des Tonoplasten wurde nicht für Schließzellen bestimmt (siehe Wang et al., 2015b).

1.2.3 Transport von Kalium bei Stomabewegungen

Kalium ist für Pflanzen ein wichtiges Nährelement und das am meisten vorkommende Ion im Cytosol. Die cytosolische Kaliumkonzentration wird auf einen Wert von 80-100 mM reguliert (Leigh, 2001, Gierth & Mäser, 2007). Die vakuoläre Kaliumkonzentration ist variabler und hängt unter anderem von der Verfügbarkeit von Kalium ab (Gierth & Mäser, 2007). Kaliumionen erfüllen verschiedene Funktionen in der Pflanzenzelle wie die elektrische Neutralisierung anionischer Gruppen, die Kontrolle über das Membranpotential und die Wirkung als Cofaktor für die Aktivierung vieler Enzyme (Lebaudy et al., 2007). Das vakuoläre Kalium hat außerdem eine osmoregulatorische Wirkung, die die Grundlage für die Stomabewegungen darstellt (Fischer, 1968). Kalium kann für die Stomaöffnung zwar durch Natrium ersetzt werden, allerdings kann anschließend kein Stomaschluss mehr erfolgen (Roelfsema & Hedrich, 2005). Der Gehalt an Kalium in Schließzellen von *Vicia faba* steigt während der Stomaöffnung von ca. 0,3 pmol auf ca. 2,5 pmol an. Daraus lässt sich ein Anstieg des Kaliumgehalts von 0,18 bzw. 0,36 pmol pro μm Öffnungsweite berechnen, je nachdem ob die Schließzellen in Epidermisstreifen vorliegen oder von intakten Epidermiszellen umgeben sind (MacRobbie, 1987, Roelfsema & Hedrich, 2005). Für die Konzentration von Kalium in Cytosol, Vakuole und Apoplast findet man eine Aufstellung in Jezek & Blatt, 2017, allerdings zeigen die Werte zum Teil eine hohe Varianz.

Um den Transport von Kalium in beide Richtungen zu bewerkstelligen, sind spezielle Kanäle und Transporter notwendig. Mithilfe elektrophysiologischer und molekularbiologischer Techniken und durch die Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) konnten viele Kaliumkanäle und -transporter identifiziert und charakterisiert werden. 1984 wurden von Schroeder et al. erstmals kaliumselektive Ströme an der Plasmamembran von *Vicia faba* Schließzellen gemessen. Ungefähr zehn Jahre später wurden dann KAT1 (K^+ -channel in *Arabidopsis thaliana* 1) (Anderson et al., 1992) und AKT1 (*Arabidopsis thaliana* K^+ -transporter 1) (Sentenac et al., 1992) als erste Kaliumkanäle aus *Arabidopsis thaliana* auf molekularer Ebene identifiziert. Insgesamt sind in *Arabidopsis* 15 Gene für Kaliumkanäle bekannt, die anhand ihrer Struktur in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: die Shaker-Kanäle mit neun Vertretern, die TPKs (Two Pore K^+) mit fünf und ein einzelner IRK-like (Inwardly Rectifying K^+) Kaliumkanal (Hedrich, 2012).

1.2.3.1 Kaliumtransport über die Plasmamembran

Für den Kaliumtransport über die Plasmamembran während der Schließzellbewegungen sind hauptsächlich Kanäle der Shaker-Familie verantwortlich. Diese Kanäle sind homo-

log zu den tierischen Shaker-Kaliumkanälen, von denen der erste 1987 in *Drosophila* identifiziert wurde (Tempel et al., 1987, Papazian et al., 1987). Sie sind in der Plasmamembran lokalisiert (Hedrich, 2012) und zeigen spannungsabhängige Ströme, die in den 80er Jahren mit Hilfe von Patch-Clamp-Messungen an Schließzellprotoplasten charakterisiert wurden (Schroeder et al., 1987). Ein funktioneller Shaker-Kanal setzt sich aus vier alpha-Untereinheiten zusammen (Daram et al., 1997).

Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sich die Kanäle der Shaker-Familie in ihrer Spannungsabhängigkeit und können so als ein- und auswärtsgleichrichtende Kaliumkanäle fungieren (Kollist et al., 2014, Dreyer & Blatt, 2009). In Einstichsmessungen an intakten Schließzellen, wie sie auch in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten diese zwei Arten von Kaliumströmen durch die Anwendung von Spannungspulsen in verschiedenen Pflanzenarten gezeigt werden (Roelfsema & Hedrich, 2005). Die einwärtsgerichteten Kanäle sind für die Aufnahme von Kalium während der Stomaöffnung verantwortlich. Sie aktivieren in *Vicia faba* bei Membranpotentialen, die negativer als -100 mV sind (Roelfsema et al., 2001). Die Kanäle, die als Auswärtsgleichrichter fungieren, werden dagegen bei Membranpotentialen um -50 mV aktiviert (Roelfsema et al., 2001). Der Stomaschluss geht mit einer Depolarisierung der Plasmamembran einher, wodurch der Kaliumausstrom durch die auswärtsgleichrichtenden Kanäle ermöglicht wird. Im Gegensatz zu den Einwärtsströmen von Kalium ist die Spannungsabhängigkeit der Auswärtsströme abhängig von der extrazellulären Kaliumkonzentration. Dabei wird die Spannungsabhängigkeit der Kaliumauswärtsströme durch das extrazelluläre Kalium so verschoben, dass die Kanäle immer bei einem Membranpotential aktivieren, das positiver als das Nernst-Potential von Kalium ist (Blatt, 1988, Roelfsema & Prins, 1997, Ache et al., 2000, Roelfsema & Hedrich, 2005). Das führt dazu, dass durch diese Kanäle tatsächlich nur ein Ausstrom von Kalium vermittelt wird. Dagegen kann durch die einwärtsgerichteten Kanäle bei sehr niedrigen extrazellulären Kaliumkonzentrationen auch ein Ausstrom von Kalium stattfinden (Véry et al., 1995, Brüggemann et al., 1999, Roelfsema & Hedrich, 2005).

Der erste identifizierte Kaliumkanal, der Einwärtsströme in Schließzellen vermittelt, war der schließzellspezifisch exprimierte (Nakamura et al., 1995) KAT1, der 1992 kloniert (Anderson et al.) und später in Oozyten elektrophysiologisch charakterisiert wurde (z. B. in Schachtman et al., 1992, Véry et al., 1995, Hoshi, 1995, Hedrich et al., 1995). Aber auch andere Mitglieder der Shaker-Familie können den Einwärtsstrom von Kalium in Schließzellen vermitteln, was Einstichsmessungen an intakten Schließzellen von *Arabidopsis* Pflanzen mit einer Transposoninsertion in KAT1 (KAT1::En-1) zeigen (Szyroki et al., 2001). Diese Pflanzen besitzen keinen funktionellen KAT1-Kanal, zeigen aber

trotzdem spannungsabhängige Kaliumeinwärtsströme und öffnen ihre Stomata. Neben KAT1 konnten Szyroki et al. die Expression von KAT2, AKT1, AKT2/3 und AtKC1 in *Arabidopsis* Schließzellen nachweisen. Durch Coexpression dieser verschiedenen Untereinheiten in *Xenopus*-Oozyten und elektrophysiologische Messungen konnte gezeigt werden, dass die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle aus unterschiedlichen alpha-Untereinheiten zusammengesetzt sein können und dass diese homo- und heteromeren Zusammensetzungen die Eigenschaften des Kanals wie zum Beispiel die Spannungsabhängigkeit modifizieren (Dreyer et al., 1997). AtKC1 bildet alleine keinen funktionellen Kanal, kann aber als regulatorische Untereinheit an der Zusammensetzung eines Kaliumkanals mitwirken und dessen Eigenschaften beeinflussen (Jeanguenin et al., 2011, Reintanz et al., 2002).

Für den spannungsabhängigen Transport von Kalium aus den Schließzellen wird nur ein einziger Kanal exprimiert, nämlich GORK (Guardcell Outward Rectifying K⁺-channel) (Ache et al., 2000, Hossy et al., 2003), der ebenfalls zu den Shaker-Kanälen gehört. In der *gork-1*-Mutante, die keinen funktionellen GORK-Kanal besitzt, sind keine spannungsabhängigen Kaliumauswärtsströme messbar und der durch das Phytohormon ABA (Abscisic acid) vermittelte Stomaschluss erfolgt langsamer als in Wildtyp-Pflanzen (Hossy et al., 2003). Da trotz Abwesenheit des spannungsabhängigen Kaliumausstroms der Stomaschluss erfolgt, muss es ein zusätzliches alternatives System für den Transport von Kalium aus den Schließzellen geben. Osakabe et al. untersuchten 2013 die Funktion von Kaliumtransportern der KUP/HAK/KT (K⁺uptake/HighAffinityK⁺/K⁺Transport) Familie, und konnten zeigen, dass der reduzierte Stomaschluss der *gork1*-Mutante in den Dreifachmutanten *kup-6-8-gork* noch verstärkt wird. Das lässt darauf schließen, dass diese KUP-Transporter neben GORK eine Rolle für den Transport von Kalium aus den Schließzellen spielen (Roelfsema & Hedrich, 2005).

1.2.3.2 Kaliumtransport über die vakuoläre Membran

Der Transport von Kalium in die Vakuole während der Stomaöffnung erfolgt gegen den elektrochemischen Gradienten durch Transporter der NHX-Familie (Na⁺/H⁺-Exchanger), die den pH-Gradienten über eine Membran zum Transport von Kalium und Natrium nutzen können (Venema et al., 2002, Kollist et al., 2014). Dieser pH-Gradient wird im Fall des vakuolären Transports durch die vakuolären Protonenpumpen V-PPase und V-ATPase generiert (Eisenach & De Angeli, 2017). Eine Lokalisation in der vakuolären Membran konnte für NHX1 (Apse et al., 1999, Quintero et al., 2000) und NHX2 (Yokoi et al., 2002) gezeigt werden, ebenso die Expression dieser beiden Transporter in Schließzellen (Barragán et al., 2012). Die Phänotypen der *nhx1nhx2*-Doppelmutante mit einer redu-

zierten Stomaöffnung belegen die Funktion für die Stomaöffnung (Andrés et al., 2014). Außerdem enthalten Schließzellvakuolen der Mutanten ohne NHX1 und NHX2 weniger Kalium, was für eine Rolle beim mit der Stomaöffnung assoziierten Kaliumtransport in die Vakuole spricht (Barragán et al., 2012).

Die Abgabe der akkumulierten Kaliumionen ins Cytosol während des Stomaschlusses erfolgt vermutlich durch Kanäle. Aufgrund ihrer Lokalisation kommen dafür Kanäle der TPK-Familie (Two Pore K⁺-channel) in Frage, deren Mitglieder mit Ausnahme von TPK4 in der vakuolären Membran lokalisiert sind, wie durch GFP-Fusionen gezeigt werden konnte (Czempinski et al., 2002, Schönknecht et al., 2002, Voelker et al., 2006). Anhand von Patch-Clamp-Messungen an Vakuolen von Verlustmutanten konnten die Ströme von TPK1 2007 von Gobert et al. elektrophysiologisch charakterisiert werden. Bereits in früheren Patch-Clamp-Messungen an Schließzellvakuolen wurden die durch TPK1 vermittelten Ströme als sogenannte VK-Ströme (Vacuolar K⁺) beschrieben (Ward & Schroeder, 1994). TPK1 ist demnach ein spannungsunabhängiger, kaliumselektiver Kanal, der durch Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration aktiviert wird und eine Regulierung durch den cytosolischen pH-Wert zeigt (Ward & Schroeder, 1994, Gobert et al., 2007). Außerdem konnte eine Aktivierung durch 14-3-3 Proteine (Latz et al., 2007) und eine Funktion als Osmosensor in der vakuolären Membran (Maathuis, 2011) gezeigt werden. Eine geringere Geschwindigkeit des ABA-vermittelten Stomaschlusses in *tpk1*-Verlustmutanten weist auf eine Funktion von TPK1 beim Stomaschluss hin, zeigt aber auch, dass noch andere Kanäle oder Transportsysteme am Transport von Kalium aus der Vakuole beteiligt sein müssen. Diese wurden jedoch noch nicht identifiziert (Eisenach & De Angeli, 2017).

Andere an Schließzellvakuolen charakterisierte Kaliumleitfähigkeiten sind neben den VK-Strömen die SV- (Slow Vacuolar) und FV- (Fast Vacuolar) Ströme, die sich vor allem in ihrer Kinetik unterscheiden (Hedrich et al., 1986, Hedrich & Neher, 1987a, Allen & Sanders, 1996). Inzwischen ist bekannt, dass die SV-Ströme durch den Kanal TPC1 (Two Pore Channel) vermittelt werden (Peiter et al., 2005, Hedrich & Marten, 2011). Dieser ist allerdings nicht ausschließlich selektiv für Kalium, sondern auch für andere Kationen wie Na⁺, NH₄⁺, Ca²⁺ und Mg²⁺ permeabel (Hedrich & Marten, 2011 und Referenzen darin). Die Rolle von TPC1 für die Stomaöffnung ist noch nicht abschließend geklärt. Bisher konnte in *tpc1*-Verlustmutanten nur eine veränderte Reaktion von Stomata in Epidermisstreifen auf hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen gezeigt werden (Peiter et al., 2005). Auf die Rolle von TPC1 als Calciumkanal wird in Abschnitt 1.3.1 eingegangen. Die Kanäle, die die FV-Ströme vermitteln, sind bis heute nicht auf molekularer Ebene identifiziert.

1.2.4 Transport von Anionen in Schließzellen

Neben dem Transport von Kalium spielt auch der Anionentransport eine wichtige Rolle für die Stomabewegungen. Zum einen gleichen die Anionen die positive Ladung des Kaliums aus, zum anderen ist es die Aktivierung von Anionenkanälen, die zur Depolarisierung der Plasmamembran führt. Diese ist wiederum essentiell für den Stomaschluss, da durch das positivere Membranpotential erst der für den Stomaschluss notwendige Kaliumefflux ausgelöst wird (Roelfsema et al., 2004, Barbier-Brygoo et al., 2011, Kollist et al., 2014).

Wie sich die Konzentration der verschiedenen Anionen während der Stomabewegungen ändert, ist schwierig in genauen Werten anzugeben. Das beruht darauf, dass die Konzentrationen der jeweiligen Anionen in der Schließzelle je nach Pflanzenart, Wachstumsbedingungen und Verfügbarkeit der Anionen stark variieren können. Laut der Übersicht in Jezek & Blatt, 2017 (Tabelle II) spielen mengenmäßig Malat und Chlorid wohl die wichtigste Rolle als Gegenionen für K^+ während der Stomaöffnung. Die Rolle dieser beiden Anionen wurde in zahlreichen Arbeiten genau untersucht (siehe z.B. Allaway, 1973, Raschke & Schnabl, 1978, Van Kirk & Raschke, 1978). Auch Nitrat wird als Gegenion während der Stomaöffnung erwähnt (z.B. in Pandey et al., 2007, Roelfsema & Hedrich, 2005 und Eisenach & De Angeli, 2017), Untersuchungen zur Änderung der Nitratkonzentration in Schließzellen gibt es aber nur wenige (Raghavendra, 1980, Guo et al., 2003). Die größten Änderungen der Anionenkonzentration können in der Vakuole gezeigt werden (Jezek & Blatt, 2017). Die Anionen werden aus dem Apoplasten aufgenommen oder im Fall von Malat zusätzlich in den Schließzellen synthetisiert und anschließend in die Vakuole transportiert (Kollist et al., 2014).

1.2.4.1 Anionentransport über die Plasmamembran

Die Aufnahme von Anionen in die Schließzellen erfordert einen aktiven Transport, da sie gegen Konzentrationgefälle und elektrochemisches Potential erfolgen muss. Wahrscheinlich wird dieser Transport von H^+ /Anionen-Cotransportern vermittelt (Kollist et al., 2014). Für Chlorid konnte noch kein solcher Transporter in der Plasmamembran identifiziert werden. 2003 wurde von Guo et al. der Nitrattransporter AtNRT1.1 (Nitrate Transporter 1.1) identifiziert, der diese Rolle für Nitrat übernehmen könnte. Die Autoren zeigten ebenfalls, dass die NRT1.1-Verlustmutante *chl1* die Stomata im Vergleich zum Wildtyp weniger weit öffnet und dass in Schließzellprotoplasten im Licht keine Nitratakkumulation stattfindet (Guo et al., 2003). Voraussetzung um diesen Phänotyp zu sehen ist allerdings, dass das KCl der Badlösung durch KNO_3 ersetzt wird.

Beim Stomaschluss können die in den Schließzellen akkumulierten Anionen durch Kanäle aus dem Cytosol in den Apoplasten abgegeben werden. Mithilfe von Patch-Clamp-Messungen konnten Ende der 80er Jahre an Schließzellen Anionenströme gemessen werden (Keller et al., 1989, Schroeder & Hagiwara, 1989, Hedrich et al., 1990), die sich anhand ihrer Aktivierungskinetik in zwei Typen einteilen lassen (Schroeder & Keller, 1992). Demnach werden sie als R- und S-Typ (R = rapid, S = slow) Anionenströme bezeichnet. R-Typ-Kanäle aktivieren im Bereich von Millisekunden (5-50 ms, Kolb et al., 1995) und damit etwa 1000-mal schneller als S-Typ-Kanäle, die in ca. 5-50 s aktivieren (Linder & Raschke, 1992, Roelfsema et al., 2012). Ein weiterer Unterschied liegt in ihrer Spannungsabhängigkeit. Während die Ströme durch S-Typ-Kanäle nur schwach spannungsabhängig sind, zeigen Ströme durch R-Typ-Kanäle ein Maximum bei Membranpotentialen um -50 mV. Bei negativeren Membranpotentialen verringert sich die Offenwahrscheinlichkeit stark (Kolb et al., 1995, Roelfsema & Hedrich, 2005). Durch extrazelluläres Malat verschiebt sich die Spannungsabhängigkeit, wodurch die R-Typ-Kanäle auch bei negativeren Membranpotentialen aktiv sein können (Hedrich & Marten, 1993). Bei länger anhaltender Depolarisierung der Plasmamembran inaktivieren die R-Typ-Kanäle im Gegensatz zu den S-Typ-Kanälen, die über einen längeren Zeitraum aktiv sein können und so physiologisch gesehen für länger anhaltende Depolarisierungen eine Rolle spielen könnten (Schroeder & Keller, 1992, Hedrich et al., 1990, Linder & Raschke, 1992). Die Einzelkanalleitfähigkeit beider Kanaltypen (S-Typ: 33 pS, Linder & Raschke, 1992; R-Typ: 39 pS, Keller et al., 1989) sowie ihre Selektivität sind dagegen ähnlich. Beide zeigen die höchste Permeabilität für NO_3^- , sind aber auch permeabel für Cl^- , Br^- , I^- und Malat^{2-} (Hedrich & Marten, 1993, Schmidt & Schroeder, 1994, Dietrich & Hedrich, 1994).

Inzwischen wurden sowohl Kanäle für den S-Typ als auch für den R-Typ auf molekularer Ebene identifiziert, was eine genauere elektrophysiologische Charakterisierung möglich machte. Als erster S-Typ-Kanal wurde 2008 SLAC1 (Slow Anion Channel 1) identifiziert – sogar gleich in zwei unterschiedlichen Studien. In einer dieser Studien wurde eine Mutantenkollektion auf ihre Ozon-Sensitivität untersucht (Vahisalu et al., 2008, Methode in Langebartels et al., 2000, Seite 531ff.), in einer zweiten wurde nach Pflanzen mit Störungen der CO_2 -abhängigen Änderung der Blatt-Temperatur gesucht (Negi et al., 2008). Die identifizierten Mutanten zeigten in Gaswechsellmessungen einen reduzierten Stomaschluss im Dunkeln und keinen Stomaschluss als Reaktion auf Erhöhung der CO_2 -Konzentration (Vahisalu et al., 2008). In Patch-Clamp-Messungen an Schließzellprotoplasten konnte bestätigt werden, dass die *slac1*-Mutanten keine durch Calcium oder ABA aktivierbaren S-Typ-Ströme zeigen. Die R-Typ-Ströme waren dagegen auch in den *slac1*-Mutanten messbar und zeigen keine signifikanten Abweichungen vom Wildtyp (Vahisalu et al., 2008). Außerdem konnte eine erhöhte Akkumulation von Malat, Fumarat,

Chlorid und Kalium in Schließzellprotoplasten der *slac1*-Mutanten gezeigt werden, die durch schließzellspezifische Expression von SLAC1 ausgeglichen werden konnte (Negi et al., 2008). Die gleiche Wirkung hatte die schließzellspezifische Expression der SLAC1-Homologen SLAH1 und SLAH3, nicht aber die von SLAH2 (Negi et al., 2008). In *Arabidopsis* gehören neben SLAC1 vier Homologe (SLAH 1-4) zur SLAC1-Familie (Vahisalu et al., 2008) s. ergänzendes Material, Negi et al., 2008). Die SLAH-Proteine haben unterschiedliche Expressionsmuster und neben SLAC1 konnte nur für SLAH3 eine Expression in Schließzellen gezeigt werden (Geiger et al., 2011). SLAH3 trägt zur Anionenleitfähigkeit in Schließzellen bei, wie TEVC-Messungen in *slac1*, *slah3* und *slac1/slah3*-Mutanten zeigten (Güzel-Değ̈er et al., 2015). Durch die Applikation von flg22, einem Peptid aus dem bakteriellen Elizitor Flagellin, wurden durch SLAH3 vermittelte Anionenströme aktiviert (Güzel-Değ̈er et al., 2015). 2019 konnten Liu et al. zeigen, dass SLAH3 im Gegensatz zu SLAC1 eine wichtige Rolle für den durch Chitin vermittelten Stomaschluss spielt. SLAH3 hat demnach eine Funktion für den Stomaschluss als Schutz vor Pathogenbefall.

Zwei Jahre nach der Identifizierung der S-Typ-Kanäle wurde mit ALMT12/QUAC1 (Aluminum-activated Malate Transporter 12/Quick Anion Channel 1) der erste R-Typ-Anionenkanal in Schließzellen identifiziert (Sasaki et al., 2010, Meyer et al., 2010). Die Familie der ALMTs wurde nach dem zuerst in Weizen identifizierten ALMT1 benannt, der in den Wurzeln eine Rolle für die Aluminium-Toleranz spielt, indem Malat als Chelator aus der Zelle transportiert wird (Sasaki et al. 2004). Wie die meisten weiteren Mitglieder der Familie ist ALMT12 nicht Al^{3+} -sensitiv und so wurde QUAC1 (QuickAnion-Channel1) als alternative Namensgebung eingeführt (Dreyer et al. 2012, Linder & Raschke 1992). Pflanzen, in denen ALMT12 durch T-DNA Insertionen unterbrochen wurde, zeigten einen reduzierten Stomaschluss auf Stimuli wie Dunkelheit, Erhöhung der CO_2 -Konzentration und das Stresshormon ABA (Sasaki et al. 2010, Meyer et al. 2010). Meyer et al. konnten in Patch-Clamp-Messungen zeigen, dass die R-Typ-Ströme im Vergleich zum Wildtyp reduziert sind und dass durch die Expression von ALMT12 in *Xenopus*-Oozyten Ströme messbar sind, die den in Schließzellen beschriebenen R-Typ-Strömen ähneln. So wird durch höhere externe Malatkonzentration die Aktivierung der Kanäle durch Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit in den Bereich negativerer Membranpotentiale verschoben, wie auch schon für die in *Vicia faba* Protoplasten gemessenen R-Typ-Ströme beschrieben wurde (Hedrich & Marten 1993).

Da die Aktivierung der Anionenkanäle einen essentiellen Schritt des Stomaschlusses darstellt und diesen initiiert, ist eine strikte Regulierung der Anionenströme notwendig. Auf der einen Seite führen Blaulicht, photosynthetisch aktive Strahlung (engl.: photosynthetic active radiation, PAR) und eine erhöhte interzelluläre CO_2 -Konzentration zur Deaktivie-

rung der Anionenkanäle (Roelfsema et al., 2002, Marten et al., 2007a). Andere Stimuli wie die Pflanzenhormone ABA und Methyljasmonat (Pei et al., 1997, Roelfsema et al., 2004, Munemasa et al., 2007), eine erhöhte cytosolische Calciumkonzentration (Hedrich et al., 1990, Schroeder & Hagiwara, 1989) sowie bestimmte Mikroben-assoziierte Elizitoren (MAMPs–microbe Associated Molecular Patterns) (Koers et al., 2011) aktivieren dagegen die Anionenkanäle. Die Mechanismen zur Regulierung der Anionenkanalaktivität beruhen zum einen auf Phosphorylierungen der Anionenkanäle, wie schon vor der molekularen Identifizierung der Kanäle gezeigt werden konnte (Schmidt et al., 1995). Außerdem konnten die durch SLAC1 vermittelten Ströme in *Xenopus*-Oozyten nur bei Coexpression mit der Kinase OST1 (Open Stomata 1), die mit SLAC1 interagiert, gemessen werden (Geiger et al., 2009). OST1 aktiviert ebenfalls den R-Typ-Kanal ALMT12/QUAC1 (Imes et al., 2013). Zum anderen ist die Aktivität der Anionenkanäle von der freien cytosolischen Calciumkonzentration abhängig (Hedrich et al., 1990, Schroeder & Hagiwara, 1989). Bei dieser calciumabhängigen Aktivierung der Anionenkanäle sind bestimmte CPKs (calciumabhängige Kinasen), die bei spezifischen Calciumkonzentrationen aktiviert werden, beteiligt (Mori et al., 2006, Geiger et al., 2010, Geiger et al., 2011). Die calcium- und ABA-abhängige Regulierung des Stomaschlusses und der Anionenkanäle wird in den Kapiteln 1.3 und 1.4 im Detail behandelt.

1.2.4.2 Anionentransport über die vakuoläre Membran

Wie alle während der Stomöffnung aufgenommen Osmolyte akkumulieren auch die Anionen zum Großteil in der Vakuole. Für den Anionentransport über die vakuoläre Membran konnte die Beteiligung von Transportern bzw. Kanälen aus der AtALMT- (*Arabidopsis thaliana* Aluminum Activated Malate Transporter) und der AtCLC- (*Arabidopsis thaliana* Chloride Channel) Familie gezeigt werden. Dabei ist zu beachten, dass in der Familie der CLCs Anionenkanäle und Anionen/Protonenaustauscher vorkommen (Jentsch 2008, Jossier et al. 2010). Die sieben in *Arabidopsis* identifizierten CLCs (a-g) sind Anionen/Protonenaustauscher und lokalisieren in intrazellulären Membranen, AtCLC a, b und c in der vakuolären Membran (De Angeli et al., 2006, Jossier et al. 2010, von der Fecht-Bartenbach et al., 2010). Für AtCLCa und AtCLCc konnte eine Rolle für die Stomabewegung belegt werden (Jossier et al. 2010, Wege et al. 2014).

Unter den vakuolären ALMTs konnte für AtALMT4, AtALMT6 und AtALMT9 eine Expression in Schließzellen gezeigt werden (Meyer et al., 2011, De Angeli et al., 2013, Eisenach et al., 2017). In Patch-Clamp-Messungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei ALMT9 um einen Chloridkanal handelt, der bei physiologischen Malatkonzentrationen im Cytosol aktiv ist und spannungsabhängige Einwärtsströme zeigt (De Angeli

et al., 2013). Stomata in Epidermisstreifen der Verlustmutante *almt9* zeigen im Vergleich zu Stomata von Wildtyp-Pflanzen eine geringere Öffnungsweite im Licht. Dieser Effekt wird durch geringere Chloridkonzentrationen im Medium abgeschwächt, da das fehlende Chlorid dann durch die Akkumulation anderer Anionen ausgeglichen werden kann (De Angeli et al., 2013). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass ALMT9 bei der Stomaöffnung für die Akkumulation von Chlorid in der Vakuole verantwortlich ist. Der Stomaschluss ist in der Verlustmutante nicht beeinträchtigt (De Angeli et al., 2013). AtALMT4 spielt dagegen eine Rolle für den ABA-vermittelten Stomaschluss (Eisenach et al., 2017). Stomata von *almt4*-Verlustmutanten zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen einen verringerten Stomaschluss nach der Applikation von ABA. Patch-Clamp-Messungen weisen darauf hin, dass ALMT4 am Efflux von Malat aus der Vakuole während des Stomaschlusses beteiligt sein könnte. Die Aktivität des Kanals wird durch Phosphorylierung reguliert, wobei die Dephosphorylierung eines bestimmten Serinrests zur Aktivierung von ALMT4 führt. Während der Stomaöffnung wird der Kanal vermutlich durch Phosphorylierung inaktiviert. Die genaue Rolle für den schließzellspezifischen Kanal ALMT6 ist noch nicht bekannt, da kein Phänotyp für *almt6*-Knockout-Pflanzen vorliegt. Aufgrund elektrophysiologischer Eigenschaften könnte dieser Kanal sowohl für die Malatakkumulation in der Vakuole während der Stomaöffnung als auch für den Efflux von Malat während des Stomaschlusses eine Rolle spielen. Der fehlende Phänotyp der *almt6*-Mutanten könnte durch eine funktionelle Redundanz anderer Kanäle und/oder Transporter zu erklären sein.

1.3 Der Transport von Calcium in Schließzellen und die Rolle für die Signaltransduktion

Im Gegensatz zu Kalium und Anionen, die in den Schließzellen hauptsächlich eine Funktion als osmotische Teilchen erfüllen, spielt Calcium eine essentielle Rolle als Signalmolekül. Signalmoleküle sind notwendig, um wahrgenommene Reize in physiologische Antworten umzusetzen. Die Rolle von Calcium als universelles Signalmolekül und seine Beteiligung an zahlreichen physiologischen Prozessen in Tieren, Pflanzen und auch in Prokaryoten ist inzwischen sehr gut untersucht (für Reviews siehe z. B. Dodd et al., 2010 (Pflanzen), Carafoli & Krebs, 2016 (Tiere) und Domínguez, 2018 (Prokaryoten)). Trotzdem sind einige Aspekte und Details wie zum Beispiel die molekulare Identität pflanzlicher Calciumkanäle oder die Rolle subzellulärer Unterschiede der Calciumverteilung bis heute weitgehend ungeklärt.

Eine zu hohe Konzentration von freiem Calcium im Cytosol ist schädlich, da sie zur Ag-

gregation von Proteinen und zur Bildung unlöslicher Komplexe mit Phosphat führen würde (Jaiswal, 2001). Aus diesem Grund muss die freie cytosolische Calciumkonzentration möglichst gering gehalten werden. Dabei werden die Calciumionen entweder aus der Zelle heraus in den Apoplasten oder in interne Kompartimente, wie die Vakuole oder das endoplasmatische Retikulum, transportiert. Durch diesen Transport ergeben sich steile elektrochemische Gradienten für Calcium (Jaiswal, 2001). Die Konzentration freier Calciumionen im Cytosol beträgt ca. 100 nM (Logan & Knight, 2003, für Schließzellen: Webb et al., 2001, Levchenko et al., 2008), in der Vakuole wurden Konzentrationen von 200 μ M bis 50 mM bestimmt (Conn & Gilliam, 2010), im Apoplasten 330 μ M bis 1 mM (Conn et al., 2011). Eine Übersicht der Calciumkonzentrationen der verschiedenen Organellen findet sich in Costa et al., 2018 und in Abbildung 1.2. Die geringe cytosolische Konzentration und der steile Konzentrationsgradient über Plasmamembran und Endomembranen ermöglichen eine sehr schnelle transiente Erhöhung der Calciumkonzentration durch die Aktivierung calciumpermeabler Kanäle (Bush, 1993). Diese transienten Erhöhungen der freien cytosolischen Calciumkonzentration, die auch als Calciumsignale bezeichnet werden, spielen eine Rolle in vielen Signaltransduktionswegen und sind auch an der Regulierung der Stomaweite beteiligt.

In Schließzellen treffen Signaltransduktionswege vieler Stimuli zusammen, die in die Stomaöffnungswerte übersetzt werden müssen. Ein Zusammenhang von Calcium und der Stomaschlussantwort wurde nach Versuchen mit Epidermisstreifen von *Commelina communis* und *Vicia faba* beschrieben, in denen extern appliziertes CaCl_2 zum Stomaschluss führte (Fujino, 1967, Willmer & Mansfield, 1969, De Silva et al., 1985). Auch eine Verstärkung der inhibierenden Wirkung von ABA auf die Stomaöffnung durch eine erhöhte Calciumkonzentration im Medium wurde beschrieben (De Silva et al., 1985). EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) im Medium, ein Calcium-Chelator, inhibierte den Stomaschluss als Reaktion auf verschiedene Stimuli (De Silva et al., 1985, Schwartz et al., 1988). Mithilfe calciumsensitiver Farbstoffe konnten Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentration direkt visualisiert und verfolgt werden. Transiente Erhöhungen der Calciumkonzentration im Cytosol von Schließzellen wurden im Zusammenhang mit der Antwort auf verschiedene Reize, wie externes Calcium (Allen et al., 1999b), ABA (Gilroy et al., 1991, McAinsh, 1990, Allen et al., 1999a, Marten et al., 2007a), Kälte (Wood et al., 2000, Allen et al., 2000), eine erhöhte CO_2 -Konzentration (Webb et al., 1996) und Blaulicht (Harada & Shimazaki, 2008) gezeigt. Diese Stimuli tragen alle durch die Beeinflussung der Calciumkonzentration zur Regulierung der Stomaweite bei. Die Kontrolle der cytosolischen Calciumkonzentration in Schließzellen muss also durch Transportsysteme strikt reguliert werden. Im Folgenden werden die bekannten Komponenten des Calciumtransports mit einem Fokus auf Schließ-

zellen beschrieben und anschließend die wichtigsten Komponenten der Signalwege zur Entschlüsselung der Calciumsignale. Eine Übersicht der verschiedenen Transporter findet sich in Abbildung 1.2.

1.3.1 Calciumtransporter und -kanäle

1.3.1.1 Aktiver Transport von Calcium aus dem Cytosol

Um die cytosolische Calciumkonzentration gering zu halten, müssen die Calciumionen unter Energieaufwand gegen das elektrochemische Gefälle aus dem Cytosol transportiert werden (Bush, 1993). Dieser Transport wird in Pflanzen von P-Typ-ATPasen und Ca^{2+} /Protonen-Antiportern vermittelt (Kudla et al., 2010, Roelfsema & Hedrich, 2010).

Es können zwei Typen von P-Typ-ATPasen, die am Transport von Calcium aus dem Cytosol beteiligt sind, unterschieden werden: die $\text{P}_{2\text{A}}$ -ATPasen (auch ECAs–ER-type Calcium-ATPasen) und die $\text{P}_{2\text{B}}$ -ATPasen (auch ACAs–autoinhibited Calcium-ATPasen). In *Arabidopsis* gibt es vier ECAs, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Liang et al., 1997), im Golgi Apparat (Mills et al., 2008) und in Endosomen (Li et al., 2008) lokalisiert sind. Zu den zehn $\text{P}_{2\text{B}}$ -ATPasen in *Arabidopsis* gehören die in der Plasmamembran lokalisierten ACA8, 9 und 10 (Bonza et al., 2000, Schiøtt et al., 2004, George et al., 2008), aber auch ACAs mit einer Lokalisation im ER (Harper et al., 1998), in der Vakuolenmembran (Geisler et al., 2000b, Lee et al., 2007) und in der äußeren Plastidenmembran (Huang et al., 1993). Die ACAs zeichnen sich durch eine autoinhibitorische Domäne am N-Terminus aus, die durch die Bindung von Calmodulin gelöst werden kann, was zur Aktivierung der ATPase führt (Harper et al., 1998, Bækgaard et al., 2005). Dadurch ergibt sich eine Feedbackregulierung der ATPase durch die Calciumkonzentration (Roelfsema & Hedrich, 2010). Generell besitzen die Calcium-ATPasen eine hohe Affinität für Calcium (Sze et al., 2000) haben aber eine geringe Transportkapazität. Aufgrund dieser Eigenschaften könnten sie eine Rolle für die Aufrechterhaltung eines geringen basalen Levels an Calcium spielen (Geisler et al., 2000a, Roelfsema & Hedrich, 2010).

Die Ca^{2+} /Protonen-Antiporter besitzen dagegen eine geringere Affinität für Calciumionen aber eine höhere Transportkapazität (Hirschi et al., 1996). Es wird daher vermutet, dass diese Transporter bei hohen Calciumkonzentrationen nach transienten Erhöhungen für eine Rückkehr zum normalen Ca^{2+} -Level wichtig sind (Roelfsema & Hedrich, 2010, Sze et al., 2000). Die Proteine, die diesen Transport übernehmen, gehören zur Familie der CAX-Proteine (Cation Exchanger), die in *Arabidopsis* von sechs Genen codiert werden (Shigaki & Hirschi, 2006) und die zum Großteil in der vakuolären Membran lokali-

siert sind (Chen et al., 2015, Pittman & Hirschi, 2016). 2016 konnten Cho et al. zeigen, dass *cax1*- und *cax3*-Knockout-Pflanzen eine geringere Stomaöffnung im Licht zeigen. Dies führen die Autoren auf ihre Funktion in der Regulation des apoplastischen pH-Werts und auf das stärker depolarisierte Membranpotential in den Mutanten zurück (Cho et al., 2012). Ansonsten ist über spezifische Funktionen einzelner P-Typ-Ca²⁺-ATPasen und CAX-Transporter in Schließzellen wenig bekannt. Neben der Aufrechterhaltung der geringen Calciumkonzentration im Cytosol spielen diese Effluxtransportsysteme auch eine Rolle für die Modellierung der Calciumsignatur, da sie die transienten Erhöhungen beenden (Kudla et al., 2010, Sze et al., 2000) und Calcium für dynamische Prozesse an Membranen, wie den Transport und die Fusion von Vesikeln, zur Verfügung stellen (Sze et al., 2000).

1.3.1.2 Influx von Calcium ins Cytosol

Transiente Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration, oft als »Calciumsignale« bezeichnet, entstehen durch die Aktivierung calciumpermeabler Kanäle in der Plasmamembran oder in Endomembranen (Sanders et al., 2002). Durch den steilen Ca²⁺-Konzentrationsgradienten können innerhalb kurzer Zeit viele Calciumionen aus dem Apoplast oder aus internen Speichern in das Cytoplasma strömen. Die meisten calciumpermeablen Kanäle gehören zu den nicht-selektiven Kationenkanälen (NSCCs - Nonselective Cation Channels) und haben keine ausgeprägte Selektivität für Calcium (Demidchik & Maathuis, 2007). Sie lassen sich aufgrund ihres Aktivierungsmechanismus in Gruppen einteilen und können anhand ihrer Eigenschaften wie Spannungsabhängigkeit, Mechano-sensitivität und Aktivierung durch bestimmte Liganden oder Calcium genauer charakterisiert werden (Demidchik et al., 2002). So gibt es Kanäle, die durch Hyperpolarisation oder durch Depolarisation aktiviert werden (HACCS und DACCS), und spannungsunabhängige Kanäle (VICCs), die andere Aktivierungsmechanismen benötigen (White, 2000). In Schließzellprotoplasten von *Vicia faba* konnte die Aktivierung depolarisationsaktivierter Kanäle durch ABA gezeigt werden (Schroeder & Hagiwara, 1990). In Versuchen mit Stomata in Epidermisstreifen und intakten Blättern von *Vicia faba* führte eine Depolarisierung jedoch zu einer Verringerung der freien cytosolischen Calciumkonzentration (Levchenko et al., 2008). Die Existenz hyperpolarisationsaktivierter Calciumkanäle in Schließzellen konnte mithilfe der TEVC-Technik (Grabov & Blatt, 1998) und in Patch-Clamp-Messungen gezeigt werden (Hamilton et al., 2000). Durch hyperpolarisierende Spannungspulse, die mittels TEVC-Technik an Schließzellen intakter Pflanzen oder in Epidermisstreifen appliziert wurden, konnte die Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration mit calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen visualisiert werden (Grabov

& Blatt, 1998, Stange et al., 2010). Diese Technik wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt, um die Auswirkungen von gezielt ausgelösten Erhöhungen der Calciumkonzentration und die subzelluläre Verteilung des Calciums zu untersuchen. Zusätzlich zu diesen spannungsabhängigen Kanälen konnten auch mechanosensitive Kanäle mit Calciumleitfähigkeit in Schließzellprotoplasten von *Vicia faba* nachgewiesen werden (Cosgrove & Hedrich, 1991).

Über die molekulare Identität der einzelnen Calciumkanäle ist wenig bekannt. Es wurden aber einige Proteinfamilien identifiziert, für die eine Beteiligung am Calciumtransport gezeigt werden konnte (Edel et al., 2017, Demidchik et al., 2018). Zu diesen gehören die CNGCs (cyclic nucleotide gated Channels) (Talke et al., 2003, Zelman et al., 2012, Tian et al., 2019), die GLRs (Glutamate receptors) (Lacombe et al., 2001, Price et al., 2012), TPC1 (Two Pore Channel 1) (Peiter et al., 2005), verschiedene mechanosensitive Kanäle (Kurusu et al., 2013, Hamilton et al., 2015) und der durch Hyperosmolalität aktivierte Kanal OSCA1 (Yuan et al., 2014).

CNGCs In *Arabidopsis* codieren 20 Gene für CNGCs (Ward et al., 2009). Sie gehören zu den ligandenabhängigen Kationenkanälen und kommen auch im Tierreich und bei den Prokaryoten vor (Nimigean et al., 2004, Kuo et al., 2007, Zelman et al., 2012). Sie lokalisieren normalerweise in der Plasmamembran und sind typischerweise permeabel für monovalente und divalente Kationen, wie K^+ und Ca^{2+} (Zelman et al., 2012). 2007 konnte von Ali et al. gezeigt werden, dass CNGC2 eine von cAMP aktivierte Calciumleitfähigkeit in Schließzellprotoplasten vermittelt, die für die Vermittlung der Immunantwort durch PAMPs wichtig zu sein scheint. Weitere CNGCs, die in Schließzellen identifiziert wurden, sind CNGC5 und CNGC6 (Wang et al., 2013). Die Autoren konnten zeigen, dass diese Kanäle durch cGMP aktivierbare Ströme vermitteln und für Mg^{2+} , Ba^{2+} und Ca^{2+} permeabel sind. In der Doppelmutante *cngc5-1 cngc6-1* sind diese Ströme nicht messbar. Da die Reaktion der Stomata auf ABA und Änderungen der CO_2 -Konzentration in der Doppelmutante aber unverändert ist, ist die genaue Funktion dieser beiden Kanäle für den Stomaschluss nicht geklärt. 2019 konnten Tian et al. zeigen, dass CNGC2 und CNGC4 eine Rolle für die pflanzliche Immunantwort spielen. Demnach sind CNGC2 und CNGC4 an der Vermittlung des Calciuminfluxes nach der Applikation von Flagellin beteiligt, wie Untersuchungen an Aequorin-exprimierenden *cngc2* und *cngc4*-Verlustmutanten belegten. Messungen der durch CNGC2 und CNGC4 vermittelten Ströme in Oozyten kamen zu dem Ergebnis, dass CNGC2 und CNGC4 zusammen einen funktionellen Kanal bilden, der durch Calmodulin blockiert wird (Tian et al., 2019).

GLRs Die GLRs sind Homologe der tierischen ionotropischen Glutamatrezeptoren, die eine Rolle für die Erregungsübertragung im zentralen Nervensystem spielen (Forde & Roberts, 2014). Die pflanzlichen GLRs, die in *Arabidopsis* von 20 Genen codiert werden, wurden aufgrund ihrer Sequenzhomologie entdeckt (Lam et al., 1998, Lacombe et al., 2001). Einen glutamatinduzierten Calciuminflux und eine Depolarisierung der Plasmamembran konnten Dennison & Spalding zeigen, ebenso Meyerhoff et al., 2005. Der durch Glutamat oder andere Aminosäuren induzierte Calciuminflux konnte in Pflanzen mit einer Mutation von GLR3.3 nicht mehr gezeigt werden (Qi et al., 2006). Zur Funktion von GLRs in Schließzellen gibt es nur wenige Studien. So wurde 2009 von Cho et al. gezeigt, dass der in Schließzellen exprimierte Glutamatrezeptor GLR3.1 eine Rolle für den durch externes Calcium induzierten Stomaschluss spielen könnte. Kong et al. untersuchten 2016 unter anderem die Stomaschlussantwort in *glr3.1/glr3.5*-Doppelmutanten. Calciuminduzierter Stomaschluss wird durch die Applikation von L-Methionin (L-Met) im WT verstärkt, tritt bei den *glr3.1/glr3.5*-Linien allerdings nicht auf. In Patch-Clamp-Messungen an Schließzellprotoplasten konnten die Autoren durch L-Met aktivierbare Ströme zeigen, die in den Doppelmutanten fehlten, genau wie der durch L-Met ausgelöste Calciuminflux (Kong et al., 2016). Die Applikation von Glutamat bewirkt in Epidermisstreifen von *Arabidopsis thaliana* und *Vicia faba* einen Stomaschluss, der abhängig von externem Calcium ist und in den Knockout-Mutanten *glr3.5* und *glr3.7* nicht auftritt (Yoshida et al., 2016). Wie genau die Glutamatrezeptoren den Stomaschluss beeinflussen und zur Generierung von transienten Calciumerhöhungen in Schließzellen und anderen Zelltypen beitragen, ist bislang unbekannt.

Mechano- und osmosensitive Calciumkanäle Außerdem interessant für die Generierung von Calciumsignalen und den Calciuminflux ins Cytosol sind verschiedene mechanosensitive Kanäle. Diese speziellen Kanäle sind für die Wahrnehmung und Reaktion auf mechanische Reize notwendig, indem sie Membranspannung direkt in Ionenflüsse umsetzen können (Hamilton et al., 2015). Hinweise auf die Existenz mechanosensitiver Kanäle mit Calciumpermeabilität in Schließzellen konnten in verschiedenen Studien gefunden werden (Cosgrove & Hedrich, 1991, Furuichi et al., 2008, Zhang et al., 2007). Da in Schließzellen während Stomabewegungen große Veränderungen des Turgordrucks auftreten und Umstrukturierungen der Membranen stattfinden, wäre es besonders interessant mehr über die Funktion einzelner Kanäle dieser Familien zu wissen. Zu den calciumpermeablen mechanosensitiven Kanälen gehören zwei Kanäle der MCA-Familie (Mid1-Complementing Activity), für die sowohl Calciumleitfähigkeit, Lokalisation in der Plasmamembran als auch eine Funktion während des hypoosmotischen Schocks in Tabak-BY2-Kulturzellen gezeigt werden konnten (Kurusu et al., 2012). Diese Kanäle scheinen

in *Arabidopsis* eine Rolle bei der kälteinduzierten Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration zu spielen (Mori et al., 2018). Ein weiterer Kandidat für einen mechanosensitiven Calciumkanal ist der Piezokanal. Abgesehen davon, dass eine homologe Sequenz in Pflanzen gefunden wurde, gibt es allerdings noch keine Studien über diesen Kanal in Pflanzen. In tierischen Zellen hat er eine Funktion in der Wahrnehmung mechanischer Reize und führt zur Aktivierung von Calciuminflux in das Cytosol (Coste et al., 2010, Coste et al., 2012, Wu et al., 2017). Der einzige mechanosensitive Kanal, für den bislang eine Rolle in Schließzellen gezeigt werden konnte, ist der 2014 in einem Screening von Aequorin-exprimierenden Pflanzen auf gestörte osmotisch-induzierte Calciumerhöhung entdeckte osmosensitive Kanal OSCA1 (Reduced Hyperosmolality Induced Calcium Increase 1) (Yuan et al., 2014). Im gleichen Jahr wurde die Familie dieser Kanäle auch von Hou et al. unter dem Namen DUF221-Proteine beschrieben. Die Stomata der *osca1*-Linien zeigten eine gestörte Antwort auf osmotischen Stress (Yuan et al., 2014). Schließzellen in Epidermisstreifen dieser Mutanten zeigten einen stark reduzierten Stomaschluss als Reaktion auf die Zugabe von 200 mM Sorbitol im Vergleich zu Schließzellen des Wildtyps. Ebenso war die Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytosol der Schließzellen wesentlich niedriger. Die Stomaschlussantwort auf ABA war dagegen nicht gestört (Yuan et al., 2014). In *Arabidopsis* hat die OSCA-Familie 15 Mitglieder (Yuan et al., 2014). 2018 konnte die Struktur der OSCAs aufgedeckt werden (Zhang et al., 2018). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass OSCA1.3 und OSCA1.7, weitere Mitglieder der OSCA-Familie, eine wichtige Rolle im pathogenvermittelten Stomaschluss spielen (Thor et al., 2020). Ob diese Kanäle ebenfalls mechanosensitiv sind, ist bislang noch nicht geklärt.

TPC1 Die bisher beschriebenen Kanäle lokalisieren in der Plasmamembran und zum Teil in Endomembranen, wie zum Beispiel AtGLR3.5 und MSL1, 2 und 3 (Teardo et al., 2015, Lee et al., 2016, Haswell & Meyerowitz, 2006). Der einzige bekannte calciumpermeable Kanal in der vakuolären Membran ist der Two Pore Channel TPC1 (siehe auch Abschnitt 1.2.3). 2005 wurde TPC1 als vakuolärer Kanal identifiziert (Peiter et al., 2005), der Ströme vermittelt, die schon in den 80er Jahren in Patch-Clamp-Messungen an Vakuolen als SV- (Slow Vacuolar) Ströme beschrieben wurden (Hedrich & Neher, 1987b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Stomaöffnung durch externes Calcium in Epidermisstreifen der *tpc1-2*-Mutanten nicht erfolgt. Der Stomaschluss durch ABA ist dagegen vergleichbar mit dem der Wildtyp-Pflanzen (Peiter et al., 2005). Aufgrund der vakuolären Lokalisation und der Calciumabhängigkeit der Ströme wurde für die SV-Ströme und später für TPC1 eine Beteiligung an der calciuminduzierten Calciumfreilassung (englisch: CICR Calcium Induced Calcium Release) und an der Generierung von Calciumtransienten diskutiert (z. B. in Ward & Schroeder, 1994, Bewell et al., 1999,

Barkla & Pantoja, 1996). Weitere Studien an *tpc1*-Mutanten zeigten jedoch, dass die Erhöhungen der Calciumkonzentration auf unterschiedliche Reize nicht von der des Wildtypen abweicht (Ranf et al., 2008, Islam et al., 2010). Auch die Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration bzw. die auftretenden Oszillationen, die durch externes Calcium in der *tpc1*-Mutante ausgelöst wurden, waren mit der im Wildtyp vergleichbar (Ranf et al., 2008, Islam et al., 2010). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Beteiligung von TPC1 an der Generierung von Calciumtransienten und an der calciuminduzierten Calciumfreisetzung. Ob und wie Calcium während des Stomaschlusses aus der Vakuole entlassen wird, ist bis heute unbekannt (Eisenach & De Angeli, 2017).

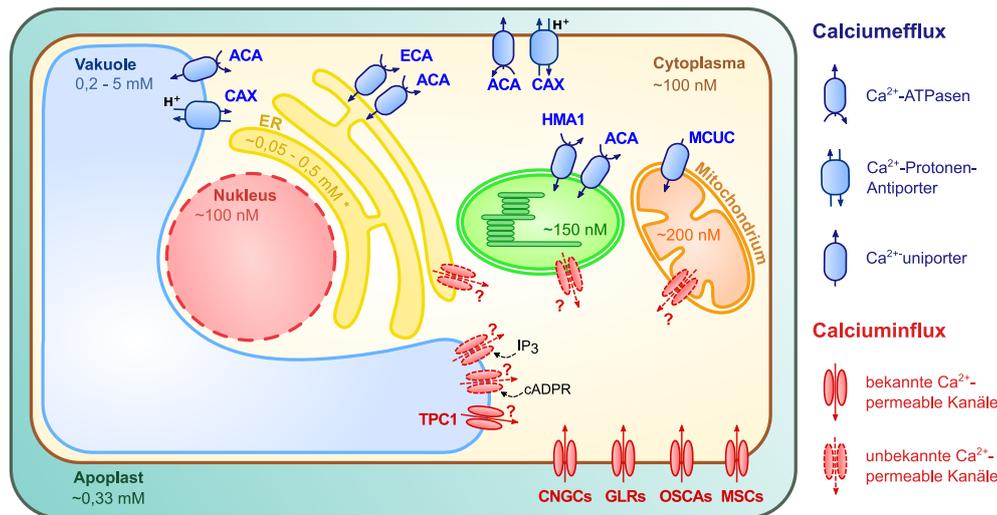


Abb. 1.2: Übersicht über den Ca^{2+} -Transport in Pflanzenzellen und die freie Ca^{2+} -Konzentration in den verschiedenen Kompartimenten. Ca^{2+} wird mithilfe von Ca^{2+} -ATPasen der ACA und ECA-Familie (Autoinhibited Ca^{2+} -ATPasen bzw. ER-type- Ca^{2+} -ATPasen) und Ca^{2+} -Protonen-Antiportern der CAX-Familie aus dem Cytosol transportiert, um eine niedrige freie Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol zu erreichen. Außerdem spielen der Ca^{2+} -Transporter MCUC (Mitochondrial Calcium Uniporter) und die Ca^{2+} -ATPase HMA1 (Heavy Metal ATPase1) eine Rolle für den Ca^{2+} -Transport in Chloroplasten und Mitochondrien. Transiente Erhöhungen der freien cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (auch Ca^{2+} -Signale) werden wahrscheinlich durch die Aktivierung Ca^{2+} -permeabler Kanäle in Plasmamembran, Tonoplast und verschiedenen Endomembranen ausgelöst. Dabei sind CNGCs (Cyclic Nucleotide Gated Channels), GLRs (Glutamate-Receptor-Like Channels), OSCAs (Reduced Hyperosmolality-induced Ca^{2+} Increase Channels) und MSCs (Mechanosensitive Channels) in der Plasmamembran sowie der vakuoläre Ca^{2+} -permeable Kanal TPC1 (Two Pore Channel) bekannt. Ob TPC1 tatsächlich eine Rolle für die Entstehung von Ca^{2+} -Signalen spielt, ist noch nicht geklärt. Es gibt außerdem Hinweise auf eine cADPR- und IP_3 -ausgelöste Ca^{2+} -Freisetzung aus der Vakuole. Der molekulare Mechanismus dafür konnte aber noch nicht aufgeklärt werden (z.B. Gilroy et al., 1990, Leckie et al., 1998, siehe auch Schönknecht, 2013). Für den Influx aus dem endoplasmatischen Retikulum, aus Mitochondrien und Chloroplasten sind noch keine Kanäle identifiziert, die Ca^{2+} -Flüsse ins Cytosol vermitteln. Abbildung in Anlehnung an Stael et al., 2011 und Edel et al., 2017. Referenzen für die freien Ca^{2+} -Konzentrationen siehe Stael et al., 2011 und Costa et al., 2018. Der mit * markierte Wert für die Ca^{2+} -Konzentration im ER stammt aus tierischen Zellen.

1.3.2 Calciumsignaturen und die Rolle intrazellulärer Calciumspeicher

Die verschiedenen Stimuli, die von den Schließzellen wahrgenommen werden und die den Stomaschluss beeinflussen, führen nicht alle zu einem vergleichbaren Anstieg der

Calciumkonzentration im Cytosol. Stattdessen können sie auch zu mehrphasigen Anstiegen der Konzentration oder zu Oszillationen der Calciumkonzentration führen (Sanders et al., 2002, McAinsh et al., 1995). Die Oszillationen unterscheiden sich in Amplitude und Frequenz und können so die Stomaschlussantwort spezifisch beeinflussen (Allen et al., 2000, Allen et al., 2001). Demnach gehört zu jedem Stimulus eine eigene Calciumsignatur, die eine spezifische Antwort auslöst (McAinsh & Hetherington, 1998). Das erfordert jedoch nicht nur die genaue Kontrolle über die cytosolische Calciumkonzentration durch Pumpen, Transporter und Kanäle zur Generierung der Signaturen, sondern auch eine große Anzahl von calciumsensitiven Proteinen, die die spezifischen Calciumsignaturen entschlüsseln und in eine Antwort umsetzen können (Hashimoto & Kudla, 2011, siehe Abschnitt 1.3.3). Eine weitere wichtige Fragestellung an dieser Stelle ist die nach der Herkunft des Calciums. Die größten und wahrscheinlich wichtigsten Calciumspeicher in Pflanzen stellen der Apoplast und die Vakuolen dar. Daneben können das endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien und Chloroplasten zum Calciumsignaling beitragen (für Reviews siehe Stael et al., 2011, Costa et al., 2018). Bei Studien mit calciumsensitiven Farbstoffen lässt sich meist keine Aussage über die Herkunft des Calciums machen und es konnte bis heute nicht gezeigt werden, ob Calciumionen aus der Vakuole tatsächlich am Stomaschluss beteiligt sind (Eisenach & De Angeli, 2017). Dieser Aspekt wurde 2000 von Wood et al. untersucht, indem Calciumänderungen in Schließzellen von *Nicotiana plumbaginifolia*-Epidermisstreifen mithilfe des Calciumreporters Aequorin verfolgt wurden. Dabei wurden unterschiedliche Stimuli appliziert und jeweils die Antwort in An- und Abwesenheit von Calciumkanalblockern und Chelatoren in der Badlösung verglichen. So konnte unterschieden werden, ob das Calcium von außerhalb der Zelle einströmt oder aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Die Experimente von Wood et al. lassen darauf schließen, dass die durch einen Kältereiz induzierte Erhöhung der Calciumkonzentration durch den Einstrom extrazellulären Calciums zustande kommt, während bei mechanischen Reizen und ABA-Applikation intrazelluläre Calciumspeicher eine wichtigere Rolle spielen. Aus welchen intrazellulären Speichern das Calcium stammt, kann mit dieser Technik nicht bestimmt werden.

Eine weitere offene Frage ist die nach dem subzellulären Muster des Calciumsignals. Durch den Einstrom von Calcium aus dem Apoplasten oder aus verschiedenen intrazellulären Speichern könnte es zu lokalen Unterschieden der freien cytosolischen Calciumkonzentration innerhalb einer Zelle kommen. Diese könnten ebenfalls zur Spezifität eines Calciumsignals beitragen (Roelfsema & Hedrich, 2010). Darüber liegen bis heute keine genaueren Daten vor, da aktuell keine Methode zur genügend schnellen und hochauflösenden Visualisierung der Calciumtransienten innerhalb einer Zelle existiert.

1.3.3 Entschlüsselung der Calciumsignale

Zur Umsetzung in eine physiologische Antwort muss die Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytosol von der Pflanze wahrgenommen werden. Dabei kann durch die cytosolischen Calciumtransienten zum Beispiel das Phosphorylierungsmuster von Proteinen und die Genexpression verändert werden (Kudla et al., 2010). Diese Antworten werden von bestimmten Calciumsensorproteinen vermittelt, von denen mehrere Familien in Pflanzen identifiziert wurden. Dazu gehören Calmodulin (CaM) (Anderson et al., 1980) und CMLs (Calmodulin-like Proteins) (Perochon et al., 2011, Snedden & Fromm, 2001, Zielinski, 1998), die CBLs (CalcineurinB-like Proteins) (Kudla et al., 1999, Luan, 2009) und die calciumabhängigen Kinasen (CDPKs Calcium Dependent Protein Kinases) (Hrabak et al., 2003). Die Sensorproteine können nach Sanders et al., 2002 in zwei Klassen eingeteilt werden. Bei den sogenannten »Sensor Respondern« hat das Sensorprotein selbst zusätzlich eine Effektor-domäne, deren Aktivität durch die Calciumbindung geändert wird. Bei den »Sensor Relays« dagegen beeinflusst die Calciumbindung die Interaktion des Sensorproteins mit bestimmten Zielproteinen, die dadurch wiederum ihre Aktivität ändern (Sanders et al., 2002). Die CDPKs gehören zur ersten Gruppe, da durch die Calciumbindung ihre Kinaseaktivität geändert wird (Kudla et al., 2010). Bei CaM, CMLs und CBLs, die zu den Sensor Relays gehören, wird die Interaktion mit Zielproteinen in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration beeinflusst (Sanders et al., 2002). Dabei interagieren die CBLs spezifisch mit bestimmten CIPKs (Calcineurin B-like Interacting Protein Kinases) (Shi et al., 1999, Luan, 2009).

Um eine Spezifität der Calciumsignale zu vermitteln, können verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. So kann durch gewebespezifische Expression oder andere zeitliche oder örtliche Expressionsmuster der Sensorproteine die physiologische Antwort auf Calciumsignale beeinflusst werden (McAinsh & Hetherington, 1998, Kudla et al., 2010). Zusätzlich zu einem calciumabhängigen Signalweg können calciumunabhängige Signalwege existieren, die die physiologische Antwort beeinflussen (Roelfsema & Hedrich, 2010). Die Vermittlung unterschiedlicher Downstream-Antworten auf Calciumsignale wird von einer großen Anzahl der Calciumsensorproteine ermöglicht (Hashimoto & Kudla, 2011), die sich in ihren Eigenschaften wie Calciumsensitivität, Substratspezifität oder in ihrer subzellulären Lokalisierung unterscheiden (Sanders et al., 1999, Simeunovic et al., 2016). In *Arabidopsis* gibt es beispielsweise 34 CDPKs (Hrabak et al., 2003), 7 CaMs, 50 verschiedene CMLs (McCormack et al., 2005), 10 CBLs und 26 CIPKs (Kolukisaoglu et al., 2004, Weinl & Kudla, 2009).

1.4 ABA-vermittelter Stomaschluss

Das Phytohormon Abszisionsäure (ABA, engl.: abscisic acid) hat einen Einfluss auf die Regulierung verschiedener physiologischer Prozesse wie Samenentwicklung, Dormanz und die Anpassung an Stressbedingungen (Walton, 1980, Zeevaart & Creelman, 1988). Für diese Arbeit besonders hervorzuheben ist die physiologische Rolle, die ABA in der Antwort auf Trockenstress spielt. Ein Anstieg der endogenen ABA-Konzentration im Zusammenhang mit Trockenstress wurde erstmals während des Welkens von abgeschnittenen Weizenblättern beobachtet (Wright, 1969, Wright & Hiron, 1969). Ungefähr zur gleichen Zeit wurde in Versuchen mit Weizen und Gerste gezeigt, dass die Applikation von ABA den Stomaschluss induziert (Mittelheuser & Van Steveninck, 1969) und die Stomaöffnung inhibiert (Jones & Mansfield, 1970). Auch in Epidermisstreifen konnte die Induktion des Stomaschlusses durch ABA beobachtet werden und mit einer Abnahme der Kaliumkonzentration in den Schließzellen in Zusammenhang gebracht werden (Horton, 1971, Mansfield & Jones, 1971). Inzwischen wurde in zahlreichen Studien der Signaltransduktionsweg, über den ABA zum Stomaschluss führt, detailliert aufgeklärt (für Reviews siehe z.B. Giraudat et al., 1994, Hetherington & Quatrano, 1991, Cutler et al., 2010, Kim et al., 2010, Munemasa et al., 2015).

Ist eine Pflanze Trockenstress ausgesetzt, wird vermehrt ABA synthetisiert und/oder aus der konjugierten Form freigesetzt, wodurch es zum Anstieg der ABA-Konzentration in den Blättern kommt (Iuchi et al., 2001, Lee et al., 2006, Ikegami et al., 2009, Xu et al., 2012, Sussmilch et al., 2017). Über welchen Mechanismus Trockenstress zur Hochregulierung der ABA-Biosynthese führt, konnte noch nicht abschließend aufgeklärt werden. Wahrscheinlich erfolgt dies über eine Wahrnehmung des sinkenden Zellurgors (Sussmilch et al., 2017, Pierce & Raschke, 1980, McAdam & Brodribb, 2016). Der Anstieg der ABA-Konzentration wird von ABA-Rezeptoren wahrgenommen, deren molekulare Identität lange unbekannt war. Erst 2009 konnte gezeigt werden, dass die Rolle der ABA-Perzeption von PYR/PYL/RCAR-Proteinen (Pyrabactin Resistance/PYR1-Like/Regulatory Component of ABA Receptor) ausgeübt wird (Ma et al., 2009, Park et al., 2009). Dabei induziert ABA eine Interaktion dieser ABA-Rezeptoren mit bestimmten PP2C-Phosphatasen, wie ABI1, ABI2 (ABA Insensitive) und HAB1 (Hypersensitive to ABA), die als negative Regulatoren der ABA-Antwort fungieren (Ma et al., 2009, Park et al., 2009, Gosti et al., 1999, Merlot et al., 2001, Saez et al., 2004, Sheen, 1998). Durch diese Interaktion wiederum kommt es zur Aktivierung von Kinasen der SnRK2-Familie (Sucrose non-fermenting 1-Related Protein Kinases 2), insbesondere der Kinase SnRK2.6, die auch als OST1 (Open Stomata 1) bekannt ist und eine zentrale Rolle in der Regulierung der Stomaöffnung spielt (Mustilli et al., 2002, Yoshida et al., 2002).

Ein Homolog von OST1 in *Vicia faba*, AAPK (ABA-activated Serine Threonine Protein Kinase), wurde bereits 2000 als positiver Regulator der ABA-Antwort in Schließzellen identifiziert (Li et al., 2000). OST1 aktiviert den S-Typ-Anionenkanal SLAC1 über die Phosphorylierung bestimmter Serinreste am N-Terminus (Geiger et al., 2009). Auch eine Aktivierung des R-Typ-Anionenkanals ALMT12/QUAC1 durch OST1 konnte in Oozyten gezeigt werden (Imes et al., 2013). Durch die aus der Aktivierung der Anionenkanäle resultierende Depolarisierung (Roelfsema et al., 2004, Levchenko et al., 2005) wird der Efflux von Kalium durch den auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanal GORK und damit auch der Stomaschluss induziert (Ache et al., 2000, Hosy et al., 2003, Kollist et al., 2014).

Zusätzlich zu den beschriebenen Rezeptoren, Kinasen und Phosphatasen, die den zentralen, calciumunabhängigen ABA-Signaltransduktionsweg in Schließzellen ausmachen, tragen auch verschiedene Signalmoleküle wie zum Beispiel Calciumionen und reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. für Reactive Oxygen Species) zur Regulierung des ABA-vermittelten Stomaschlusses bei (für eine Übersicht siehe z.B Schroeder et al., 2001, Hirayama & Shinozaki, 2007, Kim et al., 2010).

Die Regulierung der Anionenkanäle SLAC1 und SLAH3 über das Signalmolekül Calcium erfolgt durch calciumabhängige Kinasen, die durch eine ABA-induzierte Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration aktiviert werden (Mori et al., 2006, Geiger et al., 2010). Mori et al. zeigten 2006 eine Beteiligung der CPKs 3 und 6 am ABA-induzierten Stomaschluss. Die Patch-Clamp-Messungen an Schließzellprotoplasten von *cpk3cpk6*-Mutanten in dieser Studie wiesen darauf hin, dass diese beiden CPKs eine Rolle für die ABA-vermittelte Aktivierung der Anionenkanäle spielen. Durch die Coexpression von SLAC1 mit verschiedenen CPKs und PP2Cs in *Xenopus*-Oozyten konnte die Aktivierung von SLAC1 durch CPK3, CPK6 (Scherzer et al., 2012), CPK5 (Brandt et al., 2015), CPK21 und CPK23 (Geiger et al., 2010) in Abhängigkeit von Calcium bzw. ABA gemessen werden.

Der calciumabhängige und der calciumunabhängige Zweig des ABA-Signaltransduktionsweges laufen in der Regulierung der Aktivität des Anionenkanals SLAC1 zusammen (Geiger et al., 2010, Huang et al., 2019). Aktuelle Studien zeigen, dass beide Wege nicht streng voneinander getrennt sind. Brandt et al. konnten 2015 zeigen, dass ein Verlust der CPKs 5,6,11 und 23 die Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle verhindert, was darauf hindeutet, dass der calciumunabhängige Zweig allein für die Stomaschlussantwort nicht ausreichend ist. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass ABA die Calciumsensitivität von Anionenkanälen und Kaliumkanälen erhöht (Allen et al., 2002, Siegel et al., 2009, Hubbard et al., 2011, Laanemets et al., 2013). In Abwesenheit von ABA wird die CPK-vermittelte Aktivierung von SLAC1 durch eine direkte Inhibierung des Anionenka-

nals durch die PP2Cs verhindert, was durch eine Dephosphorylierung von SLAC1 durch ABI1 und PP2CA erreicht wird (Brandt et al., 2015). Dadurch könnte die Spezifität der ABA-Antwort erreicht werden, da die Calciumkonzentration auch durch andere Stimuli erhöht werden kann (Munemasa et al., 2015, Brandt et al., 2015).

Mehrere Studien belegen aber, dass nicht in allen Schließzellen eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration im Zusammenhang mit dem ABA-vermittelten Stomaschluss oder der Aktivierung von Anionenkanälen auftritt (McAinsh, 1990, Gilroy et al., 1991, Levchenko et al., 2005, Marten et al., 2007b, Huang et al., 2019). Transiente Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration scheinen also keine zwingende Voraussetzung für diese physiologischen Antworten zu sein, beschleunigen aber möglicherweise den ABA-induzierten Stomaschluss (Huang et al., 2019).

Ein weiteres Signalmolekül, das im ABA-Signaltransduktionsweg in Schließzellen eine Rolle zu spielen scheint, ist H_2O_2 (Pei et al., 2000, Murata et al., 2001). Im Jahr 2000 wurde von Pei et al. gezeigt, dass die Applikation von 5 mM H_2O_2 zur Aktivierung calciumpermeabler Kanäle in der Plasmamembran von Schließzellen führt. Außerdem wurde durch die Applikation von ABA eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (engl.: ROS Reactive Oxygen Species) ausgelöst, die für den ABA-induzierten Stomaschluss eine Rolle spielen könnte (Pei et al., 2000). Drei Jahre später identifizierten Kwak et al. zwei Gene, die für die katalytische Untereinheit der NADPH-Oxidasen codieren und für die ABA-induzierte H_2O_2 -Produktion sowie die Aktivierung calciumpermeabler Kanäle in der Plasmamembran notwendig sind: AtRBOHD und AtRBOHF (*Arabidopsis thaliana* Respiratory Burst Oxidase Homolog). Durch die Applikation von H_2O_2 konnten der in der Doppelmutante gestörte ABA-vermittelte Stomaschluss und die reduzierten ABA-induzierten Calciumströme wiederhergestellt werden (Kwak et al., 2003). Auch beim Signaltransduktionsweg über H_2O_2 spielt OST1 durch Phosphorylierung von AtRBOHF eine regulierende Rolle (Sirichandra et al., 2009). 2012 konnte von Hua et al. gezeigt werden, dass GHR1 (Guard Cell Hydrogen Peroxide-Resistant 1) eine Rolle für den ABA- und H_2O_2 -vermittelten Stomaschluss spielt. Diese Pseudorezeptorkinase ist ebenfalls an der Regulierung des Stomaschlusses durch Dunkelheit und hohe CO_2 -Konzentrationen beteiligt (Sierla et al., 2018). In Oozyten konnte gezeigt werden, dass GHR1 als positiver Regulator von SLAC1 wirkt und von ABI2 inhibiert wird (Hua et al., 2012).

Es ist also ein komplexes Signaltransduktionsnetzwerk für die Regulierung des ABA-vermittelten Stomaschlusses notwendig. Eine Übersicht darüber ist in Abbildung 1.3 gezeigt. Auch die Transduktionswege anderer Effektoren, die zum Stomaschluss führen, interagieren mit dem ABA-Signalweg. Das ist zum Beispiel bei der Stomaschlussantwort auf erhöhte CO_2 -Konzentration und auf Salicylsäure, Methyljasmonat und Pathogene der

Fall (Munemasa et al., 2015, Engineer et al., 2016, Lim et al., 2015, Güzel-Değer et al., 2015, Munemasa et al., 2007). Dass ABA die Stomaschlussantwort auf CO₂ verstärkt, konnte Raschke bereits 1975 beobachten. Später konnte gezeigt werden, dass verschiedene Regulatoren der ABA-Antwort, wie ABI1, ABI2, OST1 und die PYR/PYL/RCAR-Rezeptoren, einen Einfluss auf die CO₂-Antwort haben (Leymarie et al., 1998, Xue et al., 2011, Merilo et al., 2013, Engineer et al., 2016, Dittrich et al., 2019). Wie die unterschiedlichen Signalwege genau interagieren, konnte sowohl bei der CO₂-Antwort als auch bei der Pathogenantwort bis heute nur teilweise aufgeklärt werden (Engineer et al., 2016, Lim et al., 2015). Besonders interessant ist auch die evolutionäre Entwicklung des ABA-Signalweges, die kontrovers diskutiert wird und im folgenden Kapitel näher betrachtet wird.

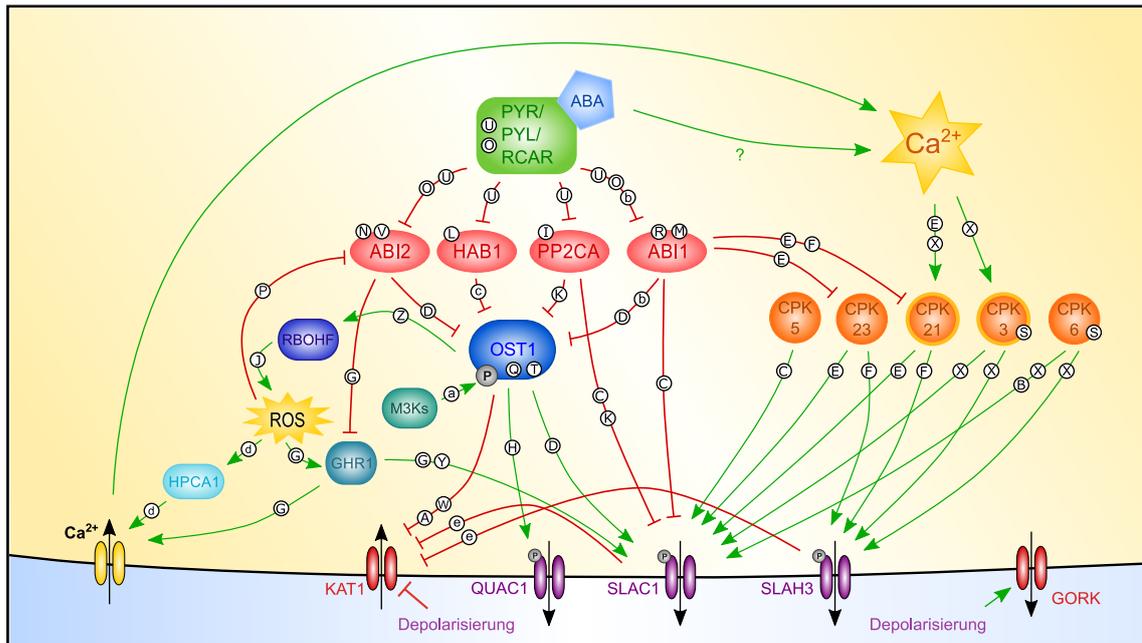


Abb. 1.3: Übersichtsmodell für den ABA-Signaltransduktionsweg, der zum Stomaschluss führt, mit Literaturreferenzen. ABA bindet an die Rezeptoren (PYP/PYL/RCAR). Dadurch werden die PP2C-Phosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1, die negative Regulatoren der ABA-Antwort sind, an den ABA-Rezeptorkomplex gebunden und inhibiert. Die Inhibition der SnRK-Kinase OST1 durch die PP2Cs wird so aufgehoben. OST1 aktiviert die S- und R-Typ Anionenkanäle SLAC1 und QUAC1 und inhibiert den einwärtsgerichteten K⁺-Kanal KAT1. Auch GHR1 trägt zur Aktivierung des Anionenkanals SLAC1 bei. Zusätzlich findet eine Regulierung der Anionenkanäle über bestimmte CPKs statt. Dabei wird die Aktivität der CPKs 3 und 21 nachweislich durch die Calciumkonzentration reguliert. Diese stellen somit einen Teil des Ca²⁺-abhängigen Zweiges der Stomaschlussantwort dar. Der Ca²⁺-abhängige und der Ca²⁺-unabhängige Weg sind miteinander verbunden. ABI1 inhibiert zum Beispiel CPK21 und 23. Außerdem spielt GHR1 eine Rolle bei der Aktivierung des ABA- und ROS-vermittelten Ca²⁺-Einstroms über die Plasmamembran ins Cytosol. Welche weiteren Mechanismen zur ABA-induzierten Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration führen und welche Interaktionen es noch zwischen den beiden Wegen gibt ist bisher nicht bekannt. Die Aktivierung der Anionenkanäle führt zur Depolarisierung der Plasmamembran, die einen Kaliumefflux durch den auswärtsgerichteten K⁺-Kanal GORK zur Folge hat. Die Zahlen in den Kreisen geben Referenzen für die jeweiligen Komponenten an. A: Acharya et al., 2013, B: Brandt et al., 2012, C: Brandt et al., 2015, D: Geiger et al., 2009, E: Geiger et al., 2010, F: Geiger et al., 2011, G: Hua et al., 2012, H: Imes et al., 2013, I: Kuhn et al., 2006, J: Kwak et al., 2003, K: Lee et al., 2009, L: Leonhardt et al., 2004, M: Leung et al., 1994, N: Leung et al., 1997, O: Ma et al., 2009, P: Meinhard et al., 2002, Q: Merlot et al., 2002, R: Meyer et al., 1994, S: Mori et al., 2006, T: Mustilli et al., 2002, U: Park et al., 2009, V: Rodriguez, 1998, W: Sato et al., 2009, X: Scherzer et al., 2012, Sierla et al., 2018, Z: Sirichandra et al., 2009, a: Takahashi et al., 2020, b: Umezawa et al., 2009, c: Vlad et al., 2009, d: Wu et al., 2020, e: Zhang et al., 2016.

1.5 Evolutionsgeschichte der Stomata

1.5.1 Evolutionärer Ursprung von Stomata und Funktionswandel

Die evolutionär betrachtet ältesten, noch existierenden Landpflanzen an denen Stomata auftreten, gehören zu den Abteilungen der Moose (Willmer & Fricker, 1996). Bei Moosen und Gefäßpflanzen treten Stomata nur in der sporophytischen Generation auf. Dabei ist aber ein wichtiger Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen zu beachten: während bei Moosen der haploide Gametophyt die dominante, photosynthetisch aktive Generation darstellt, ist bei den Gefäßpflanzen der diploide, blättertragende Sporophyt die dominante Generation. Das heißt, dass die Stomata der Moose nicht an den Blättchen des Gametophyten zu finden sind, sondern ausschließlich am Sporangium auftreten. Bei Gefäßpflanzen sind Stomata dagegen vor allem an den photosynthetisch aktiven Blättern zu finden (Raven, 2002, Susmilch et al., 2017). Innerhalb der drei Gruppen der Moose kommen Stomata bei verschiedenen Familien der Horn- und Laubmoose vor, jedoch nicht innerhalb der Lebermoose (für eine Übersicht siehe zum Beispiel Merced & Renzaglia, 2017, Fig. 1). Die an den Gametophyten der Lebermoose auftretenden Poren sind nach heutigem Kenntnisstand nicht mit Stomata verwandt (Chater et al., 2017a). Bei den Laubmoosarten, die Stomata besitzen, sind diese meist an der Basis der Sporenkapsel ringförmig angeordnet (Paton & Pearce, 1957, Chater et al., 2016 Fig. 1b). Im Falle der Hornmoose sind die Stomata über die gesamte Länge des zylindrisch hornförmigen Sporophyten verteilt (Paton & Pearce, 1957, Merced & Renzaglia, 2017, Renzaglia et al., 2017). Bei den ersten Gefäßpflanzen, den Lycophyten und Farnen, ist der blättertragende Sporophyt die dominante photosynthetisch aktive Generation (Ziegler, 1987), und Stomata treten wie bei den Samenpflanzen in der Epidermis der Blätter auf (Willmer & Fricker, 1996). Bei den Samenpflanzen treten sie zusätzlich an anderen Organen wie Kronblättern, Kelchblättern, der Sprossachse und an Früchten auf (Willmer & Fricker, 1996).

Der evolutionäre Ursprung der Stomata ist bis heute umstritten (Raven, 2002). Es gibt verschiedene Hypothesen, denen zufolge Stomata entweder monophyletisch sind, also einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben, oder mehrfach unabhängig voneinander in der Evolutionsgeschichte entstanden sind (Raven, 2002, Susmilch et al., 2017). Die nicht endgültig aufgeklärten Verwandtschaftsverhältnisse unter den drei Gruppen der Moose (Qiu et al., 2006, Wickett et al., 2014, Cox et al., 2014, Villarreal & Renzaglia, 2015, Cooper, 2014) lassen außerdem verschiedene Theorien zum ersten Auftreten und eventuell später folgenden Verlusten von Stomata in verschiedenen Arten oder Familien

zu (Sussmilch et al., 2017, Haig, 2012). Studien zur Entwicklung von Stomata in *Physcomitrella patens* ergaben, dass die Gene für Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die Entwicklung von Schließzellen und Stomata sind, homolog zu denen der Angiospermen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* sind (MacAlister & Bergmann, 2011, Chater et al., 2016), was auf einen gemeinsamen Ursprung hinweist. Wie die Stomaentwicklung in Hornmoosen reguliert wird, ist noch nicht bekannt (Chater et al., 2017b).

Betrachtet man die Evolution von Stomata und Schließzellen, ist es wichtig den Zusammenhang mit der jeweiligen Funktion der Stomata miteinzubeziehen. Während die Hauptfunktion der Stomata bei Gefäßpflanzen die Optimierung der CO₂-Fixierung und des Wasserhaushalts ist (Cowan & Farquhar, 1977, Raven, 2002), geht man heute davon aus, dass Stomata in Moosen eine Rolle für die Austrocknung des Sporophyten und die Freisetzung der reifen Sporen spielen und für die photosynthetische CO₂-Fixierung nicht oder nur begrenzt relevant sind (Lucas & Renzaglia, 2002, Duckett et al., 2009, Villarreal & Renzaglia, 2015, Chater et al., 2016). Diese Annahme wird unterstützt von der Tatsache, dass *Physcomitrella patens*-Mutanten ohne Stomata keinen direkt sichtbaren Phänotyp haben (Chater et al., 2016, Sussmilch et al., 2017). Der einzige Effekt in den Mutanten ist die verspätete Öffnung der Sporenkapseln im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, was für eine Rolle bei der Austrocknung der Sporenkapsel spricht (Chater et al., 2016). *Arabidopsis*-Pflanzen ohne Stomata zeigen dagegen einen deutlichen Phänotyp und sind nicht fähig über das Keimlingsstadium hinaus zu wachsen (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006, MacAlister et al., 2007, Sussmilch et al., 2017), da durch die fehlenden Stomata die photosynthetische CO₂-Fixierung behindert wird. Die Entstehung der Lycophyten und Farne als erste Gefäßpflanzen mit blättertragenden Sporophyten brachte also einen bedeutenden Funktionswandel der Stomata mit sich (Brodribb & McAdam, 2017).

1.5.2 Evolution des ABA-Signaltransduktionsweges in Schließzellen

Die unterschiedlichen Rollen der Stomata legen nahe, dass sich die Regulierung der Stomaweite im Laufe der Evolution an die jeweilige Funktion angepasst hat (Sussmilch et al., 2019a). Die Regulierbarkeit der Porenweite ist demnach vor allem für Gefäßpflanzen wichtig, da sie ermöglicht das Verhältnis von CO₂-Aufnahme zu Transpiration an die jeweilige Wasserverfügbarkeit und andere Faktoren anzupassen (Cowan & Farquhar, 1977, Raven, 2002). In Moosen wird die regulierbare Öffnungsweite kritisch diskutiert und es gibt Hinweise darauf, dass es ab einem gewissen Reifegrad der Stomata nur noch zu einer einmaligen Öffnung der Stomata kommt. Durch Veränderungen der Zellwand ist danach

kein Stomaschluss mehr möglich und wäre bei einer Funktion der Stomata zur Austrocknung der Sporenkapsel auch nicht notwendig (Merced & Renzaglia, 2014, Merced & Renzaglia, 2018).

Die Regulierungsmechanismen, über die die Öffnungsweite der Stomata angepasst wird, sind in Angiospermen am detailliertesten untersucht, vor allem in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Ein komplexes Netzwerk unterschiedlicher Signaltransduktionswege ist notwendig, um die Öffnungsweite der Stomata den jeweiligen Bedingungen anzupassen (Schroeder et al., 2001, Jezek & Blatt, 2017). Genau wie der evolutionäre Ursprung der Stomata wird auch die Entwicklung der Signaltransduktionswege in Schließzellen kontrovers diskutiert (Sussmilch et al., 2017). Das gradualistische Modell für die schrittweise Entwicklung der Signaltransduktionswege in Schließzellen steht dabei der Hypothese gegenüber, dass sich diese Signaltransduktionswege schon vor oder während der Entstehung der Moose in der Evolution entwickelten und dass in Schließzellen basaler Landpflanzen prinzipiell bereits die gleichen Signaltransduktionswege vorliegen wie in Samenpflanzen (Sussmilch et al., 2017, Ruzsala et al., 2011, Chater et al., 2011, Brodribb & McAdam, 2011, Brodribb & McAdam, 2017).

Beide Modelle werden durch verschiedene Forschungsergebnisse gestützt. So konnte gezeigt werden, dass Schließzellen der Moose *Physcomitrella patens* und *Funaria hygrometrica* und des Lycophyten *Selaginella uncinata* auf ABA-Applikation und erhöhte CO₂-Konzentrationen mit Stomaschluss reagieren (Ruzsala et al., 2011, Chater et al., 2011). Außerdem konnten Chater et al. zeigen, dass die ABA-Antwort in *Physcomitrella patens* von einem Homolog der Kinase OST1 abhängig ist. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass die Signalwege bereits in Schließzellen basaler Landpflanzen vorhanden und funktionsfähig sind. Durch heterologe Expression und elektrophysiologische Messungen in *Xenopus*-Oozyten konnte gezeigt werden, dass der Anionenkanal PpSLAC1 (SLAC1 Homolog in *Physcomitrella patens*) durch PpOST1 aktiviert werden kann. Im Lebermoos *Marchantia polymorpha* und in der Grünalge *Klebsormidium nitens* konnte dagegen kein funktionelles SLAC1/OST1 Paar gefunden werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass bereits die Laubmoose über eine aktive Kontrolle der Stomaöffnung mittels konservierter Signaltransduktionswege verfügen (Lind et al., 2015). Signalwegkomponenten aus Hornmoosen und Farnen wurden in dieser Studie jedoch nicht untersucht. Für die ABA-Sensitivität von Hornmoos-Stomata gibt es widersprüchliche Ergebnisse. So wurde 1987 von Hartung et al. eine Verringerung der Stomaöffnung nach der Applikation von ABA beschrieben, Pressel et al. konnten 2018 keine Antwort der Stomata auf ABA, Trockenheit und Dunkelheit zeigen. Die Funktion einer ABA-gesteuerten Regulierung des Stomaschlusses wird in Moosen in Frage gestellt, da die Stomaöffnung hier

wahrscheinlich eine Funktion zur Austrocknung der Sporenkapsel darstellt und nicht zum photosynthetischen Gasaustausch (Chater et al., 2016, Sussmilch et al., 2019a).

Das gradualistische Modell steht für eine allmähliche Entwicklung des ABA-gesteuerten Stomaschlusses in den verschiedenen Abteilungen der Landpflanzen bis hin zu den Angiospermen, die die komplexesten Regulierungsmechanismen zeigen (Sussmilch et al., 2017, Sussmilch et al., 2019b). Für dieses Modell spricht, dass in Gaswechselformen an unterschiedlichen Farn- und Lycophytenarten kein ABA-vermittelter Stomaschluss gemessen werden konnte, obwohl die ABA-Konzentration in den Blättern während des Trockenstresses anstieg (Brodribb & McAdam, 2011). Außerdem kann das Verhalten der Stomata verschiedener Farne und Lycophyten bei Veränderungen des Wasserpotentials im Blatt anhand eines einfachen Modells vorhergesagt werden (Brodribb & McAdam, 2011). Im Gegensatz zu Stomata von Angiospermen kann weder eine sogenannte »wrong way response« (Erklärung z.B. in Buckley, 2005), noch eine ABA-induzierte Inhibierung der Stomaöffnung bei Rehydrierung beobachtet werden (McAdam & Brodribb, 2012). Die Stomata zeigen demnach ein hydropassives Verhalten, der Turgor der Schließzellen würde also durch den Turgor des gesamten Blattes reguliert und nicht durch aktive metabolische Regulierung in den Schließzellen selbst, wie es bei Angiospermen der Fall ist (Brodribb & McAdam, 2011, Franks, 2013). Laut dieser Theorie tritt der ABA-vermittelte Stomaschluss zum ersten Mal in Gymnospermen auf (Brodribb & McAdam, 2011). Vergleichende Studien weisen darauf hin, dass die ABA-Antwort in Gymnospermen-Arten nicht, wie in Angiospermen, calciumabhängig ist (Brodribb & McAdam, 2013) und dass die Antwort auf Änderungen in der Luftfeuchtigkeit (VPD, engl.: Vapor Pressure Deficit) noch nicht über ABA reguliert wird (McAdam & Brodribb, 2015).

Inzwischen konnten zwei Arbeitsgruppen einen ABA-vermittelten Stomaschluss in vier verschiedenen Farnspezies zeigen (Hörak et al., 2017, Cai et al., 2017). Dabei hängt die Fähigkeit der Stomata auf ABA zu reagieren und das Ausmaß des Stomaschlusses sowohl von den Bedingungen, unter denen die Farne angezogen wurden, als auch von der untersuchten Farnspezies ab (Hörak et al., 2017). Demzufolge existiert auch in Farnen eine aktive Kontrolle der Stomaöffnung durch ABA (Hörak et al., 2017, Cai et al., 2017), was dem gradualistischen Modell widersprechen würde.

Abgesehen von der umstrittenen Rolle in der Stomaöffnung spielt ABA in basalen Landpflanzen eine Rolle für die Toleranz gegenüber Austrocknung, Kälte und Salzstress (Werner et al., 1991, Minami et al., 2003, Cuming et al., 2007, Koster et al., 2010, Sakata et al., 2014, Takezawa et al., 2011). Ein Anstieg der ABA-Konzentration als Antwort auf Trockenstress konnte in den verschiedenen Abteilungen der Landpflanzen (McAdam & Brodribb, 2012) sowie in bestimmten Algenarten (Maršálek et al., 1992) gemessen

werden. Homologe der ABA-Rezeptoren der PYR/PYL/RCAR-Familie konnten in allen Landpflanzen, selbst in den Lebermoosen, die keine Stomata besitzen, identifiziert werden (Hauser et al., 2011, Wang et al., 2015a). Inzwischen wurde auch ein Homolog von PYL in der streptophyten Alge *Zygnema circumcarinatum* identifiziert (de Vries et al., 2018) und weitere in anderen Arten der Zygnematophyceae (Sun et al., 2019). ZcPYL8 interagiert mit PP2Cs und inhibiert deren Aktivität, allerdings im Gegensatz zu den PYR/PYLs der Landpflanzen unabhängig von ABA (Sun et al., 2019). Möglicherweise ist diese ABA-Sensitivität der PYR/PYLs der Ansatzpunkt für die Entwicklung eines ABA-abhängigen Signalwegs aus einem ursprünglich ABA-unabhängigen Signalweg (Sun et al., 2019).

Der ABA-Signalweg scheint in allen Landpflanzen konserviert zu sein, wie vor allem Studien an der Modellpflanze *Physcomitrella patens* belegen (Takezawa et al., 2011, Sakata et al., 2014). Durch die Perzeption von ABA durch PYR/PYL/RCARs werden die negativen Regulatoren der PP2C-Familie inhibiert, wodurch es wiederum zur Aktivierung der SnRK2-Kinasen kommt, die die ABA-Antwort auslösen (Cuming, 2019). Außerdem wurde eine B3 Raf-like-MAP3K (MAP3K: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase), die SnRK2s phosphoryliert und für die ABA-Antwort und Trockentoleranz in *Physcomitrella patens* essentiell ist, identifiziert (Saruhashi et al., 2015 und Stevenson et al., 2016). Auch in *Arabidopsis* sind MAP3Ks für die Aktivierung der SnRK2-Kinasen notwendig (Takahashi et al., 2020, Lin et al., 2020).

In *Ceratopteris richardii* konnte gezeigt werden, dass ABA zusammen mit einem anderen Hormon die Bestimmung des Geschlechts des Gametophyten beeinflusst (Warne & Hickok, 1991, McAdam et al., 2016). Darüber hinaus wird diese ABA-Antwort von einem Homolog von OST1 vermittelt, das den Ergebnissen zufolge keinen Einfluss auf die Stomaantwort hat (McAdam et al., 2016). Es existiert also ein ursprünglicher ABA-Signaltransduktionsweg, der andere Funktionen als den Stomaschluss hatte. Wann genau sich aus diesem der ABA-vermittelte Stomaschluss entwickelte und welche Bedeutung dieser in Moosen, Lycophyten und Farnen spielt, bleibt aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse und Modelle umstritten.

1.6 Zielsetzung

Die Regulierung der Stomaweite durch Volumenänderungen der Schließzellen ermöglicht Gefäßpflanzen eine Abstimmung ihres Wasserhaushalts und Gaswechsels an wechselnde Umweltbedingungen. Eine wichtige Rolle für die Signaltransduktionswege, die zum Stomaschluss führen, spielt das Signalmolekül Calcium (Roelfsema & Hedrich, 2010).

Grabov & Blatt zeigten 1998, dass Hyperpolarisierungen der Plasmamembran mit Hilfe der TEVC-Technik (engl.: Two Electrode Voltage Clamp) in Schließzellen aus Epidermisstreifen von *Vicia faba* zu transienten Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration führen. Auch in Schließzellen intakter Tabakpflanzen wurde diese Methode angewandt, um die cytosolische Calciumkonzentration zu erhöhen (Stange et al., 2010). In meiner Arbeit sollten die durch diese Methode verursachten Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration hinsichtlich ihres subzellulären Musters genauer untersucht werden. Um das zu ermöglichen, sollte eine Methode für die simultane Durchführung konfokalmikroskopischer Aufnahmen und elektrophysiologischer Messungen etabliert werden.

Bei der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse an Schließzellen und der gleichzeitigen Visualisierung von Fluoreszenzfarbstoffen im Cytosol mithilfe des Spinning-Disc-Systems stellte sich heraus, dass sich das cytosolische Volumen während der Pulse veränderte. Daraus ergab sich eine weitere Fragestellung dieser Arbeit, nämlich die genauere Analyse dieser Volumenänderungen. Ziel war hierbei, den Grund für die Änderungen des cytosolischen Volumens zu ermitteln. Volumenänderungen der Schließzellen sind grundlegend für die Regulierung der Stomaweite, deswegen war es sehr interessant kurzfristige Volumenänderungen des Cytosols gezielt hervorrufen zu können. Von besonderem Interesse war es dabei, die Auswirkungen der Volumenänderungen auf die cytosolische Calciumkonzentration zu untersuchen, was mit Hilfe calciumsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe realisiert wurde.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine elektrophysiologische Charakterisierung von Schließzellen in Farnarten durchgeführt. In basalen Landpflanzen ist im Vergleich zu Angiospermen-Arten noch wenig über die Regulierung der Stomaöffnungsweite bekannt. Insbesondere gibt es keine Studien, die elektrophysiologische Messungen an Schließzellen von Farnen zeigen. Anhand der für diesen Teil durchgeführten Versuche sollten folgende Fragen beantwortet werden: zum einen sollten die spannungsabhängigen Ströme über die Plasmamembran von Farnschließzellen charakterisiert werden, zum anderen sollte untersucht werden, ob sich durch die Hyperpolarisierung der Plasmamembran wie in Tabak-Schließzellen eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration herbeiführen lässt. Bei der Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen in die Schließzellen von verschiedenen Farnarten wurde außerdem eine Diffusion des Farbstoffs in die benachbarte Schließzelle beobachtet. Auch die Grundlage dieser symplastischen Verbindung wurde in dieser Arbeit untersucht.

Die Rolle, die ABA für den Stomaschluss in Farnspezies spielt, ist bis heute umstritten und der evolutionären Zeitpunkt, an dem ABA-kontrollierte Stomabewegungen erstmals

auftraten ist unklar (Sussmilch et al., 2017). Ein weiteres Ziel war es, eine Methode zur Applikation von ABA an Schließzellen intakter Pflanzen zu etablieren und diese vergleichend in Tabak und *Polypodium* durchzuführen.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

2.1.1 *Nicotiana tabacum*

2.1.1.1 Pflanzen für elektrophysiologische Messungen

Nicotiana tabacum L. cv SR1-Pflanzen wurden im Gewächshaus auf Erde kultiviert. Dabei erfolgte von 9 bis 21 Uhr eine zusätzliche Beleuchtung mit Halogen-Metalldampflampen (OSRAM Powerstar HQI-E, 400 W, Philips). Für die Messungen an intakten Pflanzen und für das Vorbereiten von Epidermisstreifen wurde jeweils das zweite oder dritte Blatt von 4-6 Wochen alten Pflanzen verwendet.

2.1.1.2 Axenische Anzucht für *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Blattstückchen

Um Pflanzen für die Transformation vorzubereiten, wurden Samen von *Nicotiana tabacum* L. cv SR1 oberflächensterilisiert. Dafür wurden die Samen zuerst für 20 min in 100 % EtOH, dann für 15 min in einer 6 %-igen NaClO-Lösung mit 0,02 % Triton X 100 in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Samen wurden anschließend unter der Sterilbank 4-5 mal mit autoklaviertem Wasser gewaschen, auf Whatman-Filterpapier getrocknet und in sterilen Polypropylen-Boxen auf MS-Medium (1x MS inkl. MES, 3 % Saccharose, pH 5,7, 0,8 % Gelrite) ausgelegt. Die Anzucht erfolgte im Phytotron unter Langtag-Bedingungen (16/8 h) bei 26/20 °C und $300 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Die zur Transformation verwendeten Blattstückchen stammten von 5-6 Wochen alten Tabakpflanzen.

2.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Die für elektrophysiologische Messungen verwendeten *A. thaliana*-Pflanzen wurden auf autoklavierter Erde in einem Klimaschrank (Serie KBWF, Binder, Tuttlingen, Deutschland) mit einem Tag/Nacht Rhythmus von 12/12 h angezogen (22/17 °C, $100 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$,

60 % relative Luftfeuchte). Für das Isolieren von Epidermisstreifen wurden junge Blätter von 4-5 Wochen alten Pflanzen verwendet.

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation wurden *A. thaliana* acc. Columbia 0-Pflanzen eingesetzt, die zuerst für 4-6 Wochen in der Klimakammer unter Kurztag-Bedingungen (8/16 h) bei 22/16 °C angezogen und danach im Gewächshaus mit einer zusätzlichen Beleuchtung von $100 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Osram TL70 F32T8/TL 741, 25 W, 230 V, Philips) im Tag-Nacht-Rhythmus von 12/12 h weiter kultiviert wurden.

2.1.3 *Polypodium vulgare* und *Asplenium scolopendrium*

Die beiden der Ordnung Polypodiales zugehörigen Farnspezies *Polypodium* und *Asplenium* wurden auf Erde in Töpfen angezogen. *Polypodium* Pflanzen wurden in einer Klimakammer ($\sim 22^\circ\text{C}$, $50 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h kultiviert. *Asplenium* Pflanzen stammten aus dem botanischen Garten der Universität Würzburg und wurden in Töpfen im Freiland unter schattigen Bedingungen weiterkultiviert. Alle 4-6 Wochen wurden alte Farnwedel entfernt, um das Wachstum von neuen zu fördern. Für elektrophysiologische Messungen wurden junge Farnwedel eingesetzt, die gerade im Endstadium der vollständigen Entfaltung waren.

2.1.4 *Ceratopteris richardii*

Die an aquatische Bedingungen angepasste Farnspezies *Ceratopteris richardii* wurde im Gewächshaus kultiviert. Um eine hohe Luftfeuchte von $\sim 100\%$ zu erreichen wurden die Pflanzschalen mit transparenten Hauben abgedeckt.

2.2 Elektrophysiologische Methoden

2.2.1 Einstich in Schließzellen: die TEVC-Technik

In dieser Arbeit wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (engl.: Two Electrode Voltage Clamp Technique, kurz TEVC) eingesetzt, um das Verhalten von Ionenkanälen in der Plasmamembran von Schließzellen zu untersuchen. Sie ist eine Version der Spannungsklemm-Methode, die um 1950 in Experimenten mit Tintenfisch-Axonon entwickelt wurde (Marmont, 1949, Cole, 1949 und Hodgkin et al., 1952, s. Hille, 2001)

und die es ermöglicht das Membranpotential einer Zelle zu kontrollieren. Die TEVC-Technik kommt heute häufig zum Einsatz, um heterolog exprimierte Transportproteine in *Xenopus laevis*-Oozyten zu charakterisieren (siehe zum Beispiel Review von Wagner et al., 2000). Dabei werden zwei Mikroelektroden in das Cytosol einer Zelle eingestochen. Eine der zwei Elektroden, die Spannungselektrode, misst dabei das Membranpotential der Zelle. Mit der zweiten, der Stromelektrode, kann Strom in die Zelle injiziert werden, um das Membranpotential auf eine definierte Spannung zu klemmen. Ein Differentialverstärker vergleicht dafür den Sollwert für die Spannung mit dem durch die Spannungselektrode gemessenen Istwert und gleicht die Strominjektion entsprechend an. Über den injizierten Strom können so Rückschlüsse auf spannungsabhängige Änderungen in der Leitfähigkeit der Membran gezogen werden.

Aufgrund der geringen Größe von Schließzellen ist ein Einstich mit zwei getrennten Elektroden schwierig. Stattdessen werden für die TEVC-Technik doppelläufige Elektroden, bei denen zwei Kapillaren in einer Spitze enden, eingesetzt. So können durch einen einmaligen Einstich Spannungs- und Stromelektrode in die Zelle gebracht werden, wodurch TEVC-Messungen an Schließzellen im intakten Organismus oder in isolierten Epidermisstreifen möglich sind.

Zusätzlich zu doppelläufigen Elektroden wurden in dieser Arbeit auch Elektroden mit drei Kanälen verwendet. Diese Elektroden ermöglichen es eine Strominjektion durch den dritten Kanal durchzuführen, die durch die Stromelektrode kompensiert wird. Mit diesem Ansatz können ladungstragende Moleküle iontophoretisch in die Zelle geladen werden, ohne dass dadurch die Haltespannung geändert wird. Diese Methode wurde angewandt, um Schließzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen zu beladen.

2.2.2 Vorbereitung der Pflanzen für die Messung

2.2.2.1 Messungen an intakten Pflanzen

Die intakten Pflanzen wurden für die Messungen im Topf neben dem Objektisch positioniert, sodass ein Blatt mit der Blattunterseite nach oben auf einen Plexiglashalter geklebt werden konnte. Dafür wurde transparentes doppelseitiges Klebeband und zusätzlich ein medizinischer Kleber (Medical Adhesive B Liquid, AMT Aromando Medizintechnik GmbH, Düsseldorf, Deutschland) auf den Halter aufgebracht, bevor das Blatt aufgeklebt wurde. Zur Positionierung der Pflanze wurde bei Tabakpflanzen ein Holzkeil auf den Mikroskopisch gelegt, bei größeren Pflanzen wie Farnen wurde außerdem eine Laborhebebühne eingesetzt, um den Topf zu halten.

2.2.2.2 Vorbereitung von Epidermisstreifen

Messungen an Schließzellen von *N. tabacum* und *A. thaliana* wurden außerdem an isolierten Epidermisstreifen durchgeführt. Dafür wurden mit einer Uhrmacherpinzette Epidermisstreifen von der Blattunterseite eines abgeschnittenen Blattes abgezogen. Für *A. thaliana* wurde das Blatt dafür mit der Blattunterseite nach oben auf Klebeband fixiert, dabei wurde die Spitze des Blattes nicht mit aufgeklebt. Von der Spitze des Blattes aus konnte die Epidermis dann leicht abgezogen werden. Nach dem Abziehen der Streifen wurden diese sofort auf dünn mit medizinischem Kleber (Medical Adhesive B Liquid, AMT Armando Medizintechnik GmbH, Düsseldorf, Deutschland) bestrichene Deckgläschen gedrückt. Die Deckgläschen wurden nach dem Bestreichen mit Kleber für einige Minuten mit Wasser gewaschen, um eventuelle Lösungsmittelreste zu entfernen. Die aufgeklebten Epidermisstreifen wurden dann vor der Messung für mindestens 2 h in einer Lösung zum Öffnen der Stomata inkubiert (Opening Buffer, s. Abschnitt 2.2.5), bevor sie für die Messung in eine andere Badlösung gegeben wurden (Recording Buffer, s. Abschnitt 2.2.5).

2.2.3 Aufbau des Messplatzes

Die Einstichmessungen an Schließzellen wurden an einem Messplatz durchgeführt, der eine Kombination elektrophysiologischer Messungen und Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht (s. Abbildung 2.1). Dabei stand ein aufrechtes Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 FS, ZEISS, Deutschland) auf einem schwingungsgedämpften Tisch, der zur Abschirmung elektrischer Störungen aus der Umgebung von einem Faradayschen Käfig umgeben war.

Für die Steuerung der Mikroelektroden wurde ein Piezo-getriebener Mikromanipulator (MM3A, Kleindiek Nanotechnologie, Reutlingen, Deutschland) verwendet. Dieser wurde mit Hilfe eines Magneten auf dem Objektisch befestigt. Auf der gleichen Seite des Mikroskops waren die Vorverstärker (HS-180, Bio-Logic Claix, Frankreich) mit einem Eingangswiderstand von $\sim 10^{11} \Omega$ angebracht, an die alle Kapillaren der Mikroelektroden über Halbzellen (s. Abschnitt 2.2.4.1) angeschlossen wurden. Die Vorverstärker wurden an Mikroelektrodenverstärker angeschlossen, die sich außerhalb des Käfigs befanden. Es wurden während dieser Arbeit zwei verschiedene Verstärkersysteme verwendet. Für die Messungen innerhalb der ersten zweieinhalb Jahre (bis Mitte 2015) war das eine Kombination aus Mikroelektrodenverstärkern (VF-102 Dual Microelectrode Verstärker und CA-100 Clamp Amplifier, Bio-Logic, Claix, Frankreich) für die TEVC-Technik und einem zusätzlichen Nachbau des VF-102 für die iontophoretische Beladung der Schließ-

zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Später wurde eine speziell neu angefertigte Kombination aus vier Mikroelektrodenverstärkern mit jeweils integriertem Differentialverstärker verwendet. Die Daten wurden mit einem 4-Pol Tiefpass-Bessel-Filter (LPF 202A, Warner Instruments Corp., Hamden, USA) bei 10 Hz gefiltert und über einen DA/AD-Wandler (LIH-1600, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) an den Messcomputer übertragen. Für die Aufzeichnung der Daten und zur Kontrolle der applizierten Spannungspulse wurde die Software HEKA PULSE Version 8.74 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) verwendet.

Für eine Einstichmessung wurde zuerst mit einer kleineren Vergrößerung (Achromat 10x/0,25, ZEISS, Deutschland) die Mikroelektrode grob positioniert. Dann wurde für den eigentlichen Einstich und die Fluoreszenzaufnahmen auf ein long-distance Wasserimmersionsobjektiv mit stärkerer Vergrößerung (entweder Achroplan 40x/0.8 W oder W Plan-Apochromat, 63x/1.0, beide ZEISS, Deutschland) gewechselt. Die Spitze der Mikroelektroden tauchte für den Einstich in die Badlösung, die gleichzeitig als Immersionslösung diente. Um den Stromkreis zu schließen, wurde eine mit der Erdung verbundene Referenzelektrode in die Badlösung getaucht. Für Versuche, in denen zwischen unterschiedlichen Badlösungen gewechselt wurde, wurde ein Perfusionssystem verwendet. Der Zulauf der Badlösungen auf die Probe erfolgte der Schwerkraft folgend durch eine Kanüle. Dabei konnte mittels zweier Hähne der Zulauf gestoppt und zwischen den verschiedenen Lösungen gewählt werden. Durch einen Schlauch auf der gegenüberliegenden Seite der Probe wurde die Lösung mit einer Vakuumpumpe (Laboport, KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland) abgesaugt.

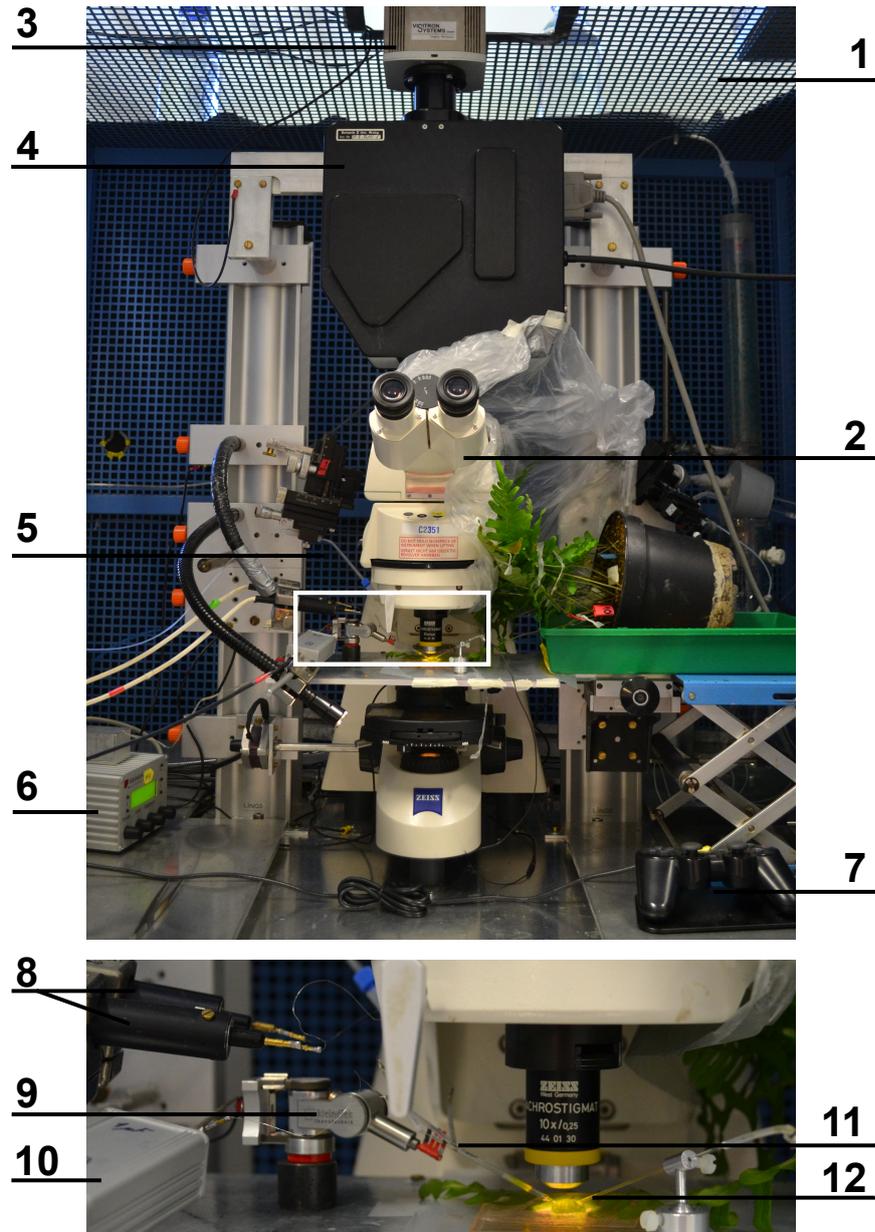


Abb. 2.1: Aufbau des Messplatzes für elektrophysiologische Messungen und Fluoreszenzmikroskopie. Hier dargestellt ist der Aufbau für Messungen an einer intakten Farnpflanze. Die wichtigsten Komponenten werden im Folgenden benannt. Der untere Teil der Abbildung zeigt den oben markierten Ausschnitt vergrößert. 1: Faradayscher Käfig; 2: Mikroskop; 3: EMCCD-Kamera, 4: Filtrerräder und Spinning Disc des CARVII-Systems; 5: Vorrichtung für Perfusionsversuche; 6: Steuermodul des Mikromanipulators; 7: Steuerung des Mikromanipulators; 8: Vorverstärker für TEVC-Technik; 9: Mikromanipulator; 10: Vorverstärker für iontophoretische Beladung mit Fluoreszenzfarbstoffen; 11: Mikroelektrode mit drei Kanälen; 12: Referenzelektrode.

2.2.4 Vorbereitung der Elektroden

2.2.4.1 Mikroelektroden für den Einstich

Für die Herstellung der Mikroelektroden wurden Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Außendurchmesser: 1 mm, Wandstärke 0,21 mm; Hilgenberg GmbH, Mahlsfeld, Deutschland) verwendet. Das Filament an der Innenseite der Kapillare (Durchmesser 0,1 mm) ist wichtig, um die Elektrodenlösung beim Befüllen über Adhäsion bis in die sehr feine Spitze der Elektrode zu leiten. Je nach Art der Mikroelektroden wurden zwei oder drei dieser Kapillaren zusammen in ein modifiziertes vertikales Pipettenziehgerät (List-Medical L/M-3P-A, List-Electronic, Darmstadt, Deutschland) eingespannt, mit einem Glühwendel erhitzt und dabei miteinander um 360° verdreht. Nach einer Abkühlzeit von 10 s wurden die Kapillaren noch einmal erhitzt und dabei der Schwerkraft folgend mit Hilfe eines Abstandhalters entweder 4 oder 7 mm lang ausgezogen. Die so entstandenen Mikroelektrodenrohlinge wurden dann im horizontalen Laser-Pipettenziehgerät (P-2000, Sutter Instrument Co., Novato, USA) zu zwei getrennten, fertigen Mikroelektroden ausgezogen. Diese Elektroden wurden mit Hilfe einer Spritze und einer elastischen Kanüle aus einer ausgezogenen Plastik-Pipettenspitze mit der Elektrodenlösung befüllt. Der Widerstand der einzelnen Ausgänge von mit 300 mM KCl befüllten Mikroelektroden lag dabei je nach Einstellung zwischen 80 und 280 M Ω .

Jeder Kanal dieser Elektroden wurde nach dem Befüllen mit Elektrodenlösung über eine Ag/AgCl-Halbzelle mit dem Vorverstärker verbunden. Die Halbzellen wurden aus Silberdraht (Durchmesser 0,25 mm; World Precision instruments Inc., Sarasota, USA) angefertigt, der mit Zwei-Komponentenkleber in einen Polyvinylschlauch mit einem Innendurchmesser von ca. 1,3 mm so an einer Seite verklebt wurde, dass auf beiden Seiten ein Stück Silberdraht überstand. An der zugeklebten Seite wurde ein Draht und ein Stecker zum Anschluss an den Vorverstärker angelötet, die offene Seite wurde auf die Glaselektroden aufgesetzt, sodass der Silberdraht in die Elektrodenlösung eintauchte. Der Silberdraht wurde vor den Messungen durch Anlegen einer Spannung in einer 3 M KCl-Lösung chloriert.

Für die Elektroinfusion (s. Abschnitt 2.2.8) wurden Mikroelektroden aus einzelnen Kapillaren gezogen. Dafür wurde eine Borosilikat-Glaskapillare direkt in das horizontale Pipettenziehgerät eingespannt und durch den Laserstrahl und die Zugvorrichtung zu zwei getrennten Mikroelektroden ausgezogen. Der Widerstand dieser mit 300 mM KCl befüllten Elektroden betrug zwischen 60 und 130 M Ω .

2.2.4.2 Referenzelektrode

Die Referenzelektrode bestand aus einer mit Elektrodenlösung gefüllten, stumpfen Borosilikat-Glaskapillare, die am unteren Ende mit einem Stückchen 2-%iger Agarose mit 300 mM KCl abgedichtet wurde. Es wurden hierfür die gleichen Glaskapillaren wie für die Herstellung der Mikroelektroden verwendet (s. oben). Die Verbindung mit der Masse erfolgte ebenfalls mit einer Ag/AgCl-Halbzelle.

2.2.5 Bad- und Elektrodenlösungen

Für alle hierunter beschriebenen Lösungen wurde Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage verwendet (GenPure, TKA, Niederelbert, Deutschland). Die Lösungen wurden aus Stocklösungen angesetzt und höchstens eine Woche lang verwendet.

Badlösung für Messung an intakten Pflanzen:

KCl 5 mM
CaCl₂ 0,1 mM
KCitrat 5 mM
pH = 5,0 mit KOH

Badlösung für Messung an Epidermisstreifen (Recording Buffer):

KCl 50 mM
CaCl₂ 1 mM
MES 5 mM
pH = 6,0 mit BTP

Für einige Experimente wurde das KCl durch CsCl ersetzt, um die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle zu blockieren und/oder es wurde 1 mM LaCl₃ hinzugefügt, um Ca²⁺-permeable Kationenkanäle in der Plasmamembran zu inhibieren.

Badlösung zum Öffnen der Stomata in Epidermisstreifen (Opening Buffer):

KCl 50 mM
CaCl₂ 0,1 mM
MES 5 mM
pH = 6,0 mit BTP

Elektrodenlösung:

Als Elektrodenlösung wurde, falls nicht anders erwähnt, standardmäßig 300 mM KCl verwendet. Alternativ wurden stattdessen 300 mM CsCl oder 300 mM KGluconat verwendet. Die KGluconat-Lösung wurde allerdings nur in die Spitze der Elektrode gefüllt, während der hintere Teil der Elektrode mit 300 mM KCl aufgefüllt wurde.

2.2.6 Pulsprotokolle

Nach dem Einstich wurden die Schließzellen auf eine Haltespannung V_H von -100 mV geklemmt. Bei dieser Spannung sind die ein- und auswärtsgerichtenden Kaliumkanäle inaktiv. Um das Verhalten der Ionenkanäle bei verschiedenen Spannungen aufzeichnen zu können, wurden verschiedene Spannungspulsprotokolle durchgeführt, die in Abbildung 2.2 gezeigt sind.

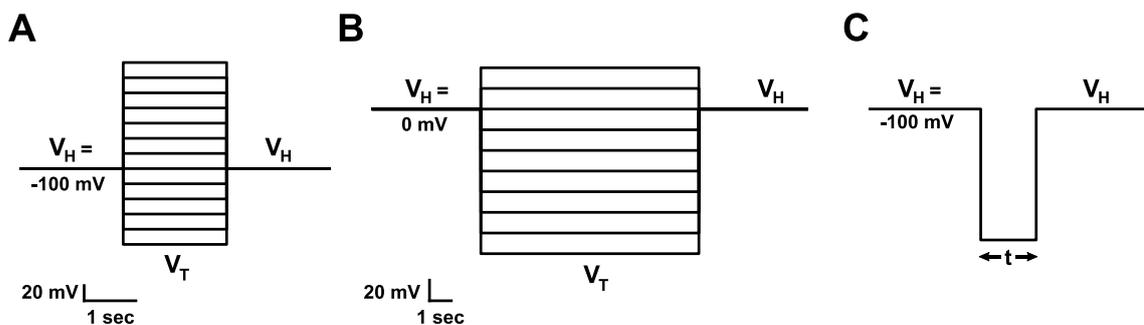


Abb. 2.2: Übersicht der verwendeten Spannungspulsprotokolle: V_H = Haltespannung, V_T = Testspannung. (A): Spannungspulsprotokoll zur Aufzeichnung der ein- und auswärtsgerichtenden Kaliumkanäle, (B): Spannungspulsprotokoll zur Aufzeichnung der Anionenkanalaktivität und (C): Spannungspulsprotokoll für einzelne hyperpolarisierende Spannungspulse zur Induzierung einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration. Von der Haltespannung ausgehend wurde auf Testspannungen zwischen -160 und -220 mV gesprungen.

Für die Aufzeichnung der Aktivität der Kaliumkanäle wurde ausgehend von V_H für jeweils 2 s auf eine Testspannung gesprungen, die bei jedem Puls um -20 mV verringert wurde. Die Pulse erfolgten in einem Intervall von 6 Sekunden (s. Abbildung 2.2 A).

Um die Aktivität von Anionenkanälen aufzuzeichnen wurde V_H auf 0 mV gesetzt. Die Testspannungen wurden hierbei für 10 s gehalten, und die Pulse in einem Abstand von 20 s ausgeführt (s. Abbildung 2.2 B). Die Kaliumauswärtsgleichrichter wurden bei diesen Messungen durch den Einsatz von CsCl als Elektrodenlösung blockiert.

Um durch die Hyperpolarisierung der Plasmamembran transiente Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration auszulösen, wurden ebenfalls ausgehend von -100 mV

einzelne hyperpolarisierende Spannungspulse von -160 mV bis zu -220 mV durchgeführt. Die Länge der Pulse betrug entweder 10 oder 50 s (s. Abbildung 2.2 C).

2.2.7 Datenauswertung für elektrophysiologische Messungen

Zur Auswertung der elektrophysiologischen Messungen wurden die mit PULSE aufzeichneten Daten in IGOR Pro (Version 6.11, WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA) und/oder Excel (Office 2007 bzw. 15, Microsoft Corp., Redmond, USA) importiert und analysiert. Zusätzlich wurde zur graphischen Darstellung der Daten mit Origin Pro 9.1 G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) gearbeitet.

2.2.8 Elektroinfusion

Mittels iontophoretischer Injektion können geladene Moleküle nicht nur in das Cytosol der Zellen, sondern auch in den Apoplasten geladen werden. Diese Methode wurde in dieser Arbeit erstmals zur apoplastischen Applikation von ABA an Schließzellen von Tabak und von *Polypodium* verwendet. Es bietet eine Alternative zur klassischen Perfusion über die Blattoberfläche, bei der die Kutikula als Barriere wirken kann, die verhindert, dass das ABA bei den Schließzellen ankommt. Für diese Methode wurde eine Lösung mit 1 mM ABA und 1 mM Lucifer Yellow in die Spitze einer einfachen Mikroelektrode (s. Abschnitt 2.2.4.1) geladen. Die Elektrode wurde dann, ähnlich wie beim Einstich, mit Hilfe eines Mikromanipulators in die unmittelbare Nähe einer Schließzelle gebracht. Allerdings wurde daraufhin nicht in diese Zelle eingestochen, sondern die Elektrodenspitze wurde nur so nah an die Schließzelle herangeführt, dass eine Spannungsänderung durch den Kontakt mit der Zellwand eintrat. Dieser Kontakt konnte durch ein akustisches Signal wahrgenommen werden. Nach diesem Positionieren der Elektrode an der Zellwand wurde jeweils eine Aufnahme der Schließzelle gemacht, bevor die apoplastische Beladung durch Strominjektion erfolgte. Die Beladung des Apoplasten konnte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow (s. Abschnitt 2.3.2) verfolgt werden. Ab dem Zeitpunkt, an dem das Lucifer Yellow im Apoplasten sichtbar wurde, wurde für 1 Minute lang ein Strom von bis zu 1 nA appliziert. Nach der erfolgreichen Beladung wurde die Elektrodenspitze ein Stück von der Schließzelle entfernt, und es wurde eine Serie von Hellfeld-Aufnahmen der Schließzelle über eine Dauer von 20 Minuten gemacht. Dabei wurde beobachtet, ob und wie schnell ABA den Stomaschluss auslöste.

ABA-Lösung für die Elektroinfusion:

ABA	1 mM
HEPES, pH 7,5	1 mM
Lucifer Yellow	1 mM

Da das ABA in EtOH gelöst wurde, wurde der Kontrolllösung das gleiche Volumen EtOH zugefügt, das auch die ABA-Lösung enthielt.

2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Simultan zu elektrophysiologischen Messungen in dieser Arbeit wurden oft fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht, um Prozesse während der hyperpolarisierenden Spannungspulse innerhalb der Schließzellen sichtbar zu machen. Dafür wurden sowohl unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe als auch genetisch codierte Fluoreszenzproteine eingesetzt. Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass sogenannte Fluorophore durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und daraufhin Fluoreszenzlicht einer etwas längeren Wellenlänge emittieren. Durch den Einsatz von wellenlängenspezifischen Filtern kann man so Anregungs- und Emissionslicht trennen und die fluoreszierenden Moleküle lokalisieren. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe dienen entweder zur Visualisierung des Cytosols und/oder zur Detektion von Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentration.

2.3.1 CARV-Spinning-Disc System

Die Aufnahme konfokaler fluoreszenzmikroskopischer Bilder kann nach verschiedenen Prinzipien erfolgen. Klassischerweise wird oft das sogenannte konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (engl.: CLSM) eingesetzt, bei dem die Anregung der Fluorophore durch einen Laser erfolgt. Ein sogenanntes Pinhole sorgt dafür, dass nur Emissionslicht aus einer Ebene der Probe detektiert wird. Dabei misst der Detektor die Emission einzelner Bildpunkte, die Probe wird abgerastert und es kann Pixel für Pixel aus den einzelnen Intensitäten ein Gesamtbild zusammengesetzt werden. Da diese Art der Konfokalmikroskopie aufgrund des Aufbaus des Mikroskops und aufgrund der relativ geringen Geschwindigkeit nicht mit Einstichmessungen an Schließzellen vereinbar ist, wurde für die Experimente in dieser Arbeit ein Spinning-Disc-System eingesetzt. Bei dieser Methode befindet sich eine Scheibe (die Spinning Disc, auch Nipkow-Schweibe), auf der eine Vielzahl einzelner Pinholes

arrangiert ist, im Strahlengang. Die Scheibe rotiert sehr schnell und das Anregungslicht wird durch die Pinholes auf eine Ebene der Probe fokussiert. Auch das Emissionssignal wird wieder durch die Pinholes fokussiert, bevor es auf den Kamerachip trifft und dort ein Bild erzeugt.

Das Spinning-Disc-System (CARVII, Crestoptics, Rom, Italien) wurde mit einer EMCCD-Kamera (QuantEM 512SC, Photometrics, Tucson, USA) kombiniert. Außer der Spinning-Disc besitzt das CARVII drei Filterräder, in denen die Filter für Anregung und Emission, sowie die dichroitischen Spiegel angebracht sind. Diese können entweder über eine Steuereinheit mit Touchpad oder über die Software VisiVIEW (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) angesteuert werden. Als Quelle für das Anregungslicht bei konfokalen Aufnahmen wurde eine Quecksilberdampfampe (LQ-HXP 120, Leistungselektronik JENA, Deutschland) verwendet. Um durch verschiedene Ebenen einer Probe fokussieren zu können, wurde an den Feintrieb des Mikroskops der Schrittmotor eines Mikromanipulators (Eppendorf Micromanipulator 5171, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angeschlossen, mit dem der Abstand der Objektive zur Probe gesteuert werden konnte.

Für Messungen mit Fura-2 wurde die Spinning-Disc aus dem Strahlengang herausgefahren, da die Anregungswellenlängen für Fura-2 zu niedrig sind, um mit dem CARVII-System konfokal aufgenommen werden zu können.

2.3.2 Konfokale Fluoreszenzaufnahmen mit Oregon-Green-BAPTA und Lucifer Yellow

Um die Erhöhung der Calciumkonzentration in Schließzellen genauer charakterisieren und lokalisieren zu können, wurde der Einzel-Wellenlängen-Sensor Oregon Green 488 BAPTA-1 (kurz Oregon Green-BAPTA) verwendet. Oregon Green-BAPTA besteht aus dem Fluorophor Oregon Green, der kovalent an den Ca^{2+} -Chelator BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure) gekoppelt ist. Bei Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration kommt es zu einer verstärkten Bindung von Calciumionen an BAPTA, durch die die Fluoreszenzintensität des Fluorophors erhöht wird. Diese Bindung ist reversibel, das heißt bei einer späteren Abnahme der Calciumkonzentration nimmt auch die Fluoreszenz wieder ab. Der K_d -Wert für Ca^{2+} von Oregon Green-BAPTA liegt bei 170 nM (Thomas et al., 2000).

Lucifer Yellow hingegen besitzt keine Calciumsensitivität und wurde hier als Kontrolle eingesetzt, um Volumenänderungen des Cytosols während der Applikation hyperpolarisierender Pulse zu beobachten. Lucifer Yellow wurde 1978 erstmals von W. Stewart

beschrieben (Stewart, 1978). Da es eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute besitzt, gut in Wasser löslich und unschädlich für die Zellen ist, wurde es zu einem beliebten Fluoreszenzmarker in der Biologie (zusammengefasst in einer Review von Hanani, 2012). Außerdem ist die Fluoreszenzquantenausbeute unabhängig vom pH-Wert (Stewart, 1978).

Sowohl die Aufnahmen mit Oregon Green-BAPTA als auch die mit Lucifer Yellow wurden konfokal mit Hilfe des Spinning-Disc-Systems gemacht. Die verwendeten Filter mit Anregungs- und Emissionswellenlänge sind der Übersichtstabelle 2.1 zu entnehmen. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 500 und 1000 ms, die Quecksilberdampflampe zur Anregung wurde auf Stufe 1 gedimmt. Lucifer Yellow wurde außerdem als Marker für die Elektroinfusion eingesetzt (s. Abschnitt 2.2.8).

2.3.3 Fluoreszenzaufnahmen mit Fura-2

Im Gegensatz zum Einzelwellenlängen-Calciumindikator Oregon Green-BAPTA gehört Fura-2 zu den ratiometrischen Calciumindikatoren. Das heißt, dass sich die Anregungs- und/oder Emissionsspektren in Abhängigkeit der Calciumkonzentration verschieben. Bei Fura-2 verschiebt sich das Anregungsmaximum, das in Abwesenheit von Calcium bei 362 nm liegt, mit steigender Calciumkonzentration in den kurzwelligeren Bereich auf 335 nm. Dabei hat das Anregungsspektrum bei geringen Calciumkonzentrationen eine Schulter bei ca. 380 nm. Der isosbestische Punkt, an dem sich die Spektren für alle Calciumkonzentrationen treffen liegt bei Fura-2 bei 360 nm. Wird Fura-2 bei dieser Wellenlänge angeregt, ist die Fluoreszenzintensität unabhängig von der Calciumkonzentration. Entwickelt und beschrieben wurde Fura-2 von Grynkiewicz et al., 1985. Der Vorteil ratiometrischer Farbstoffe ist, dass die Calciumkonzentration mit Hilfe des Quotienten aus den beiden Fluoreszenzintensitäten ($F_{345/390}$) bestimmt werden kann. Dadurch können intrazelluläre Umverteilungen des Farbstoffs nicht fälschlicherweise als lokale Änderung der Calciumkonzentration interpretiert werden, was für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist.

Für die Fura-2 Aufnahmen in dieser Arbeit wurden abwechselnd Aufnahmen mit 345 nm und 390 nm als Anregungswellenlängen gemacht. Detaillierte Information über die Filter sind in Abschnitt 2.3.6 zu finden. Die Anregung erfolgte mit einem Polychromator (VisiChrome High Speed Polychromator System, Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) über den auch die Anregungswellenlänge eingestellt wurde. Die Belichtungszeit für die einzelnen Aufnahmen betrug 200 ms und es wurden alle 3 s Bilder aufgenommen.

2.3.4 Weitere Fluoreszenzfarbstoffe und genetisch codierte Fluoreszenzproteine

Schließzellen in Epidermisstreifen wurden mit BCECF-AM (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Acetoxymethyl Ester) und mit Fluorescein-Diacetat beladen, um die Vakuole bzw. das Cytosol anzufärben. Fluorescein-Diacetat ist außerdem ein Farbstoff, der benutzt wird um die Vitalität der Zellen zu zeigen (Widholm, 1972). Nur in intakten Zellen können die Acetatgruppen durch Esterasen abgespalten werden, wodurch das fluoreszierende Fluorescein entsteht. Mit BCECF-AM, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in der Vakuole akkumuliert (Scheuring et al., 2015), wurden in dieser Arbeit die Änderungen des vakuolären Volumens während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse an Tabak-Schließzellen beobachtet.

Um in *Arabidopsis thaliana* fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Cytosols zu machen, wurden für diese Arbeit Pflanzen generiert, die das gelbe Fluoreszenzprotein Venus unter Kontrolle des GC1-Promotors (Yang et al., 2008) schließzellspezifisch exprimieren. In Tabak wurde ebenfalls mit Venus unter der Kontrolle des GC1-Promotors die schließzellspezifische Expression überprüft.

2.3.5 Beladung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Fluoreszenzfarbstoffe Lucifer Yellow, Oregon Green-BAPTA und Fura-2 wurden iontophoretisch in die Schließzellen geladen. Dafür wurden ca. 0,3 μ l einer konzentrierten Lösung des jeweiligen Farbstoffs (Lucifer Yellow: 1 mM, Oregon-Green BAPTA: 10 mM und Fura-2: 20 mM) in die Spitze der dritten Kapillare der Mikroelektrode geladen, bevor diese mit Elektrodenlösung aufgefüllt wurde. Nach dem Einstich wurde anhand von Strominjektion der Farbstoff in die Zelle geladen.

Die Beladung der Schließzellen in Epidermisstreifen mit BCECF-AM und Fluorescein-Di-Acetat erfolgte durch Inkubation in Badlösung, der diese Farbstoffe zugefügt wurden.

BCECF-AM: Es wurde eine Stocklösung mit einer Konzentration von 5 mM in DMSO angesetzt. Die Endkonzentration in der Badlösung zur Inkubation betrug 10 μ M BCECF-AM. Außerdem wurden 0,02 % (w/v) Pluronic F127 hinzugegeben (siehe z.B. Kolb et al., 2015). Die Epidermisstreifen wurden 10 bis 30 Minuten im Dunkeln in der Lösung inkubiert und anschließend mindestens zweimal mit Badlösung gewaschen. Nach ca. 2-3 Stunden war das BCECF-AM hauptsächlich in den Vakuolen der Schließzellen lokalisiert.

Fluorescein-Di-Acetat: Für die Stocklösung wurden 5 mg/ml Fluorescein-Di-Acetat in Aceton gelöst. Die Konzentration in der Badlösung zum Anfärben betrug 0,025 mg/ml. Die Epidermisstreifen wurden ebenfalls nach 10 Minuten Inkubation im Dunkeln zweimal mit Badlösung gewaschen.

2.3.6 Verwendete Filterkombinationen

Die in dieser Arbeit für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe und -proteine eingesetzten Filterkombinationen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Typ und Hersteller der einzelnen Filter sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Bei einem der dichroitischen Spiegel waren Typ und Hersteller nicht mehr nachzuvollziehen. Die Transmissionswellenlängen wurden hier durch das Messen eines Spektrums in einem Photometer bestimmt.

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Fluoreszenzproteine und die zugehörigen Filterkombinationen. In der zweiten und dritten Spalte sind die Anregungs- und Emissionmaxima der Fluorophore angegeben (Literaturwerte), dahinter stehen die verwendeten Filter. Dic. Spiegel = Dichroitischer Spiegel, PC = Polychromator: für Fura-2 wurde kein Anregungsfilter benutzt, die Anregungswellenlänge wurde über den Polychromator gesteuert.

Fluorophor	λ_{Ex} (nm)	λ_{Em} (nm)	Filter _{Ex}	Dic.Spiegel	Filter _{Em}	konfokal
OG BAPTA	494	523	472/30	490	520/35	ja
Lucifer Yellow	428	536	430/24	490	520/35	ja
Fura-2	340/380	508	PC	400	510/40	nein
BCECF-AM	440/490	535	472/30	490	520/35	ja
Fluorescein-Diacetat	490	521	472/30	490	520/35	ja
YFP (Venus)	514	527	472/30	490	520/35	ja

Tab. 2.2: Übersicht über die Typen der Filter und dichroitischen Spiegel.

Anregungsfilter	
430/24	ET 430/24 Chroma Technology Corp.
472/30	Semrock 472/30 nm BrightLine single-band bandpass filter
Emissionsfilter	
510/40	D510/40M, Chroma Technology Corp.
520/35	Semrock 520/35 nm BrightLine single-band bandpass filter
Dichroitische Spiegel	
400	FT 395, ZEISS, Deutschland
490	unbekannt

2.3.7 Datenauswertung Fluoreszenzmikroskopie

Die mit der Software VisiVIEW aufgenommenen Bilder wurden in ImageJ (Rasband, 1997–2018, ImageJ, Bethesda, MD: US National Institutes of Health, <https://imagej.nih.gov/ij/>) analysiert oder für die Darstellung als Videos bearbeitet. Die Berechnungen für die Diagramme erfolgte in Excel (Office 2007 bzw. 15, Microsoft Corp., Redmond, USA) und die endgültigen Graphen wurden mit Origin Pro 9.1 G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) erstellt.

2.3.7.1 Lucifer Yellow und Oregon Green-BAPTA

Um den Verlauf der Fluoreszenzintensität darzustellen, wurde die Intensität zum jeweiligen Zeitpunkt mit der zu Beginn der Aufnahme verrechnet (F/F_0). Für die Darstellung als Video wurde dazu der ImageCalculator von ImageJ benutzt, der das Verhältnis der Intensitäten von jedem einzelnen Pixel im Vergleich zu t_0 berechnet. So konnte F/F_0 in einem Video in Falschfarben dargestellt werden. Für die Erstellung der Diagramme wurden verschiedene ROIs (engl. für Region of Interest) ausgewählt (Hintergrund, Nukleus, Region um den Nukleus und Ganze Zelle). Die Werte wurden für die gesamte Zeitreihe gemessen und in Excel importiert. Dort erfolgten die Berechnungen für Hintergrundabzug, F/F_0 und die Bestimmung der Mittelwerte und des Standardfehlers, bevor die Daten zur endgültigen Darstellung in Origin importiert wurden.

2.3.7.2 Fura-2

Ähnlich wie bei der Auswertung für Lucifer Yellow und Oregon Green-BAPTA beschrieben, wurden die Falschfarben-Videos von Versuchen mit Fura-2 mit Hilfe des Image-Calculators von ImageJ erstellt. Allerdings wurde hier nicht die Intensität gegen die der Anfangsaufnahme verrechnet, sondern die Intensitäten der jeweils zusammengehörigen Bilder der zwei unterschiedlichen Wellenlängen Pixel für Pixel miteinander verrechnet. Für die Erstellung der Diagramme sowie die Berechnung der Calciumkonzentration wurden ROIs ausgewählt (Hintergrund, Nukleus, Ganze Zelle). Die mittlere Intensität dieser Regionen wurde mit Hilfe des ROI-Managers und der Multi-Measure-Funktion für die beiden Stacks der unterschiedlichen Wellenlängen getrennt gemessen und in Excel importiert. In Excel wurde der Hintergrund für die jeweilige Wellenlänge abgezogen und die Ratio (F_{345}/F_{390}) berechnet. Bei den Messungen für Tabak wurden diese Ratiowerte für die weitere Auswertung verwendet. Bei Messungen mit *Polypodium* wurde außerdem aus dem Verhältnis F_{345}/F_{390} die freie cytosolische Calciumkonzentration berechnet. Die Berechnung der Calciumkonzentration wurde anhand der von Grynkiewicz et al. 1985 beschriebenen Formel

$$[Ca^{2+}]_{\text{cyt}} = K_d \times \frac{(R - R_{\min}) \times F_{\min}}{(R_{\max} - R) \times F_{\max}}$$

durchgeführt. K_d ist dabei die Bindungskonstante von Fura-2 für Ca^{2+} . Es wurde hier mit einer K_d von 270 nM gerechnet, die 2005 von Levchenko et al. in vitro bestimmt wurde. R steht für das Verhältnis aus F_{345} und F_{390} nach Durchführung des Hintergrundabzuges, also

$$\frac{F_{345, \text{cyt}} - F_{345, \text{bgr}}}{F_{390, \text{cyt}} - F_{390, \text{bgr}}}$$

R_{\min} , R_{\max} , F_{\min} und F_{\max} wurden in Kalibrationsmessungen bestimmt. R_{\min} und F_{\min} stehen für die minimalen ratiometrischen Werte und die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten von Fura-2 ohne gebundenes Ca^{2+} . Diese Werte wurden bestimmt, indem die Schließzellen nach dem Einstich auf 0 mV geklemmt wurden, und zusätzlich zu Fura-2 der Calcium-Chelator BAPTA in die Schließzelle injiziert wurde. Dazu wurden der Fura-2-Lösung 500 mM BAPTA zugegeben. Das freie Calcium in der Zelle wurde dadurch gebunden und Fura-2 lag vorwiegend in der freien Form vor. Um die Werte für Ca^{2+} -gesättigtes Fura-2 zu erhalten (R_{\max} und F_{\max}), wurden die Zellen nach dem Einstich und Beladen auf -250 mV geklemmt, was zu einer starken Aktivierung calciumpermeabler Kanäle in der Plasmamembran führt. Zusätzlich wurde die Spitze der Elektrode bewegt,

um mechanisch einen möglichst großen Calciumeinstrom in die Zelle zu erzielen. Für die Bestimmung dieser Kalibrationswerte wurden jeweils acht Zellen gemessen und die Mittelwerte berechnet.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Bakterienstämme und Anzuchsbedingungen

2.4.1.1 *Escherichia coli*

Für die Klonierungen wurde in dieser Arbeit der *E.coli* Stamm XL1-Blue MRF' (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) genutzt. Die Zellen wurden für die Aufnahme von Plasmid-DNA chemisch kompetent gemacht, bevor sie mittels Hitzeschock transformiert werden konnten. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium bei 37 °C. Für Übernachtskulturen wurden 3-5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte oder direkt von einem Cryostock inokuliert, und für ca. 14 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

LB-Medium:

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

Für die Herstellung von Agar-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar hinzugefügt. Je nachdem welcher Vektor verwendet wurde, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das entsprechende Antibiotikum zur Selektion in einer Konzentration von 50 µg/l zugefügt.

2.4.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Für die stabile Transformation von *Nicotiana tabacum*-Pflanzen, wurde der Agrobakterien-Stamm GV3101 eingesetzt. Die Bakterien wurden bei 28 °C im Dunkeln auf YEP-Medium mit Rifampicin und Gentamycin angezogen. Wie schon bei *E.coli* beschrieben, erfolgte das Ansetzen einer Übernachtskultur entweder aus einer Einzelkolonie oder aus einem Cryostock.

YEB_{Rif, Gent}-Medium

Trypton	5 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Sucrose	5 g/l
MgSO ₄	50 mM
Rifampicin	10 µg/l
Gentamycin	25 µg/l

Für die Herstellung von Agar-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar hinzugefügt. Bei Selektion auf pCambia-Vektoren wurden außerdem 100 µg/l Kanamycin zugegeben.

2.4.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Kulturen erfolgte entweder durch eine sogenannte Miniprep für kleinere Mengen an DNA oder, bei Bedarf an größeren Mengen von Plasmid-DNA, durch eine Midiprep.

2.4.2.1 DNA-Miniprep

Die hier verwendete Methode zur Gewinnung von Plasmid-DNA beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge. Für eine Miniprep wurden 1-2 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet wurde mithilfe eines Vortex-Schüttlers im restlichen LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden zuerst 300 µl P1-Puffer und 300 µl P2-Puffer hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Nach 2-3 min Inkubationszeit wurden 300 µl 3M NaAcetat hinzugegeben, erneut vorsichtig gemischt und für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 600 µl Isopropanol aufgenommen, gemischt und erneut für 8 min zentrifugiert, wodurch die ausgefallene Plasmid-DNA pelletiert wird. Nach dem Abgießen des Überstandes wurden 600 µl Ethanol zugegeben und 1 min zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol möglichst vollständig abgenommen und die Probe um verbleibende Ethanol-Reste vollständig zu entfernen 20-30 min bei 37 °C getrocknet. Das Pellet wurde in 30 µl autoklaviertem Reinstwasser resuspendiert.

P1-Puffer

Tris	50 mM
EDTA	12,5 mM
RNase	~6% (w/v)

P2-Puffer

NaOH	0,2 M
SDS	1 % (w/v)

2.4.2.2 DNA-Midiprep

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden Übernachtkulturen mit einem Volumen von ca. 150 ml angesetzt. Die Aufreinigung erfolgte mithilfe eines Kits (Qiagen Plasmid Plus Midi Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend dem beigefügten Protokoll. Die Plasmid-DNA wurde in 100 μ l sterilem Reinstwasser aufgenommen.

2.4.3 Hitzeschock-vermittelte Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E.coli* wurden aliquotierte, bei -80 °C gelagerte kompetente MRF⁺-Zellen für 5-10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10-50 ng Plasmid-DNA oder nach einer USER-Reaktion (s. Abschnitt 2.4.7) 10 μ l des USER-Reaktionsansatzes hinzugegeben. Nach weiteren 5-10 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 45 s im Heizblock oder Wasserbad auf 45 °C erhitzt. Danach wurde der Ansatz nochmal 5 min auf Eis gestellt und bei Vektoren mit Ampicillin-Resistenz direkt auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Bei Vektoren mit Kanamycin-Resistenz wurden vorher 300 μ l SOC-Medium hinzugefügt und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Um das Volumen des Ansatzes vor dem Ausstreichen wieder zu verringern, wurden die Bakterien kurz durch Zentrifugation pelletiert und ein Teil des Überstandes abgenommen. Das Pellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert und anschließend auf LB-Platten mit Kanamycin ausgestrichen.

SOC-Medium

Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
MgSO ₄ ·x ₇ H ₂₀	5 g/l
Glukose	20 mM

2.4.4 Transformation von *A. tumefaciens*

Die Transformation der Agrobakterien erfolgte mittels Elektroporation. Es wurden dafür Agrobakterien in YEB_{Rif, Gent}-Medium (s. Abschnitt 2.4.1) in ca. 5 ml Flüssigkultur angezogen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 8000 g pelletiert und anschließend dreimal mit 800 μ l sterilem Reinstwasser gewaschen. Nach den Waschschriften wurde das Bakterienpellet in 50 μ l sterilem Reinstwasser resuspendiert. Es wurden jeweils 1 μ l gelöste Plasmid-DNA zugegeben und die Mischung wurde in vorgekühlte Küvetten (Elektrodenabstand: 2 mm) pipettiert. Zur Elektroporation wurde für ca. 5 s eine Spannung von 2500 V angelegt (Electroporator 2510, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Danach wurden die Zellen in 400 μ l SOC-Medium aufgenommen und bei 28°C für eine Stunde in einem Schüttler inkubiert. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die Antibiotika-Resistenzgene des transfizierten Vektors für die Antibiotika-basierte Selektion hoch genug exprimiert wurden. Die Agrobakterien wurden durch 1 min Zentrifugation bei 8000 g pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet im restlichen Medium zum Ausstreichen auf YEB_{Rif, Gent, Kan}-Agarplatten resuspendiert. Die Agarplatten wurden 2 Tage bei 28°C inkubiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transformation wurden pro Konstrukt ca. 5 Kolonien ausgewählt, ein Teil dieser Kolonien gepickt und einem PCR-Reaktionsansatz (s. Tabelle 2.3) zugegeben. Anschließend wurde eine PCR-Reaktion (siehe Tabelle 2.3) zum Nachweis des Konstruktes durchgeführt (Kolonie-PCR).

Tab. 2.3: Reaktionsansatz und PCR-Programm für die Durchführung einer Kolonie-PCR

Reaktionsatz		PCR-Programm			
Primer fwd. (10 μ M)	0,5 μ l	Denaturierung	95 °C	5 min	x 35
Primer rev. (10 μ M)	0,5 μ l	Denaturierung	95 °C	30 s	
dNTPs (10 mM)	0,5 μ l	Anlagerung	55 - 57 °C	30 s	
Phusion Cx	0,5 μ l	Elongation	72 °C	tE	
5X Phusion Buffer	5 μ l	End-Elongation	72 °C	2-3 min	
PCR-H ₂ O	18 μ l	Pause	4 °C	∞	

2.4.5 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *A. thaliana*

Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte mittels Floral-Dip Methode (Clough & Bent, 1998) nach einem modifizierten Protokoll. Die *Agrobacterien* mit dem entsprechenden Vektor zur Übertragung des Konstruktes wurden in 5 ml YEB_{Rif, Gent, Kan}-Medium angezogen. Die Bakterien wurden, wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben, pelletiert und 3 mal in sterilem Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 ml einer Zuckerlösung (5 % Saccharose, 0,02 % Silwet) resuspendiert. Es wurden ca. 8 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet, dabei wurden vorher alle Schoten, geöffneten Blüten und zu weit entwickelten Blütenknospen entfernt und die Pflanzen an Holzstäbchen angebunden. Die Zuckerlösung mit den *Agrobakterien* wurde direkt auf die jungen Blütenknospen pipettiert. Um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu erreichen, wurden die Schalen mit den *Arabidopsis*-Pflanzen mit Plastiktüten abgedeckt. Die Schalen wurden für einen Tag im Dunkeln bei weniger als 28 °C stengelassen, bevor sie zurück ins Gewächshaus gebracht und dort bis zur Samenreife weiter angezogen wurden. Sobald die ersten Schoten sich gelb verfärbten, wurden die Pflanzen in Papiertütchen gesteckt, noch weitere 2 Wochen gegossen und schließlich getrocknet. Nach dem vollständigen Trocknen konnten die Samen geerntet werden.

2.4.6 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *N. tabacum*

Zur Generierung transgener Tabak-Pflanzen wurde die Methode der Blattscheiben-Transformation (Horsch et al., 1985, Gallois & Marinho, 1995) eingesetzt. Die Tabak-Pflanzen

wurden dazu unter axenischen Bedingungen, wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben, bis zu einem Alter von 4-6 Wochen herangezogen. Alle Schritte des Transformations-Protokolls wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Agrobakterien mit der zu transferierenden T-DNA wurden in 5 ml $\text{YEB}_{\text{Rif, Gent, Kan}}$ -Medium angezogen. Die Flüssigkultur wurde bei 8000 g abzentrifugiert und mindestens 5 mal in sterilem Reinstwasser gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 1x MS-Medium (pH 5,7) aufgenommen und die Bakteriensuspension wurde durch weitere Verdünnung mit MS-Medium auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt und in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Mit einem Skalpell wurden einzelne Tabak-Blätter abgetrennt, die Mittelrippe wurde entfernt und die Blättchen wurden in kleine Stückchen von 0,5-1 cm Seitenlänge zerschnitten. Diese Blattstückchen wurden in die vorbereiteten Röhrchen mit der Agrobakterien-Suspension gegeben. Für jeden Konstrukt wurden 1-2 Blätter verwendet. Es folgte eine 15-20 minütige Inkubation, während der die Röhrchen gelegentlich geschwenkt wurden. Nach der Inkubation wurden die Blattstückchen auf sterilen Papiertüchern abgetropft und anschließend auf MS-Platten mit Vitaminen und Hormonen jedoch ohne Selektionsantibiotika (für eine Zusammensetzung der MS-Platten siehe Tabelle 2.4) mit der Blattunterseite nach unten möglichst flach ausgelegt. Diese Platten wurden für 2 Tage bei 25 °C im Dunkeln inkubiert, bevor die Blattstückchen auf MS-Platten mit einem Antibiotikum zur Hemmung des Wachstums der Agrobakterien und einem Selektionsantibiotikum umgesetzt wurden. Die Blattstückchen wurden anschließend ca. alle 10 Tage auf frische Platten umgesetzt. Dabei konnte man die Bildung von Kalli an den Rändern der Blattstückchen beobachten. Diese Kalli wurden, sobald sie groß genug waren, von den Blattstückchen abgetrennt und umgesetzt. Aus jedem Kalli entsteht eine transgene Pflanze. Wenn die Kalli zu groß wurden, wurden sie statt in Petrischalen in sterile Polypropylenboxen gesetzt. Sobald sich Sprosse bildeten, wurden diese abgebrochen und in Boxen mit MS-Medium ohne den Zusatz von Hormonen umgesetzt, um die Wurzelbildung zu initiieren. Nach der Wurzelbildung wurden die Pflanzen in Töpfe mit Pikiererde gesetzt. Zur Akklimatisierung wurden sie mit einer Haube abgedeckt und für eine Woche in eine Klimakammer bei 22 °C gestellt, bevor sie in das Gewächshaus gebracht wurden. Nach einigen Wochen wurden die Pflanzen unter dem Mikroskop auf Fluoreszenz untersucht und bis zur Samenreife weiter angezogen. Die Samenkapseln wurden abgetrennt, geöffnet und die Samen bei 4 °C aufbewahrt.

Tab. 2.4: Zusammensetzung der MS-Platten zur Anzucht der Tabak-Kalluskulturen.

MS-Medium	+Vitamine
1x MS	100 mg/l Myo-Inositol
3 % Sucrose	1 mg/l Thiamin
pH 5,8 (+/- 0,03)	
0,8 % Gelzan	+Hormone
	1 mg/l BAP
	100 µg/l 1-NAA
	+Antibiotika
	500 mg/l Ticarcillin
	20 mg/l BASTA (ggf. anderes Selektions-AB)

2.4.7 Klonierung mittels USER™-System

Für die Generierung der Konstrukte mit den verschiedenen genetisch codierten Calciumsensoren wurde die USER-Klonierungstechnik (engl.: Uracil Specific Excision Reagent) genutzt (Nour-Eldin et al., 2006). Es werden dabei an Vektor und Insert überhängende Enden mit einer Länge von 8 bp generiert, die zueinander komplementär sind, und so die korrekte Anlagerung des Inserts in den aufgeschnittenen Vektor vermitteln. Die Überhänge am Insert werden durch eine PCR mit speziell designten Primern erzeugt (s. auch Tabelle 2.8), die an ihren Enden die Sequenz der 8 bp langen Überhänge tragen, jeweils mit einem Uracil bevor die Sequenz des eigentlichen Inserts beginnt. Die verwendeten Vektoren benötigen eine USER-Kassette, die durch einen Verdau mit PacI aufgeschnitten wird, bevor die Überhänge mit dem Nicking-Enzym NtBbvCI einzelsträngig gemacht werden. Die so vorbereiteten Vektoren und Inserts können in einer sogenannten USER™-Reaktion hybridisiert werden. Dabei wird durch einen speziellen Enzym-Mix (USER™-Enzyme, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) bei den noch doppelsträngigen Überhängen des Inserts das Uracil ausgeschnitten und das kurze einzelsträngige DNA-Stück neben der Abspaltungsstelle entfernt. Die Überhänge an Vektor und Insert können sich dann aneinander anlagern und bilden ein stabiles Hybridisationsprodukt, sodass kein weiterer Ligationsschritt notwendig ist.

Im Folgenden sind die Bedingungen für die USER-PCR, die USER-Reaktion und die verwendeten Primer beschrieben.

2.4.7.1 USER-PCR

Die USER-PCR wurde angewandt, um die benötigten überhängenden Enden an das gewünschte Konstrukt anzuhängen. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das PCR-Programm sind in Tabelle 2.5 zu finden.

Tab. 2.5: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und PCR-Programm für eine USER-PCR. Die Elongationszeit t_E wurde je nach Länge des Inserts eingestellt. Dabei wurde gerechnet, dass die Phusion-Polymerase mit einer Geschwindigkeit von ca. 1000 bp in 20 s elongiert.

Reaktionsatz		PCR-Programm			
DNA	1 μ l (10 -100 ng)	Denaturierung	95 °C	45 s	x 35
Primer fwd. (10 μ M)	1 μ l	Denaturierung	95 °C	20 s	
Primer rev.(10 μ M)	1 μ l	Anlagerung	55 - 57 °C	20 s	
dNTPs (10 mM)	1 μ l	Elongation	72 °C	t_E	
Phusion Cx	1 μ l	End-Elongation	72 °C	2-3 min	
5X Phusion Buffer	10 μ l	Pause	4 °C	∞	
PCR-H ₂ O	35 μ l				

2.4.7.2 USER-Reaktion

Für eine USER-Reaktion wurde ein Ansatz (s. Tabelle 2.6) zunächst für 30 min bei 37 °C zur Erzeugung der Überhänge und anschließend für weitere 30 min bei 25 °C zur Hybridisierung in einem Heizblock inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde direkt für eine Hitzeschock-vermittelte Transformation von *E.coli* weiterverwendet.

Tab. 2.6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die USER-Reaktion. Das Volumen des eingesetzten Vektors und des PCR-Produkts war abhängig von der jeweiligen Konzentration.

Reaktionsatz	
Vektor	1-3 μ l
PCR-Produkt	1-3 μ l
USER-Enzym	1 μ l
TE	ad. 10 μ l

2.4.7.3 Verwendete Primer und Vektoren

Ziel der Klonierungen war es mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation transgene *Arabidopsis*- oder Tabak-Pflanzen zu generieren, die Venus möglichst schließzellspezifisch exprimieren. Der Zielvektor für die Transformation gehört zu den pCambia Vektoren mit einer nachträglich hinzugefügten USER-Kassette. Zwischenschritte der Klonierungen wurden über pSat-Vektoren, ebenfalls mit eingefügter USER-Kassette, gemacht. Die für die Klonierung verwendeten Primer und die Vektoren sind in den Tabellen 2.8 und 2.7 zu finden.

Tab. 2.7: Übersicht über die verwendeten Vektoren. Das U in der Bezeichnung der Vektoren steht für die eingefügte USER-Kassette.

Vektor	Resistenz in Bakterien	Resistenz in Pflanzen	Kommentar
<i>für Klonierungen</i>			
pSAT leer U	Ampicillin		
pSAT UBQ10 U	Ampicillin		
pCambia 3300 leer U	Kanamycin	BASTA	
pCambia 3300 35S U	Kanamycin	BASTA	
<i>Promotor</i>			
pSAT GC1-ERD15	Ampicillin		zur Verfügung gestellt von Julia Schwarz

Tab. 2.8: Übersicht über die verwendeten Primer. Die Sequenzen zur Erzeugung der spezifischen Überhänge für die USER-Reaktion sind in rot gezeigt.

<i>USER-Primer</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>
pGC1_USER_fwd	GGCTTAAUATGGTTGCAACAGAGAGGAT
pGC1_USER_rev	GGTTTAAUATTTCTTGAGTAGTGATTTTGAAGTAG
RBC_terminator_rev	GGTTTAAUCGAT TGATGCATGTTGTCAATC
UBQ10Userfwd	GGCTTAAUACCCGACGAGTCAGTAATAAACGG
<i>Primer zur Rekonstituion einer USER Kasette</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>
GC1_Cas_rev	GGTTTAAUTAAGGATCCTTAATTAAGCCTCAGCATTCT TGAGTAGTGATTTTGAAG
RBC_Term User cas fwd	GGCTTAAUTAAGGATCCTTAATTAACCTCAGCAGCT
<i>Primer zur Sequenzierung</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>
pGC1 seq fwd	CTCCAGCGATGAAAGTCTATG
RBC seq rev	GTGCGCAATGAAACTGAT
pC3300 seq fwd	GGGTAACGCCAGGGTTTTTC
pC3300 seq rev	CAGCTATGACCATGATTACG
pUBQ seq fwd	GGTGTTAGTTTCTAGTTTGTGCG

3 Ergebnisse

3.1 Konfokales Imaging von Tabak-Schließzellen mit dem Spinning-Disc-System

Transiente Erhöhungen der Calciumkonzentration in Schließzellen spielen für die Regulierung der Stomaöffnungsweite in Anpassung an die äußeren Bedingungen eine wichtige Rolle. Wie genau die verschiedenen Calciumsignale, die sich in Amplitude, Frequenz oder möglicherweise in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden, in eine spezifische physiologische Antwort übersetzt werden, ist weitgehend unbekannt. Mithilfe eines Spinning-Disc-Systems sollte hier eine Methode zur hochaufgelösten Darstellung lokaler Calciumänderungen in Schließzellen etabliert werden, die simultan zu elektrophysiologischen Messungen durchgeführt werden kann.

3.1.1 Beladung von Schließzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Ein Großteil der Versuche wurde an Schließzellen intakter Tabak-Pflanzen durchgeführt, wobei die Beladung der Schließzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen durch Strominjektion (auch: iontophoretische Beladung) erreicht wurde. Der Einstich von Mikroelektroden aus Glas in die Schließzelle ermöglicht ein direktes Einbringen des Farbstoffs in eine einzelne Zelle. Da die Schließzellen von den sie umgebenden Zellen symplastisch isoliert sind (Wille & Lucas, 1984), findet auch keine Diffusion in angrenzende Zellen statt. In Abbildung 3.1 ist der zeitliche Verlauf einer solchen Beladung, die mit einem Spinning-Disc-System fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen wurde, dargestellt. Der Farbstoff verteilte sich während der Injektion ausgehend von der Einstichstelle über die ganze Zelle, dabei nahm die Fluoreszenzintensität innerhalb der Zelle mit fortschreitender Beladung immer weiter zu.

Nach der erfolgreichen Beladung der Schließzelle kann ein sogenannter Z-Stack der Zelle aufgenommen werden, für den Aufnahmen unterschiedlicher Fokusebenen dieser Zelle gemacht werden. Dafür wurde der Abstand der Objektive vom Präparat mit einem Schrittmotor verändert, was es ermöglichte, die unterschiedlichen Ebenen der Schließzelle konfokal abzubilden (Abbildung 3.2). Die Spitze der Mikroelektrode konnte dabei nach dem

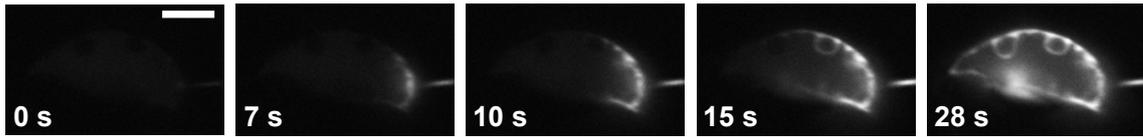


Abb. 3.1: Konfokale Aufnahmen einer Schließzelle in einer intakten *Nicotiana tabacum*-Pflanze, während der iontophoretischen Injektion von Oregon Green-BAPTA. Scalebar: 10 μm . Abbildung verändert aus Voss et al., 2016.

Einstich entweder im Cytosol oder in der Vakuole lokalisiert sein (Marten et al., 2007b). Dementsprechend wurde auch der Fluoreszenzfarbstoff entweder in das Cytosol (Abbildung 3.2 A) oder in die Vakuole (Abbildung 3.2 B) der Schließzellen geladen. Nur in 8 von 45 Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff in die Vakuole geladen, in den anderen war die Spitze der Elektrode im Cytosol lokalisiert. Anders als in Wurzelhaaren (Lew, 2004) ist es in Schließzellen nicht möglich, gezielt in eines der beiden Kompartimente einzusteichen. Daher kann es für bestimmte Versuche an Schließzellen auch notwendig sein, anhand der Beladung mit Fluoreszenzfarbstoff die Position der Elektrode in der Zelle zu bestimmen.

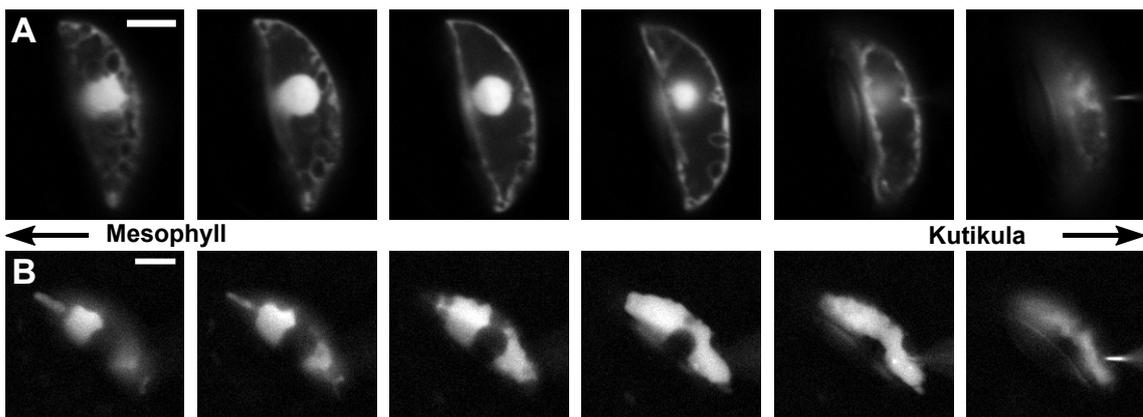


Abb. 3.2: Konfokale Aufnahmen von Schließzellen aus einer intakten *Nicotiana tabacum*-Pflanze, die mit Oregon Green-BAPTA beladen wurden. Der Farbstoff wurde entweder in das Cytosol (A) oder in die Vakuole (B) geladen. Es werden verschiedene konfokale Ebenen der jeweiligen beladenen Zelle gezeigt, dabei wurde von der Ebene der Schließzellen, die zum Mesophyll hin zeigt, begonnen und immer weiter Richtung Oberseite der Schließzelle, die an die Kutikula grenzt, fokussiert. Abstand zwischen den Ebenen: 1,6 (A) oder 2 (B) μm . Scalebar: 10 μm . Abbildung verändert aus Voss et al., 2016.

Bei der cytosolischen Beladung (Abbildung 3.2 A) erkennt man, dass die Chloroplasten der Schließzellen vor allem im unteren Bereich der Schließzelle liegen, während der Nukleus, in den der Farbstoff diffundieren kann, eher in der mittleren Ebene liegt. Um den Nukleus herum und am Rand der Schließzelle, angrenzend an die Plasmamembran, befindet sich ebenfalls Cytoplasma. Die oberen Bereiche der Schließzelle werden von der

Vakuole ausgefüllt. Die mit Oregon Green-BAPTA beladene Vakuole (Abbildung 3.2 B) erscheint als einzelnes zusammenhängendes Kompartiment, das durch den Einstich beladen werden konnte. Die Position des Nukleus, der von der Vakuole umgeben ist, ist ebenfalls deutlich zu erkennen.

Eine alternative Methode zur Beladung der Zellen ist die Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoffen, die über die Plasmamembran in die Zellen diffundieren. Hierfür wurden anstelle von intakten Pflanzen Epidermisstreifen eingesetzt, da ansonsten die Kutikula das Beladen behindern würde und da außerdem das Hintergrundsignal aus den ebenfalls mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen umliegenden Epidermis- und Mesophyllzellen die Aufnahmen stören würde. Nach der Präparation von Epidermisstreifen sind hauptsächlich die Schließzellen intakt, und nur in intakten Zellen kommt es bei den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen durch die Aktivität von cytosolischen Esterasen zur Fluoreszenz. Fluorescein-Diacetat wird in das Cytosol der Schließzellen aufgenommen (Abbildung 3.3 A). Um die Vakuole zu visualisieren, wurde BCECF-AM (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Acetoxymethyl Ester) eingesetzt (siehe Abbildung 3.3 B). Im Gegensatz zur iontophoretischen Beladung werden bei dieser Methode beide Schließzellen eines Stomakomplexes beladen (vergleiche Abbildung 3.2 und 3.3). Fluorescein-Diacetat hat eine höhere Fluoreszenzintensität als Oregon Green-BAPTA, die Aufnahmen waren daher detaillierter. Auch dünnere cytoplasmatische Stränge ließen sich so optisch auflösen (Abb. 3.3 A).

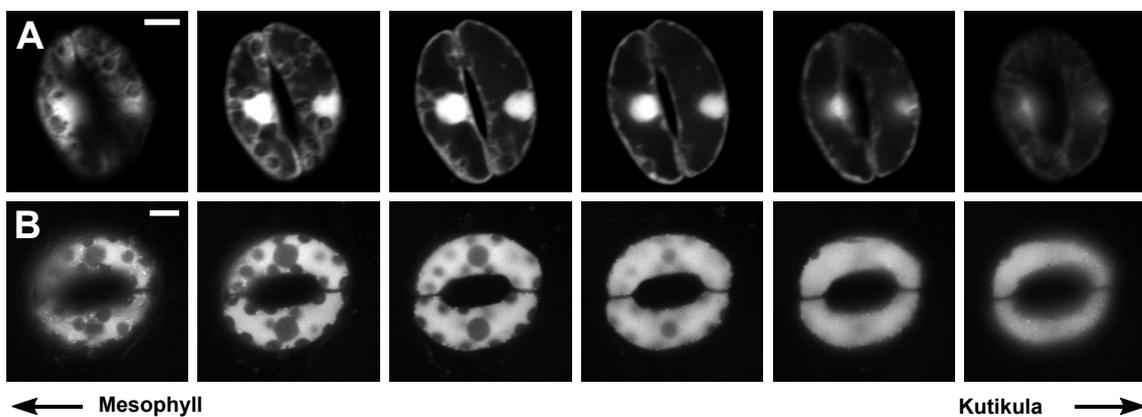


Abb. 3.3: Konfokale Aufnahmen zweier benachbarter Schließzellen in einem Epidermisstreifen von *Nicotiana tabacum*. Die Bilderserien wurden vom Mesophyll her begonnen und Richtung Kutikula weitergeführt. (A): Z-Scan durch Schließzellen, deren Cytosol mit Fluorescein-Diacetat beladen wurde. Der Abstand zwischen den Ebenen beträgt ca. $2\ \mu\text{m}$. (B): Z-Scan durch Schließzellen, deren Vakuole mit BCECF-AM beladen wurde. Der Abstand zwischen den Ebenen beträgt ca. $2,9\ \mu\text{m}$. Scalebar: $10\ \mu\text{m}$.

3.1.2 Mechanisch ausgelöste Änderung der Calciumkonzentration in Tabak-Schließzellen

Durch die Wirkung mechanischer Kräfte auf die Plasmamembran oder durch Verletzung, wie beim Einstich, kann im Cytosol lokal eine Erhöhung der Calciumkonzentration verursacht werden (Roelfsema & Hedrich, 2010). In mit Oregon Green-BAPTA beladenen Schließzellen konnte durch eine leichte Bewegung der eingestochenen Elektrode eine solche Calciumerhöhung induziert und visualisiert werden (Abbildung: 3.4). Durch die Bewegung der Elektrode an der Einstichstelle kam es dort zu einem Einstrom von Calcium. Ausgehend von dieser Stelle erhöhte sich das Fluoreszenzsignal von Oregon Green-BAPTA wellenförmig durch die ganze Zelle (Abbildung: 3.4 A). Das kann am besten gezeigt werden, wenn die Änderung der Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur anfänglichen Fluoreszenzintensität (F/F_0) berechnet und in Falschfarben dargestellt wird (Abbildung: 3.4 B).

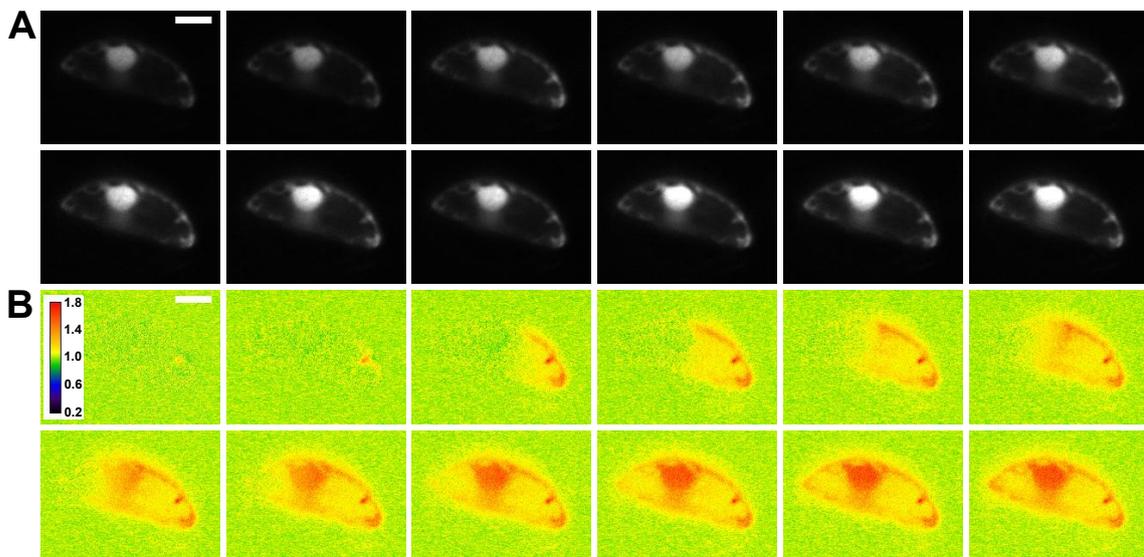


Abb. 3.4: Sequenz konfokaler Aufnahmen der Calciumkonzentration in einer mit Oregon Green-BAPTA beladenen Schließzelle von *Nicotiana tabacum*. Zu Beginn der Sequenz wurde durch Bewegung der Elektrode ein mechanischer Reiz gegeben, um eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration zu erzielen. Es wurde alle 500 ms eine Aufnahme gemacht. Scalebar: 10 μm . (A): Absolute Fluoreszenzintensität von Oregon Green-BAPTA. (B): Farbcodierte Darstellung der Änderung der Fluoreszenzintensität relativ zur Fluoreszenzintensität zu Beginn der Sequenz (F/F_0).

Durch den Einsatz des Spinning-Disc-Systems konnten also lokale Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentrationen in einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung (1 Bild/500 ms) dargestellt werden. Problematisch war bei der Arbeit mit intakten Pflanzen allerdings, dass die Schließzellen sich oft aus dem Fokus oder seitlich bewegen. Bei

nicht-ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffen kann das über die Zeit zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Wenn sich die Zelle während der Aufnahmesequenz seitlich oder aus der fokalen Ebene bewegte, konnte eine Verschiebung des Verhältnisses F/F_0 beobachtet werden. Epidermisstreifen zeigen aufgrund Ihrer Fixierung eine wesentlich geringere Bewegung und erleichtern die Aufnahme längerer Sequenzen.

3.2 Die Auswirkungen hyperpolarisierender Spannungspulse auf die cytosolische Calciumkonzentration und auf das Volumen des Cytosols

Durch eine transiente Hyperpolarisierung des Membranpotentials kann in Schließzellen eine Erhöhung der Calciumkonzentration ausgelöst werden (Stange et al., 2010, Grabov & Blatt, 1998, Levchenko et al., 2008). Um die dabei auftretenden Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentration genauer aufzulösen und Bewegungen im Cytosol zu visualisieren, wurden in dieser Arbeit Fluoreszenzaufnahmen mit dem konfokalen Spinning-Disc-System gemacht. Oregon Green-BAPTA und Fura-2 dienten dabei als Calciumreporter, wobei Oregon Green-BAPTA ein Einzelwellenlängenreporter ist, bei dem die Fluoreszenzintensität durch die Bindung von Calciumionen zunimmt (Lock et al., 2015). Fura-2 ist dagegen ein ratiometrischer Farbstoff, der es ermöglicht durch das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen die Calciumkonzentration darzustellen (Bootman et al., 2013). Zusätzlich wurde der calciuminsensitive Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow (Stewart, 1978) eingesetzt, um Umverteilungen des Farbstoffs innerhalb der Zelle zu visualisieren.

3.2.1 Hyperpolarisierende Spannungspulse führen zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration und zu einer transienten Änderung des cytosolischen Volumens

Die Schließzellen wurden nach dem Einstich auf ein Membranpotential von -100 mV geklemmt und entweder mit Lucifer Yellow oder mit Oregon-Green-BAPTA beladen. Die Aufnahme von Fluoreszenzbildern wurde gestartet und zu einem definierten Zeitpunkt wurde ein 10 Sekunden andauernder hyperpolarisierender Spannungspuls auf ein Membranpotential von -180 oder -200 mV appliziert. Die Änderungen der Fluoreszenzintensiti-

täten während dieser Sequenz wurden, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, als Verhältnis F/F_0 dargestellt.

Abbildung 3.5 A zeigt, dass man sowohl in Zellen mit Oregon Green-BAPTA als auch in mit Lucifer Yellow beladenen Zellen während der Hyperpolarisierung einen Fluoreszenzanstieg in der Region um den Zellkern beobachten kann. Da die Fluoreszenzintensität von Lucifer Yellow nicht durch die Calciumkonzentration beeinflusst wird, muss dieser lokale Fluoreszenzanstieg einen anderen Grund haben, wie zum Beispiel die Umverteilung des Fluoreszenzfarbstoffs innerhalb der Zelle. Zusätzlich zu der lokalen Zunahme der Fluoreszenzintensität beider Fluoreszenzfarbstoffe konnte man eine Abnahme der Fluoreszenzintensität innerhalb des Nukleus beobachten (Abbildung 3.5 A).

Um eventuelle Unterschiede zwischen den Zellen mit Oregon Green-BAPTA und Lucifer Yellow genauer zu bestimmen, wurden die Versuche mehrfach wiederholt und der Mittelwert der Fluoreszenzänderung (F/F_0) über die Zeit für verschiedene Regionen der Zelle in Abbildung 3.5 B aufgezeichnet. Sowohl in Zellen mit dem Calciumreporter Oregon Green-BAPTA als auch in Zellen mit dem calciuminsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow war in der Region um den Nukleus ein relativer Anstieg der Fluoreszenzintensität um ca. 30 % zu beobachten (Abbildung 3.5 A und B). In der Region des Nukleus nahm die Fluoreszenzintensität dagegen um etwa 20 % ab, wenn Lucifer Yellow geladen wurde. In Zellen mit Oregon Green-BAPTA blieb die Fluoreszenzintensität dort dagegen nahezu unverändert (Abbildung 3.5 B). An dieser Stelle ist es auch wichtig zu erwähnen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe klein genug sind, um durch die Poren in der Kernhülle in den Zellkern zu gelangen (Ma et al., 2012). Lucifer Yellow und Oregon Green-BAPTA lokalisieren also beide sowohl im Nukleus als auch im Cytosol und können dazwischen frei diffundieren. Für die gesamte Zelle gesehen erhöhte sich die Fluoreszenzintensität in Zellen mit dem calciumsensitiven Farbstoff Oregon Green-BAPTA um ca. 15 %, während die Fluoreszenzintensität in Zellen mit Lucifer Yellow weitgehend gleichblieb (Abbildung 3.5 B, dreieckige Symbole).

Man kann anhand dieser Ergebnisse darauf schließen, dass die Änderungen der Fluoreszenzintensität während der Hyperpolarisierung der Plasmamembran zum Teil durch eine Umverteilung des Fluoreszenzfarbstoffs hervorgerufen werden, und daher auch mit dem calciuminsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow auftreten. Zusätzlich traten bei der Visualisierung mit Oregon Green-BAPTA weitere Änderungen der Fluoreszenzintensität auf, die durch die Bindung von Calcium verursacht werden. Diese beiden Effekte überlagern sich, sodass eine subzelluläre Analyse der Calciumdynamik während hyperpolarisierender Spannungspulse in Schließzellen mit dieser Methode nicht möglich ist. Wären die Versuche nur mit einem Calciumreporter durchgeführt worden und nicht zu-

sätzlich mit einem calciuminsensitiven Farbstoff als Kontrolle, hätte das vermutlich zu der Annahme geführt, dass sich die Calciumkonzentration lokal um den Zellkern erhöht. Das verdeutlicht, wie wichtig es ist, bei fluoreszenzmikroskopischen subzellulären Analysen auch Bewegungen bzw. Umverteilungen innerhalb der Zelle zu berücksichtigen.

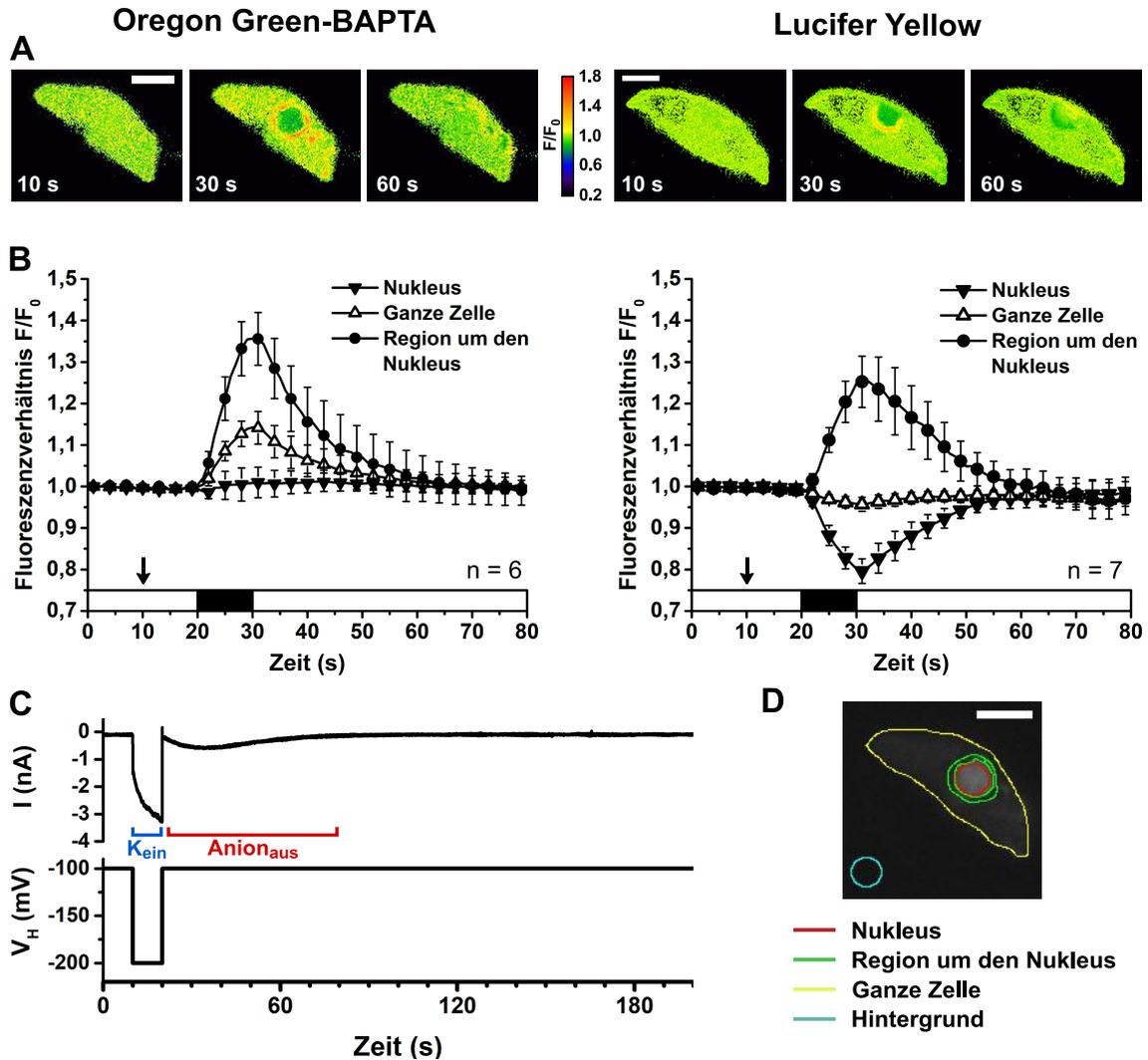


Abb. 3.5: Applikation eines hyperpolarisierenden Spannungspulses an Schließzellen intakter *Nicotiana tabacum*-Pflanzen, die entweder mit Oregon Green-BAPTA oder Lucifer Yellow beladen wurden. (A): Darstellung des Verhältnisses F/F_0 in Falschfarbe vor, während und nach einem hyperpolarisierenden Spannungspuls. Scalebar $10 \mu\text{m}$. (B): Darstellung der Veränderung der Fluoreszenzintensitäten in der Schließzelle über die Zeit für verschiedene Regionen in der Zelle. Der Pfeil zeigt den Start des Pulsprotokolls an. (C): Beispiel für eine Stromspur (oben) und das applizierte Pulsprotokoll (unten). (D): Darstellung der für die Analysen in B ausgewählten Regionen innerhalb der Schließzelle. Teile der Abbildung verändert aus Voss et al., 2016.

Zeitgleich zur Visualisierung der Fluoreszenzintensitäten wurde die Aktivität der Ionenkanäle während des Spannungspulses aufgezeichnet. Abbildung 3.5 C zeigt ein Beispiel

für eine Stromspur (oberer Teil) und das für den hyperpolarisierenden Spannungspuls applizierte Pulsprotokoll (unterer Teil). Mit Beginn der Hyperpolarisierung wurde ein Einwärtsstrom aufgezeichnet, der durch den Einstrom von Kalium durch einwärtsgerichtete Kaliumkanäle bedingt ist (K_{ein} , blau markiert in 3.5 C) und durch die negative Membranspannung ausgelöst wird (Roelfsema et al., 2001, Roelfsema & Prins, 1997, Szyroki et al., 2001, Lebaudy et al., 2008). Nach der Rückkehr auf die Haltespannung von -100 mV war wiederum ein Einwärtsstrom messbar, der allerdings auf eine Aktivierung von Anionenkanälen (Stange et al., 2010) und den darauf folgenden Anionenausstrom zurückzuführen ist ($\text{Anion}_{\text{aus}}$, rot markiert in 3.5 C).

3.2.1.1 Ausdehnung des cytosolischen Volumens

Um die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Veränderung innerhalb der Schließzelle während eines hyperpolarisierenden Pulses genauer zu beschreiben, wurde eine weitere Analyse der mit Lucifer Yellow beladenen Zellen durchgeführt. Bei Verwendung dieses calciuminsensitiven Farbstoffs lässt sich die auftretende Umverteilung des Fluoreszenzfarbstoffs ohne Effekte durch die veränderte Calciumkonzentration beobachten.

Anhand eines Profilplots wurden die absoluten Fluoreszenzintensitäten entlang einer durch die Zelle gelegten Linie (siehe Abbildung 3.6 A) an drei verschiedenen Zeitpunkten dargestellt (s. Abbildung 3.6B), nämlich vor (10 s), während (30 s) und nach der Hyperpolarisierung (60 s) der Plasmamembran.

Wie auch schon in Abbildung 3.5 A und B zu erkennen ist, nahm die Fluoreszenzintensität in der Region des Nukleus während der Hyperpolarisierung der Plasmamembran ab (Abbildung 3.6, blau hinterlegter Bereich) und erhöhte sich nach Beenden des Spannungspulses wieder in etwa auf den Ausgangswert (Abbildung 3.6 C). In der Region, die direkt an den Nukleus angrenzt, nahm die absolute Intensität dagegen zu (Abbildung 3.6 B, rot hinterlegter Bereich). Der Peak, der durch die höhere Fluoreszenzintensität in der Region des Nukleus gebildet wird, wurde also flacher und gleichzeitig breiter, was auf eine Umverteilung des Farbstoffs auf eine größere Region hinweist. In diesem Fall wäre die Verringerung der Fluoreszenzintensität durch die relative Verdünnung des Farbstoffs zu erklären. Geht man von einer gleichmäßigen Verdünnung des Farbstoffs durch eine Vergrößerung des cytosolischen Volumens aus, kann man anhand der relativen Abnahme der Fluoreszenzintensität von Lucifer Yellow das Ausmaß der Volumenänderung abschätzen. Wie in Abbildung 3.5 B erkennbar nimmt F/F_0 von Lucifer Yellow während des Spannungspulses auf 0,8 ab, was auf eine Zunahme des cytosolischen Volumens um ca. 25 % hindeutet.

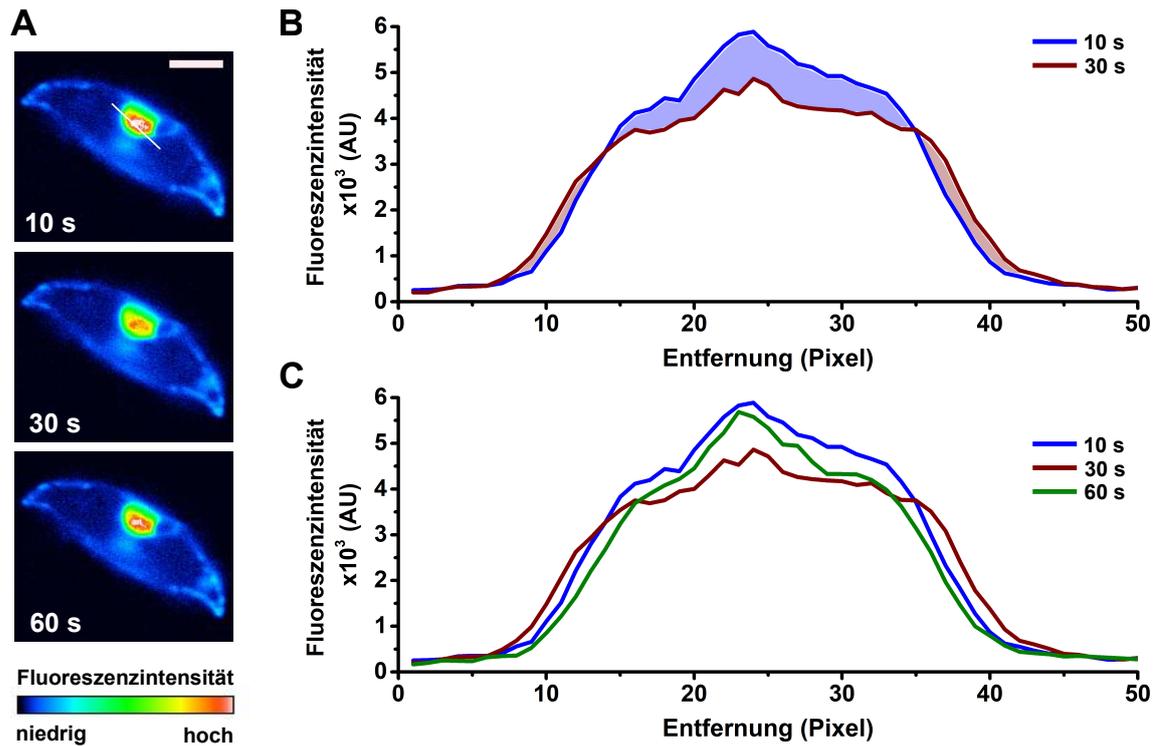


Abb. 3.6: Analyse der Änderung der Fluoreszenzintensität von Lucifer Yellow in einer Schließzelle von *Nicotiana tabacum* vor, während und nach einem hyperpolarisierenden Spannungspuls (A): Darstellung der Fluoreszenzintensität in Falschfarbe. Entlang der Linie wurden die Intensitäten für B und C aufgezeichnet. Scalebar $10\ \mu\text{m}$. (B): Plot der Intensitäten entlang der in A gezeigten Linie innerhalb der Zelle vor (10 s) und während (30 s) der Hyperpolarisierung. Blau hinterlegt wurde der Bereich in dem die Fluoreszenzintensität während der Hyperpolarisierung abnimmt, rot hinterlegt wurde der Bereich in dem die Fluoreszenzintensität ansteigt. (C): Plot der Intensitäten vor (10 s), während (30 s) und nach (60 s) der Hyperpolarisierung. Teile der Abbildung verändert aus Voss et al., 2016.

3.2.1.2 Verkleinerung des vakuolären Volumens

Die Ergebnisse in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.1.1 lassen darauf schließen, dass sich das cytosolische Volumen während eines hyperpolarisierenden Spannungspulses transient vergrößert. Dabei würde die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs in den ursprünglich cytosolischen Bereichen, die aufgrund der freien Diffusion des Fluoreszenzfarbstoffs auch den Nukleus mit einschließen, aufgrund einer relativen Verdünnung abnehmen. Die Ausdehnung des Cytosols (erkennbar an der sich erhöhenden relativen Fluoreszenzintensität) erfolgte in den Bereich der Schließzelle hinein, der von der Vakuole, in der kein Fluoreszenzfarbstoff ist, ausgefüllt wird. Das würde bedeuten, dass sich das Volumen des Cytosols in Richtung Vakuole ausdehnt. Das Volumen der Vakuole würde sich demnach durch den Spannungspuls transient verkleinern.

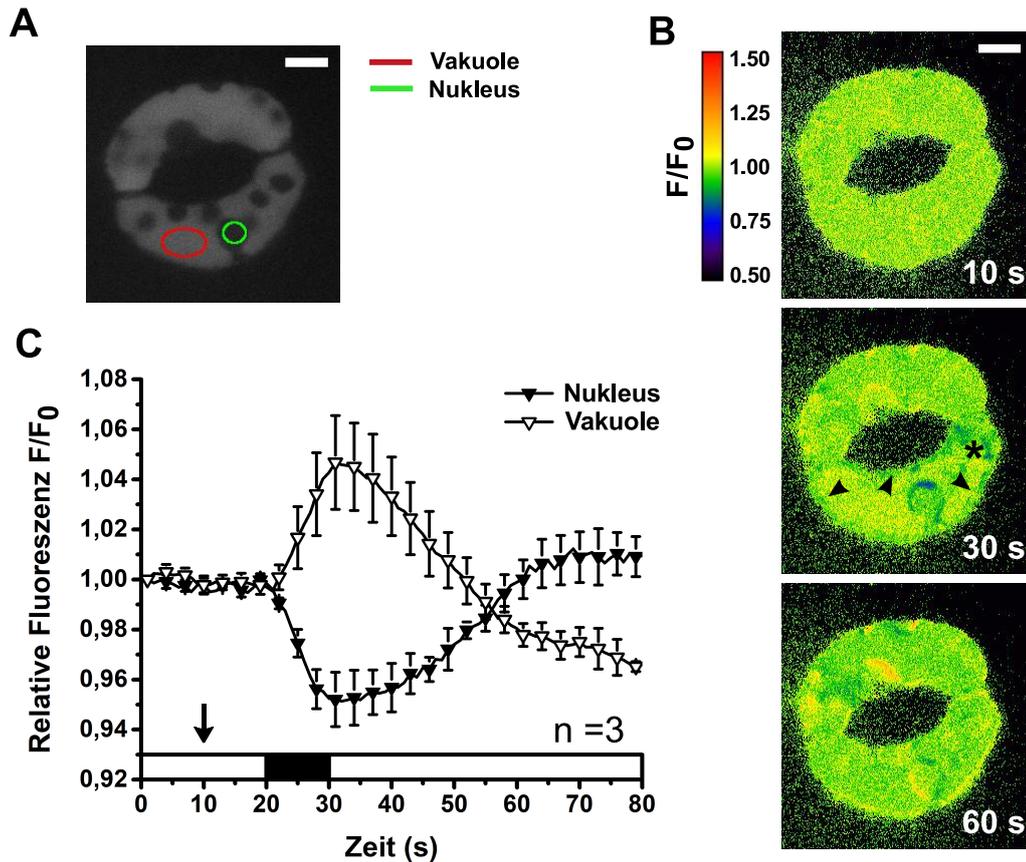


Abb. 3.7: Visualisierung der Schließzellvakuole in *Nicotiana tabacum* mit BCECF-AM während eines hyperpolarisierenden Spannungspulses. (A): Fluoreszenz in den Vakuolen von mit BCECF beladenen Schließzellen. In die untere Schließzelle wurde eingestochen um einen hyperpolarisierenden Spannungspuls zu applizieren. Die Markierungen kennzeichnen die Regionen für die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten in Vakuole und Nukleus für C. (B): In Falschfarben codierte relative Fluoreszenzintensität F/F_0 von BCECF vor (10 s), während (30 s) und nach (60 s) dem hyperpolarisierenden Spannungspuls. Die Pfeile zeigen Regionen nahe der Plasmamembran, in denen die Fluoreszenz abnimmt, das Sternchen markiert die Einstichstelle. Scalebar $10 \mu\text{m}$. (C): Darstellung der Veränderung der Fluoreszenzintensitäten über die Zeit in einer Region in der Vakuole und für die Region des Nukleus. Der Pfeil zeigt den Start des Pulsprotokolls an, der schwarze Balken markiert die Zeitspanne des hyperpolarisierenden Spannungspulses.

Um das zu prüfen, sollte die Vakuole der Schließzellen während der hyperpolarisierenden Pulse visualisiert werden. Da ein gezieltes Einstechen in die Vakuole in Schließzellen nicht möglich ist, wurde der Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM verwendet, der in die Vakuole transportiert wird (siehe z. B. Matsuoka et al., 1997). Dafür wurden die Epidermisstreifen in einer Badlösung mit BCECF-AM inkubiert, um den Farbstoff in die Vakuolen zu laden (Abbildung 3.7 C, vergleiche auch Abbildung 3.3). Die Fluoreszenz in der Vakuole wurde anschließend während der Applikation einer 10 s andauernden Hyperpolarisierung der Plasmamembran aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass sich die fluo-

reszenzfreie Region, in der sich der Nukleus befindet, während der Hyperpolarisierung transient vergrößert (Abbildung 3.7 A und B). Die Fluoreszenz nahm um die Region des Nukleus herum ab, während die Fluoreszenz innerhalb der Vakuole zunahm, wie Abbildung 3.7 zeigt. Auch in der Region am Rand der Zelle, angrenzend an die Plasmamembran, und an der Einstichstelle nahm die Fluoreszenz während des Pulses ab (Pfeile und Sternchen in Abbildung 3.7 A). Die Vakuole verkleinerte sich diesen Ergebnissen nach während des hyperpolarisierenden Spannungspulses. Durch das sich verkleinernde Volumen der Vakuole wurde der Fluoreszenzfarbstoff konzentrierter, was die ansteigende Fluoreszenzintensität im Bereich innerhalb der Vakuole erklärt.

3.2.1.3 Schließzellspezifische Expression des Fluoreszenzproteins Venus

Hyperpolarisierende Pulse wurden auch an Schließzellen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* appliziert, um zu überprüfen, ob das Auftreten der cytosolischen Volumenänderung eventuell spezifisch für Tabak ist. Damit diese Volumenänderung sichtbar gemacht werden kann, wird auch hier ein Fluoreszenzreporter benötigt, der die Visualisierung des Cytosols ermöglicht. Ein Einstich mit Mikroelektroden mit drei Kanälen ist in Schließzellen von *Arabidopsis* aufgrund ihrer geringen Größe (vergleiche Willmer & Fricker, 1996, Tabelle 2.1 und Jezek & Blatt, 2017, Tabelle 1) nicht möglich, ohne die Zellen dabei zu stark zu verletzen. Deswegen wurden im Rahmen dieser Arbeit Pflanzen generiert, die unter einem möglichst starkem schließzellspezifischen Promotor, in diesem Fall dem GC1-Promotor, das Fluoreszenzprotein Venus exprimieren (Yang et al., 2008). Da auch Tabakpflanzen mit schließzellspezifisch exprimiertem Fluoreszenzprotein für weitere Versuche interessant wären, wurde das gleiche Konstrukt auch für die stabile Transformation von Tabakpflanzen verwendet. Nach der stabilen Transformation von *A.thaliana*- und *N. tabacum*-Pflanzen wurden diese auf die Expression von Venus gescreent. Fluoreszenzaufnahmen einzelner Pflanzen werden in Abbildung 3.8 gezeigt.

Es wurden sieben *Arabidopsis*-Pflanzen gescreent, davon zeigten sechs eine relativ starke Expression von Venus in den Schließzellen (Abbildung 3.8). Eine Pflanze zeigte nur in einem Teil der Schließzellen Fluoreszenz. Eine schwache Fluoreszenz von Venus konnte auch in Epidermis und Mesophyllzellen beobachtet werden, was besonders in weniger stark exprimierenden Pflanzen auffiel. Die Expression von Venus in den Schließzellen war jedoch ausreichend stark und spezifisch, um die Verteilung von Venus während der Applikation von hyperpolarisierenden Versuchen mithilfe des Spinning-Disc-Systems zu visualisieren. In Tabak exprimierten nach der Transformation 13 von 14 Pflanzen Venus nicht nur in den Schließzellen, sondern in allen Zellen in etwa gleich stark (Abbildung 3.8 B). Eine der 14 Pflanzen exprimierte Venus in allen Zellen außer den Schließzellen

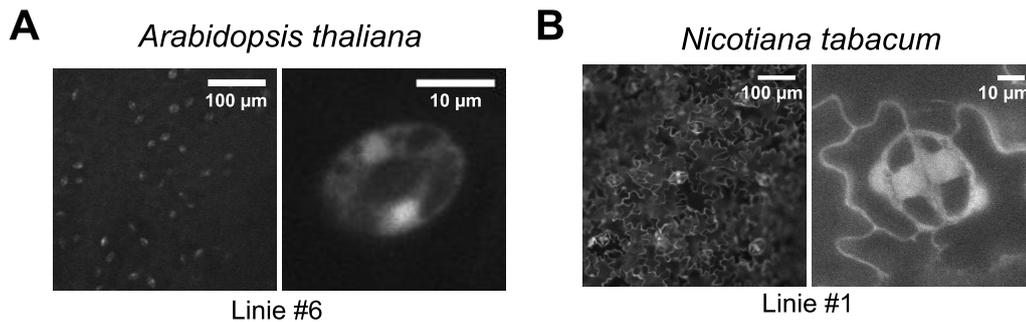


Abb. 3.8: Expression von Venus unter dem GC1-Promotor in *A. thaliana* und *N. tabacum*. Vergleich der Spezifität der Expression des Fluoreszenzproteins. (A): Konfokale Aufnahmen einer *Arabidopsis thaliana* GC1-Venus-Linie. Linie 6 zeigte die stärkste Fluoreszenzintensität in den Schließzellen. Links ist eine Aufnahme der Blattoberfläche mit dem Objektiv mit 10-facher Vergrößerung gezeigt, rechts einzelne Schließzellen mit 63-fach vergrößerndem Objektiv. (B): Konfokale Fluoreszenzaufnahmen einer repräsentativen GC1-Venus-Linie von *Nicotiana tabacum*. Die Expression von Venus ist nicht spezifisch auf die Schließzellen begrenzt. Links ist eine Aufnahme der Blattoberfläche mit dem Objektiv mit 10-facher Vergrößerung gezeigt, rechts einzelne Schließzellen mit 63-fach vergrößerndem Objektiv.

(Daten nicht gezeigt). Der GC1-Promotor vermittelt diesen Ergebnissen nach zwar eine relativ schließzellspezifische Expression in *Arabidopsis*, nicht aber in Tabak. Dies widerspricht zum Teil den Ergebnissen von Yang et al., 2008, die eine schließzellspezifische Expression von GUS und einem GFP-basierten Calciumsensor unter dem GC1-Promotor für *Arabidopsis* und für Tabak postulieren.

Die Verteilung von Venus innerhalb der Zelle, nämlich im Cytosol und im Nukleus, war vergleichbar mit der Verteilung der injizierten Fluoreszenzfarbstoffe (vergleiche Abbildung 3.2 A und 3.8). Versuche, die die Änderungen der Fluoreszenzintensität von Venus während hyperpolarisierenden Pulsen untersuchen, können daher mit den vorhergehenden Versuchen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow verglichen werden. Es wurde eine GC1-Venus Linie ausgewählt, die möglichst stark und spezifisch Venus in den Schließzellen exprimiert. Von diesen Pflanzen wurden Epidermisstreifen präpariert, mit denen die gleichen Versuche durchgeführt wurden wie mit Tabak-Schließzellen.

3.2.1.4 Hyperpolarisierende Pulse in Schließzellen von *Arabidopsis thaliana*

Die Applikation der hyperpolarisierenden Pulse hat ähnliche Auswirkungen auf Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* wie auf die von *Nicotiana tabacum*. Abbildung 3.9 fasst die Ergebnisse der Messungen zusammen. Die Fluoreszenzintensität von Venus im Nu-

kleus nahm während eines Pulses ab (blau hinterlegter Bereich in Abbildung 3.9 B), in der Region um den Nukleus nahm sie dagegen zu (rot hinterlegter Bereich in Abbildung 3.9 B). Zusätzlich zur Zunahme der Fluoreszenzintensität um den Zellkern nahm die Fluoreszenz auch an der Stelle des Einstichs (siehe Markierung in Abbildung 3.9 A) relativ stark zu, wie man auch im Profilplot durch die Zelle in Abbildung 3.9 B deutlich sehen kann. Nach der Rückkehr zum Haltepotential ging die Fluoreszenzintensität in diesem Bereich wieder annähernd auf den Ausgangszustand zurück (grüne Linie in Abbildung 3.9 B). Allerdings verringerte sich die Fluoreszenzintensität von Venus während der Dauer der Messungen konstant (Abbildung 3.9 C), vermutlich durch Bleichung des Fluoreszenzproteins. Der Vergleich der relativen Fluoreszenz F/F_0 über die Zeit sieht vom Muster her ähnlich aus, wie in Abbildung 3.5 B bei den Versuchen mit Tabak. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass transiente Änderungen des cytosolischen Volumens während hyperpolarisierender Pulse nicht nur in Tabak auftreten.

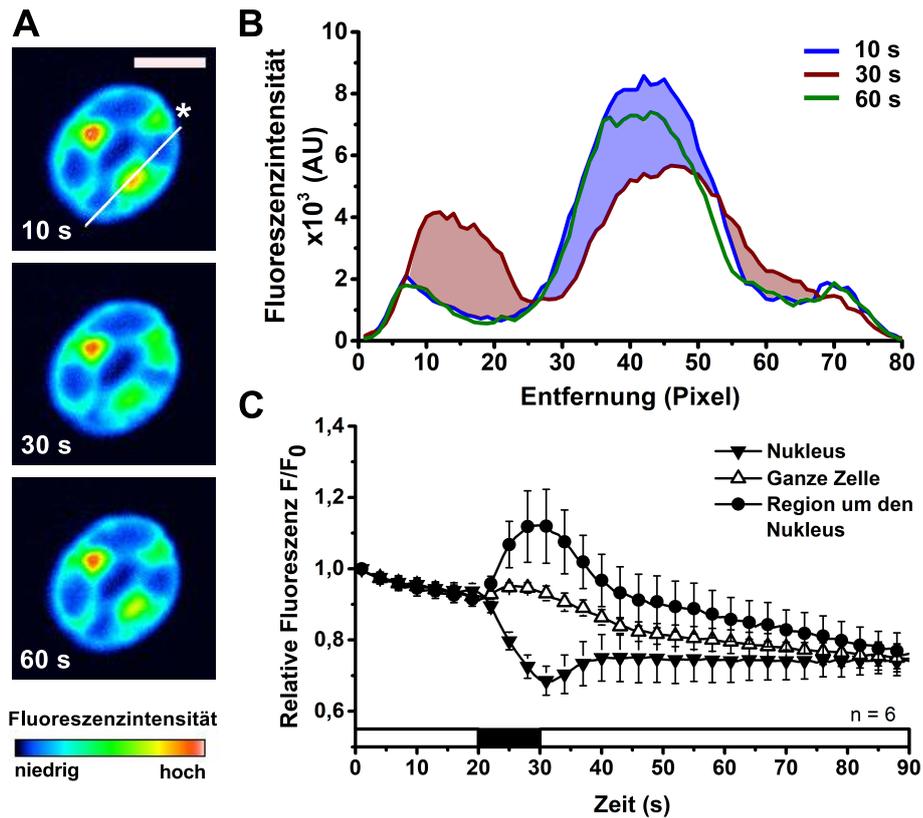


Abb. 3.9: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von Venus in Schließzellen von Epidermisstreifen GC1-Venus exprimierender *A. thaliana*-Pflanzen während eines hyperpolarisierenden Pulses (A): In Falschfarben codierte absolute Fluoreszenzintensitäten von Venus vor (10 s), während (30 s) und nach (60 s) der Hyperpolarisierung von -100 mV auf -180 mV. Das Sternchen markiert die Einstichsstelle. Entlang der weißen Linie wurden die Intensitäten für das Profil in B aufgezeichnet, ausgehend von der Seite der Zelle auf der eingestochen wurde. Scalebar: 10 μ m. (B): Plot der Fluoreszenzintensitäten entlang der in A gezeigten Linie vor (10 s), während (30 s) und nach (60 s) der Hyperpolarisierung. Der Bereich, in dem sich während der Hyperpolarisierung die Fluoreszenz verringert, wurde blau hinterlegt, der Bereich in dem sie ansteigt wurde rot hinterlegt. (C): Darstellung der durchschnittlichen relativen Fluoreszenzintensitäten F/F_0 in verschiedenen Regionen der Schließzelle über die Zeit. Die Zellen wurden von einem Haltepotential von -100 mV auf -160 (2 Zellen), -180 (3 Zellen) oder -200 mV (1 Zelle) hyperpolarisiert. Abbildung verändert aus Voss et al., 2016.

3.2.2 Die Vergrößerung des cytosolischen Volumens ist eine Folge der Strominjektion während der Applikation von hyperpolarisierenden Spannungspulsen

Die in den vorherigen Experimenten gezeigte Änderung des cytosolischen Volumens (Abbildungen 3.6, 3.7 und 3.9) lässt sich als eine transiente Ausdehnung des Cytosols be-

schreiben. Diese Ausdehnung könnte durch einen schnellen, osmotisch bedingten Fluss von Wasser aus der Vakuole in das Cytosol bedingt sein. Eine Theorie, die diesen Prozess erklärt, wäre eine Erhöhung der Ionenkonzentration im Cytosol, die durch Strominjektion während der hyperpolarisierenden Spannungspulse verursacht wird. Um den Einfluss bestimmter Ionenkanäle und Ionen zu untersuchen, wurde die Zusammensetzung der Badlösung beziehungsweise der Elektrodenlösung verändert. Unter verschiedenen Bedingungen konnten dann die Umverteilung des Fluoreszenzfarbstoffs und die elektrophysiologischen Messungen bei der Applikation der Hyperpolarisierungen miteinander verglichen werden. Die Versuche mussten dafür allerdings mit Epidermisstreifen durchgeführt werden, damit ein direkter Kontakt der Badlösung mit den Schließzellen besteht.

3.2.2.1 Der Einfluss einwärtsgerichteter Kaliumkanäle

Wie schon für Schließzellen intakter Pflanzen beschrieben, aktivieren während der hyperpolarisierenden Spannungspulse in Schließzellen in Epidermisstreifen einwärtsgerichtete Kaliumkanäle und Kalium strömt in die Zelle ein (Abbildung 3.10 A, linke Seite, blau markiert als K_{ein} , vergleiche Abbildung 3.5 C und Abschnitt 3.2.1). Enthielt die Badlösung KCl, war kurz vor Ende des hyperpolarisierenden Pulses ein mittlerer Strom von $-4,05 \text{ nA}$ ($SE = 0,767$, $n = 11$) messbar. Die Zellen wurden dabei auf -180 mV (5 Zellen) oder -200 mV (6 Zellen) hyperpolarisiert. Nach Rückkehr zum Haltepotential von -100 mV , wurde ein Anionenausstrom von $-0,37 \text{ nA}$ ($SE = 0,06$, $n = 11$) verzeichnet (Anionenausstrom rot markiert als $\text{Anion}_{\text{aus}}$ in Abbildung 3.10 A). Die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle sind nicht permeabel für Cäsium-Ionen (Schroeder, 1988, Hedrich et al., 1995). Wurde das KCl in der Badlösung durch CsCl ersetzt, führte das dazu, dass bei der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse während der Hyperpolarisierung keine typischen Einwärtsströme durch diese Kanäle messbar waren (Abbildung 3.10 A). Auch der Anionenausstrom nach Rückkehr zum Haltepotential war in Anwesenheit von CsCl nicht mehr oder nur noch sehr gering sichtbar (Abbildung 3.10 A).

Cäsium in der Badlösung unterdrückte nicht nur die Ionenströme, sondern führte auch dazu, dass während der Hyperpolarisierung der Plasmamembran keine transiente Volumenänderung des Cytosols stattfand. Das konnte anhand der ausbleibenden Änderungen der relativen Fluoreszenzintensität F/F_0 von iontophoretisch injiziertem Lucifer Yellow gezeigt werden (Abbildung 3.10 B und C). Der Kaliumstrom in das Cytosol der Schließzellen durch einwärtsgerichtete Kanäle bedingt also vermutlich einen osmotisch getriebenen Wasserfluss aus der Vakuole ins Cytosol und damit die transiente Vergrößerung des cytosolischen Volumens während der Hyperpolarisierung. Dafür würde auch sprechen, dass die Ausdehnung des Cytosols umso größer ist, je stärker der Kaliumstrom

während des Pulses ist (Abbildung 3.10 D).

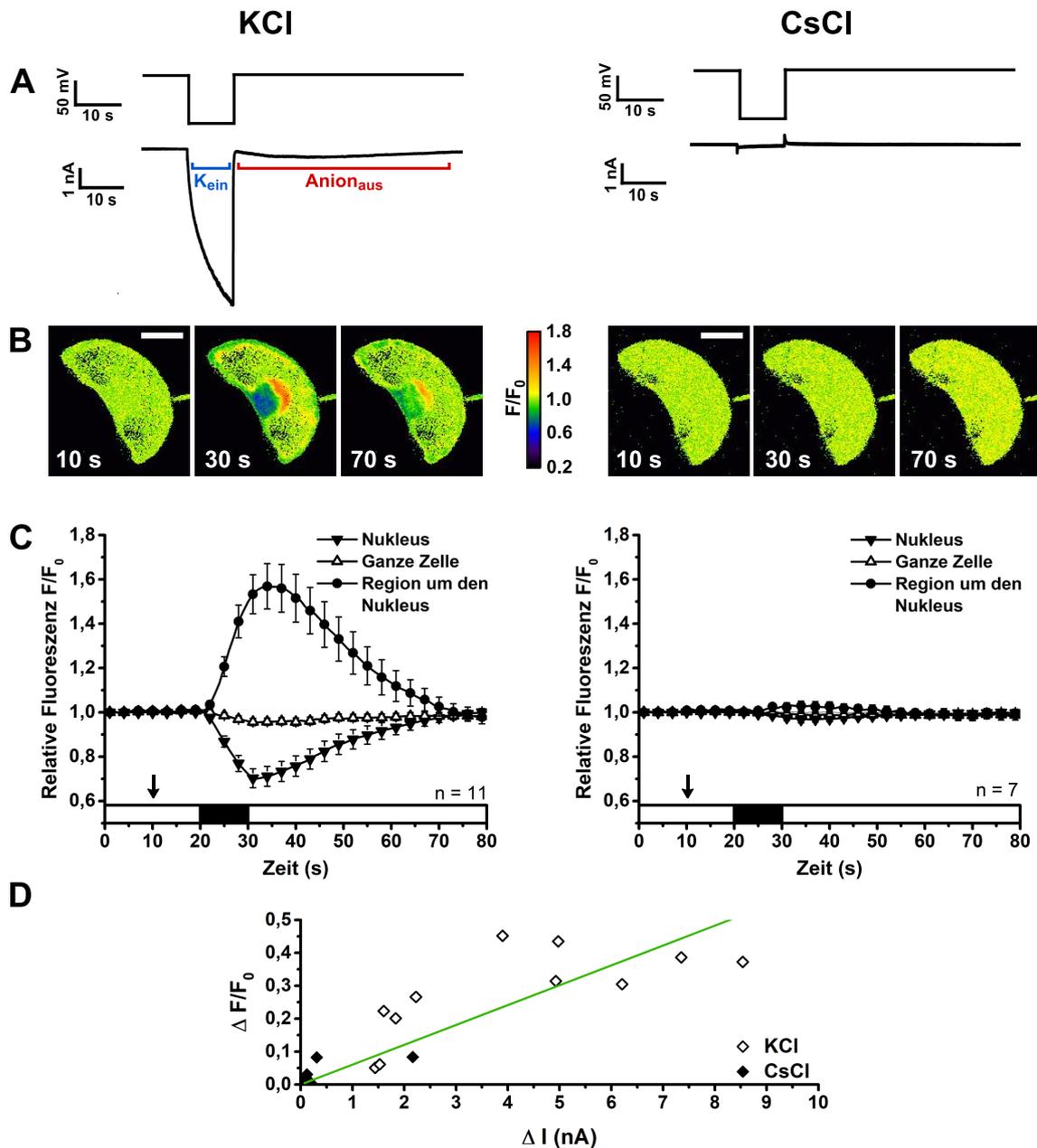


Abb. 3.10: Extrazelluläres Cs^+ unterdrückt die Änderungen des cytosolischen Volumens während hyperpolarisierender Pulse in Schließzellen von *N. tabacum*-Epidermistreifen. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse ohne (linke Seite der Abbildung) und mit Cs^+ (rechte Seite) in der Badlösung. (A): Appliziertes Pulsprotokoll für einen hyperpolarisierenden Puls (oberer Teil) und repräsentative Stromspur einer Schließzelle (unterer Teil). (B): In Falschfarben codierte relative Fluoreszenzintensität F/F_0 vor (10 s), während (30 s) und nach (70 s) der Hyperpolarisierung. Scalebar: $10 \mu\text{m}$. (C): Relative Fluoreszenzintensität F/F_0 über die Zeit, aufgetragen für verschiedene Regionen innerhalb der Zelle. Der Pfeil markiert den Start des Pulsprotokolls, der schwarze Balken markiert die Zeitspanne des hyperpolarisierenden Spannungspulses. >

Abb. 3.10 (Fortsetzung): (D): Änderung der relativen Fluoreszenzintensität am Ende der Hyperpolarisierung, aufgetragen gegen die maximale Änderung des Injektionsstroms während des hyperpolarisierenden Pulses. Offene Symbole: Badlösung mit KCl, geschlossene Symbole: Badlösung mit CsCl. Die grüne Linie wurde durch lineare Regression der Datenpunkte erstellt. Abbildung verändert aus Voss et al., 2016.

3.2.2.2 Der Einfluss von Chlorid in der Elektrodenlösung

Öffnen sich während einer mittels Spannungspuls herbeigeführten Hyperpolarisierung der Plasmamembran die Kaliumkanäle (erkennbar in Abbildung 3.5 C und 3.10 A), kommt es zu einem Einstrom von Kalium ins Cytosol. Dieser Einstrom positiver Ionen wird durch die Strominjektionselektrode ausgeglichen, sodass während der Dauer der Hyperpolarisierung ein negativer Strom in die Zelle injiziert wird, der abhängig von der Stärke des aktivierten KaliumEinstroms ist. Der KaliumEinstrom durch die Kaliumkanäle in der Plasmamembran wird dabei zu einem Teil durch den Ausstrom von Chlorid aus der Strominjektionselektrode ins Cytosol kompensiert und gleichzeitig auch durch den Einstrom von Kationen wie Kalium aus dem Cytosol in die Elektrode. Hierbei akkumuliert KCl im Cytosol.

Um den Einfluss des Chlorideinstroms während der Spannungspulse zu untersuchen, wurde die Spitze der Strominjektionselektrode mit KGlukonat anstelle von KCl befüllt. Glukonat hat eine geringere Elektromobilität als Chlorid. Diese beträgt relativ zu Kalium 0,33, während die von Chlorid mit 1,04 ähnlich der von Kalium ist (Ng & Barry, 1995, Barry & Lynch, 1991). Außerdem können Glukonationen nicht durch die Anionenkanäle permeieren (Hedrich et al., 1990, Maierhofer, 2012, Scherzer, 2012).

Vergleichend zu den vorhergehenden Versuchen mit Chlorid als Anion in der Elektrodenlösung (Abbildung 3.10, linke Seite) wurden Mikroelektroden, die Glukonat als Anion enthalten, für die Applikation der hyperpolarisierenden Spannungspulse verwendet. Während der Hyperpolarisierung wurde die Fluoreszenzintensität von Lucifer Yellow beobachtet. Es fand dabei eine geringere Ausdehnung des Cytosols statt, wenn anstelle von Chlorid Glukonat in der Elektrodenlösung verwendet wurde (Abbildung 3.11, vergleiche auch mit Abbildung 3.10 A und B, linke Seite). Die Strominjektion während des Pulses betrug mit Glukonat in der Elektrode durchschnittlich -3.46 nA ($SE = 1.76 \text{ n} = 5$), was nicht signifikant niedriger als bei Chlorid war (-4.05 nA , $SE = 0.77$, $n = 11$). Die geringere Ausdehnung wurde also nicht durch eine geringere Strominjektion während der Hyperpolarisierung verursacht.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit KCl in der Elektrode, blieben die erhöhte Fluor-

reszenzintensität um den Nukleus und die verringerte Fluoreszenzintensität im Nukleus, die auf die Ausdehnung des Cytosols zurückzuführen sind, auch nach der Rückkehr zum Haltepotential bestehen (Abbildung 3.11). Die Vergrößerung des cytosolischen Volumens war also geringer als mit KCl in der Elektrodenlösung und außerdem irreversibel (vergleiche mit Abbildung 3.10 B und C).

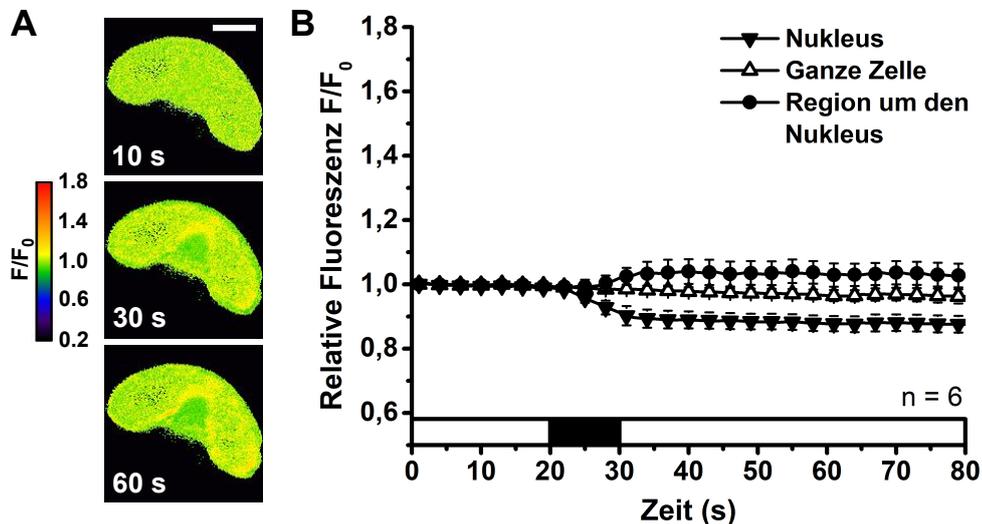


Abb. 3.11: Glukonat in der Elektrodenlösung führt zu einer geringeren, irreversiblen Ausdehnung des Cytosols. Hyperpolarisierende Spannungspulse an Schließzellen von *Nicotiana tabacum* in Epidermisstreifen mit KGlukonat in der Spitze der Strominjektionselektrode. (A): In Falschfarben codierte relative Fluoreszenzintensität F/F_0 vor, während und nach einem 10 Sekunden anhaltenden hyperpolarisierenden Spannungspuls auf -180 mV. Scalebar: $10 \mu\text{m}$. (B): Darstellung der Veränderung der Fluoreszenzintensitäten in der Schließzelle über die Zeit für verschiedene Regionen in der Zelle. Die Zellen wurden auf -160 mV (2 Zellen), -180 mV (3 Zellen) oder -200 mV (1 Zelle) hyperpolarisiert. Der schwarze Balken markiert die Zeitspanne des hyperpolarisierenden Spannungspulses.

Durch die Verlängerung der Zeitspanne der Hyperpolarisierung von 10 auf 50 Sekunden ist es möglich eine noch stärkere Veränderungen der Verteilung von Lucifer Yellow auszulösen. Bei der Durchführung dieser Versuche ließ sich deutlich erkennen, dass die Umverteilung des Farbstoffs Lucifer Yellow durch die Ausdehnung des Cytosols nicht mehr, wie bei 10 Sekunden dauernden Spannungspulsen, auf die Region um den Zellkern begrenzt ist (Abbildung 3.12 A). Stattdessen beobachtet man auch eine Zunahme der absoluten Fluoreszenzintensität an der Einstichstelle und im Bereich des Randes der Schließzelle, der vor der Hyperpolarisierung durch die Vakuole ausgefüllt war.

Wenn KCl in der Strominjektionselektrode war, also während eines hyperpolarisierenden Spannungspulses Chlorid injiziert wurde, erreichte die Erhöhung der Fluoreszenzintensität um den Nukleus nach 20 Sekunden einen Höchstwert, an dem sie um ca. 60 % angestiegen war (3.12 B, linke Seite). Danach verringerte die Fluoreszenz sich wieder bis

zum Ende des hyperpolarisierenden Spannungspulses und stieg nach Rückkehr zum Haltepotential nochmals auf diesen Wert an. Nach ungefähr 120 Sekunden wurde ein neuer stabiler Zustand erreicht, an dem die Fluoreszenz um ca. 10 % niedriger war als zu Beginn der Hyperpolarisierung. Die Fluoreszenzintensität von Lucifer Yellow in der Region innerhalb des Nukleus verringerte sich während des Pulses um ca. 60 % im Vergleich zum Ausgangszustand und war nach der Hyperpolarisierung etwas höher als davor (etwa 15 %), was bedeutet, dass sich das Volumen des Cytosols nach der Hyperpolarisierung im Vergleich zum Ausgangszustand verkleinert hatte. War Glukonat in der Strominjektionselektrode, schritt die Ausdehnung des Cytosols wie auch bei 10 Sekunden dauernden Pulsen während der gesamten Dauer der Hyperpolarisierung voran, und stoppte erst bei der Rückkehr auf das Haltepotential von -100 mV. Dabei war die Abnahme der Fluoreszenzintensität im Nukleus und die Zunahme um den Nukleus (um jeweils ca. 20 %) deutlich geringer im Vergleich zu Chlorid in der Elektrodenlösung (Abbildung 3.12 B, rechte Seite). Die Ausdehnung war also, wie schon für 10 Sekunden andauernde Hyperpolarisierungen gezeigt wurde (Abbildung 3.11), mit Glukonat in der Strominjektionselektrode schwächer als mit Chlorid.

Die Strominjektion während der Pulse war auch hier für beide Fälle vergleichbar (Chlorid: -4,29 nA, SE = 0,41, n = 7; Glukonat: -3,28 nA, SE = 1,09, n = 7). Während des Pulses konnte man die spannungsabhängige Aktivierung einwärtsgerichteter Kaliumkanäle erkennen, die zum Kaliumeinstrom führte (blau markiert als K_{ein} in Abbildung 3.10 C). Nach Rückkehr zum Haltepotential war zudem an den auftretenden Einwärtsströmen die Aktivierung von Anionenkanälen erkennbar (rot markiert als $\text{Anion}_{\text{aus}}$ in Abbildung 3.10 C). Diese war sowohl bei 10 als auch bei 50 Sekunden andauernden Pulsen bei Chlorid in der Strominjektionselektrode stärker, als wenn Glukonat injiziert wurde (Abbildung 3.12 C). Mit Chlorid in der Elektrodenlösung betrug das Maximum des Anionenausstroms im Schnitt -0,369 nA (SE = 0,064, n = 11) nach einer 10 Sekunden dauernden Hyperpolarisierung und -1,701 nA (SE = 0,152, n = 7) nach einer 50 Sekunden andauernden Hyperpolarisierung. Mit Glukonat als Anion in der Elektrodenlösung waren es -0,059 nA (SE = 0,040, n = 5) beziehungsweise -0,366 nA (SE = 0,211, n = 7).

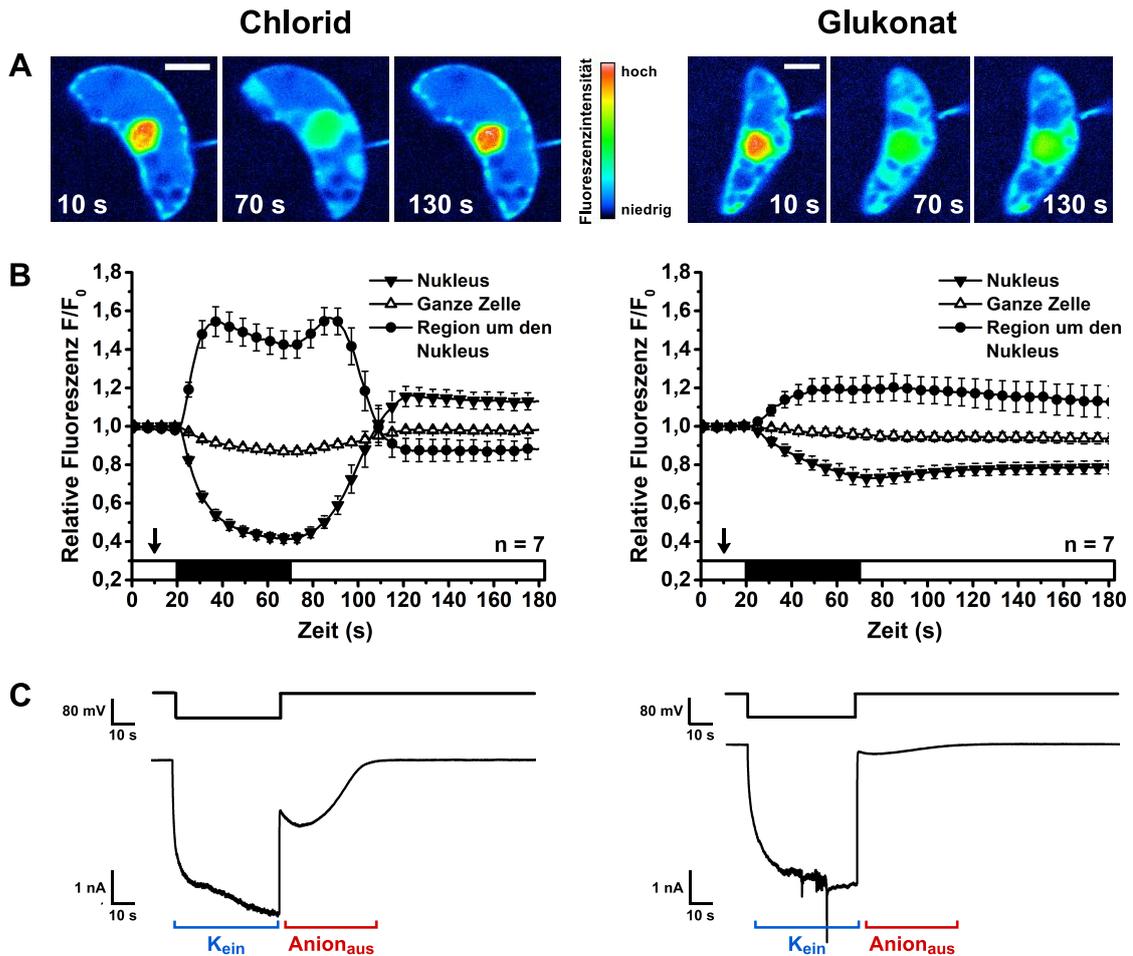


Abb. 3.12: Eine 50 Sekunden anhaltende Hyperpolarisierung der Plasmamembran löst eine starke Ausdehnung des cytosolischen Volumens aus. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für Schließzellen in Epidermisstreifen von *Nicotiana tabacum* mit Chlorid (linke Seite) und Glukonat (rechte Seite) als Anionen in der Elektrodenlösung. (A): In Falschfarben codierte absolute Fluoreszenzintensität von Lucifer Yellow vor, während und nach einer 50 sekundigen Hyperpolarisierung auf -180 mV. Scalebar: $10 \mu\text{m}$. (B): Darstellung der Veränderung der Fluoreszenzintensitäten in der Schließzelle über die Zeit für verschiedene Regionen in der Zelle. Der Pfeil zeigt den Start des Pulsprotokolls, der schwarze Balken markiert die Zeitspanne der Hyperpolarisierung. Die Zellen wurden entweder auf -180 mV (Chlorid: $n = 6$, Glukonat: $n = 5$) oder -200 mV (Chlorid: $n = 1$, Glukonat: $n = 2$) hyperpolarisiert. (C): Pulsprotokoll (oberer Teil) und repräsentative Stromspur einer Schließzelle, die anhand eines solchen Spannungspulses für 50 Sekunden hyperpolarisiert wurde (unterer Teil). Abbildung verändert aus Voss et al., 2016.

Eine potentielle Abhängigkeit der Ausdehnung des Cytoplasmas von der Kaliumkonzentration in der Elektrodenlösung wurde ebenfalls untersucht. Dafür wurde statt 300 mM KCl zum Vergleich 1 M KCl als Elektrodenlösung bei der Applikation hyperpolarisierender Pulse verwendet. Wie Abbildung 3.13 zeigt, unterschieden sich die während der Hyperpolarisierung auftretenden Änderungen der Fluoreszenzintensität von Lucifer Yel-

low innerhalb der Zelle nicht signifikant von den Änderungen, die mit 300 mM KCl als Elektrodenlösungen auftraten (getestet anhand der maximalen Intensität um den Nukleus bzw. den minimalen Wert in der Region des Nukleus beider Gruppen: $p=0,2483$ bzw. $0,7638$). Das Ausmaß der cytosolischen Ausdehnung scheint also nicht von einer Erhöhung der Ionenkonzentration der Elektrodenlösung abhängig zu sein.

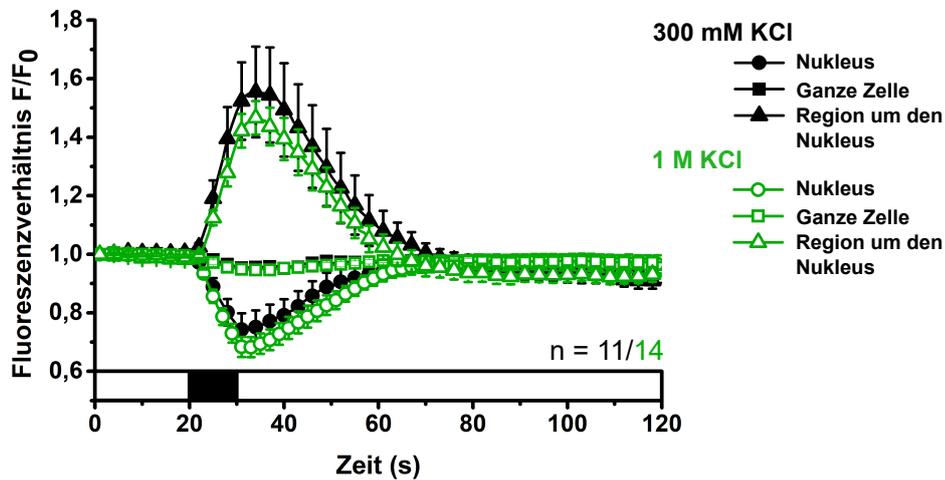


Abb. 3.13: Die cytosolische Ausdehnung während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse wird nicht durch eine Erhöhung der KCl-Konzentration in der Elektrode beeinflusst. Vergleich der Änderung der Fluoreszenzintensität von Lucifer Yellow in Schließzellen aus Epidermisstreifen von *Nicotiana tabacum* während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse mit 300 mM KCl (schwarze Symbole) und 1 M KCl (grüne Symbole) als Elektrodenlösung. Der schwarze Balken markiert die Zeitspanne der Hyperpolarisierung. Es wurde ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV auf -180 ($n = 5/5$) oder -200 mV ($n = 6/9$) hyperpolarisiert.

3.2.2.3 Quantifizierung der Ionenflüsse während der Applikation hyperpolarisierender Pulse

Anhand der während der hyperpolarisierenden Pulse gemessenen Ströme kann man annähernd berechnen, wie viele Kaliumionen dabei durch die einwärts gleichrichtenden Kanäle in die Zelle fließen. Es gilt:

$$I_{\text{ion}} = f_{\text{net}} \times z \times F,$$

wobei I_{ion} der gemessene Strom in Ampere (A) ist, dabei entspricht ein Ampere einem C/s. f_{net} ist der Ionenfluss in mol/Sekunde, z ist die Ladungszahl und F die Faraday Konstante (96500 C/mol). Umgestellt ergibt sich dann:

$$f_{\text{net}} = \frac{I_{\text{ion}}}{z \times F}.$$

Bei einer Stromstärke von 4 nA (Mittelwert für die maximale Stromstärke bei hyperpolarisierenden Pulsen an Schließzellen in Epidermisstreifen von *Nicotiana tabacum*: -4,05 nA, SE = 0,767, n = 11, in intakten Pflanzen: -4,10 nA, SE = 0,619 n = 6) würde sich so ein Strom von 40 fmol/s ergeben, das heißt, dass gegen Ende eines hyperpolarisierenden Pulses in einer Sekunde durchschnittlich 40 fmol Kaliumionen durch die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle in die Zelle fließen.

Um zu quantifizieren wieviele Ionen während der Gesamtdauer eines hyperpolarisierenden Spannungspulses fließen, wurde das Integral des Stroms für jeweils eine Zelle, die nahe des Mittelwertes lag, bestimmt. Für intakte Pflanzen ergab dieses einen Wert von 36,62 nC, für Schließzellen in Epidermisstreifen 29,68 nC. Mithilfe der Faraday Konstante (96500 C/mol), die der elektrischen Ladung eines Mols einfach geladener Ionen entspricht, wurde die molare Menge der geflossenen Ionen berechnet. Diese betrug bei der Beispielzelle einer intakten Pflanze 308 fmol und bei der eines Epidermisstreifens 380 fmol Kaliumionen, die durch einwärtsgerichtete Kanäle in das Cytosol fließen. In der Annahme, dass bei einer Elektrodenlösung aus KCl der Strom durch die Injektions-elektrode zu 50 % aus Chloridefflux ins Cytosol besteht (basierend auf der ähnlichen Elektromobilität von Kalium- und Chloridionen, (Barry & Lynch, 1991), würden also bei intakten Pflanzen näherungsweise 150 fmol Chloridionen ins Cytosol fließen, während 150 fmol Kaliumionen in die Elektrode fließen. Insgesamt würde sich die Ionenkonzentration im Cytosol während eines 10 Sekunden andauernden hyperpolarisierenden Spannungspulses also um ca. 300 fmol erhöhen.

Daraus lässt sich die Änderung der Osmolarität des Cytosols während der Spannungspulse berechnen. Das Volumen einer Schließzelle von *Nicotiana tabacum* ist in etwa vergleichbar mit dem einer Schließzelle von *Vicia faba* (Willmer & Fricker, 1996 Kapitel 2, Jezek & Blatt, 2017, Tabelle 1, und Marten et al., 2007b). Dieses beträgt im geöffneten Zustand ca. 6,5 pl (Shope et al., 2003, Roelfsema & Hedrich, 2005). Wenn man davon ausgeht, dass die Vakuole einen Anteil von ca. 70 % am Gesamtzellvolumen hat (Tanaka et al., 2007), hat das Cytosol annäherungsweise ein Volumen von 1,95 pl. Eine Erhöhung der Ionenkonzentration um 300 fmol bedeutet somit einen Anstieg um ca. 150 mM, also einen Anstieg der cytosolischen Osmolarität um 150 mosM (Berechnung siehe unten). Die Vergrößerung des cytosolischen Volumens während des Spannungspulses, das der Erhöhung der Osmolarität entgegenwirkt, wurde bei dieser Berechnung nicht berücksichtigt.

$$\Delta c = \frac{\Delta n_{\text{ion}}}{V} = \frac{0,3 \text{ pmol}}{1,95 \text{ pl}} = 0,153 \text{ M} = 153 \text{ mM}.$$

Auch für *Arabidopsis*-Schließzellen, die ebenfalls mit einer cytosolischen Ausdehnung

auf hyperpolarisierende Spannungspulse reagieren (Abbildung 3.9), wurde die hervorgerufene Änderung der Kaliumkonzentration berechnet. Der gemessene Kaliumstrom während der Spannungspulse war hier mit einem Mittelwert von -1.06 nA ($SE = 0,169$, $n = 6$) kleiner und somit auch die berechnete Menge an Kaliumionen, die während eines Spannungspulses durch die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle aufgenommen wird. Diese betrug anhand der Bestimmung des Integrals des Stroms im Mittel circa 107 fmol . Für die Änderung der Osmolarität des Cytosols wurde von einem Zellvolumen von $0,87 \text{ pl}$ ausgegangen, dass zu etwa 70% von der Vakuole ausgefüllt wird (Tanaka et al., 2007). Das Volumen des Cytosols würde demnach $0,26 \text{ pl}$ ausmachen. Bei einer Zunahme um 107 fmol (davon ca. 50 fmol Kalium und ca. 50 fmol Chlorid) würde die Ionenkonzentration im Cytosol um ca. 410 mM zunehmen, entsprechend einer Zunahme der Osmolarität um 410 mosM (Berechnung siehe unten). Auch hier wurde die Vergrößerung des cytosolischen Volumens während des Spannungspulses nicht für die Berechnung berücksichtigt.

$$\Delta c = \frac{\Delta n_{\text{ion}}}{V} = \frac{0,1 \text{ pmol}}{0,26 \text{ pl}} = 0,41 \text{ M} = 410 \text{ mM}.$$

3.2.2.4 Anionenströme nach der Rückkehr zum Haltepotential im Anschluss an einen hyperpolarisierenden Spannungspuls

Nachdem das Membranpotential der Schließzellen für 10 oder 50 Sekunden hyperpolarisiert wurde, erfolgte die Rückkehr zum Haltepotential, das -100 mV betrug. Die direkt nach dem Beenden des Pulses bei -100 mV gemessenen Ströme (siehe Abbildungen 3.5 C, 3.10 A und 3.12 C, jeweils rot markiert als $\text{Anion}_{\text{aus}}$) resultieren wahrscheinlich aus der Aktivität von Anionenkanälen (Stange et al., 2010). Dafür würde auch sprechen, dass diese Ströme bei Verwendung von Glukonat in der Elektrodenlösung nur sehr reduziert auftraten (Abbildung 3.12 C), da die Anionenkanäle nicht für Glukonat permeabel sind (Hedrich et al., 1990, Scherzer, 2012, Maierhofer, 2012). Die gemessenen Anionenströme nach dem Spannungspuls könnten also durch die Erhöhung der Chloridkonzentration im Cytosol verstärkt werden und durch den Ausstrom des überschüssigen Chlorids aus der Zelle auch für die Reversibilität der cytosolischen Expansion notwendig sein. Das Ausmaß der cytosolischen Ausdehnung während hyperpolarisierender Spannungspulse war von der Stärke des Stroms durch die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle und damit auch von der Menge der injizierten Chloridionen abhängig (Abbildung 3.10 D). Deswegen wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Kaliuminflux ins Cytosol und den gemessenen Anionenströmen nach den hyperpolarisierenden Spannungspulsen besteht.

Um dies zu überprüfen, wurde der gemessene Anionenstrom nach dem hyperpolarisieren-

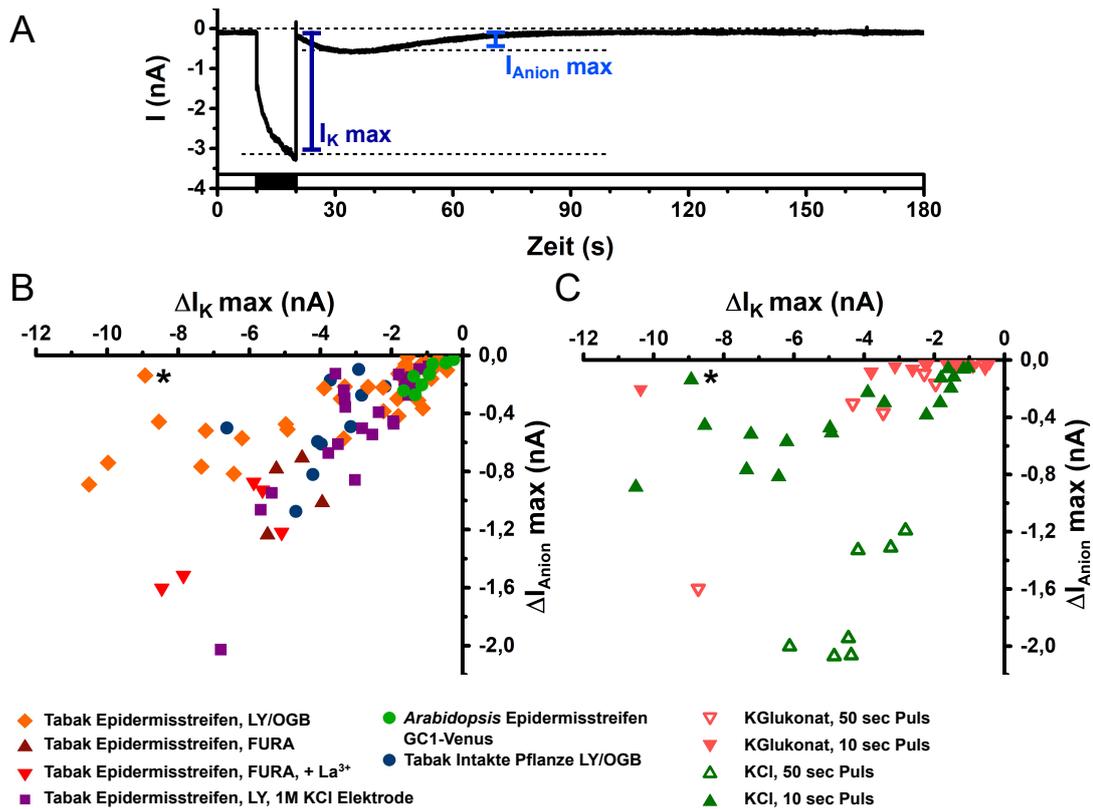


Abb. 3.14: Die Stärke der nach den Spannungspulsen gemessenen Anionenströme korreliert mit der Stärke des Kaliuminfluxes während der Spannungspulse. (A): Repräsentative Stromspur eines hyperpolarisierenden Spannungspulses. I_K max entspricht dem gemessenen Strom am Ende der hyperpolarisierenden Spannungspulse, I_{Anion} max entspricht dem Maximum des Stroms, der nach der Rückkehr zum Haltepotential messbar war. (B): Nach den Spannungspulsen gemessene Anionenströme (I_{Anion} max) aufgetragen gegen die während der Spannungspulse gemessenen Kaliumeinwärtsströme (I_K max). Es sind Daten verschiedener Versuchsreihen mit 10 Sekunden andauernden Hyperpolarisierungspulsen abgebildet. (C): Vergleich des Verhältnisses I_K max zu I_{Anion} max für 10 und 50 Sekunden andauernde Hyperpolarisierungspulse mit Chlorid oder Glukonat als Anion in der Elektrodenlösung.

den Spannungspuls gegen den Strom der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle während der Hyperpolarisierung aufgetragen (Abbildung 3.14 A). Abbildung 3.14 B zeigt diese Beziehung zwischen I_K in und I_{Anion} für verschiedene Versuchsreihen. Dafür wurde die maximale Änderung des Injektionsstroms während des Spannungspulses (I_K max) und die maximale Änderung des Injektionsstroms nach der Rückkehr zum Haltepotential (I_{Anion} max) bestimmt (Abbildung 3.14 A) und jeweils gegeneinander aufgetragen. Zu erkennen ist eine Korrelation zwischen den Anionenströmen, die nach den Spannungspulsen auftreten, und den Kaliumströmen durch einwärtsgerichtete Kanäle (Abbildung 3.14 B und C). Bei einer Verlängerung der Spannungspulse auf 50 Sekunden vergrößerte sich auch der gemessene Anionenausstrom nach dem Spannungspuls relativ zu dem vor-

her gemessenen maximalen Kaliumeinstrom (Abbildung 3.14 C). Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass durch die längere Aktivierung der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle während eines längeren Spannungspulses auch insgesamt mehr Chlorid aus der Strominjektionselektrode ins Cytosol fließt. Durch Glukonat in der Elektrodenlösung waren die Anionenströme im Verhältnis zu den Kaliumströmen stark reduziert (Abbildung 3.14 C). Der mit Sternchen markierte Ausreißer (Abbildung 3.14 B und C) mit sehr geringen Anionenströmen nach dem Spannungspuls ist auf eine Zelle zurückzuführen, bei der die cytosolische Ausdehnung nach dem Spannungspuls nur sehr langsam und unvollständig zurückging, obwohl Chlorid als Anion in der Elektrodenlösung eingesetzt wurde.

3.2.3 Cytosolische Volumenänderungen bewirken einen zusätzlichen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration

Durch die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Veränderungen des cytosolischen Volumens während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse ist es nicht möglich, mit Oregon Green-BAPTA die Änderung der Calciumkonzentration räumlich aufzulösen, da der Fluoreszenzfarbstoff innerhalb der Zelle umverteilt wird. Es lässt sich also nicht unterscheiden, ob eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch Bindung von Calcium oder durch die Umverteilung des Farbstoffs verursacht wurde. Wie in Abbildung 3.10 gezeigt wurde, kann die Ausdehnung des cytosolischen Volumens in Schließzellen von Epidermisstreifen aber durch extrazelluläres Cs^+ unterdrückt werden. Das ermöglicht die Visualisierung der cytosolischen Calciumkonzentrationen mittels Oregon Green-BAPTA während einer Hyperpolarisierung, ohne dass die Umverteilung des Fluoreszenzreporters durch die Ausdehnung Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des Calciumreporters hat.

Während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse an Schließzellen in Epidermisstreifen von *Nicotiana tabacum* in einer Badlösung mit Cäsium erhöhte sich die Fluoreszenzintensität von Oregon Green-BAPTA vor allem am Rand der Zelle (Abbildung 3.15 A). Dort stieg folglich die cytosolische Calciumkonzentration am stärksten an, wahrscheinlich durch die Aktivierung spannungsabhängiger, calciumpermeabler Kationenkanäle in der Plasmamembran (Hamilton et al., 2000, Pei et al., 2000, Stoelzle et al., 2003). War in der Badlösung dagegen Kalium, so konnten während der Hyperpolarisierung, zusätzlich zur Fluoreszenzerhöhung am Rand der Zelle, die schon beschriebenen Änderungen um den Zellkern beobachtet werden (Abbildung 3.15 A).

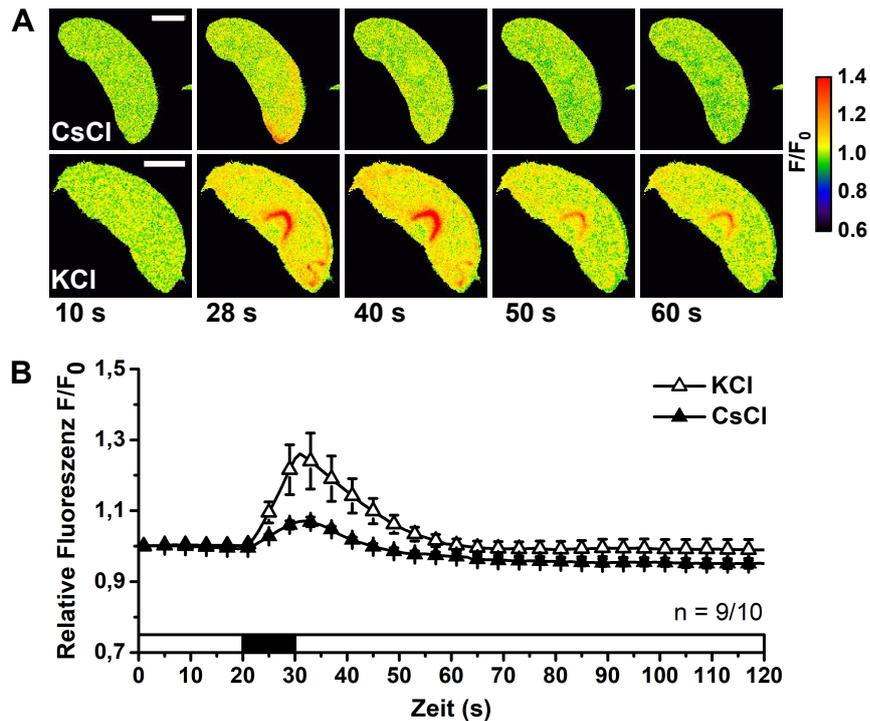


Abb. 3.15: Extrazelluläres Cs^+ verringert den Anstieg der Calciumkonzentration während eines hyperpolarisierenden Spannungspulses. Vergleichende Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von Oregon Green-BAPTA während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse in Schließzellen von *Nicotiana tabacum* Epidermisstreifen in einer Badlösung mit 50 mM KCl oder 50 mM CsCl. (A): In Falschfarben codierte relative Fluoreszenzintensität F/F_0 vor, während und nach einer Hyperpolarisierung auf -200 mV in einer Badlösung mit CsCl (oben) oder KCl (unten). Scalebars $10 \mu\text{m}$. (B): Änderungen der relativen Fluoreszenzintensität der gesamten Zelle durch Hyperpolarisierung auf -180 (jeweils 4 Zellen) oder -200 mV (6 Zellen mit CsCl, 5 Zellen mit KCl). Der schwarze Balken markiert die Zeitspanne der Hyperpolarisierung. Abbildung verändert aus Voss et al., 2016.

Die Änderung der Fluoreszenzintensität in der gesamten Schließzelle war größer, wenn die Badlösung Kalium statt Cäsium enthielt (Abbildung 3.15 B). Das lässt darauf schließen, dass die Änderungen des cytosolischen Volumens, die in der Badlösung mit Kalium auftreten, den Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration verstärken. Dieser könnte zum Beispiel durch eine Aktivierung mechanosensitiver, calciumpermeabler Kanäle verursacht werden.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Intensität des Oregon Green-BAPTA Signals durch Bewegungen des Farbstoffs relativ zur fokalen Ebene beeinflusst wird, wurden zur Bestätigung dieser Hypothese Versuche mit dem ratiometrischen Calciumreporter Fura-2 durchgeführt. Dieser ermöglicht eine Visualisierung der Änderungen der Calciumkonzentration, die unabhängig von der Konzentrationsänderungen des Fluoreszenzfarb-

stoffs ist, sodass ein Vergleich zwischen Schließzellen in einer Badlösung mit CsCl oder KCl möglich ist. Fura-2 wurde, wie Oregon Green-BAPTA und Lucifer Yellow, mittels iontophoretischer Injektion in die Schließzellen geladen. Um die Dynamik der cytosolischen Calciumkonzentration zu beobachten, wurden Aufnahmen bei den Wellenlängen 345 und 390 nm gemacht. Zum Vergleich der Effekte der hyperpolarisierenden Spannungspulse wurde ein Perfusionssystem eingesetzt, damit dieselbe Schließzelle bei unterschiedlichen Badlösungen beobachtet werden konnte. Dabei wurde Cäsium eingesetzt, um die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle zu inhibieren, und Lanthan zur Inhibierung der calciumpermeablen Kanäle in der Plasmamembran.

Die Änderung der F_{345}/F_{390} -Ratio von Fura-2 wurde durch Cäsium in der Badlösung vermindert (Abbildung 3.16 A, B, D). Die Änderung der cytosolischen Calciumkonzentration während der Hyperpolarisierung ist also mit Cäsium kleiner als mit Kalium, wie auch schon in den Versuchen mit Oregon Green-BAPTA gezeigt werden konnte (Abbildung 3.15). Das bestätigt, dass die cytosolische Ausdehnung einen Einfluss auf die cytosolische Calciumkonzentration haben könnte. Der Einstrom von Kalium während der Spannungspulse wird ebenfalls inhibiert, wie die Stromspur in Abbildung 3.16 B zeigt.

Um zu untersuchen, ob die durch die Spannungspulse ausgelöste Erhöhung der Calciumkonzentration durch Inhibitoren der Kationenkanäle in der Plasmamembran unterdrückt werden, wurde den Badlösungen mit KCl und CsCl jeweils 1 mM La^{3+} zugegeben. Nach Zugabe des Lanthans verringerte sich die Calciumkonzentration im Cytosol der Schließzelle (Abbildung 3.16 A), was durch die Inhibierung nichtselektiver Kationenkanäle in der Plasmamembran zu erklären ist (Hescheler & Schultz, 1993, Demidchik & Maathuis, 2007). Unter diesen Bedingungen wurden ebenfalls Hyperpolarisierungspulse appliziert. Nur durch die Kombination von Cäsium und Lanthan in der Badlösung wurden Änderungen der Fura-2 Ratio vollständig unterdrückt (Abbildung 3.16 A, C, E). Wurde Lanthan der Badlösung mit KCl hinzugefügt, konnte immer noch eine Erhöhung der Calciumkonzentration beobachtet werden (Abbildung 3.16 A, C und E). Diese war aber geringer, als in Badlösungen ohne Lanthan. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass während einer Hyperpolarisierung zwei verschiedene Mechanismen zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration führen. Zum einen ist das die Aktivierung spannungsabhängiger, calciumpermeabler Ionenkanäle in der Plasmamembran, zum anderen die osmotisch getriebene Expansion des Cytosols. Letztere führt zu einer Freisetzung von Calcium aus Speichern innerhalb der Zelle durch einen bisher unbekanntem Mechanismus.

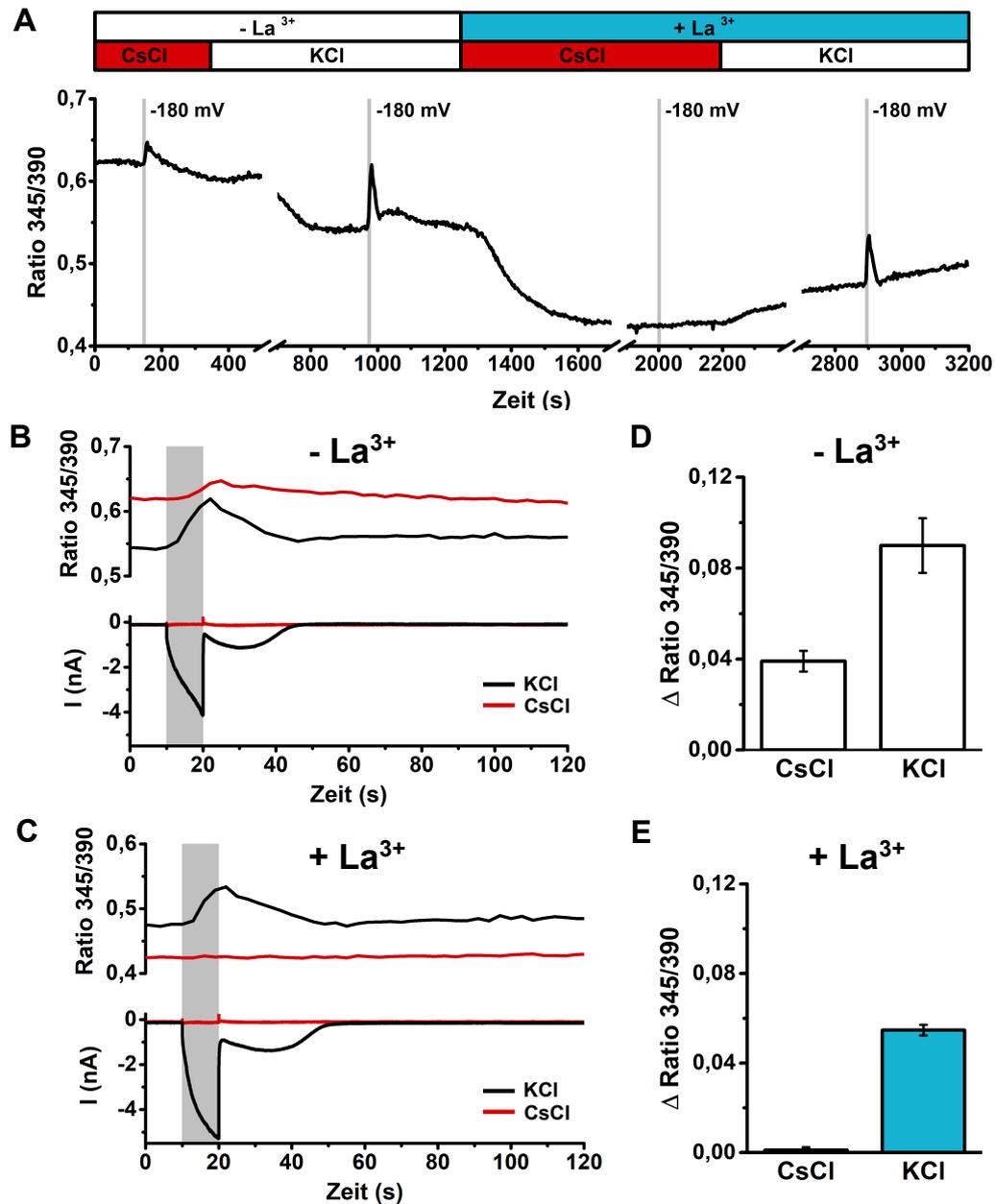


Abb. 3.16: Cytosolische Volumenänderungen führen zu einem Anstieg der Calciumkonzentration (A): F_{345}/F_{390} -Ratio von Fura-2 in einer Schließzelle von *Nicotiana tabacum* aufgetragen gegen die Zeit. Die Epidermisstreifen wurden mit Badlösung perfundiert, die entweder 50 mM KCl oder CsCl und +/- 1 mM La^{3+} enthielt, wie in den Balken über dem Diagramm gezeigt wird. Die Plasmamembran wurde mehrmals für 10 Sekunden von einem Haltepotential von -100 mV auf -180 mV hyperpolarisiert (graue Balken). (B) und (C): Fura-2 Ratios und Stromspuren für dieselbe Zelle, die in A gezeigt wird. Die Hyperpolarisierung (grau hinterlegt) wurde in einer Badlösung mit KCl oder CsCl appliziert (schwarze bzw. rote Linie). In C wurde zusätzlich 1 mM La^{3+} zugegeben. (D) und (E): Durchschnittliche Änderungen der Fura-2 Ratio durch Hyperpolarisierung auf -180 mV in Badlösungen mit CsCl oder KCl. In E wurde 1 mM La^{3+} zugegeben. Die Fehlerbalken zeigen SE, n = 5. Abbildung verändert aus Voss et al., 2016.

3.3 Untersuchung elektrophysiologischer und anatomischer Eigenschaften von Farn-Schließzellen

Farne waren nach den Moosen und Bärlappgewächsen die ersten Landpflanzen und sind evolutionär älter als die im ersten Teil der Arbeit verwendeten Blütenpflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*. Zusammen mit den Bärlappgewächsen gehören die Farne zu den frühesten Gefäßpflanzen und besitzen funktionelle Stomata in der Epidermis ihrer photosynthetisch aktiven Blätter. Diese Stomata unterscheiden sich in einigen Punkten von Stomata der Angiospermen, allerdings ist noch relativ wenig über die molekularen Mechanismen der Stomaregulierung in Farnen bekannt. Als Teil dieser Arbeit wurden elektrophysiologische Analysen der spannungsabhängigen Ströme über die Plasmamembran von Schließzellen des Farns *Polypodium vulgare* durchgeführt. Das ermöglicht einen ersten Vergleich mit elektrophysiologischen Eigenschaften bereits charakterisierter Arten, wie zum Beispiel *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* und *Vicia faba*. Aufgrund abweichender Eigenschaften könnten so eventuell Rückschlüsse auf die Funktion und Regulierung der Stomaweite in früheren Landpflanzen gezogen werden. Auch das Vorhandensein hyperpolarisationsaktivierter, calciumpermeabler Kanäle in Schließzellen von *Polypodium vulgare*, *Asplenium scolopendrium* und *Ceratopteris richardii* wurde untersucht. Dazu wurde im wesentlichen die im Kapitel 3.2 beschriebene, für *Nicotiana tabacum* etablierte Methode zur Applikation von hyperpolarisierenden Spannungspulsen und zur Visualisierung der cytosolischen Calciumkonzentration angewandt.

3.3.1 Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von Schließzellen in Farnen

Um die zelluläre Organisation in Schließzellen von Farnen konfokal aufzulösen, wurden anhand von Fluoreszenzfarbstoffen das Cytosol und die Vakuole dieser Zellen visualisiert. Für die Visualisierung des Cytosols wurde, wie schon für Tabak beschrieben (Abschnitt 3.1), mit Mikroelektroden in Schließzellen intakter Pflanzen der Farnspezies *Polypodium vulgare* und *Asplenium scolopendrium* eingestochen. Der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green-BAPTA wurde durch iontophoretische Injektion in das Cytosol geladen.

Auffallend im Vergleich zu Tabak- und *Arabidopsis*-Schließzellen ist, dass es in beiden gezeigten Farnspezies größere cytosolische Bereiche gibt (Abbildung 3.17, vergleiche Abbildung 3.2 A), was darauf hinweist, dass die Vakuole im Vergleich kleiner ist. Dies

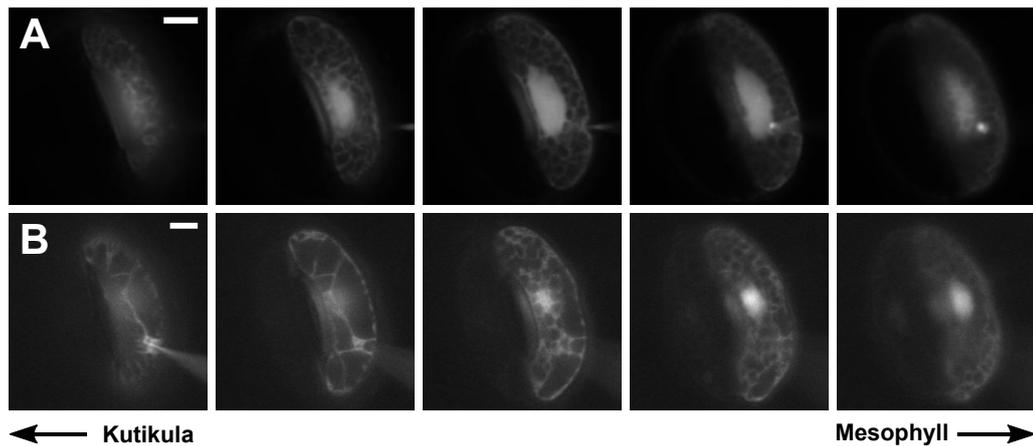


Abb. 3.17: Konfokale Aufnahmen von Schließzellen in intakten *Polypodium vulgare* (A) und *Asplenium scolopendrium* (B) Pflanzen, die mit Oregon Green-BAPTA beladen wurden. Es werden verschiedene fokale Ebenen der Schließzellen gezeigt, dabei wurde bei der Ebene der Schließzellen, die an die Kutikula angrenzt begonnen und in Richtung Mesophyll fortgefahren. Scalebar: 10 μ m.

konnte auch gezeigt werden, indem Epidermisstreifen von *Polypodium vulgare* mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF, der in die Vakuole transportiert wird, inkubiert wurden. Die Fluoreszenz von BCECF konnte dann mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Abbildung 3.18). So ließ sich auch erkennen, dass die Schließzellen von *Polypodium vulgare* eine sehr große Anzahl an Chloroplasten besitzen, wohingegen in Tabak-Schließzellen nur einige wenige Chloroplasten vorliegen (siehe Abbildung 3.18).

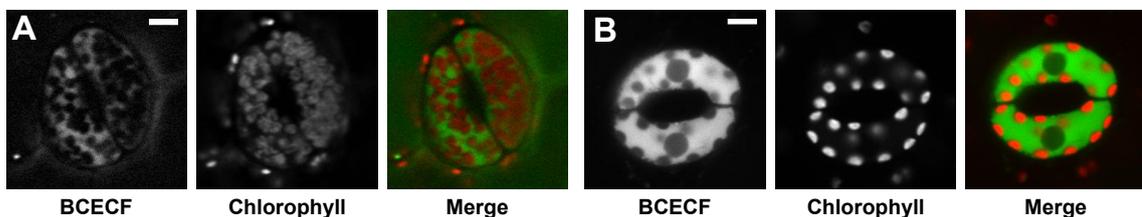


Abb. 3.18: Konfokale Aufnahmen von Schließzellen in Epidermisstreifen von *Polypodium vulgare* (A) und *Nicotiana tabacum* (B), die mit BCECF beladen wurden. Die Fluoreszenz von BCECF und die Autofluoreszenz des Chlorophylls wird einzeln und übereinandergelagert gezeigt. Scalebar 10 μ m.

3.3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Ströme in Schließzellen von *Polypodium vulgare* und *Asplenium scolopendrium*

Die Anpassung der Stomaöffnung wird in Angiospermen durch den Turgordruck der Schließzellen kontrolliert, der durch die osmotisch getriebene Aufnahme oder Abgabe

von Wasser in die Zelle eingestellt wird. Die treibende Kraft für diesen Wasserfluss ist die Veränderung der Kaliumkonzentration, die durch Kaliumkanäle in der Plasmamembran reguliert wird (Fischer, 1968, Schroeder et al., 1984). In Schließzellen intakter Pflanzen können die durch spannungsabhängige Kaliumkanäle vermittelten Ströme, die für die Aufnahme bzw. Abgabe von Kalium zuständig sind, mittels TEVC-Technik gemessen werden (Roelfsema et al., 2001).

Um Rückschlüsse auf die Kaliumströme über die Plasmamembran in Schließzellen von Farnen machen zu können, wurde in Schließzellen von *Polypodium* und *Asplenium* eingestochen und ebenfalls die TEVC-Technik angewandt. Dabei wurde ein Pulsprotokoll verwendet, mit dem auch in Schließzellen von *Arabidopsis*, Tabak oder *Vicia faba* die Aktivierung von ein- und auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen gemessen werden konnte (z.B. in Roelfsema et al., 2001, Roelfsema & Prins, 1997 und Stange, 2010). In den beiden untersuchten Farnspezies konnten dabei Ströme gemessen werden, die von ihrer zeitabhängigen Aktivierungskinetik her den in Schließzellen von Samenpflanzen gemessenen Kaliumströmen glichen (siehe Abbildung 3.19, vergleiche Roelfsema et al., 2001, Roelfsema & Prins, 1997 und Stange, 2010). Die auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle aktivierten bei Spannungen positiv von -40 mV, die einwärtsgleichrichtenden Kanäle negativ von -120 mV.

Neben den Kaliumkanälen spielen auch Anionenkanäle eine wichtige Rolle für die Regulierung der Stomaöffnungsweite in Samenpflanzen (Roelfsema et al., 2004, Roelfsema et al., 2012). Auch die durch Anionenkanäle vermittelten Ströme sollten in *Polypodium* mit Hilfe der TEVC-Technik untersucht werden. Dafür wurden die Zellen auf ein Haltpotential von 0 mV geklemmt und für jeweils 10 Sekunden auf Potentiale von 40 bis -100 mV geklemmt. Die auf diese Weise gemessenen Ströme (Abbildung 3.20) zeigten eine ähnliche zeitabhängige Deaktivierungskinetik wie S-Typ-Anionenkanäle (vergleiche Stange, 2010, Marten et al., 2007a). Auch hier war eine langsame Deaktivierung bei negativeren Potentialen erkennbar. Die instantanen Ströme, die direkt nach dem Anlegen der Testspannungen gemessen wurden, zeigten eine lineare Strom-Spannungskennlinie (Abbildung 3.20 B), da die spannungsabhängige Deaktivierung bei S-Typ-Kanälen relativ langsam ist und nicht direkt nach dem Sprung auf die Testspannung einsetzt. Um zu zeigen, dass es sich bei den gemessenen Strömen tatsächlich um Anionenströme handelt, wurde durch den dritten Kanal der Mikroelektrode ein negativer Strom appliziert. Dadurch wurde die Konzentration von Chlorid im Cytosol der Schließzelle artifizial erhöht.

Nach zwei und anschließend nach vier Minuten dieser Strominjektion wurde erneut das Pulsprotokoll appliziert. Die Zunahme der gemessenen Ströme nach der Injektion von Chlorid (siehe Abbildung 3.20 A, B und C) ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei den hier

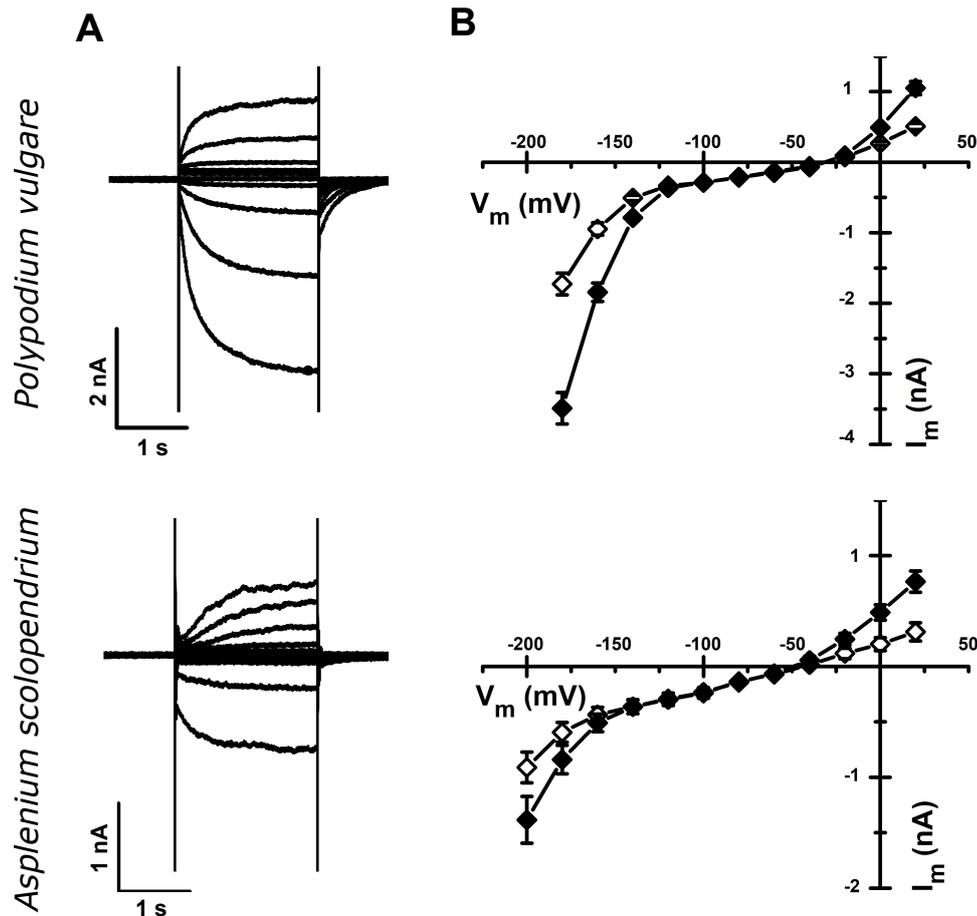


Abb. 3.19: Spannungsabhängige Ströme in Schließzellen von *Polypodium vulgare* und *Asplenium scolopendrium*. (A): Repräsentative Stromspuren für *Polypodium*- und *Asplenium*-Schließzellen. Nach dem Einstich wurden ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV für 2 Sekunden Testpulse im Bereich von $+20$ bis -180 mV in Schritten von 20 mV appliziert. (B): Strom-Spannungs-Verhältnis in Schließzellen der beiden Farnspezies. Die Werte für die instantanen Ströme (offene Symbole) wurden am Anfang, die für die Gleichgewichtsströme (geschlossene Symbole) am Ende der jeweiligen Testpulse bestimmt. $n = 40$ (*Polypodium*) bzw. 15 (*Asplenium*). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Abbildung verändert aus Voss et al., 2018.

gemessenen Strömen tatsächlich um Anionenströme handelt. In den Strom-Spannungs-Diagrammen ließ sich gut die Erhöhung der instantanen Ströme nach der Injektion des negativen Stroms erkennen. Die Gleichgewichtsströme wurden ebenfalls größer. Außerdem wurde nach der Injektion des negativen Stroms und der damit verbundenen Erhöhung der cytosolischen Chloridkonzentration das Umkehrpotential positiver, was beides dafür spricht, dass die gemessenen Ströme tatsächlich Anionenströme darstellen.

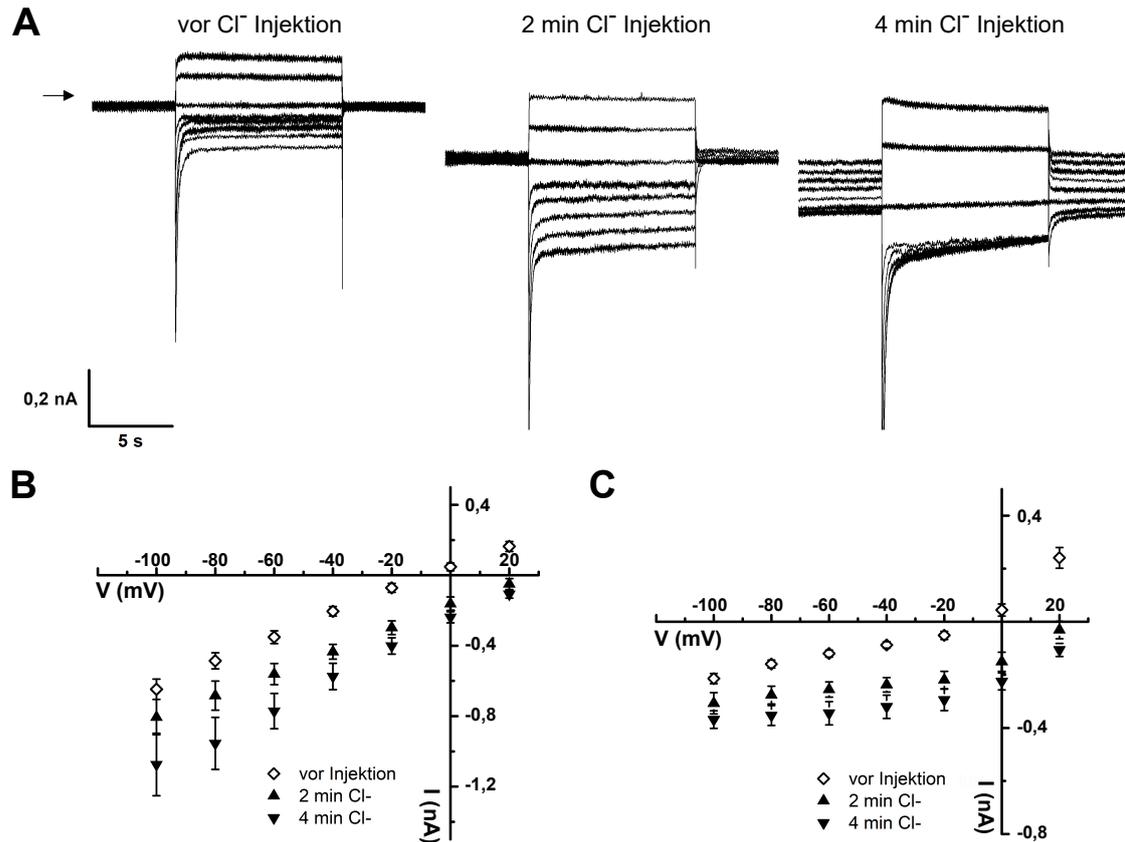


Abb. 3.20: Anionenströme über die Plasmamembran in Schließzellen von *Polypodium vulgare*. (A): Stromspuren vor der iontophoretischen Injektion von Chlorid (links) und nach zwei (Mitte) und vier (rechts) Minuten Chloridinjektion. Die Schließzellen wurden auf ein Haltepotential von 0 mV geklemmt, davon ausgehend wurde in 20 mV Schritten für 10 s auf Potentiale von 40 bis zu -100 mV gesprungen. Um auswärtsgerichtete Kaliumkanäle zu inhibieren, enthielt die Mikroelektrode CsCl. Der Pfeil markiert die Position von 0 nA. (B,C): Strom-Spannungsdiagramme der instantanen Ströme (B) und der Gleichgewichtsströme (C) vor und zwei bzw. vier Minuten nach der iontophoretischen Chloridinjektion. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, $n= 9/9/8$ (vor/2min/4min Chloridinjektion).

3.3.3 Hyperpolarisationsaktivierte Calciumkanäle in *Polypodium* und *Asplenium*

Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration spielen eine wichtige Rolle in Signalwegen, die an der Regulierung der Stomaweite in Angiospermen beteiligt sind (Rolfsema & Hedrich, 2010, Kudla et al., 2010). In mehreren Studien wurden Unterschiede zwischen der Reaktion der Stomata von Farnspezies und Samenpflanzen auf Veränderungen der Luftfeuchtigkeit beobachtet (Brodrigg & McAdam, 2017, Brodrigg & McAdam, 2011). Demnach schließen die Stomata der Farne bei geringer Luftfeuchtigkeit durch einen passiven, ABA-unabhängigen Mechanismus. Allerdings wird die Evolution

der aktiven Regulierung der Stomaweite kontrovers diskutiert, da einige Studien auch in basalen Landpflanzen, wie dem Bryophyten *Physcomitrella patens* und dem Lycophyten *Selaginella uncinata*, eine Inhibierung der Stomaöffnung durch ABA zeigen konnten (siehe z.B. Brodribb & McAdam, 2011, Chater et al., 2011, Ruszala et al., 2011). 2017 konnte auch in Farnspezies ein ABA-abhängiger Stomaschluss nachgewiesen werden, der von den Wachstumsbedingungen der Versuchspflanzen abhängig war (Hörak et al., 2017). Über die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Stomaregulierung, insbesondere über die Rolle der cytosolischen Calciumkonzentration im Zusammenhang mit der Aktivierung von Anionenkanälen und calciumabhängigen Proteinkinasen, ist in Farn-Schließzellen allerdings bis heute sehr wenig bekannt. In Tabak wird durch Hyperpolarisierung der Plasmamembran von Schließzellen die Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration durch die spannungsabhängige Aktivierung von calciumpermeablen Kationenkanälen in der Plasmamembran und durch die Freigabe von Calcium aus intrazellulären Speichern ausgelöst (Voss et al., 2016). Um zu testen, ob diese Mechanismen auch in Schließzellen von Farnen ausgelöst werden können, wurde die Kombination aus elektrophysiologischen Messungen und Imaging mit calciumsensitiven Farbstoffen angewandt.

Es wurden hierfür die beiden Farnspezies *Polypodium vulgare* und *Asplenium scolopendrium*, die beide der Ordnung Polypodiales angehören, untersucht. Dabei wurde zuerst der Einzelwellenlängen-Calciumindikator Oregon Green-BAPTA verwendet, um zu beurteilen, ob überhaupt eine Änderung der cytosolischen Calciumkonzentration durch eine Hyperpolarisierung hervorgerufen werden kann.

Sowohl bei *Polypodium* als auch bei *Asplenium* wurde direkt nach Beginn der Hyperpolarisierung ein Anstieg der Fluoreszenzintensität von Oregon Green-BAPTA beobachtet. Die Hyperpolarisierung durch einen Spannungspuls führt also auch in diesen beiden Arten zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration. Auffällig dabei war, dass die Verteilung des Fluoreszenzfarbstoff in einigen Stomata nicht auf die Schließzelle begrenzt blieb, in die die Mikroelektrode eingestochen wurde. Stattdessen verteilte sich Oregon Green-BAPTA auch in der Nachbarschließzelle, wie in Abbildung 3.21 bei der Messung von *Asplenium* zu sehen ist. Dies konnte in Messungen mit Schließzellen von *Nicotiana tabacum* nicht beobachtet werden. Außerdem war während der Hyperpolarisierung keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um den Zellkern und Abnahme im Zellkern zu beobachten (Abbildung 3.21).

Zur Quantifizierung der Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentration wurden weitere Messungen mit dem ratiometrischen Calciumreporter Fura-2 durchgeführt. Dabei wurde die Plasmamembran auf Spannungen von -180, -200 und -220 mV hyperpolarisiert,

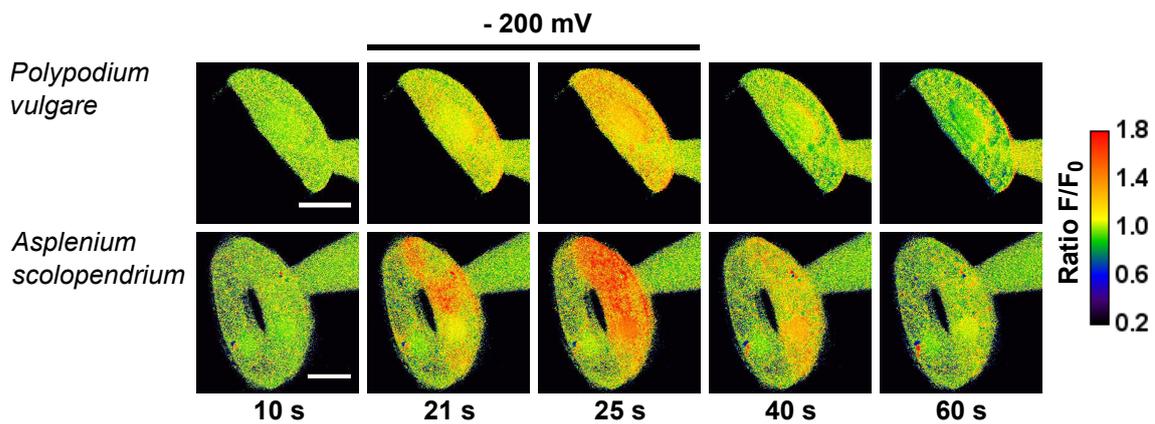


Abb. 3.21: Hyperpolarisierung der Plasmamembran durch Spannungspulse führt in Schließzellen von *Polypodium vulgare* und *Asplenium scolopendrium* zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration. In Falschfarben dargestellte relative Fluoreszenzintensität F/F_0 von Oregon Green-BAPTA in Schließzellen vor, während und nach einer Hyperpolarisierung. Die Schließzellen wurden für 10 s auf -200 mV hyperpolarisiert. Start der Hyperpolarisierung $t = 20$ s. Scalebar: $20 \mu\text{m}$. Abbildung verändert aus Voss et al., 2018.

um die Stärke der Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration zu vergleichen.

Während einer Hyperpolarisierung konnte man an dem veränderten Verhältnis der Intensitäten von Fura-2 bei den Wellenlängen 345 nm und 390 nm erkennen, dass die cytosolische Calciumkonzentration durch die Hyperpolarisierung anstieg und nach der Rückkehr zum Haltepotential wieder abnahm. Ungefähr 120 Sekunden nach Beenden des Spannungspulses wurde der ursprünglichen Wert wieder erreicht (3.22 A und B). Das Verhältnis der beiden Wellenlängen wurde durch Kalibrationsmessungen in die cytosolische Calciumkonzentration umgerechnet und in Abbildung 3.22 A in Falschfarben dargestellt. Das Ergebnis der Messung von 15 Zellen ergab, dass durch einen Hyperpolarisierungspuls auf -200 mV in Schließzellen von *Polypodium vulgare* durchschnittlich eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration um 263 nM (SE = 152 nM) ausgelöst wird (Abbildung 3.22 C). Wie schon von Stange et al., 2010 für Tabak beschrieben, war der Anstieg der Calciumkonzentration abhängig von der Stärke des hyperpolarisierenden Spannungspulses. Wurde die Plasmamembran auf -180 mV hyperpolarisiert, waren Erhöhungen bis ca. 200 nM messbar. Bei Hyperpolarisierungen der Plasmamembran auf -200 mV oder -220 mV ergaben sich Änderungen bis über 1000 nM. Die Häufigkeitsverteilung ist in Abbildung 3.22 D in einem Balkendiagramm dargestellt.

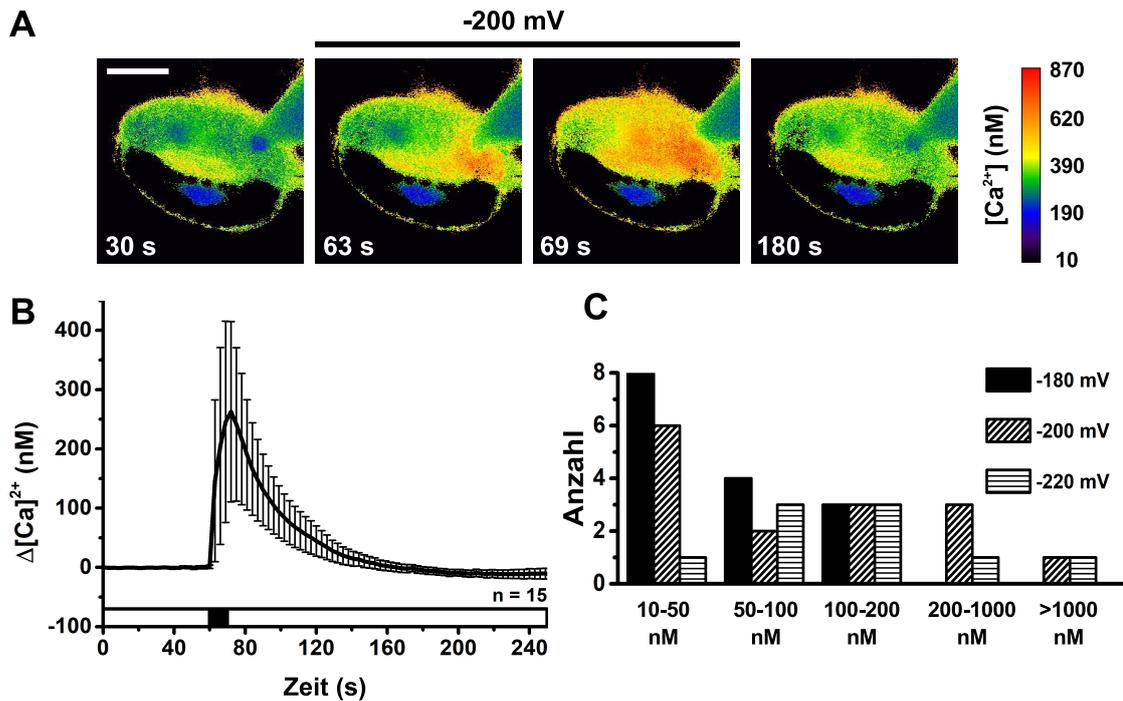


Abb. 3.22: Quantifizierung des spannungsinduzierten Calciumanstiegs in Schließzellen von *Polypodium vulgare* mithilfe des ratiometrischen Calciumindikators Fura-2. (A): In Falschfarben dargestellte cytosolische Calciumkonzentration vor (30 s), während (63 und 69 s) und nach (180 s) einem 10 Sekunden andauernden hyperpolarisierenden Spannungspuls. Scalebar: 20 μm . (B): Durchschnittliche Änderung der cytosolischen Calciumkonzentration durch die Applikation eines 10 Sekunden anhaltenden hyperpolarisierenden Spannungspulses auf -200 mV. Der schwarze Balken markiert die Zeitspanne der Hyperpolarisierung. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, n = 15. (C): Häufigkeitsverteilung der Stärke des Anstiegs der cytosolischen Calciumkonzentration durch hyperpolarisierende Spannungspulse auf -180, -200 oder -220 mV. Abbildung verändert aus Voss et al., 2018.

3.3.3.1 Abhängigkeit der Anionenströme von der Calciumkonzentration und vom Kaliuminflux während der hyperpolarisierenden Spannungspulse in *Polypodium*

In *Polypodium vulgare* wurde zusätzlich zum Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration während der hyperpolarisierenden Spannungspulse auch die Aktivierung der Anionenströme nach Rückkehr zum Haltepotential analysiert. Wie schon für Versuche mit *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* (Abbildung 3.14) wurden auch hier die gemessenen Anionenströme im Verhältnis zu den einwärtsgerichteten Kaliumströmen während der Spannungspulse aufgetragen (Abbildung 3.23 A und B). In beiden Arten konnte gezeigt werden, dass die Stärke des Anionenausstroms nach dem Spannungspuls mit der Stärke des Kaliumeinstroms während des Spannungspulses korreliert (Abbildung

3.14, Abschnitt 3.2.2.4), was wahrscheinlich durch die erhöhte Chloridkonzentration im Cytosol zu erklären ist. Da die Messungen an *Polypodium vulgare* mit Fura-2 durchgeführt wurden, lagen für alle Zellen Informationen über die cytosolische Calciumkonzentration während der Hyperpolarisierung vor, die ebenfalls mit in die Darstellung einbezogen werden konnten. Das ermöglicht eventuell Aussagen über eine potentielle Regulierung der Anionenkanäle durch calciumabhängige Signalkaskaden. Um einen Zusammenhang darstellen zu können, wurden die Messungen anhand der Höchstwerte der mittels Spannungspuls induzierten Erhöhung der Calciumkonzentration in Gruppen eingeteilt (Abbildung 3.23 A). Wie in Tabak und *Arabidopsis* besteht auch in *Polypodium vulgare* ein Zusammenhang zwischen der Stärke des aktivierten Kaliuminflusses und dem Anionenausstrom nach dem Spannungspuls (Abbildung 3.23 B). Außerdem kann man aus Abbildung 3.23 B schließen, dass eine höhere cytosolische Calciumkonzentration zu einem höheren Anionenausstrom nach Beenden des Spannungspulses im Verhältnis zum Kaliumeinstrom während des Spannungspulses führt.

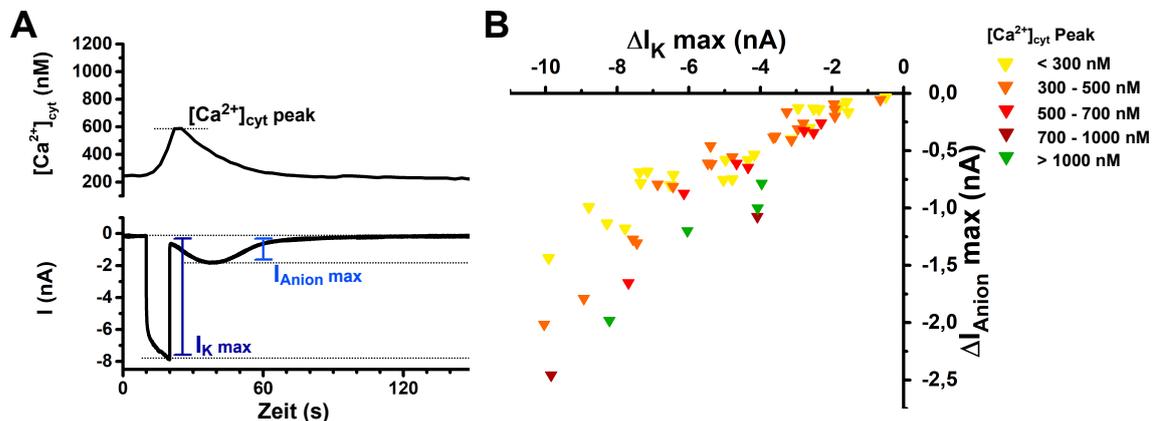


Abb. 3.23: Die nach hyperpolarisierenden Spannungspulsen gemessenen Anionenströme in *Polypodium vulgare* sind abhängig vom Kaliumeinstrom während der Hyperpolarisierung und werden durch eine hohe cytosolische Calciumkonzentration verstärkt. Die Messungen wurden an Schließzellen intakter Pflanzen durchgeführt. (A): Cytosolische Calciumkonzentration und während des Pulsprotokolls gemessener Strom einer Beispielpflanze aufgetragen über die Zeit. $[Ca^{2+}]_{cyt} \text{ peak}$ entspricht der maximalen, während der Messung auftretenden Calciumkonzentration. $I_K \max$ entspricht dem gemessenen Strom am Ende der hyperpolarisierenden Spannungspulse, $I_{Anion} \max$ entspricht dem Maximum des Stroms, der nach der Rückkehr zum Haltepotential messbar war. (B): Nach Rückkehr zum Haltepotential gemessene Anionenströme aufgetragen gegen die Kaliumströme, die während der 10 Sekunden andauernden Spannungspulse gemessen wurden an Schließzellen intakter *Polypodium vulgare*-Pflanzen. Die einzelnen Messungen sind anhand der mit Fura-2 ermittelten cytosolischen Calciumkonzentration während des Spannungspulses in Gruppen eingeteilt (farbliche Markierung).

3.3.4 Schließzellen in *Polypodium* und *Asplenium* sind miteinander verbunden

In den Versuchen, in denen Fluoreszenzfarbstoffe in Schließzellen verschiedener Farnspezies injiziert wurde, blieb der Fluoreszenzfarbstoff nicht auf die eingestochene Zelle begrenzt, in die der Farbstoff direkt injiziert wurde. Stattdessen konnte man in 23 von 39 Stomakomplexen von *Polypodium vulgare* und in 9 von 14 Stomakomplexen von *Asplenium scolopendrium* im Verlauf der Versuche eine zunehmende Fluoreszenz von Fura-2 in der angrenzenden Nachbarschließzelle beobachten. Diese Verteilung eines Fluoreszenzfarbstoffs auf beide Schließzellen eines Stomakomplexes trat in vergleichbaren Versuchen mit den Samenpflanzen *Nicotiana tabacum* und *Vicia faba* (wie z.B in dieser Arbeit in den Abschnitten 3.1 und 3.2 oder in der Literatur: Marten et al., 2007b, Stange et al., 2010, Levchenko et al., 2008, Voss et al., 2016) nicht auf.

Zwischen den beiden Schließzellen eines Stomakomplexes in den Farnspezies *Polypodium vulgare* und *Asplenium scolopendrium* scheint also eine cytoplasmatische Verbindung zu existieren, die dazu führt, dass der Fluoreszenzfarbstoffe sich in beiden Schließzellen eines stomatären Komplexes verteilen kann. Um diese cytoplasmatische Verbindung der Schließzellen genauer zu charakterisieren, wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow iontophoretisch in Schließzellen der Farne *Polypodium vulgare* und *Polypodium glycyrrhiza* injiziert. Während der Beladung erschien die Fluoreszenz von Lucifer Yellow zuerst in der eingestochenen Schließzelle und bald darauf auch zunehmend in der benachbarten Schließzelle (3.24 A). Die Intensität von Lucifer Yellow in der Nachbarschließzelle nahm im Vergleich zu der in der eingestochenen Zelle langsamer zu (3.24 B). Die maximale Intensität, die in der Nachbarschließzelle erreicht wurde, war in *Polypodium vulgare* im Durchschnitt um 40 % geringer als in der eingestochenen Schließzelle. In *Polypodium glycyrrhiza* war die Fluoreszenz nach 20 Minuten in der Nachbarschließzelle genauso hoch wie in der eingestochenen.

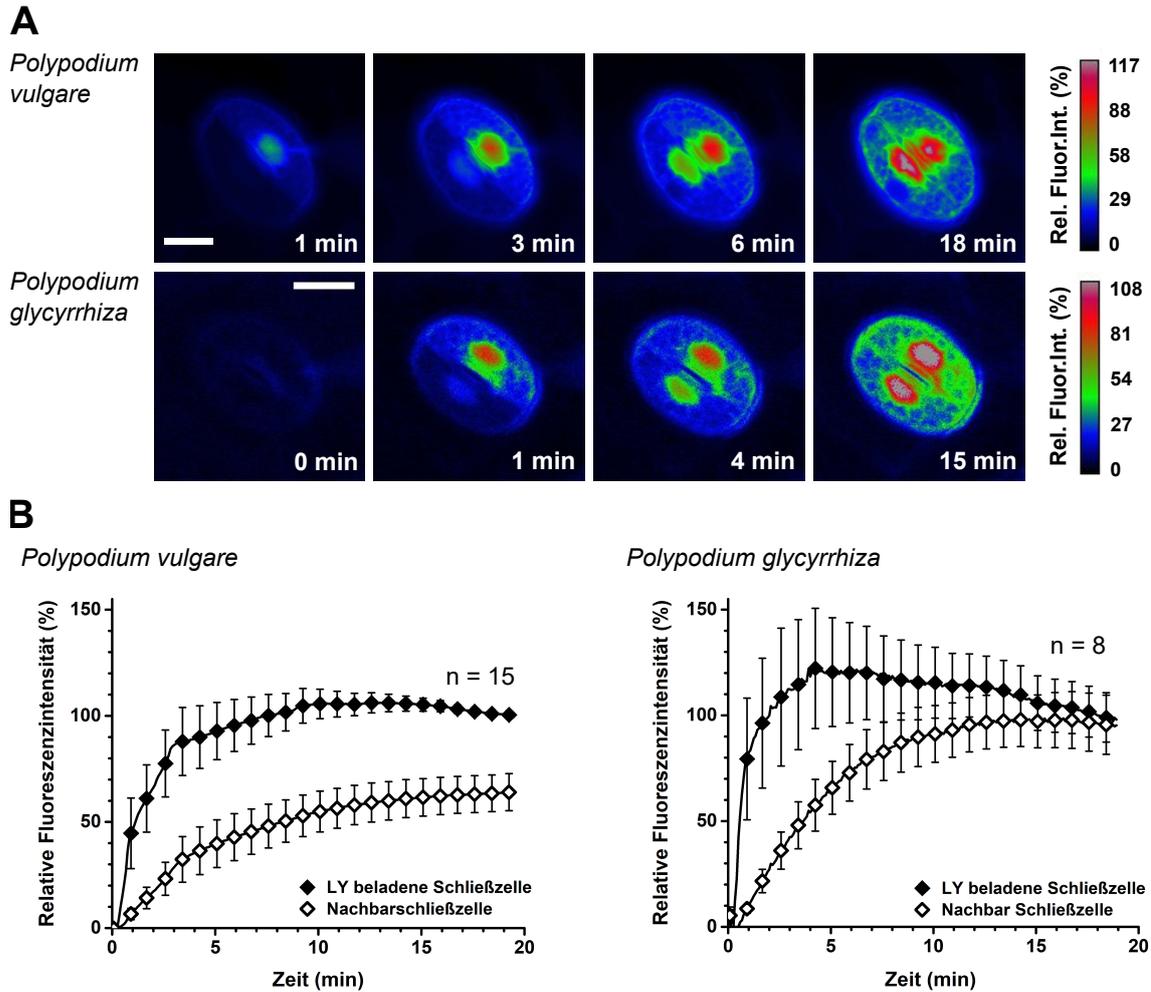


Abb. 3.24: Fluoreszenzfarbstoff verteilt sich in *Polypodium*-Arten in der Nachbarschließzelle. (A): In Falschfarben codierte Bilder der Fluoreszenzintensität von Lucifer Yellow in Schließzellen von *Polypodium vulgare* (oben) und *Polypodium glycyrrhiza* (unten) in einem intakten Farnblatt. In die jeweils obere Zelle wurde eingestochen und iontophoretisch Lucifer Yellow geladen. Die Farben stellen die relative Fluoreszenzintensität dar, dabei wurde die Intensität für $t=20$ min (in der eingestochenen Schließzelle) auf 100 % gesetzt. Scalebar: $20 \mu\text{m}$. (B): Zunahme der Fluoreszenzintensität von Lucifer Yellow in Schließzellenpaaren von *Polypodium vulgare* (links) und *Polypodium glycyrrhiza* (rechts). Wie in A beschrieben, wurde die Fluoreszenzintensität für $t=20$ min auf 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Daten wurden von M. R. G. Roelfsema zur Verfügung gestellt. Abbildung verändert aus Voss et al., 2018.

Eine Verbindung, die die Verteilung von iontophoretisch in eine Schließzelle injizierten Fluoreszenzfarbstoffen zwischen beiden Schließzellen eines Stomakomplexes ermöglicht, könnte zum Beispiel durch Plasmodesmata in der Zellwand zwischen diesen beiden Zellen hergestellt werden. Plasmodesmata bilden eine cytoplasmatische Verbindung, die über die Zellgrenzen hinweg einen Stoffaustausch erlauben (Robards & Gunning, 1976).

Auch eine Diffusion von Fluoreszenzfarbstoffen durch Plasmodesmata und die daraus resultierende Verteilung des Farbstoffs in angrenzende Zellen wurden bereits beschrieben (Terry & Robards, 1987). Um die Anwesenheit von Plasmodesmata in Schließzellen von *Polypodium* zu untersuchen, wurden durch die Arbeitsgruppe von Professor Michael Knoblauch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stomata in *Polypodium glycyrrhiza* gemacht.

Im Querschnitt einer solchen Aufnahme erkennt man den Nukleus der Schließzellen, der von zahlreichen Chloroplasten umgeben im Zentrum der Schließzelle liegt (Abbildung 3.25 A). In der Vergrößerung konnten tatsächlich Plasmodesmata zwischen den beiden Schließzellen gefunden werden, die die gesamte Zellwand durchspannen (3.25 B und C).

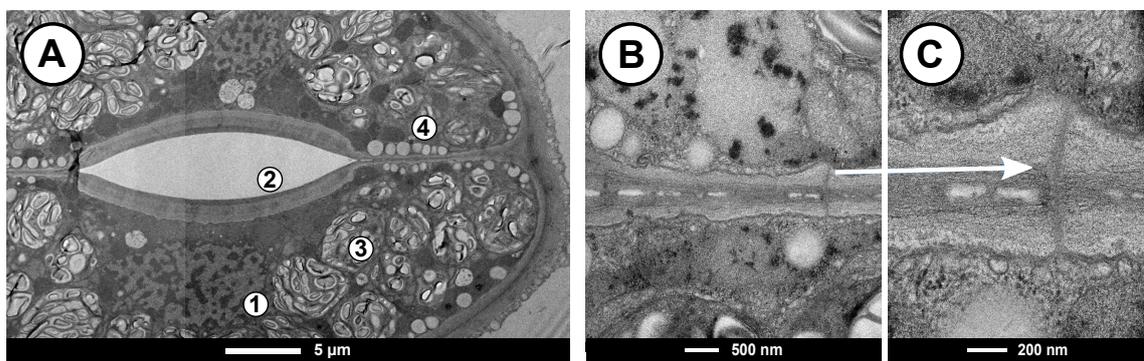


Abb. 3.25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Stomas von *Polypodium glycyrrhiza*. (A): Querschnitt durch die beiden Schließzellen des Stomas. Zu erkennen sind der Zellkern (1), der stomatäre Spalt (2), Chloroplasten (3) und Lipidtröpfchen (4). (B) und (C): Vergrößerung der Aufnahme der Zellwand zwischen den beiden Schließzellen, in der ein Plasmodesmos zu erkennen ist (s. Pfeil). Bilddaten zur Verfügung gestellt von Professor Michael Knoblauch und veröffentlicht in Voss et al., 2018.

3.3.5 Trotz symplastischer Verbindung werden Calciumsignale in den Schließzellen von *Polypodium* und *Asplenium* unabhängig voneinander reguliert

Ebenso wie Fluoreszenzfarbstoffe könnten auch andere kleine Moleküle und Ionen durch Plasmodesmata in die Nachbarschließzelle gelangen. Dadurch wäre auch eine Übertragung von Calciumsignalen zwischen den Schließzellen eines Stomakomplexes möglich. Um eine potentielle Übertragung von Calciumsignalen zwischen benachbarten Schließzellen zu untersuchen, wurde die durch hyperpolarisierende Spannungspulse induzierte transiente Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration benachbarter Schließzellen von *Polypodium vulgare* analysiert. Dafür wurde während einer Hyperpolarisie-

rung der Plasmamembran von einem Haltepotential von -100 mV auf -200 mV das Fura-2 Verhältnis $F_{345/390}$ in beiden Schließzellen aufgezeichnet (Abbildung 3.26). In der eingestochenen Schließzelle wurde ein schneller, steiler Anstieg des Verhältnisses $F_{345/390}$ um durchschnittlich $0,069$ erreicht ($SE = 0,030$, $n = 22$), was auf eine schnelle Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration hinweist. Die Nachbarschließzelle zeigte dagegen nur einen minimalen Anstieg dieses Verhältnisses um $0,001$ ($SE = 0,014$, $n = 22$). Aufgrund dieser Ergebnisse scheint keine Kopplung der cytosolischen Calciumkonzentration zwischen beiden Schließzellen eines Stomakomplexes vorzuliegen, stattdessen wird die Calciumhomöostase wahrscheinlich in jeder Zelle eigenständig reguliert.

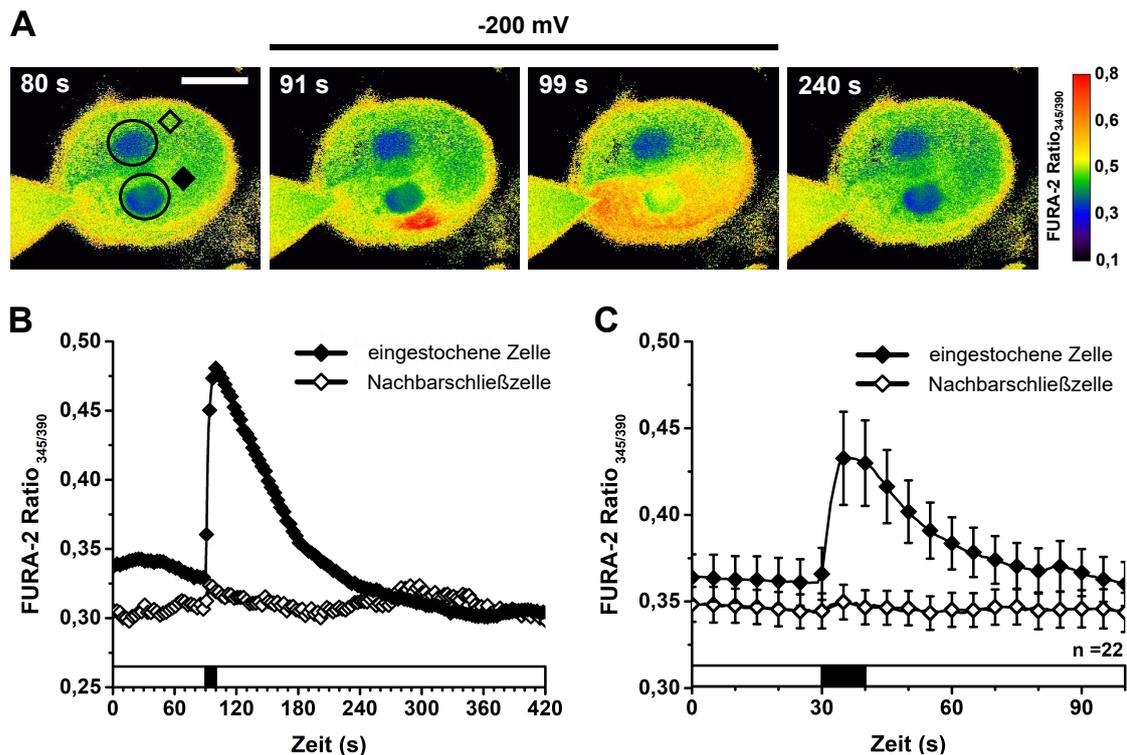


Abb. 3.26: Hyperpolarisationsinduzierte Erhöhungen der Calciumkonzentration werden nicht auf die Nachbarschließzelle übertragen. (A): In Falschfarben codierte Darstellung des $F_{345/390}$ Verhältnisses der Fura-2-Fluoreszenz in einer Schließzelle von *Polypodium vulgare* vor (80 s), während (91 und 99 s) und nach (240 s) einer 10 s andauernden Hyperpolarisierung auf -200 mV . Der hyperpolarisierende Spannungspuls wurde bei $t = 90\text{ s}$ gestartet. Die markierten Kreise zeigen die für B ausgewerteten Regionen an. Die geschlossene Raute steht für die eingestochene Zelle, die offene für die benachbarte Schließzelle. Scalebar: $20\ \mu\text{m}$. (B): Änderung der Fura-2-Ratio in den in A gezeigten Schließzellen über die Zeit. (C): Hyperpolarisationsinduzierte Änderung der Fura-2-Ratio über die Zeit, gemittelt für 22 Zellen. Der schwarze Balken markiert die Zeitspanne der Hyperpolarisierung. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Abbildung verändert aus Voss et al., 2018.

Gegen die gekoppelte Regulierung der cytosolischen Calciumkonzentration innerhalb ei-

nes Schließzellenpaares spricht auch die Beobachtung von Oszillationen der Calciumkonzentration in Schließzellen von *Asplenium scolopendrium*, die nach der iontophoretischen Injektion von Fura-2 auftraten (Abbildung 3.27). Wurde die Fluoreszenz von Fura-2 in beiden Schließzellen über längere Zeiträume beobachtet, traten in der nicht eingestochenen Schließzelle repetitive Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration auf. Das konnte in 5 von 9 Schließzellpaaren beobachtet werden. Ein Beispiel dafür wird in Abbildung 3.27 gezeigt. In der eingestochenen Schließzelle wurden diese Oszillationen nicht beobachtet. Die Veränderungen der $F_{345/390}$ -Ratio von Fura-2 über die Zeit schien für beide Zellen unabhängig zu sein.

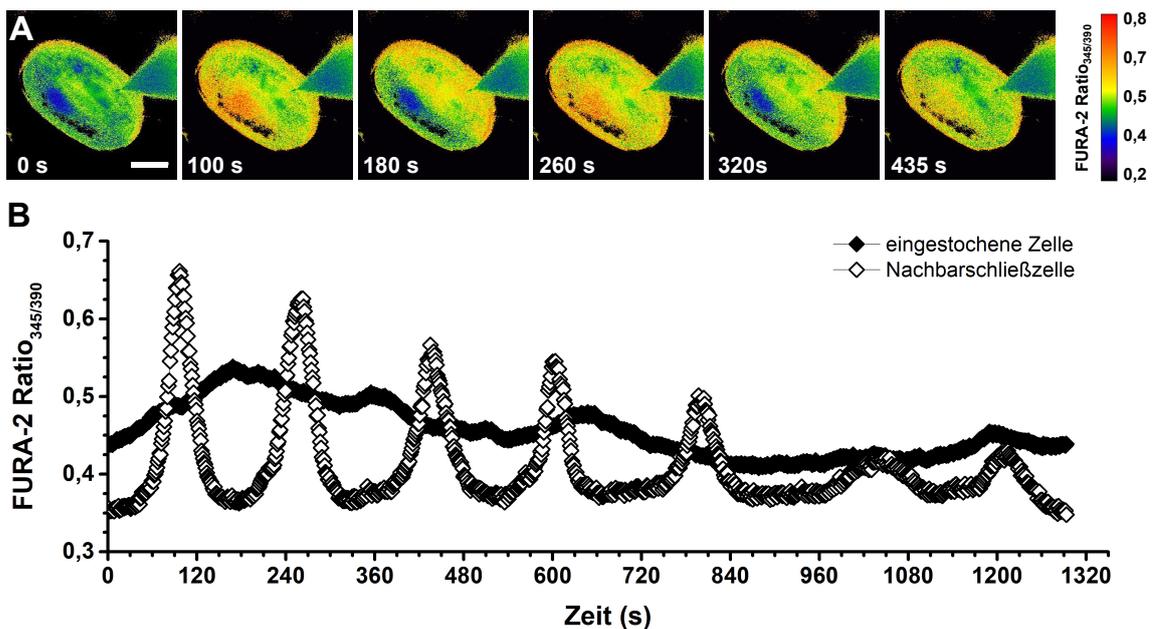


Abb. 3.27: Repetitive Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration in Schließzellen von *Asplenium scolopendrium*. (A): In Falschfarben codiertes Verhältnis der Fura-2 Fluoreszenzintensitäten $F_{345/390}$ in zwei benachbarten Schließzellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Die obere Schließzelle wurde nach dem Einstich einer Mikroelektrode iontophoretisch mit Fura-2 beladen, nachdem das Membranpotential auf -100 mV geklemmt wurde. Scalebar: $20 \mu\text{m}$. (B): Änderung der Fura-2 Ratio in den in A gezeigten Schließzellen über die Zeit. Abbildung verändert aus Voss et al., 2018.

3.4 Elektroofusion als Methode der ABA-Applikation

Die ABA-Responsivität von Schließzellen basaler Landpflanzen ist bis heute umstritten (Sussmilch et al., 2017). Auch für Farne liegen Studien mit widersprüchlichen Ergebnis-

sen vor (Brodrigg & McAdam, 2011, Hörak et al., 2017, Cai et al., 2017).

In dieser Arbeit sollte eine neue, verbesserte Methode für die Applikation von ABA an Schließzellen intakter Pflanzen etabliert werden. Diese sollte dann vergleichend für *Polypodium vulgare* und *Nicotiana tabacum* durchgeführt werden. Dafür wurde ABA mithilfe einer Mikroelektrode iontophoretisch in die Zellwand der Schließzelle injiziert. Um zu überprüfen, ob es tatsächlich zu einer Beladung des Apoplasten kommt, wurde der Injektionslösung der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow hinzugefügt. Zuerst konnte mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie die Beladung kontrolliert werden, danach wurden Hellfeldaufnahmen der entsprechenden Spaltöffnung gemacht, um die Reaktion zu beobachten. Die Versuche wurden zunächst mit Tabak-Schließzellen intakter Pflanzen durchgeführt und anschließend mit *Polypodium vulgare*, um zu überprüfen, ob in dieser Art Stomaschluss als Antwort auf die ABA-Applikation eintritt.

Die iontophoretische Beladung des Apoplasten mittels der beschriebenen Methode funktionierte sehr effektiv. Bei korrekter Positionierung der Elektrode konnte man direkt nach dem Start der Elektroinfusion beobachten, wie sich Lucifer Yellow von der Elektroden spitze aus im Apoplasten ausbreitete. Angrenzend an die jeweilige Schließzelle wurde dafür eine Minute lang der Apoplast mit einem Strom von 1 nA beladen. Dabei wurde die Zeit ab dem Zeitpunkt gemessen, ab dem zunehmende Fluoreszenz im Apoplast beobachtet werden konnte. Nach einer Minute konnte deutliche Fluoreszenz in den Zellwänden der Schließzellen gemessen werden, sowohl an den äußeren Zellwänden als auch zwischen den Schließzellen innerhalb der Spaltöffnung (Abbildung 3.28 A). Die Beladung des Apoplasten mittels Elektroinfusion wurde an derselben Schließzelle zuerst mit der Kontrolllösung ohne ABA und nach Abschluss der Messung noch einmal mit ABA durchgeführt (bezeichnet mit »ABA 2« in Abbildung 3.28 C). Zusätzlich wurde ABA in den Apoplasten von anderen Schließzellen des gleichen Blattes geladen, an denen noch keine Elektroinfusion stattgefunden hatte (gekennzeichnet als »ABA 1«).

Schließzellen von *Nicotiana tabacum* reagierten auf diese Methode der ABA-Applikation mit einem schnellen, aber unvollständigen Stomaschluss, der bei der Kontrolllösung ohne ABA nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 3.28 B). Die Verringerung der Stomaweite in Schließzellen von *Nicotiana tabacum* war bereits circa eine Minute nach dem Beenden der Strominjektion messbar (Abbildung 3.28 C, oben). Die Reaktion war unabhängig davon, ob an derselben Schließzelle vorher eine Elektroinfusion mit der Kontrolllösung ohne ABA stattgefunden hatte. Bei *Polypodium vulgare* trat keine vergleichbare Verringerung der Stomaweite als Reaktion auf ABA ein (Abbildung 3.28 B und C, unten). Stattdessen konnte nur eine kleine Verringerung der Öffnungsweite nach der Elektroinfusion mit oder ohne ABA beobachtet werden. Dabei verringerte sich vor

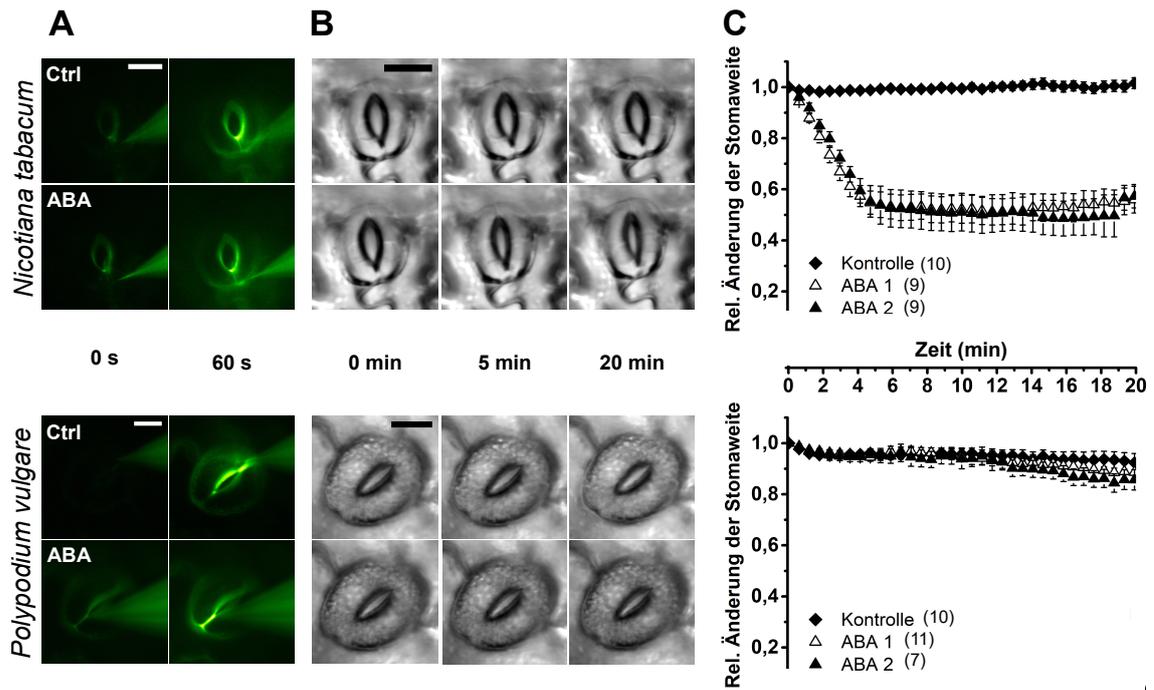


Abb. 3.28: Elektroinfusion mit ABA führt zu schnellem Stomaschluss bei *Nicotiana tabacum*, nicht aber bei *Polypodium vulgare*. (A): Visualisierung der erfolgreichen Elektroinfusion mit Hilfe von Lucifer Yellow. Die Schließzellen werden vor dem Start und nach 60 s Strominjektion gezeigt. Es wurde entweder eine Injektionslösung mit 1 mM ABA, oder eine Kontrolllösung ohne ABA verwendet. Scalebar 10 μm . (B): Hellfeld-Aufnahmen derselben Schließzellen wie in A nach der erfolgreichen Elektroinfusion. Scalebar 10 μm . (C): Durchschnittliche Änderung der Stomaöffnungsweite nach der Elektroinfusion. Die Elektroinfusion von ABA wurde entweder an Schließzellen durchgeführt, an denen vorher noch keine Elektroinfusion durchgeführt wurde (\gg ABA 1 \ll , Erstinjektion) oder an Schließzellen, an die vorher schon Kontrolllösung appliziert wurde (\gg ABA 2 \ll , Folgeinjektion). Die Anzahl der jeweiligen Experimente ist in Klammern im Graphen angegeben. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

allem innerhalb der ersten zwei Minuten nach dem Beenden der Elektroinfusion die Öffnungsweite. Später verringerte sich die Stomaweite weiter geringfügig, es bestand dabei aber kein signifikanter Unterschied in der Änderung der Stomaöffnungsweite zwischen Kontrolllösung und ABA-haltiger Lösung.

4 Diskussion

4.1 Der Einsatz eines Spinning-Disc-Systems eröffnet neue Möglichkeiten für hochaufgelöstes Calcium-Imaging in Schließzellen

Transiente Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration treten in Schließzellen als Antwort auf verschiedene Stimuli auf und können sich in ihren zeitlichen und räumlichen Muster voneinander unterscheiden. Dabei treten Unterschiede in Dauer, Amplitude und in der Frequenz der Calciumtransienten auf (Evans et al., 2001, Trewavas, 1999, Konrad et al., 2018). Zur genaueren Analyse der Calciumtransienten in Schließzellen von *Nicotiana tabacum* wurde in dieser Arbeit erstmalig ein Spinning-Disc-System eingesetzt, um elektrophysiologische Methoden mit konfokaler Visualisierung von Schließzellen kombinieren zu können. Der wesentliche Vorteil dieser Technik gegenüber der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) ist die schnellere Bildgebung. Statt der zeitintensiven Rasterung einzelner Bildpunkte mithilfe eines einzelnen Laserstrahls, wie bei der CLSM, wird bei der Spinning-Disc-Methode durch die Anwendung einer rotierenden Scheibe mit speziell angeordneten »Pinholes« das Fluoreszenzabbild einer gesamten Ebene direkt mithilfe einer CCD-Kamera aufgenommen (Gräf et al., 2005, Oreopoulos et al., 2014). Schnelle Änderungen der Fluoreszenzintensität eines Reporterfarbstoffs sowie dynamische Vorgänge innerhalb einzelner Zellen können so mit einer höheren zeitlichen Auflösung verfolgt werden. Mithilfe von Spinning-Disc-Systemen wurden unter anderem der endocytotische und sekretorische Verkehr durch das Trans-Golgi Netzwerk (Viotti et al., 2010) und dynamische Prozesse des Cytoskeletts (Sampathkumar et al., 2011, Komis et al., 2017) visualisiert. In Schließzellen wurde mithilfe dieser Technik die Interaktion von Zellulosesynthesekomplexen mit Mikrotubulis während der Stomabewegungen gezeigt (Rui & Anderson, 2016).

Der Einsatz des Spinning-Disc-Systems ermöglicht relativ unkompliziert die Durchführung elektrophysiologischer Messungen während der Aufnahme konfokaler Fluoreszenzbilder. Auch das Beladen einzelner Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen durch Mikroelektroden ist mit Hilfe des elektrophysiologischen Setups möglich. Da die Spinning-Disc-

Einheit relativ einfach an ein gewöhnliches Fluoreszenzmikroskop angebaut werden kann, sind auch Messungen an intakten Pflanzen, durch die ein höherer Platzbedarf entsteht, möglich. Im Vergleich zu nicht-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, wie sie ansonsten oft in Kombination mit elektrophysiologischen Methoden eingesetzt wird, ist die räumliche Auflösung bei Spinning-Disc-Systemen höher und erlaubt die Abbildung einzelner Ebenen von Schließzellen. Durch die Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen konnte in dieser Arbeit das Cytosol oder die Vakuole der Schließzellen in verschiedenen Ebenen der Zelle konfokal visualisiert werden, wobei auch die Lage des Nukleus und der Chloroplasten erkennbar ist (Abbildung 3.2 und 3.3). Solche Aufnahmen aus den verschiedenen fokalen Ebenen würden mit entsprechender Software auch die 3D-Rekonstruktion des cytosolischen bzw. vakuolären Volumens erlauben, wie sie zum Beispiel von Andrés et al., 2014 und Tanaka et al., 2007 mittels CLSM durchgeführt wurde.

Die Anwendung des hier verwendeten Spinning-Disc-Systems zur Visualisierung der Dynamik der Calciumkonzentration innerhalb einzelner Schließzellen mittels Oregon Green-BAPTA ermöglichte Aufnahmesequenzen mit zwei Bildern/Sekunde. In solchen kann beispielsweise gezeigt werden, wie sich ausgehend von der Einstichstelle die lokale Erhöhung der Calciumkonzentration in einer Schließzelle von *Nicotiana tabacum* an der Membran entlang ausbreitet (Abbildung 3.4). Diese Erhöhung der Calciumkonzentration um die Einstichstelle in Zusammenhang mit einer Bewegung der Elektrode wird wahrscheinlich durch eine kurzzeitige Verletzung der Membran verursacht. Eine Aktivierung mechanosensitiver, calciumpermeabler Kanäle (Hamilton et al., 2015, Cosgrove & Hedrich, 1991) kann aber auch dazu beitragen.

Für Aufnahmen von Schließzellen in intakten Pflanzen über längere Zeiträume hinweg beschränken die Bewegungen der Zellen in seitlicher Richtung oder aus der fokalen Ebene hinaus den Nutzen der Methode. So war es zum Beispiel nicht möglich, mithilfe von Oregon Green-BAPTA die Calciumkonzentration nach der Applikation von ABA durch Perfusion zu beobachten, vor allem da die Bewegungen der Pflanze durch die Perfusion von Lösungen über das Blatt oft verstärkt werden. Hierfür würde sich der Einsatz ratiometrischer Farbstoffe anbieten. Allerdings stellt das für diese Messungen erforderliche Wechseln der Filter durch die Ansteuerung des Filterrads während der Messung vor allem bei kurzen Intervallzeiten eine Erschütterung dar, die elektrophysiologische Messungen stören kann. Eventuell könnte dieser Effekt durch langsames Beschleunigen und Abstoppen des Filterrads vermindert werden, indem die Geschwindigkeit der Filterradbewegungen über die Software angepasst wird. Trotz Anwendung eines ratiometrischen Farbstoffs müssten außerdem die Bewegungen aus der fokalen Ebene heraus in gewissem Maße korrigiert werden. In dieser Arbeit konnte für die ratiometrischen Messungen

mit Fura-2 das Spinning-Disc-System nicht eingesetzt werden, da bei den kurzen Anregungswellenlänge von 345 bzw. 390 nm zu viel Anregungslicht verloren geht. Um die Erschütterungen bei der Bewegung des Filtrerrades zu vermeiden, wurde ein Polychromator für die Erzeugung des Anregungslichts verschiedener Wellenlängen genutzt.

Ein weiterer Punkt, der bei der Verwendung des Spinning-Disc-Systems CARVII zu berücksichtigen ist, ist ein relativ hoher Verlust von Anregungs- und Emissionslicht, unter anderem an der sich drehenden Pinhole-Scheibe. Hinzu kommt der Verlust an Anregungs- und Emissionslicht durch den Einsatz von Objektiven mit größerem Arbeitsabstand (LD-long working Distance), die für die Zugänglichkeit mit Mikroelektroden jedoch Voraussetzung sind. Deswegen ist vor allem bei kleinen Schließzellen wie in *Arabidopsis thaliana* und beim Einsatz genetisch codierter Fluoreszenzreporter, die häufig relativ geringe Fluorezenzausbeuten haben, die Fluoreszenzintensität zu gering. Mit fluoreszenzintensiven Farbstoffen wie Oregon Green-BAPTA, Lucifer Yellow oder auch Fluorescein-Diacetat und BCECF können dagegen sehr detaillierte Aufnahmen von Schließzellen gemacht werden (Abbildung 3.2 und 3.3). Der Einsatz eines verbesserten Spinning-Disc-Systems, indem eine zusätzliche Scheibe mit Mikrolinsen den Verlust von Anregungs- und Emissionslicht innerhalb der Spinning-Disc-Einheit vermindert (wie zum Beispiel Yokogawa CSU-10, CSU-21 oder CSU-W1, wie sie in Gräf et al., 2005 und Oreopoulos et al., 2014 erwähnt werden), würde wahrscheinlich zu höher aufgelösten Bildern führen.

Die Anwendung der Kombination aus konfokaler Mikroskopie und elektrophysiologischer Methodik führte im Rahmen dieser Arbeit trotz der oben genannten Beschränkungen des Systems zu verschiedenen neuen Erkenntnissen. So wurden zum ersten Mal Änderungen des cytosolischen und vakuolären Volumens, die in Verbindung mit der Strominjektion während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse stehen, sichtbar gemacht und anhand eines Modells erklärt (Abbildung 4.1).

4.2 Strominjektion führt zu einem osmotisch getriebenen Wassereinstrom ins Cytosol

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik (TEVC) wurde in dieser Arbeit eingesetzt um die Plasmamembran von Schließzellen in intakten Pflanzen kurzzeitig zu hyperpolarisieren und um so transiente Erhöhungen der Calciumkonzentration im Cytosol auszulösen (siehe auch Stange et al., 2010 und Grabov & Blatt, 1998). Durch die gleichzeitige Visualisierung mittels konfokaler Spinning-Disc-Mikroskopie und den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe konnten dabei an Schließzellen von *Nicotiana tabacum* und *Ara-*

bidopsis thaliana eine Vergrößerung des cytosolischen Volumens und eine Verkleinerung des vakuolären Volumens während der Hyperpolarisierung der Plasmamembran beobachtet werden (Abbildungen 3.5, 3.6, 3.7, 3.9). Durch Versuche mit verschiedenen Bad- und Elektrodenlösungen konnte gezeigt werden, dass diese Volumenänderung durch einen Ionenfluss aus der Elektrode ins Cytosol verursacht werden, der einen osmotischen Wasserstrom nach sich zieht (Abbildungen 3.10). Ein Modell der Vorgänge in der Schließzelle, wie sie unserer Hypothese nach während eines hyperpolarisierenden Spannungspulses auftreten, wird in Abbildung 4.1 gezeigt. Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass die spannungsabhängige Aktivierung der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle (Schroeder, 1988, Roelfsema & Prins, 1997) der initiierte Schritt ist. Durch Cäsiumionen in der Badlösung wurden sowohl die Einwärtsströme während der hyperpolarisierenden Spannungspulse, als auch die cytosolische Ausdehnung inhibiert (Abbildung 3.10). Der durch die spannungsaktivierten Kanäle erfolgende Kaliumeinstrom in die Zelle wird während des Spannungspulses durch den Kompensationsstrom der Strominjektionselektrode ausgeglichen. Dabei kommt es sowohl zu einem Ausstrom von Kaliumionen aus dem Cytosol in die Elektrode als auch zum Einstrom von Chloridionen aus der Strominjektionselektrode in das Cytosol (Abbildung 4.1 A Punkt 2).

Da die Mobilität von Kalium- und Chloridionen vergleichbar ist (Ng & Barry, 1995), wird sich der Kompensationsstrom etwa zur Hälfte aus Chlorideinstrom ins Cytosol und zur Hälfte aus Kaliumausstrom in die Elektrode zusammensetzen. Dabei wurden Ströme von anderen Kationen aus dem Cytosol in die Elektrode, aufgrund von geringerer cytosolischer Konzentration und ionischer Mobilität im Vergleich zu K^+ , vernachlässigt (Ionenkonzentrationen im Cytosol der Schließzellen siehe Jezek & Blatt, 2017, ionische Mobilitäten siehe Ng & Barry, 1995 und Barry & Lynch, 1991). Durch das Ersetzen des Chlorids in der Elektrodenlösung durch Glukonat ließ sich dieses Verhältnis verschieben, da Glukonationen relativ zu Kaliumionen eine Mobilität von 0,33 besitzen (Ng & Barry, 1995). Die geringeren Volumenänderungen während der hyperpolarisierenden Spannungspulse mit Glukonat als Anion in der Elektrode deuten darauf hin, dass der Kaliumeinstrom aus dem Cytosol in die Elektrode mit dieser Elektrodenlösung größer war als der Glukonatstrom aus der Elektrode ins Cytosol. Somit nahm die Ionenkonzentration im Cytosol insgesamt weniger zu (Abbildung 3.11 und 3.12, siehe auch Modell 4.1 B). Anhand der ionischen Mobilität von 0,33 im Vergleich zu K^+ kann der Anteil des Glukonatausstromes während der Hyperpolarisierung auf circa ein Viertel des gesamten Stromes geschätzt werden, während die anderen drei Viertel durch Kaliumeinstrom in die Elektrode verursacht werden.

Insgesamt erhöht sich also während einer durch TEVC verursachten Hyperpolarisierung

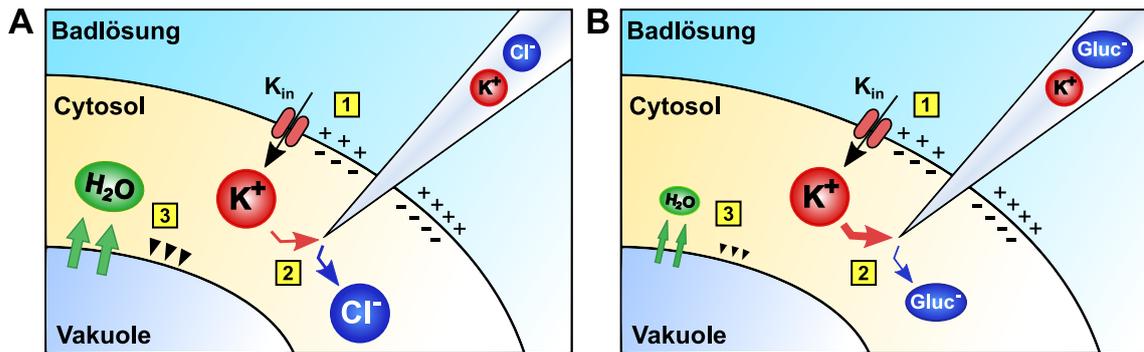


Abb. 4.1: Ein osmotisch getriebener Wasserfluss aus der Vakuole führt zur Erhöhung des cytosolischen Volumens während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse mittels TEVC. Modell für die Vorgänge in der Schließzelle während eines Spannungspulses. (A): mit KCl als Elektrodenlösung. 1: Durch die Hyperpolarisierung werden einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle aktiviert und K^+ strömt ins Cytosol. 2: Zur Kompensation des Kaliumeinstroms werden K^+ -Ionen in die Elektrode aufgenommen und Cl^- -Ionen fließen aus der Elektrode ins Cytosol. Diese beiden Ionenflüsse sollten theoretisch zu gleichen Teilen auftreten, da die ionische Mobilität von K^+ und Cl^- fast identisch ist. 3: Durch die Erhöhung der Ionenkonzentration im Cytosol fließt Wasser osmotisch getrieben aus der Vakuole ins Cytosol, wodurch das cytosolische Volumen zunimmt. (B): mit KGlukonat als Elektrodenlösung. 1: Die Aktivierung der einwärtsgerichteten K^+ -Kanäle findet genauso wie in A statt. 2: Aufgrund der geringeren ionischen Mobilität von Glukonat⁻ in Relation zu K^+ strömt mehr K^+ in die Elektrode als Glukonat ins Cytosol abgegeben wird. Deswegen erhöht sich die Ionenkonzentration im Cytosol weniger als in A. 3: Es erfolgt eine geringere Vergrößerung des cytosolischen Volumens, da die Ionenkonzentration im Cytosol weniger zugenommen hat.

des Membranpotentials die Ionenkonzentration im Cytosol und zwar in Abhängigkeit von der Stärke des dabei aktivierten Kaliumeinwärtsstromes durch die Plasmamembran und vom Anteil des Anionenausstromes aus der Elektrode ins Cytosol (Abbildung 3.10). Laut Berechnung (siehe Abschnitt 3.2.2.3) flossen in einer Schließzelle einer intakten Tabakpflanze während eines 10 s andauernden hyperpolarisierenden Spannungspulses im Mittel 300 fmol Kaliumionen durch einwärtsgerichtete Kanäle. Die cytosolische Kalium- und Chloridkonzentration würde dabei mit einer Elektrodenlösung von KCl um jeweils 150 fmol zunehmen. Um eine Vorstellung zu bekommen, welche Größenordnung diese Zunahme der Ionenkonzentration im Cytosol hat, wurden die hier berechneten Werte mit experimentell bestimmten Werten für den Kaliumgehalt in Schließzellen verglichen. Diese liegen nur für *Vicia faba* vor, lassen sich jedoch zum Vergleich heranziehen, wenn man davon ausgeht, dass Schließzellen von *Vicia faba* und *Nicotiana tabacum* annäherungsweise das gleiche Volumen haben (Willmer & Fricker, 1996 Kapitel 2, Jezek & Blatt, 2017, Tabelle 1, und Marten et al., 2007b) und dass die Kaliumkonzentration in Schließzellen in beiden Arten in etwa vergleichbar ist. Der Kaliumgehalt einer Schließ-

zelle von *Vicia faba* im geschlossenen Zustand beträgt ungefähr 0,3 pmol, im geöffneten Zustand circa 2,5 pmol (Roelfsema & Hedrich, 2005, Tabelle 1 und Referenzen dort). Bei Stomabewegungen werden folglich ungefähr 2 pmol Kaliumionen aufgenommen bzw. abgegeben. Diese Werte beinhalten das Kalium der gesamten Schließzelle, also in Cytosol und Vakuole. Denkt man nun an die 150 fmol Kaliumionen, die in nur 10 Sekunden während eines hyperpolarisierenden Spannungspulses vermutlich im Cytosol akkumulieren, sind das ca. 7,5 % der Kaliumionen, die während der gesamten Dauer der Stomaöffnung aufgenommen werden. Allerdings geschieht dies bei der Stomaöffnung über einen viel längeren Zeitraum und die Ionen akkumulieren hauptsächlich in der Vakuole. Es ist also anzunehmen, dass während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse osmotisch getriebene Wasserströme ins Cytosol auftreten. Diese Wasserströme konnten in dieser Arbeit indirekt durch die Volumenänderungen des Cytosols und der Vakuole gezeigt werden.

In Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* werden während eines hyperpolarisierenden Spannungspulses im Mittel 107 fmol Kaliumionen durch einwärtsgerichtete Kaliumkanäle aufgenommen. Das bedeutet, dass sich die Kalium- und Chloridkonzentration um jeweils ca. 50 fmol ändern müsste, wenn der Kompensationsstrom sich aus 50 % Kaliumeinstrom aus dem Cytosol in die Elektrode und aus 50 % Chloridausstrom aus der Elektrode in das Cytosol zusammensetzt. Im Vergleich zum relativen Volumen von *Arabidopsis thaliana*-Schließzellen zu *Vicia faba*-Schließzellen (0,87 pl im Vergleich zu 6,5 pl in *Vicia faba*, Tanaka et al., 2007 und Roelfsema & Hedrich, 2005, Tabelle 1 und Referenzen darin, Werte für den Zustand bei geöffneten Stomata) sind die Auswirkungen der hyperpolarisierenden Spannungspulse wahrscheinlich noch stärker als in Tabak-Schließzellen.

Anhand dieser Werte kann man eine ungefähre Vorstellung davon bekommen, wie massiv die Änderungen der Ionenkonzentration im Cytosol während der kurzen Spannungspulse sein müssten, was auch die gut sichtbaren Änderungen des cytosolischen Volumens erklären würde.

4.2.1 Die Rolle osmotisch getriebener Wasserflüsse

Bei den durch die Strominjektion verursachten, osmotisch getriebenen Wasserflüssen innerhalb der Schließzelle, die zur Veränderungen der Volumenverhältnisse von Cytosol und Vakuole führen, besteht prinzipiell eine gewisse Ähnlichkeit zum Vorgang bei Stomabewegungen. Auch bei Schließzellbewegungen werden osmotische Wasserflüsse durch in die Zelle strömende Kaliumionen und Anionen verursacht. Durch hyperpolarisieren-

de Spannungspulse werden Änderungen durch die herbeigeführte starke Aktivierung der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle und durch Ionenströme aus der Mikroelektrode jedoch innerhalb weniger Sekunden hervorgerufen. Die Stomaöffnung im Licht dauert in Schließzellen von *Nicotiana tabacum* in der Regel mehr als eine Stunde (Kollist et al., 2014), in *Arabidopsis thaliana* ca. 40 Minuten (Elhaddad et al., 2014, Eckert & Kaldenhoff, 2000). Der ABA-vermittelte Stomaschluss dauert circa 15-20 Minuten (Kollist et al., 2014, Müller et al., 2017). Außerdem sind die während der hyperpolarisierenden Spannungspulse auftretenden Erhöhungen der Ionenkonzentration allem Anschein nach auf das Cytosol begrenzt, während bei der Stomaöffnung der Transport der aufgenommenen Ionen in die Vakuole erfolgt (Roelfsema & Hedrich, 2005), in der sich die Ionenkonzentration während der Stomaöffnung am meisten erhöht (Jezek & Blatt, 2017). Der Wasserfluss während der hyperpolarisierenden Spannungspulse erfolgt aus der Vakuole in das Cytosol der Schließzelle und nicht, wie bei der Stomaöffnung, aus dem Apoplasten. Zurückzuführen ist das wahrscheinlich auf die höhere Wasserpermeabilität des Tonoplasten im Vergleich zur Plasmamembran (Maurel et al., 1997, Niemietz & Tyerman, 1997), die einen schnelleren ausgleichenden Wasserstrom erlaubt. Das ist ein weiterer, wesentlicher Unterschied, wodurch auch das Gesamtvolumen der Schließzellen während der hyperpolarisierenden Spannungspulse unverändert blieb und sich nur das Verhältnis von cytosolischem zu vakuolären Volumen veränderte. Beim Stomaschluss durch ABA oder in der Dunkelheit ändert sich zwar ebenfalls das vakuoläre Volumen, es bleibt jedoch im Verhältnis zur gesamten Schließzelle, und damit auch zum Cytosol, relativ konstant, da sich auch das Volumen der gesamten Schließzelle vergrößert. Das wurde von Tanaka et al. 2007 durch Visualisierung von Plasmamembran und vakuolärer Membran und anschließender 3D-Rekonstruktion gezeigt. Allerdings wurde hier nur zwischen Schließzellen von Stomata in geöffnetem und geschlossenem Zustand verglichen. Ob sich das Volumenverhältnis von Vakuole und Cytosol während der Stomabewegungen transient verändert, geht daraus nicht hervor. Bei länger anhaltenden osmotischen Gradienten zwischen Apoplast und Cytosol würde eventuell auch ein Wasserfluss aus dem Apoplasten in die Zelle auftreten (Voss et al., 2016). Interessant wäre für diesen Aspekt die Untersuchung von Pflanzen, bei denen die Wasserleitfähigkeit des Tonoplasten verändert ist, zum Beispiel durch Verlustmutation der vakuolären Aquaporine. Aquaporine spielen eine wichtige Rolle in der Osmoregulation, indem sie die Permeabilität der Membranen für Wasser erhöhen und dadurch auch den osmotisch getriebenen Wasserfluss über die Membranen erleichtern (Chaumont & Tyerman, 2014, Maurel et al., 2015). Die vakuolären Aquaporine werden von den TIP-Genen (Tonoplast Intrinsic Protein) codiert und sind zusammen mit der vakuolären H^+ -ATPase und der H^+ -PPase die am meisten vorkommenden intrinsischen Proteine in der vakuolären Membran (Jaquinod et al., 2007, Maurel et al.,

2015). In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit versucht, anhand von iontophoretischer Injektion von Quecksilberionen durch die Strominjektionselektrode (mit HgCl_2 in der Elektroden spitze) die Aquaporine zu blockieren, da Quecksilber als Inhibitor vieler Aquaporine bekannt ist (Daniels et al., 1996). Auch die Wasserpermeabilität von Tabak-Tonoplast-Vesikeln wird durch Quecksilber reduziert (Maurel et al., 1997). Die durchgeführten Versuche gaben allerdings keinen Aufschluss über die Rolle der Aquaporine bei hyperpolarisierenden Spannungspulsen, da der Einsatz von Quecksilber offensichtlich toxische Effekte auf die Zelle hatte und elektrophysiologische Messungen nicht mehr möglich waren (Daten wurden nicht gezeigt).

4.2.2 Reversibilität der Volumenänderungen nach Beenden der Spannungspulse

Während der Applikation eines hyperpolarisierenden Spannungspulses wurde in Schließzellen von *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* eine transiente Vergrößerung des cytosolischen Volumens gezeigt, die abhängig von der Strominjektion war. Nach Beenden des hyperpolarisierenden Spannungspulses verringerte sich das cytosolische Volumen wieder, bis es ungefähr mit dem Ausgangszustand vor der Applikation des Spannungspulses vergleichbar war (Abbildung 3.5, 3.6, 3.7, 3.9, 3.10). Diese Reversibilität trat nicht auf, wenn das Chlorid in der Elektrodenlösung durch Glukonat ersetzt wurde. Auch die nach den Spannungspulsen gemessenen Einwärtsströme, die auf einen Anionenausstrom über die Plasmamembran hinweisen (vergleiche Stange et al., 2010, Huang et al., 2019), waren bei Versuchen mit Glukonat in der Elektrodenlösung stark reduziert (Abschnitt 3.2.2.2 und 3.2.2.4). Der Anionenausstrom aus dem Cytosol führt zu einer Verringerung der Chloridkonzentration, die wiederum eine Umkehr der Wasserflüsse aus dem Cytosol in die Vakuole zur Folge hat. Der Anionenausstrom scheint so für die Reversibilität der Volumenänderungen wichtig zu sein. Dabei werden vermutlich die während des Spannungspulses akkumulierten Chloridionen aus der Zelle transportiert. Wenn dagegen Glukonat-Ionen in der Elektrodenlösung sind, fließen diese ebenfalls während des Spannungspulses in das Cytosol und sind dort osmotisch wirksam, können aber nicht durch die Anionenkanäle aus der Zelle strömen (Hedrich et al., 1990, Maierhofer, 2012, Scherzer, 2012). Das führt dazu, dass die Volumenänderung des Cytosols unter diesen Bedingungen nicht reversibel ist.

Ein weiterer Zusammenhang, der sowohl in Schließzellen von *Nicotiana tabacum*, als auch in *Arabidopsis thaliana* und *Polypodium vulgare* beobachtet werden konnte, ist die Abhängigkeit der Stärke der gemessenen Anionenströme nach den hyperpolarisie-

renden Spannungspulsen von der Stärke des vorhergehenden KaliumEinstroms durch die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle (Abbildungen 3.14 und 3.23). Diese Korrelation könnte mit der Erhöhung der Chloridkonzentration im Cytosol (siehe Abschnitt 3.2.2.3) zu erklären sein. Je größer der Einstrom von K^+ während des Spannungspulses ist, desto größer ist der entsprechende Kompensationsstrom und damit der Anstieg der Chloridkonzentration im Cytosol. Durch diesen Anstieg wird auch der Anionenausstrom durch die Anionenkanäle nach Beenden des hyperpolarisierenden Spannungspulses zunehmen. Durch den Anionenausstrom könnte der Ausgleich der erhöhten Chloridkonzentration stattfinden, was auch wichtig für die Reversibilität der cytosolischen Volumenänderung zu sein scheint.

Dieser Zusammenhang zwischen KaliumEinstrom und Anionenausstrom sollte bei der Analyse der Aktivierung von Anionenströmen, die mittels TEVC durch hyperpolarisationsinduzierte Calciumtransienten ausgelöst wurden, auf jeden Fall berücksichtigt werden. Ein kausaler Zusammenhang der Erhöhung der Calciumkonzentration durch Spannungspulse und der Anionenkanalaktivität sollte demnach kritisch betrachtet werden, da sowohl die erhöhte Calciumkonzentration als auch die erhöhte Chloridkonzentration im Cytosol zur Aktivierung beziehungsweise zur Verstärkung der Anionenströme führen kann. Die Erhöhung der Chloridkonzentration sollte also mit berücksichtigt werden. Eine Möglichkeit wäre zum Beispiel das Verhältnis zwischen KaliumEinstrom und Anionenausstrom bei verschiedenen Calciumkonzentrationen zu betrachten. Dafür müssten mit einem ratiometrischen Calciumreporter die Änderung der Calciumkonzentration während der hyperpolarisierenden Spannungspulse beobachtet werden (wie zum Beispiel in Schließzellen von *Polypodium vulgare* in dieser Arbeit, s. Abbildung 3.14).

4.3 Transiente Calciumerhöhungen durch hyperpolarisierende Spannungspulse werden durch zwei Mechanismen verursacht.

Zwar ist bekannt, dass bestimmte Stimuli in Schließzellen Calciumsignale auslösen, allerdings sind nur begrenzte Informationen über die Herkunft der Calciumionen und über die Mechanismen der Aktivierung des KaliumEinstroms vorhanden (Roelfsema & Hedrich, 2010). In einigen Arbeiten wurde der Calciumkanalblocker Lanthan oder der Chelator EGTA eingesetzt, um an Schließzellen in Epidermisstreifen die Herkunft oder die Rolle des extrazellulären Calciums bei bestimmten Stimuli zu spezifizieren (Wood et al., 2000, De Silva et al., 1985). Diese Experimente deuten daraufhin, dass sowohl die Aktivität

von calciumpermeablen Kanälen in der Plasmamembran, als auch die Freisetzung von Calcium aus Speichern innerhalb der Zelle eine Rolle für die Entstehung der Calciumtransienten spielen können. Welche calciumpermeablen Kanäle für die Auslösung von Calciumsignalen in Schließzellen eine Rolle spielen, ist bis heute aber weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit konnte in Versuchen mit Schließzellen in Epidermisstreifen von *Nicotiana tabacum* gezeigt werden, dass während hyperpolarisierenden Spannungspulsen zwei verschiedene Mechanismen zu transienten Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration führen können (Abbildungen 3.15 und 3.16). In Abbildung 4.2 A sind diese in einem Modell dargestellt.

Einer der Mechanismen, der zum Calciumeinstrom ins Cytosol führt, ist die spannungsabhängige Aktivierung calciumpermeabler Kanäle in der Plasmamembran (Punkt 1 in Abbildung 4.2 A), die schon mittels TEVC-Technik für intakte Schließzellen (Grabov & Blatt, 1998, Stange et al., 2010) und mittels Patch-Clamp-Messungen an Schließzellprotoplasten (Hamilton et al., 2000, Pei et al., 2000, Stoelzle et al., 2003) beschrieben wurde. Zum anderen weisen die Ergebnisse meiner Arbeit darauf hin, dass auch der Ioneneinstrom ins Cytosol, beziehungsweise die cytosolische Ausdehnung, eine transiente Erhöhung der Calciumkonzentration auslöst (Punkt 2 in Abbildung 4.2 A). Diese transiente Erhöhung muss durch Calciumionen aus intrazellulären Speichern verursacht werden, da sie auch in Anwesenheit von La^{3+} in der Badlösung, welches die calciumpermeablen Kanäle in der Plasmamembran blockiert (Demidchik et al., 2002), auftritt (Abbildung 3.16 und Abbildung 4.2 B). Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann allerdings nicht ausgesagt werden, aus welchen Kompartimenten diese stammen. Prinzipiell kommen dafür sowohl die Vakuole, das endoplasmatische Retikulum aber auch Chloroplasten und Mitochondrien in Frage.

Durch die Ausdehnung des Cytosols ändern sich innerhalb der Schließzellen die ionische Zusammensetzung, das Volumen des Cytosols und auch das Volumen der Vakuole (Abbildung 3.7). Dabei bewirken diese Volumenänderungen eine veränderte mechanische Spannung auf die Membranen. Sowohl diese Änderung der mechanischen Membranspannung, als auch der osmotische Gradient über die intrazellulären Membranen, wie z.B. die vakuoläre Membran, können zur Aktivierung von osmo- und/oder mechanosensitiven Kanälen in verschiedenen Membranen führen. Diese wiederum können die Ionenhomöostase in der Zelle und das jeweilige Membranpotential beeinflussen. So können diese Kanäle als Osmosensoren wirken, wie es für den vakuolären Kanal TPK1 vorgeschlagen wurde (Maathuis, 2011). Sind die mechano- bzw. osmosensitiven Kanäle calciumpermeabel, können durch sie auch Calciumflüsse in das Cytosol ausgelöst werden.

Die Aktivierung mechanosensitiver, calciumpermeabler Kanäle wird auch im Zusammenhang mit der Regulierung des Stomaschlusses diskutiert (Furuichi et al., 2008) und könnte bei der Erzeugung von Calciumtransienten in Schließzellen eine Rolle spielen. Mittels Patch-Clamp-Messungen an Schließzellprotoplasten von *Vicia faba* konnte die Existenz calciumpermeabler Kanäle, die Mechanosensitivität oder Osmosensitivität aufweisen, gezeigt werden (Cosgrove & Hedrich, 1991, Zhang et al., 2007). Allerdings liegen bis auf eine Ausnahme noch keine molekularen Identitäten oder spezifischen physiologischen Funktionen für einzelne Kanäle vor. Der einzige molekular identifizierte Kanal, der zu osmotisch getriebenen Calciumströmen führt, ist der im Jahre 2014 von Yuan et al. in *Arabidopsis thaliana* identifizierte Kanal OSCA1 (reduced hyperosmolalityinduced Calcium increase 1), der in der Plasmamembran lokalisiert ist und für die Regulierung des Stomaschlusses bei osmotischem Stress eine Rolle spielt (Yuan et al., 2014). Ähnliche Kanäle könnten auch in Endomembranen wie der vakuolären Membran vorkommen, und eine Rolle für die durch Volumenänderung ausgelösten Calciumtransienten spielen. Auch andere osmosensitive Kanäle oder Kanäle wie zum Beispiel Homologe der MsCS-like Kanäle (MSL-Kanäle) würden dafür in Frage kommen, wobei die charakterisierten MSL-Kanäle eine Präferenz für Anionen haben (Hamilton et al., 2015, Hou et al., 2014, Basu & Haswell, 2017).

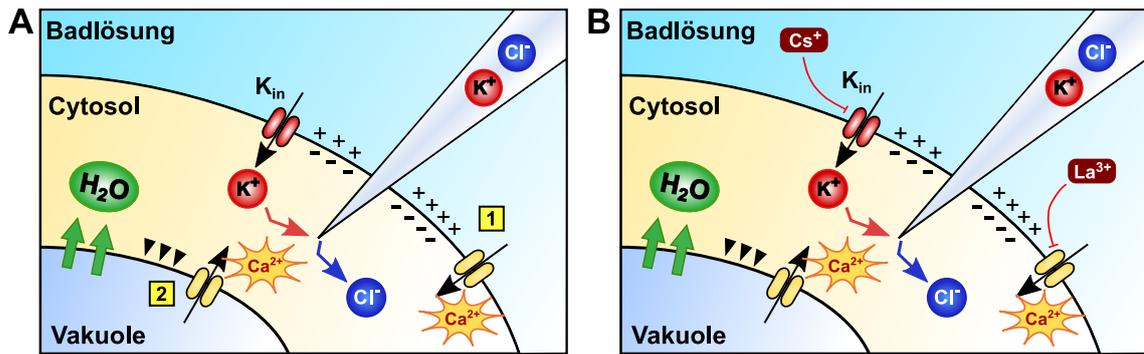


Abb. 4.2: Während der Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse führen zwei Mechanismen zur Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Schließzellen. (A): Modell zur Darstellung der beiden Mechanismen. 1: Durch die Hyperpolarisierung der Plasmamembran wird ein Ca^{2+} -Einstrom durch hyperpolarisationsaktivierte Ca^{2+} -permeable Kanäle ausgelöst. 2: Durch die Änderung der Ionenkonzentration oder durch die daraus folgende Volumenänderung des Cytosols wird ein Ca^{2+} -Einstrom aus internen Speichern (vereinfachte Darstellung: aus der Vakuole) ausgelöst. (B): Beide Mechanismen zur Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration können getrennt voneinander inhibiert werden. Durch Cs^+ in der Badlösung werden die einwärtsgerichteten K^+ -Kanäle inhibiert. Die Erhöhung der Ionenkonzentration während des Spannungspulses und die damit verbundene Änderung des cytosolischen Volumens bleiben aus. Es erfolgt darum keine Freisetzung von Ca^{2+} aus zellinternen Speichern. Durch La^{3+} in der Badlösung werden Ca^{2+} -permeable Kanäle in der Plasmamembran inhibiert. Es erfolgt dann kein Einstrom von Ca^{2+} ins Cytosol über die Plasmamembran.

4.3.1 Was können Änderungen der mechanischen Membranspannung und der Osmolarität bewirken?

Bei Stomabewegungen kommt es durch die dynamischen Volumenänderungen ebenfalls zu Änderungen der mechanischen Membranspannung und durch die Ionenflüsse wahrscheinlich auch zu kurzzeitigen Unterschieden in den osmotischen Gradienten über Membranen. Diese können zum Beispiel Ionenflüsse über die vakuoläre Membran hervorrufen (MacRobbie, 2006). Osmotische Änderungen könnten auf diese Weise auch eine Rolle in der Koordinierung der Transportprozesse an Plasmamembran und vakuolärer Membran spielen.

Dass an Stomaöffnungen beteiligte Ionenkanäle wie die einwärts- und auswärtsgerichteten Kaliumkanäle durch osmotische Gradienten reguliert werden können, wurde schon 1998 von Liu & Luan beschrieben und als positive Feedbackregulierung für die Stomaöffnung interpretiert. Dabei kam es durch eine höhere Osmolarität auf der cytosolischen Seite zu einer stärkeren Aktivierung der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle durch die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit (Liu & Luan, 1998). Auch bei den in dieser

Arbeit angewandten hyperpolarisierenden Spannungspulsen könnte durch den Anstieg der Osmolarität innerhalb des Cytosols die Offenwahrscheinlichkeit der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle beeinflusst werden, was während der Spannungspulse noch zu einer Verstärkung des Kaliumeinstroms führen würde und die zum Teil sehr großen Kaliumeinwärtsströme (einzelne Zellen bis zu 10 nA) erklären könnte. Da auch für den vakuolären Kanal TPK1 eine Regulierung durch mechanische Spannung und osmotische Gradienten gezeigt wurde, die möglicherweise eine Rolle für die osmotische Homöostase spielt (Maathuis, 2011), könnte dieser Kanal ebenfalls durch die hyperpolarisierenden Spannungspulse aktiviert werden und zu Kaliumströmen aus der Vakuole in das Cytosol führen.

Es gibt auch Hinweise darauf, dass ein Gating der Aquaporine durch osmotische Gradienten (Moshelion et al., 2004, Niemietz & Tyerman, 1997) oder durch mechanische Membranspannung (Wan et al., 2004) auftritt, sodass sich durch die Ioneninjektion während der Spannungspulse auch die Wasserpermeabilität der Membranen verändern könnte.

Insgesamt könnten durch die während der Strominjektion auftretenden Änderungen der Ionenkonzentrationen und der Volumenverhältnisse in der Zelle also unter anderem verschiedene Transportprozesse in der Zelle beeinflusst werden. Welche Bedeutung diese Regulierungsmechanismen im Einzelnen haben könnten, ist allerdings nicht genau bekannt, unter anderem da es sehr schwierig oder sogar unmöglich ist, die verschiedenen Prozesse im intakten System einzeln zu betrachten.

4.4 Vergleichende Analysen von Schließzellen verschiedener Farnspezies

Die Forschung an den molekularen Grundlagen der Stomaregulierung konzentrierte sich bislang vor allem auf Schließzellen verschiedener Angiospermen. Es gibt zwar zahlreiche, vor allem ältere Studien über die Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Stomata früher Gefäßpflanzen (z.B. in Strasburger, 1866 - 1867, Porsch, 1905, Inamdar et al., 1971, Ziegler, 1987). Diese beruhen aber vorwiegend auf Beschreibungen der anatomischen Besonderheiten und Unterschiede der verschiedenen Typen von Stomata. Ein auffälliger Unterschied ist zum Beispiel das Vorkommen einer hohen Anzahl von Chloroplasten in den Schließzellen vieler Pteridophytenarten, wie hier ebenfalls beobachtet werden konnte (Abbildung 3.17 und 3.18). Im Gegensatz dazu weisen die Schließzellen der meisten Angiospermen wenige, nicht vollentwickelte Chloroplasten auf (Mansfield & Willmer, 1969). Auch einige vergleichende physiologische Untersuchungen zur Regu-

lierung der Stomaweite in frühen Gefäßpflanzen anhand von Gaswechselformen oder Analysen der Stomaöffnungsweite liegen vor (McAdam & Brodribb, 2012, Brodribb & McAdam, 2011, Mansfield & Willmer, 1969, Hörak et al., 2017, Doi et al., 2006, Doi & Shimazaki, 2008, Doi et al., 2015). Über die molekularen Grundlagen der Regulierung des Stomaschlusses ist in diesen Arten allerdings sehr wenig bekannt. Welche funktionellen Auswirkungen bestimmte Unterschiede, wie zum Beispiel die hohe Anzahl an Chloroplasten in Schließzellen (vergleiche auch Abbildung 3.18) und die im Verhältnis zu *Nicotiana tabacum* größeren Schließzellen für den Stomaschluss haben, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Die Größe der Schließzellen, vor allem in Relation zu den Epidermiszellen, hat aber möglicherweise eine Bedeutung, da die mechanische Interaktion mit den Epidermiszellen im Vergleich zu Angiospermen unterschiedlich ist (Franks & Farquhar, 2007, Franks, 2013), und die Epidermiszellen in Farnen keinen mechanischen Vorteil gegenüber den Schließzellen haben (Franks & Farquhar, 2007). So wird in frühen Gefäßpflanzen auch ohne eine aktive Regulierung durch ABA eine Reaktion auf Wassermangel durch den sinkenden Turgor im Blatt erreicht, was als hydropassive Regulierung des Stomaschlusses bezeichnet wird (McAdam & Brodribb, 2013, Franks, 2013).

4.4.1 In Farn-Schließzellen sind ähnliche spannungsabhängige Ströme messbar wie in Angiospermen

Die elektrophysiologische Charakterisierung von Ionenkanälen in Schließzellen der Modellpflanzen *Vicia faba*, *Commelina communis*, *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* hat maßgeblich zum Verständnis der Stomabewegung und deren Regulierung beigetragen. Elektrophysiologische Charakterisierungen von Strömen in Schließzellen niederer Landpflanzen wurden vor dieser Arbeit nicht vorgenommen, könnten aber Hinweise auf die Grundlagen der molekularen Regulierung der Stomaweite in diesen Spezies geben. Bisher wurden nur einige Homologe des Anionenkanals SLAC1, die in basalen Landpflanzen identifiziert wurden, im heterologen Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten charakterisiert (Lind et al., 2015, McAdam et al., 2016). Der einzige Vertreter der Farne (Polypodiopsida) war dabei *Ceratopteris richardii*.

4.4.1.1 Kaliumströme

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe der TEVC-Technik spannungsabhängige Ströme über die Plasmamembran von Schließzellen intakter Pflanzen der Arten *Polypo-*

dium vulgare und *Asplenium scolopendrium* gemessen werden (Abbildung 3.19). Die gemessenen Ströme waren in ihrer Aktivierungskinetik und Spannungsabhängigkeit ähnlich wie die in Schließzellen verschiedener Angiospermen gemessenen Ströme (Blatt, 1992, Roelfsema & Prins, 1997, Roelfsema et al., 2001, Stange et al., 2010). Diese werden bekannterweise durch ein- und auswärtsgerichtete Kaliumkanäle der Shaker-Familie vermittelt (Schachtman et al., 1992, Ache et al., 2000, Hosy et al., 2003). Das Auftreten von Homologen zu den Shaker-Kaliumkanälen (AtGORK, AtKAT1-2, AtAKT1, AKT2/3) in den untersuchten Arten ist demnach sehr wahrscheinlich. Nach einer Analyse von Sussmilch et al., 2019a gibt es in den dort analysierten Farnspezies *Salvinia cucullata* und *Azolla filiculoides* Homologe von ein- und auswärtsgerichteten Shaker-Kanälen (Sussmilch et al., 2019a, ergänzendes Material). Die Frage nach der Konservierung dieser Kanäle ist trotzdem nicht ganz einfach zu beantworten, da es zum Beispiel in *Physcomitrella patens* und *Sphagnum fallax* nur Homologe von Vertretern der einwärtsgerichteten Kanäle gibt und in *Selaginella moellendorffii* nur Homologe für auswärtsgerichtete Kanäle (Sussmilch et al., 2019a, ergänzendes Material). In Schließzellen von *Selaginella uncinata* konnte allerdings mithilfe der Kobaltnitritfärbung die Akkumulation von Kalium im Licht gezeigt werden (Ruszala et al., 2011, Doi et al., 2015), ebenso in einigen Farnarten, unter anderem *Polypodium aureum* (Dayanandan & Kaufman, 1975, Willmer & Pallas Jr, 1973). Auch in *Marchantia*, einem Vertreter der Lebermoose ohne Stomata, konnten Homologe für ein- und auswärtsgerichtete Shaker-Kanäle gefunden werden (Sussmilch et al., 2019a, ergänzendes Material). Es wäre also durchaus interessant für näher verwandte Farne, die zum Beispiel zu den Polypodiales gehören, Homologe zu identifizieren. Möglicherweise könnte dabei das 1000 Plants project (Matasci et al., 2014), in dem auch verschiedene *Polypodium*- und *Asplenium*-Arten vertreten sind, bei der Aufklärung der Funktion der Kaliumkanäle und auch der Anionenkanäle helfen.

4.4.1.2 Anionenströme

Durch die Anwendung eines Pulsprotokolls zur Messung von S-Typ-Anionenströmen über die Plasmamembran von Schließzellen, konnten in *Polypodium vulgare* Ströme gemessen werden, die von den elektrophysiologischen Eigenschaften den S-Typ-Anionenströmen in Schließzellen von Angiospermen ähneln (Abbildung 3.20, Stange, 2010, Marten, 2008, Güzel-Değer et al., 2015). Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass diese Ströme durch die Injektion von Chlorid ins Cytosol zunahmen (Abbildung 3.20). Homologe von Anionenkanälen der SLAC/SLAH Familie konnten in Vertretern verschiedener phylogenetischer Gruppen identifiziert werden (Sussmilch et al., 2019a, Lind et al., 2015). Ihre Rolle für den Stomaschluss und ihr Aktivierungsmechanismus ist in diesen Arten

allerdings noch unklar, da Untersuchungen von Lind et al., 2015 und McAdam et al., 2016 zeigten, dass nur das SLAC1-Homolog von *Physcomitrella patens* durch eine native OST1-Kinase aktiviert werden konnte. Auch die SLAC1-Homologe im Farn *Ceratopteris richardii* wurden durch heterologe Expression in *Xenopus*-Oozyten charakterisiert, zeigten aber nur schwache messbare Ströme bei Coexpression mit den SnRk2-Kinasen aus *Ceratopteris richardii* oder mit AtOST1. Bei der Coexpression dieser Kinasen mit AtSLAC1 ergibt sich dagegen eine deutliche Aktivierung der Anionenströme (McAdam et al., 2016). Wie auch für die Kaliumkanäle wären hier Studien mit näher verwandten Spezies interessant.

Die physiologische Charakterisierung entsprechender Mutanten könnte zur Aufklärung der Funktion der jeweiligen Ionenkanäle bei der Stomabewegung beitragen, allerdings ist die einzige Farnart für die momentan die Möglichkeit der gezielten Transformation besteht *Ceratopteris richardii*. Eine andere Möglichkeit wäre die Identifizierung von Homologen einzelner Ionenkanäle und eine genauere elektrophysiologische Charakterisierung in *Xenopus*-Oozyten, die Aufschluss über die jeweilige Funktion und Regulierungsmechanismen geben könnte. Die detailliertere Aufklärung der Stomaregulierung in verschiedenen Arten früher Gefäßpflanzen wäre sehr interessant, um offene Fragen bezüglich der Evolution der Stomaregulierung zu klären, vor allem da dieses Thema aktuell kontrovers diskutiert wird und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse keine klaren Schlussfolgerungen zulassen.

4.4.1.3 Hyperpolarisationsaktivierte Calciumkanäle

Durch die Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse konnte sowohl an Schließzellen von *Asplenium scolopendrium* als auch von *Polypodium vulgare* Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration ausgelöst werden (Abbildung 3.21). Quantitative Bestimmungen der cytosolischen Calciumkonzentration mithilfe des ratiometrischen Calciumsensors Fura-2 zeigten, dass in *Polypodium vulgare* das Ausmaß der Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration von der Membranspannung abhängt (Abbildung 3.22). Bei einer Hyperpolarisierung auf -200 mV wurde im Schnitt eine Erhöhung um 250 nM ausgelöst. Je negativer die Membranspannung während der Spannungspulse war, desto stärker waren die Änderungen der Calciumkonzentration im Cytosol (Abbildung 3.22). Aus der Literatur ist bekannt, dass auch in Schließzellen von Tabak und *Vicia faba* durch die Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse ein spannungsabhängiger Anstieg der Calciumkonzentration im Cytosol auftritt (Stange et al., 2010, Grabov & Blatt, 1998). Dies konnte in dieser Arbeit in Versuchen mit Tabak-Schließzellen ebenfalls gezeigt werden (Abbildungen 3.5 A, 3.15 und 3.16). Dieser Anstieg der cytosolischen Calciumkon-

zentration lässt sich vermutlich auf die Aktivierung hyperpolarisationsaktivierter, calciumpermeabler Kanäle in der Plasmamembran zurückführen (Grabov & Blatt, 1998, Stange et al., 2010, Hamilton et al., 2000). In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass in Tabak- und *Arabidopsis*-Schließzellen zusätzlich die Änderungen des cytosolischen Volumens durch die Strominjektion während der Spannungspulse zum Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration beiträgt (Abbildung 3.16, Voss et al., 2016). Die molekulare Identität der hyperpolarisationsaktivierten Kanäle ist allerdings bis heute nicht bekannt. Hyperpolarisationsaktivierte Calciumströme wurden zum Beispiel mit AtCNGC2 in Zusammenhang gebracht (Ali et al., 2007, Demidchik et al., 2018), eine elektrophysiologische Charakterisierung des Kanals im heterologen Expressionssystem steht allerdings noch aus.

4.4.2 Strominjektion hat keine messbaren Auswirkungen auf das cytosolische Volumen in *Polypodium*

Im Gegensatz zu *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* konnten in Schließzellen von *Polypodium vulgare* in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen keine Änderungen des cytosolischen Volumens während der Hyperpolarisierungen beobachtet werden. Da die Hyperpolarisierungspulse zum größten Teil nach der Injektion des ratiometrischen Calciumindikators Fura-2 durchgeführt wurden, kann man dafür die Fluoreszenzintensitäten des Farbstoffs für beide Anregungswellenlängen vergleichen. Die Fluoreszenzintensität von Fura-2 während des hyperpolarisierenden Spannungspulses nahm im Bereich des Nukleus von *Polypodium*-Schließzellen nämlich nur bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge 390 nm ab und nicht bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 345 nm (Anhang, Abbildung 5.1). Im Bereich des Nukleus von Tabak-Schließzellen nahm dagegen die Fluoreszenzintensität bei beiden Wellenlängen ab, was auf die deutliche Ausdehnung des Cytosols zurückzuführen ist (Anhang, Abbildung 5.1). Folglich tritt bei *Polypodium vulgare* durch die Strominjektion entweder gar keine oder eine wesentlich schwächere Ausdehnung des Cytosols auf. Um das genauer zu analysieren, müssten die Versuche an *Polypodium vulgare* allerdings mit einem calciuminsensitiven Fluoreszenzfarbstoff wie Lucifer Yellow wiederholt werden. Dadurch könnte die Umverteilung dieses Fluoreszenzfarbstoffs innerhalb der *Polypodium*-Schließzellen während der hyperpolarisierenden Spannungspulse unabhängig von der cytosolischen Calciumkonzentration beobachtet werden. Ein Grund für die geringere oder nicht auftretende cytosolische Ausdehnung im Vergleich zu Tabak-Schließzellen könnte eventuell das größere gesamte Zellvolumen oder die vergleichsweise kleinere Vakuole sein (Abbildung 3.18). Der Zusammenhang zwischen der Größe des Kaliumeinstroms während der Hyperpolarisierungen und den nach

Rückkehr zum Haltepotential gemessenen Anionenströmen lässt sich trotzdem beobachten (Abbildung 3.23). Zusätzlich scheint auch die erhöhte cytosolische Calciumkonzentration einen Einfluss auf die Anionenströme zu haben, da die nach den Spannungspulsen gemessenen Anionenströme relativ zu den K^+ -Strömen bei höherer Calciumkonzentration größer werden.

4.4.3 Schließzellen in Farnen sind durch Plasmodesmata symplastisch verbunden

In verschiedenen, in dieser Arbeit untersuchten Arten früher Gefäßpflanzen, wie *Selaginella uncinata*, *Ceratopteris richardii*, *Polypodium vulgare* und *Asplenium scolopendrium* konnte gezeigt werden, dass benachbarte Schließzellen eines Stomakomplexes miteinander verbunden sind, sodass ein injizierter Fluoreszenzfarbstoff sich in beiden Schließzellen verteilt (s. Abbildungen 3.21, 3.22, 3.24 und im Anhang). Generell sind die Zellen einer Pflanze durch Plasmodesmata, die eine cytoplasmatische Verbindung durch die Zellwand hindurch bilden, miteinander verbunden (Gunning & Robards, 2012). Diese symplastische Verbindung ermöglicht den Austausch von Ionen und größeren Molekülen und erleichtert damit auch die Kommunikation zwischen den Zellen (Lucas & Lee, 2004, Sager & Lee, 2014). Schließzellen bilden in dieser Hinsicht jedoch einen Sonderfall, da sie symplastisch isoliert sind (Roberts & Oparka, 2003, Willmer & Sexton, 1979, Wille & Lucas, 1984, Palevitz & Hepler, 1985). Elektronenmikroskopische Studien aus den 70er und 80er Jahren an verschiedenen Arten zeigen, dass nur in Schließzellen, die noch nicht voll entwickelt sind, symplastische Verbindungen durch Plasmodesmata vorkommen. Vollentwickelte Schließzellen der untersuchten Arten dagegen weisen keine vollständigen bzw. durchgängigen Plasmodesmata mehr auf, weder zu angrenzenden Epidermiszellen, noch zur Nachbarschließzelle (Willmer & Sexton, 1979, Wille & Lucas, 1984). Auch Untersuchungen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen kamen zu ähnlichen Ergebnissen und konnten eine Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs nur in jungen Geweben mit noch nicht ausgereiften Stomata nachweisen (Palevitz & Hepler, 1985). Die vorhandenen Plasmodesmata werden allem Anschein nach während des Entwicklungsprozesses von der Seite der Schließzellen aus verschlossen (Willmer & Sexton, 1979, Wille & Lucas, 1984, Oparka & Roberts, 2001). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass der Verschluss der Stomata zu den angrenzenden Epidermiszellen eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Schließzellen spielt und dieser verhindert, dass sich (durch Diffusion von Transkriptionsfaktoren wie SPCH) Cluster von Stomata bilden (Guseman et al., 2010).

Welche Rolle symplastische Verbindungen zwischen den beiden Schließzellen eines Sto-

makomplexes spielen, ist aber nicht genau bekannt. Allerdings gibt es Arten, in denen die beiden Nachbarschließzellen miteinander verbunden sind. So wurden in Schließzellen von verschiedenen Gräsern und Schachtelhalmen Lücken in der Zellwand zwischen den Schließzellen beschrieben (Brown & Johnson, 1962, Sack, 1987). Auch die Diffusion eines injizierten Fluoreszenzfarbstoffs in beide Schließzellen konnte z.B. in Mais beobachtet werden (Mumm et al., 2011). In einigen Laubmoosen wie *Funaria hygrometrica* und auch *Physcomitrella patens* entsteht durch eine unvollständige Zellteilung sogar eine einzelne Schließzelle mit zwei Zellkernen (Sack & Paolillo Jr, 1985, Paton & Pearce, 1957, Chater et al., 2016) und auch in der Farnart *Azolla* wird die stomatare Pore von einer zweikernigen Zelle umgeben (Busby & Gunning, 1984). Das Vorkommen von Plasmodesmata zwischen vollentwickelten Nachbarschließzellen wurde bisher allerdings noch nicht beschrieben und bei der Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen in Schließzellen der Modellpflanzen *Nicotiana tabacum*, *Commelina communis* und *Vicia faba* ist auch keine Verteilung des Farbstoffs in die Nachbarschließzelle zu beobachten (siehe z.B. Abbildungen 3.1, 3.2 A, 3.4, 3.5 A, 3.6 A und weitere, Levchenko et al., 2008, Marten et al., 2007b, Stange et al., 2010, Palevitz & Hepler (1985)).

In dieser Arbeit konnten anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen funktionsfähige Plasmodesmata zwischen den benachbarten Schließzellen in *Polypodium glycyrrhiza* gezeigt werden (3.25) und in allen hier untersuchten Arten früher Gefäßpflanzen konnte die Diffusion injizierter Farbstoffe in die Nachbarschließzellen beobachtet werden (Abbildungen 3.21, 3.22, 5.3, 3.24). Eine mögliche Funktion von Plasmodesmata könnte der Ausgleich des Turgors zwischen beiden Schließzellen sein, da Ionen und andere osmotisch wirksame Moleküle durch die Plasmodesmata diffundieren könnten (Terry & Roberts, 1987, Roberts & Oparka, 2003). Da auch die Mechanik der Stomaöffnung in Farnen von der für dikotyle Angiospermen typischen abweicht, könnte die symplastische Verbindung in früheren Gefäßpflanzen eventuell wichtig sein, während sie in Schließzellen von dikotylen Samenpflanzen keine Rolle mehr spielt. Im Vergleich ändert sich in Farnen und Moosen nämlich der Querschnitt der Schließzellen, während bei dikotylen Samenpflanzen durch die Wölbung der Schließzellen die Pore geöffnet wird (Ziegler, 1987, Franks & Farquhar, 2007, Voss et al., 2018). Außerdem wird auch eine hydropassive Regulierung der Stomata in Farnen vorgeschlagen, bei denen der Turgor der Schließzellen vom Turgor des gesamten Blattes abhängt und nicht von den einzelnen Schließzellen reguliert wird (Franks, 2013). Auch bei den hantelförmigen Schließzellen der Gräser ist der Mechanismus für die Stomaöffnung ein anderer, der möglicherweise von der Verbindung der Schließzellen und dem damit einhergehenden Turgorausgleich profitiert (Voss et al., 2018).

4.4.4 Die Calciumhomöostase wird in beiden Schließzellen unabhängig voneinander reguliert

Die Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse in den Schließzellen von *Polypodium vulgare* führte trotz symplastischer Verbindungen über Plasmodesmata nur in der eingestochenen Schließzelle zu Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration (Abbildung 3.26). Möglicherweise wird das Membranpotential in der Nachbarschließzelle bei der Durchführung eines Spannungspulses nicht im gleichen Maße hyperpolarisiert. Dies könnte man eventuell anhand von Messungen in denen in beide Schließzellen eingestochen wird überprüfen, und so Aufschluss über die elektrische Leitfähigkeit der Plasmodesmata bekommen. Auch die Diffusion von Calcium durch die Plasmodesmata scheint nicht so schnell zu funktionieren, dass ein gleiches Signal in der Nachbarschließzelle erreicht wird (Abbildung 3.26). Um die Geschwindigkeit der Diffusion zu beurteilen, müsste man eventuell länger andauernde Erhöhungen der Calciumkonzentration auslösen. Nach einer Erhöhung wie sie durch kurzzeitige Hyperpolarisierung ausgelöst wird, wird der Ausgangszustand durch den Transport von Calciumionen aus dem Cytosol von Ca^{2+} -ATPasen und $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiportern relativ schnell wiederhergestellt (Kudla et al., 2010). In Schließzellpaaren von *Asplenium scolopendrium* konnte zudem beobachtet werden, dass in der Nachbarschließzelle Oszillationen der freien cytosolischen Calciumkonzentration auftreten, nicht aber in der eigentlich eingestochenen (Abbildung 3.27). Eventuell sind diese Oszillationen auch mit Änderungen des Membranpotentials verbunden, die in der eingestochenen Schließzelle durch das Klemmen der Membranspannung auf -100 mV unterdrückt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Schließzellen eines stomatären Komplexes ihre Calciumhomöostase trotz Verbindung durch Plasmodesmata getrennt voneinander regulieren. Auch in *Arabidopsis thaliana* konnten zwischen den beiden Nachbarschließzellen Unterschiede in den spontanen und stimulusinduzierten Oszillationen der cytosolischen Calciumkonzentration gezeigt werden (Allen et al., 1999b).

4.4.5 Die Rolle von ABA beim Stomaschluss in *Polypodium vulgare*

Der Einfluss von ABA auf die Regulierung der Stomaweite in Farnen und auch anderen frühen Gefäßpflanzen wie Moosen und Lycophyten ist umstritten, und widersprüchliche Ergebnisse verschiedener Studien bilden die Grundlage für verschiedene Theorien zur Evolution des ABA-Signaltransduktionswegs (siehe Abschnitt 1.5.2). So konnte in Gaswechselexperimenten mit verschiedenen Farnarten keine Antwort auf in den Transpirati-

onsstrom geleitetes ABA gezeigt werden (Brodrribb & McAdam, 2011). Andere Studien zeigen aber eine Stomaschlussantwort bestimmter Farne auf ABA nach Besprühen mit dem Phytohormon (Hörak et al., 2017, Cai et al., 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Methode der direkten ABA-Applikation an Schließzellen die Elektroinfusion etabliert. Diese führte zwar bei Tabak-Schließzellen zum Stomaschluss, an Stomata von *Polypodium vulgare* konnte jedoch keine Antwort gezeigt werden (Abbildung 3.28).

Trotzdem ist es schwierig eine definitive Aussage über den Einfluss von ABA zu machen, da 2017 eine Studie von Hörak et al. zeigte, dass die Fähigkeit von Farnen mit Stomaschluss auf ABA zu reagieren auch von den Wachstumsbedingungen abhängt. Diese Tatsache macht es noch schwieriger zu zeigen, dass eine ABA-Responsivität bei Farnen ausgeschlossen ist. Auch der Vergleich der bisherigen Studien an verschiedenen Arten ist schwierig, da sowohl unterschiedliche Anzuchtbedingungen, unterschiedliche Konzentrationen des Phytohormons (1 μ M - 1 mM), als auch verschiedene Applikationstechniken (Zufuhr über den Transpirationsstrom, Besprühen der Blätter, Inkubation von Epidermisstreifen oder Sporophytenkapseln, Elektroinfusion) eingesetzt wurden (Ruszala et al., 2011, Hörak et al., 2017, Cai et al., 2017, Chater et al., 2011, Brodrribb & McAdam, 2011). Vielleicht sind aber auch die Variationen zwischen einzelnen Arten, Familien oder Klassen innerhalb der verschiedenen Abteilungen größer als angenommen. So fehlt zum Beispiel in Farnen der Klasse Polypodiopsida die stomatare Blaulichtantwort, in anderen Klassen der Farne und in Lycophyten ist sie dagegen messbar (Doi et al., 2015).

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurden hyperpolarisierende Spannungspulse an Schließzellen appliziert, um die cytosolische Calciumkonzentration zu erhöhen. Um hochaufgelöste Informationen über die Calciumkonzentration innerhalb der Zelle während dieser Spannungspulse zu bekommen, wurde ein konfokales Spinning-Disc-System eingesetzt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass sich die Applikation hyperpolarisierender Spannungspulse mittels TEVC nur bedingt eignet, um Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration auf zellulärer Ebene zu beobachten, da die Spannungspulse zu einer Ausdehnung des cytosolischen Volumens führen.

Die Erkenntnisse über Änderungen der Ionenkonzentration im Cytosol, die während der Applikation von Spannungspulsen mittels TEVC auftreten, können auch für zukünftige Studien genutzt werden. So könnten Spannungspulse eingesetzt werden, um die Ionenkonzentration im Cytosol gezielt zu manipulieren. Auf diese Weise könnten zum Beispiel

Wasserflüsse ausgelöst werden, um die Rolle von Aquaporinen bei der Regulierung der Stomaweite oder an der Osmoregulierung zu untersuchen.

Die herbeigeführten Änderungen des cytosolischen Volumens führten dazu, dass ein bislang unbekannter Mechanismus zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern beschrieben werden konnte. Dieser wird durch Änderungen der mechanischen Spannung der Membran und/oder der Osmolarität verursacht. Solche Veränderungen könnten zum Beispiel während des Stomaschlusses auftreten und zu transienten Erhöhungen der Calciumkonzentration führen. Die Identifizierung von Kanälen, die an diesem Calcium-einstrom beteiligt sind, sollte das Ziel zukünftiger Studien sein, ebenso wie die Aufklärung der physiologischen Bedeutung dieses Mechanismus für Stomabewegungen.

Der Einsatz des konfokalen Spinning-Disc-Systems erlaubte eine hochaufgelöste Darstellung der Erhöhungen der Calciumkonzentrationen innerhalb der Zelle, z. B. nach einem mechanischen Reiz (Abbildung 3.4) oder durch Hyperpolarisierung der Plasmamembran (Abbildung 3.15 A). Zweiteres ist allerdings auf Schließzellen in Epidermisstreifen beschränkt, in denen die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle durch Cäsium blockiert wurden. Prinzipiell wäre es also möglich, das subzelluläre Muster von Calciumtransienten, also lokale Erhöhungen der Calciumkonzentration und deren Dynamik, darzustellen. Dieses könnte Aufschluss über beteiligte Kanäle oder über die Spezifität der Calciumsignale geben. Interessant wäre zum Beispiel eine vergleichende Studie, bei der untersucht wird, wie genau verschiedene Stimuli, wie MAMPs oder pH-Wert-Änderungen, die Calciumkonzentration innerhalb der Schließzellen beeinflussen. Hierfür wäre es hilfreich, eine Methode zur gezielten Applikation dieser Stimuli an Schließzellen intakter Blätter zu entwickeln, um nicht auf Schließzellen in Epidermisstreifen begrenzt zu sein.

Im Hinblick auf die Studien an Farnschließzellen wäre es sehr interessant, die physiologische Bedeutung der Ionenströme in Farnschließzellen aufzuklären. Insbesondere sollten die Fragen untersucht werden, ob die Stomaöffnung in Farnen ebenfalls durch Kalium-einstrom verursacht wird und ob die Aktivierung von Anionenkanälen am Stomaschluss beteiligt ist. Diese Erkenntnisse könnten helfen, die evolutionäre Entwicklung des Stomaschlusses weiter aufzuklären. Ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen der Trockenstressantwort in evolutionär älteren Landpflanzen wie Farnen wäre auch im Hinblick auf sich ändernde Umweltbedingungen, die eine Anpassung von Pflanzen an trockenere Bedingungen erfordern, von großem Interesse. Das Wissen aus solchen Studien könnte in der modernen Pflanzenzüchtung eingesetzt werden, um eine höhere Trockenresistenz von Nutzpflanzen zu erreichen.

Literaturverzeichnis

- ACHARYA, B. R., JEON, B. W., ZHANG, W., & ASSMANN, S. M. (2013). Open Stomata 1 (OST 1) is limiting in abscisic acid responses of Arabidopsis guard cells. *New Phytologist*, 200(4), 1049–1063.
- ACHE, P., BECKER, D., IVASHIKINA, N., DIETRICH, P., ROELFSEMA, M. R. G., & HEDRICH, R. (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Letters*, 486(2), 93–98.
- ALI, R., MA, W., LEMTIRI-CHLIEH, F., TSALTAS, D., LENG, Q., VON BODMAN, S., & BERKOWITZ, G. A. (2007). Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *The Plant Cell*, 19(3), 1081–1095.
- ALLAWAY, W. (1973). Accumulation of malate in guard cells of *Vicia faba* during stomatal opening. *Planta*, 110(1), 63–70.
- ALLEN, G., CHU, S., HARRINGTON, C., SCHUMACHER, K., HOFFMANN, T., TANG, Y., GRILL, E., SCHROEDER, J., ET AL. (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*, 411(6841), 1053–1057.
- ALLEN, G. J., CHU, S. P., SCHUMACHER, K., SHIMAZAKI, C. T., VAFEADOS, D., KEMPER, A., HAWKE, S. D., TALLMAN, G., TSIEN, R. Y., HARPER, J. F., ET AL. (2000). Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science*, 289(5488), 2338–2342.
- ALLEN, G. J., KUCHITSU, K., CHU, S. P., MURATA, Y., & SCHROEDER, J. I. (1999a). Arabidopsis *abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *The Plant Cell*, 11(9), 1785–1798.
- ALLEN, G. J., KWAK, J. M., CHU, S. P., LLOPIS, J., TSIEN, R. Y., HARPER, J. F., & SCHROEDER, J. I. (1999b). Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in arabidopsis guard cells. *The Plant Journal*, 19(6), 735–747.
- ALLEN, G. J., MURATA, Y., CHU, S. P., NAFISI, M., & SCHROEDER, J. I. (2002). Hypersensitivity of abscisic acid-induced cytosolic calcium increases in the Arabidopsis Farnesyltransferase mutant *eral-2*. *The Plant Cell*, 14(7), 1649–1662.

- ALLEN, G. J., & SANDERS, D. (1996). Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *The Plant Journal*, 10(6), 1055–1069.
- ANDERSON, J., HUPRIKAR, S., KOCHIAN, L., LUCAS, W., & GABER, R. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(9), 3736–3740.
- ANDERSON, J. M., CHARBONNEAU, H., JONES, H. P., MCCANN, R. O., & CORMIER, M. J. (1980). Characterization of the plant nicotinamide adenine dinucleotide kinase activator protein and its identification as calmodulin. *Biochemistry*, 19(13), 3113–3120.
- ANDRÉS, Z., PÉREZ-HORMAECHE, J., LEIDI, E. O., SCHLÜCKING, K., STEINHORST, L., MCLACHLAN, D. H., SCHUMACHER, K., HETHERINGTON, A. M., KUDLA, J., CUBERO, B., ET AL. (2014). Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), E1806–E1814.
- APSE, M. P., AHARON, G. S., SNEDDEN, W. A., & BLUMWALD, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 285(5431), 1256–1258.
- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815.
- ASSMANN, S., SIMONCINI, L., & SCHROEDER, J. (1985). Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, 318(6043), 285–287.
- BÆKGAARD, L., FUGLSANG, A. T., & PALMGREN, M. G. (2005). Regulation of plant plasma membrane H⁺- and Ca²⁺-ATPases by terminal domains. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(6), 369–374.
- BAK, G., LEE, E.-J., LEE, Y., KATO, M., SEGAMI, S., SZE, H., MAESHIMA, M., HWANG, J.-U., & LEE, Y. (2013). Rapid structural changes and acidification of guard cell vacuoles during stomatal closure require phosphatidylinositol 3, 5-bisphosphate. *The Plant Cell*, (pp. 2202–2216).
- BARBIER-BRYGOO, H., DE ANGELI, A., FILLEUR, S., FRACHISSE, J.-M., GAMBALLE, F., THOMINE, S., & WEGE, S. (2011). Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 25–51.

- BARKLA, B. J., & PANTOJA, O. (1996). Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 159–184.
- BARRAGÁN, V., LEIDI, E. O., ANDRÉS, Z., RUBIO, L., DE LUCA, A., FERNÁNDEZ, J. A., CUBERO, B., & PARDO, J. M. (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(3), 1127–1142.
- BARRY, P. H., & LYNCH, J. W. (1991). Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *Journal of Membrane Biology*, 121(2), 101–117.
- BASU, D., & HASWELL, E. S. (2017). Plant mechanosensitive ion channels: an ocean of possibilities. *Current Opinion in Plant Biology*, 40, 43–48.
- BEWELL, M. A., MAATHUIS, F. J., ALLEN, G. J., & SANDERS, D. (1999). Calcium-induced calcium release mediated by a voltage-activated cation channel in vacuolar vesicles from red beet. *FEBS Letters*, 458(1), 41–44.
- BLATT, M. (1992). K⁺ channels of stomatal guard cells. Characteristics of the inward rectifier and its control by pH. *The Journal of General Physiology*, 99(4), 615–644.
- BLATT, M. R. (1988). Potassium-dependent, bipolar gating of K⁺ channels in guard cells. *The Journal of Membrane Biology*, 102(3), 235–246.
- BONZA, M. C., MORANDINI, P., LUONI, L., GEISLER, M., PALMGREN, M. G., & DE MICHELIS, M. I. (2000). *At-ACA8* encodes a plasma membrane-localized calcium-ATPase of *Arabidopsis* with a calmodulin-binding domain at the N terminus. *Plant Physiology*, 123(4), 1495–1506.
- BOOTMAN, M. D., RIETDORF, K., COLLINS, T., WALKER, S., & SANDERSON, M. (2013). Ca²⁺-sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca²⁺ imaging. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013(2), 83–99.
- BOWLING, D. (1987). Measurement of the apoplastic activity of K⁺ and Cl⁻ in the leaf epidermis of *Commelina communis* in relation to stomatal activity. *Journal of Experimental Botany*, 38(8), 1351–1355.
- BRANDT, B., BRODSKY, D. E., XUE, S., NEGI, J., IBA, K., KANGASJÄRVI, J., GHASSEMIAN, M., STEPHAN, A. B., HU, H., & SCHROEDER, J. I. (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10593–10598.

- BRANDT, B., MUNEMASA, S., WANG, C., NGUYEN, D., YONG, T., YANG, P. G., PORETSKY, E., BELKNAP, T. F., WAADT, R., ALEMÁN, F., ET AL. (2015). Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* guard cells. *Elife*, 4, e03599.
- BRAULT, M., AMIAR, Z., PENNARUN, A.-M., MONESTIEZ, M., ZHANG, Z., CORNEL, D., DELLIS, O., KNIGHT, H., BOUTEAU, F., & RONA, J.-P. (2004). Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in *Arabidopsis* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca²⁺ dependent. *Plant Physiology*, 135(1), 231–243.
- BRODRIBB, T. J., & MCADAM, S. A. (2011). Passive origins of stomatal control in vascular plants. *Science*, 331(6017), 582–585.
- BRODRIBB, T. J., & MCADAM, S. A. (2013). Unique responsiveness of angiosperm stomata to elevated CO₂ explained by calcium signalling. *PLoS One*, 8(11), e82057.
- BRODRIBB, T. J., & MCADAM, S. A. (2017). Evolution of the stomatal regulation of plant water content. *Plant Physiology*, 174(2), 639–649.
- BROWN, W. V., & JOHNSON, S. C. (1962). The fine structure of the grass guard cell. *American Journal of Botany*, 49(2), 110–115.
- BRÜGGEMANN, L., DIETRICH, P., BECKER, D., DREYER, I., PALME, K., & HEDRICH, R. (1999). Channel-mediated high-affinity K⁺ uptake into guard cells from *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 3298–3302.
- BUCKLEY, T. N. (2005). The control of stomata by water balance. *New Phytologist*, 168(2), 275–292.
- BUSBY, C., & GUNNING, B. (1984). Microtubules and morphogenesis in stomata of the water fern *Azolla*: an unusual mode of guard cell and pore development. *Protoplasma*, 122(1-2), 108–119.
- BUSH, D. S. (1993). Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiology*, 103(1), 7–13.
- CAI, S., CHEN, G., WANG, Y., HUANG, Y., MARCHANT, D. B., WANG, Y., YANG, Q., DAI, F., HILLS, A., FRANKS, P. J., ET AL. (2017). Evolutionary conservation of ABA signaling for stomatal closure. *Plant physiology*, 174(2), 732–747.
- CARAFOLI, E., & KREBS, J. (2016). Why calcium? How calcium became the best communicator. *Journal of Biological Chemistry*, 291(40), 20849–20857.

- CASSON, S., & GRAY, J. E. (2008). Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*, *178*(1), 9–23.
- CHATER, C., KAMISUGI, Y., MOVAHEDI, M., FLEMING, A., CUMING, A. C., GRAY, J. E., & BEERLING, D. J. (2011). Regulatory mechanism controlling stomatal behavior conserved across 400 million years of land plant evolution. *Current Biology*, *21*(12), 1025–1029.
- CHATER, C., PENG, K., MOVAHEDI, M., DUNN, J. A., WALKER, H. J., LIANG, Y.-K., MCLACHLAN, D. H., CASSON, S., ISNER, J. C., WILSON, I., ET AL. (2015). Elevated CO₂-induced responses in stomata require ABA and ABA signaling. *Current Biology*, *25*(20), 2709–2716.
- CHATER, C. C., CAINE, R. S., FLEMING, A. J., & GRAY, J. E. (2017a). Origins and evolution of stomatal development. *Plant Physiology*, *174*(2), 624–638.
- CHATER, C. C., CAINE, R. S., FLEMING, A. J., & GRAY, J. E. (2017b). Origins and evolution of stomatal development. *Plant Physiology*, *174*(2), 624–638.
- CHATER, C. C., CAINE, R. S., TOMEK, M., WALLACE, S., KAMISUGI, Y., CUMING, A. C., LANG, D., MACALISTER, C. A., CASSON, S., BERGMANN, D. C., ET AL. (2016). Origin and function of stomata in the moss *Physcomitrella patens*. *Nature Plants*, *2*(12), 16179.
- CHAUMONT, F., & TYERMAN, S. D. (2014). Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiology*, *164*(4), 1600–1618.
- CHEN, H., ZHANG, X., ET AL. (2015). Subcellular localization of CAX proteins in plants. *Molecular Soil Biology*, *6*(3), 1–5.
- CHO, D., KIM, S. A., MURATA, Y., LEE, S., JAE, S.-K., NAM, H. G., & KWAK, J. M. (2009). De-regulated expression of the plant glutamate receptor homolog AtGLR3.1 impairs long-term Ca²⁺-programmed stomatal closure. *The Plant Journal*, *58*(3), 437–449.
- CHO, D., VILLIERS, F., KRONIEWICZ, L., LEE, S., SEO, Y. J., HIRSCHI, K. D., LEONHARDT, N., & KWAK, J. M. (2012). Vacuolar CAX1 and CAX3 influence auxin transport in guard cells via regulation of apoplastic pH. *Plant Physiology*, *160*, 1293–1302.
- CLOUGH, S. J., & BENT, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, *16*(6), 735–743.

- COLE, K. S. (1949). Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Archives des Sciences Physiologiques*, 3(2), 253–258.
- CONN, S., & GILLIHAM, M. (2010). Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Annals of Botany*, 105(7), 1081–1102.
- CONN, S. J., GILLIHAM, M., ATHMAN, A., SCHREIBER, A. W., BAUMANN, U., MOLLER, I., CHENG, N.-H., STANCOMBE, M. A., HIRSCHI, K. D., WEBB, A. A., ET AL. (2011). Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23, 240–257.
- COOPER, E. D. (2014). Overly simplistic substitution models obscure green plant phylogeny. *Trends in Plant Science*, 19(9), 576–582.
- COSGROVE, D. J., & HEDRICH, R. (1991). Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta*, 186(1), 143–153.
- COSTA, A., NAVAZIO, L., & SZABO, I. (2018). The contribution of organelles to plant intracellular calcium signalling. *Journal of Experimental Botany*, 69(17), 4175–4193.
- COSTE, B., MATHUR, J., SCHMIDT, M., EARLEY, T. J., RANADE, S., PETRUS, M. J., DUBIN, A. E., & PATAPOUTIAN, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, 330(6000), 55–60.
- COSTE, B., XIAO, B., SANTOS, J. S., SYEDA, R., GRANDL, J., SPENCER, K. S., KIM, S. E., SCHMIDT, M., MATHUR, J., DUBIN, A. E., ET AL. (2012). Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature*, 483(7388), 176–181.
- COWAN, I., & FARQUHAR, G. (1977). Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. In *Symposia of the Society for Experimental Biology*, vol. 31, (pp. 471–505).
- COX, C. J., LI, B., FOSTER, P. G., EMBLEY, T. M., & CIVÁŇ, P. (2014). Conflicting phylogenies for early land plants are caused by composition biases among synonymous substitutions. *Systematic Biology*, 63(2), 272–279.
- CUMING, A. C. (2019). Evolution of aba signaling pathways. In *Advances in Botanical Research*, vol. 92, (pp. 281–313). Elsevier.

- CUMING, A. C., CHO, S. H., KAMISUGI, Y., GRAHAM, H., & QUATRANO, R. S. (2007). Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*, 176(2), 275–287.
- CUTLER, S. R., RODRIGUEZ, P. L., FINKELSTEIN, R. R., & ABRAMS, S. R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 651–679.
- CZEMPINSKI, K., FRACHISSE, J.-M., MAUREL, C., BARBIER-BRYGOO, H., & MUELLER-ROEBER, B. (2002). Vacuolar membrane localization of the *Arabidopsis* two-pore K⁺ channel KCO1. *The Plant Journal*, 29(6), 809–820.
- DANIELS, M. J., CHAUMONT, F., MIRKOV, T. E., & CHRISPEELS, M. J. (1996). Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *The Plant Cell*, 8(4), 587–599.
- DARAM, P., URBACH, S., GAYMARD, F., SENTENAC, H., & CHÉREL, I. (1997). Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *The EMBO journal*, 16(12), 3455–3463.
- DAYANANDAN, P., & KAUFMAN, P. B. (1975). Stomatal movements associated with potassium fluxes. *American Journal of Botany*, 62(3), 221–231.
- DE ANGELI, A., MONACHELLO, D., EPHRITIKHINE, G., FRACHISSE, J., THOMINE, S., GAMBALE, F., & BARBIER-BRYGOO, H. (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, 442(7105), 939.
- DE ANGELI, A., ZHANG, J., MEYER, S., & MARTINOIA, E. (2013). AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 4, 1804.
- DE SILVA, D., HETHERINGTON, A., & MANSFIELD, T. (1985). Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. *New Phytologist*, 100(4), 473–482.
- DE VRIES, J., CURTIS, B. A., GOULD, S. B., & ARCHIBALD, J. M. (2018). Embryophyte stress signaling evolved in the algal progenitors of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), E3471–E3480.
- DEMIDCHIK, V., DAVENPORT, R. J., & TESTER, M. (2002). Nonselective cation channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 67–107.

- DEMIDCHIK, V., & MAATHUIS, F. J. (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*, 175(3), 387–404.
- DEMIDCHIK, V., SHABALA, S., ISAYENKOV, S., CUIN, T. A., & POTTOSIN, I. (2018). Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytologist*, 220(1), 49–69.
- DENNISON, K. L., & SPALDING, E. P. (2000). Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124(4), 1511–1514.
- DIETRICH, P., & HEDRICH, R. (1994). Interconversion of fast and slow gating modes of GCAC1, a guard cell anion channel. *Planta*, 195(2), 301–304.
- DITTRICH, M., MUELLER, H. M., BAUER, H., PEIRATS-LLOBET, M., RODRIGUEZ, P. L., GEILFUS, C.-M., CARPENTIER, S. C., AL RASHEID, K. A., KOLLIST, H., MERILO, E., ET AL. (2019). The role of Arabidopsis ABA receptors from the PYR/PYL/RCAR family in stomatal acclimation and closure signal integration. *Nature Plants*, 5(9), 1002–1011.
- DODD, A., KUDLA, J., & SANDERS, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 593–620.
- DOI, M., KITAGAWA, Y., & SHIMAZAKI, K.-I. (2015). Stomatal blue light response is present in early vascular plants. *Plant Physiology*, 169(2), 1205–1213.
- DOI, M., & SHIMAZAKI, K.-I. (2008). The stomata of the fern *Adiantum capillus-veneris* do not respond to CO₂ in the dark and open by photosynthesis in guard cells. *Plant Physiology*, 147(2), 922–930.
- DOI, M., WADA, M., & SHIMAZAKI, K.-I. (2006). The fern *Adiantum capillus-veneris* lacks stomatal responses to blue light. *Plant and Cell Physiology*, 47(6), 748–755.
- DOMÍNGUEZ, D. C. (2018). Calcium Signaling in Prokaryotes. In J. N. Buchholz, & E. J. Behringer (Eds.) *Calcium and Signal Transduction*, chap. 5, (pp. 89–106). Rijeka: IntechOpen.
- DREYER, I., ANTUNES, S., HOSHI, T., MÜLLER-RÖBER, B., PALME, K., PONGS, O., REINTANZ, B., & HEDRICH, R. (1997). Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophysical Journal*, 72(5), 2143–2150.
- DREYER, I., & BLATT, M. R. (2009). What makes a gate? The ins and outs of Kv-like K⁺ channels in plants. *Trends in Plant Science*, 14(7), 383–390.

- DREYER, I., GOMEZ-PORRAS, J. L., RIAÑO PACHÓN, D. M., HEDRICH, R., & GEIGER, D. (2012). Molecular evolution of slow and quick anion channels (SLACs and QUACs/ALMTs). *Frontiers in Plant Science*, 3, 263.
- DUCKETT, J. G., PRESSEL, S., P'NG, K. M., & RENZAGLIA, K. S. (2009). Exploding a myth: the capsule dehiscence mechanism and the function of pseudostomata in *Sphagnum*. *New Phytologist*, 183(4), 1053–1063.
- ECKERT, M., & KALDENHOFF, R. (2000). Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. *Journal of Experimental Botany*, 51(349), 1435–1442.
- EDEL, K. H., MARCHADIER, E., BROWNLEE, C., KUDLA, J., & HETHERINGTON, A. M. (2017). The evolution of calcium-based signalling in plants. *Current Biology*, 27(13), R667–R679.
- EISENACH, C., BAETZ, U., HUCK, N. V., ZHANG, J., DE ANGELI, A., BECKERS, G. J., & MARTINOIA, E. (2017). ABA-induced stomatal closure involves ALMT4, a phosphorylation-dependent vacuolar anion channel of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 29(10), 2552–2569.
- EISENACH, C., & DE ANGELI, A. (2017). Ion transport at the vacuole during stomatal movements. *Plant Physiology*, 174(2), 520–530.
- ELHADDAD, N. S., HUNT, L., SLOAN, J., & GRAY, J. E. (2014). Light-induced stomatal opening is affected by the guard cell protein kinase APK1b. *PLoS One*, 9(5), e97161.
- EMI, T., KINOSHITA, T., & SHIMAZAKI, K.-I. (2001). Specific binding of vf14-3-3a isoform to the plasma membrane H⁺-ATPase in response to blue light and fusicoccin in guard cells of broad bean. *Plant Physiology*, 125(2), 1115–1125.
- ENGINEER, C. B., HASHIMOTO-SUGIMOTO, M., NEGI, J., ISRAELSSON-NORDSTRÖM, M., AZOULAY-SHEMER, T., RAPPEL, W.-J., IBA, K., & SCHROEDER, J. I. (2016). CO₂ sensing and CO₂ regulation of stomatal conductance: advances and open questions. *Trends in Plant Science*, 21(1), 16–30.
- EVANS, N. H., MCAINSH, M. R., & HETHERINGTON, A. M. (2001). Calcium oscillations in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5), 415–420.
- FISCHER, R. (1968). Stomatal opening: role of potassium uptake by guard cells. *Science*, 160(3829), 784–785.

- FORDE, B. G., & ROBERTS, M. R. (2014). Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000prime reports*, 6(37).
- FRANKS, P. J. (2013). Passive and active stomatal control: either or both? *New Phytologist*, 198(2), 325–327.
- FRANKS, P. J., & FARQUHAR, G. D. (2007). The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiology*, 143(1), 78–87.
- FUGLSANG, A. T., BORCH, J., BYCH, K., JAHN, T. P., ROEPSTORFF, P., & PALMGREN, M. G. (2003). The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H⁺-ATPase involvement of a region promoting phosphorylation-independent interaction in addition to the phosphorylation-dependent C-terminal end. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42266–42272.
- FUJINO, M. (1967). Role of adenosinetriphosphate and adenosinetriphosphatase in stomatal movement. *Science Bulletin, Faculty of Education Nagasaki University*, 18, 1–47.
- FURUICHI, T., TATSUMI, H., & SOKABE, M. (2008). Mechano-sensitive channels regulate the stomatal aperture in *Vicia faba*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(3), 758–762.
- GALLOIS, P., & MARINHO, P. (1995). Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco. In *Plant gene transfer and expression protocols*, (pp. 39–48). Springer.
- GAO, X.-Q., LI, C.-G., WEI, P.-C., ZHANG, X.-Y., CHEN, J., & WANG, X.-C. (2005). The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiology*, 139(3), 1207–1216.
- GEIGER, D., MAIERHOFER, T., AL-RASHEID, K. A., SCHERZER, S., MUMM, P., LIESE, A., ACHE, P., WELLMANN, C., MARTEN, I., GRILL, E., ET AL. (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Science Signaling*, 4(173), ra32.
- GEIGER, D., SCHERZER, S., MUMM, P., MARTEN, I., ACHE, P., MATSCHI, S., LIESE, A., WELLMANN, C., AL-RASHEID, K., GRILL, E., ET AL. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), 8023–8028.
- GEIGER, D., SCHERZER, S., MUMM, P., STANGE, A., MARTEN, I., BAUER, H., ACHE, P., MATSCHI, S., LIESE, A., AL-RASHEID, K. A., ET AL. (2009). Activity

- of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21425–21430.
- GEISLER, M., AXELSEN, K. B., HARPER, J. F., & PALMGREN, M. G. (2000a). Molecular aspects of higher plant P-type Ca^{2+} -ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 52–78.
- GEISLER, M., FRANGNE, N., GOMÈS, E., MARTINOIA, E., & PALMGREN, M. G. (2000b). The *ACA4* gene of Arabidopsis encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast. *Plant Physiology*, 124(4), 1814–1827.
- GEORGE, L., ROMANOWSKY, S. M., HARPER, J. F., & SHARROCK, R. A. (2008). The *ACA10* Ca^{2+} -ATPase regulates adult vegetative development and inflorescence architecture in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(2), 716–728.
- GIERTH, M., & MÄSER, P. (2007). Potassium transporters in plants— involvement in K^+ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters*, 581(12), 2348–2356.
- GILROY, S., FRICKER, M. D., READ, N. D., & TREWAVAS, A. J. (1991). Role of calcium in signal transduction of *Commelina* guard cells. *The Plant Cell Online*, 3(4), 333–344.
- GILROY, S., READ, N., & TREWAVAS, A. (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature*, 346(6286), 769–771.
- GIRAUDAT, J., PARCY, F., BERTAUCHE, N., GOSTI, F., LEUNG, J., MORRIS, P.-C., BOUVIER-DURAND, M., & VARTANIAN, N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signalling. In *Signals and Signal Transduction Pathways in Plants*, (pp. 321–341). Springer.
- GOBERT, A., ISAYENKOV, S., VOELKER, C., CZEMPINSKI, K., & MAATHUIS, F. J. (2007). The two-pore channel *TPK1* gene encodes the vacuolar K^+ conductance and plays a role in K^+ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10726–10731.
- GOSTI, F., BEAUDOIN, N., SERIZET, C., WEBB, A. A., VARTANIAN, N., & GIRAUDAT, J. (1999). *ABI1* protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 11(10), 1897–1909.

- GRABOV, A., & BLATT, M. R. (1998). Membrane voltage initiates Ca²⁺ waves and potentiates Ca²⁺ increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4778–4783.
- GRÄF, R., RIETDORF, J., & ZIMMERMANN, T. (2005). Live cell spinning disk microscopy. In *Microscopy Techniques*, (pp. 57–75). Springer.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., & TSIEN, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440–3450.
- GUNNING, B. E., & ROBARDS, A. (2012). *Intercellular communication in plants: studies on plasmodesmata*. Springer Science & Business Media.
- GUO, F.-Q., YOUNG, J., & CRAWFORD, N. M. (2003). The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(1), 107–117.
- GUSEMAN, J. M., LEE, J. S., BOGENSCHUTZ, N. L., PETERSON, K. M., VIRATA, R. E., XIE, B., KANAOKA, M. M., HONG, Z., & TORII, K. U. (2010). Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in Arabidopsis CHORUS (glucan synthase-like 8). *Development*, 137(10), 1731–1741.
- GÜZEL-DEĞER, A. G., SCHERZER, S., NUHKAT, M., KEDZIERSKA, J., KOLLIST, H., BROSCHE, M., UNYAYAR, S., BOUDSOCQ, M., HEDRICH, R., & ROELFSEMA, M. R. G. (2015). Guard cell SLAC1-type anion channels mediate flagellin-induced stomatal closure. *New Phytologist*, 208(1), 162–173.
- HAIG, D. (2012). Filial mistletoes: the functional morphology of moss sporophytes. *Annals of Botany*, 111(3), 337–345.
- HAMILTON, D. W., HILLS, A., KÖHLER, B., & BLATT, M. R. (2000). Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4967–4972.
- HAMILTON, E. S., SCHLEGEL, A. M., & HASWELL, E. S. (2015). United in diversity: mechanosensitive ion channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 113–137.
- HANANI, M. (2012). Lucifer yellow—an angel rather than the devil. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(1), 22–31.

- HARADA, A., & SHIMAZAKI, K.-I. (2008). Measurement of changes in cytosolic Ca²⁺ in *Arabidopsis* guard cells and mesophyll cells in response to blue light. *Plant and Cell Physiology*, 50(2), 360–373.
- HARPER, J. F., HONG, B., HWANG, I., GUO, H. Q., STODDARD, R., HUANG, J. F., PALMGREN, M. G., & SZE, H. (1998). A novel calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal autoinhibitory domain. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 1099–1106.
- HARTUNG, W., WEILER, E., & VOLK, O. (1987). Immunochemical evidence that abscisic acid is produced by several species of Anthocerotae and Marchantiales. *Bryologist*, 90(4), 393–400.
- HASHIMOTO, K., & KUDLA, J. (2011). Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie*, 93(12), 2054–2059. The Calcium signal: a universal carrier to code, decode and transduce information.
- HASWELL, E. S., & MEYEROWITZ, E. M. (2006). MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 16(1), 1–11.
- HAUSER, F., WAADT, R., & SCHROEDER, J. I. (2011). Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Current Biology*, 21(9), R346–R355.
- HEDRICH, R. (2012). Ion Channels in Plants. *Physiological Reviews*, 92(4), 1777–1811.
- HEDRICH, R., BUSCH, H., & RASCHKE, K. (1990). Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *The EMBO Journal*, 9(12), 3889–3892.
- HEDRICH, R., FLÜGGE, U., & FERNANDEZ, J. (1986). Patch-clamp studies of ion transport in isolated plant vacuoles. *FEBS Letters*, 204(2), 228–232.
- HEDRICH, R., & MARTEN, I. (1993). Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells. *The EMBO journal*, 12(3), 897–901.
- HEDRICH, R., & MARTEN, I. (2011). TPC1–SV channels gain shape. *Molecular Plant*, 4(3), 428–441.
- HEDRICH, R., MORAN, O., CONTI, F., BUSCH, H., BECKER, D., GAMBALE, F., DREYER, I., KÜCH, A., NEUWINGER, K., & PALME, K. (1995). Inward rectifier potassium channels in plants differ from their animal counterparts in response to voltage and channel modulators. *European Biophysics Journal*, 24(2), 107–115.

- HEDRICH, R., & NEHER, E. (1987a). Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature*, 329(6142), 833–835.
- HEDRICH, R., & NEHER, E. (1987b). Regulation of voltage-dependent ion channels in plant vacuoles by cytoplasmic calcium. *Nature*, 329, 833–835.
- HESCHELER, J., & SCHULTZ, G. (1993). Nonselective cation channels: physiological and pharmacological modulations of channel activity. In *Nonselective Cation Channels*, (pp. 27–43). Springer.
- HETHERINGTON, A. M., & QUATRANO, R. S. (1991). Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytologist*, 119(1), 9–12.
- HILLE, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes*, vol. 507. Sinauer Sunderland, MA.
- HIRAYAMA, T., & SHINOZAKI, K. (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science*, 12(8), 343–351.
- HIRSCHI, K. D., ZHEN, R.-G., CUNNINGHAM, K. W., REA, P. A., & FINK, G. R. (1996). CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16), 8782–8786.
- HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F., & KATZ, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *The Journal of Physiology*, 116(4), 424–448.
- HÖRAK, H., KOLLIST, H., & MERILO, E. (2017). Fern stomatal responses to ABA and CO₂ depend on species and growth conditions. *Plant Physiology*, 174(2), 672–679.
- HORSCH, R. B., FRY, J. E., HOFFMANN, N. L., EICHHOLTZ, D., ROGERS, S. G., & FRALEY, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227(4691), 1229–1231.
- HORTON, R. F. (1971). Stomatal opening: the role of abscisic acid. *Canadian Journal of Botany*, 49(4), 583–585.
- HOSHI, T. (1995). Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors. *The Journal of General Physiology*, 105(3), 309–328.
- HOSY, E., VAVASSEUR, A., MOULINE, K., DREYER, I., GAYMARD, F., PORÉE, F., BOUCHEREZ, J., LEBAUDY, A., BOUCHEZ, D., VÉRY, A.-A., ET AL. (2003). The

- Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5549–5554.
- HOU, C., TIAN, W., KLEIST, T., HE, K., GARCIA, V., BAI, F., HAO, Y., LUAN, S., & LI, L. (2014). DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes. *Cell Research*, 24(5), 632–635.
- HRABAK, E. M., CHAN, C. W., GRIBSKOV, M., HARPER, J. F., CHOI, J. H., HALFORD, N., KUDLA, J., LUAN, S., NIMMO, H. G., SUSSMAN, M. R., ET AL. (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology*, 132(2), 666–680.
- HUA, D., WANG, C., HE, J., LIAO, H., DUAN, Y., ZHU, Z., GUO, Y., CHEN, Z., & GONG, Z. (2012). A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid-and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(6), 2546–2561.
- HUANG, L., BERKELMAN, T., FRANKLIN, A. E., & HOFFMAN, N. E. (1993). Characterization of a gene encoding a Ca²⁺-ATPase-like protein in the plastid envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(21), 10066–10070.
- HUANG, S., WAADT, R., NUHKAT, M., KOLLIST, H., HEDRICH, R., & ROELFSEMA, M. R. G. (2019). Ca²⁺ signals in guard cells enhance the efficiency by which ABA triggers stomatal closure. *New Phytologist*, 224(1), 177–187.
- HUBBARD, K. E., SIEGEL, R. S., VALERIO, G., BRANDT, B., & SCHROEDER, J. I. (2011). Abscisic acid and CO₂ signalling via calcium sensitivity priming in guard cells, new CDPK mutant phenotypes and a method for improved resolution of stomatal stimulus–response analyses. *Annals of Botany*, 109(1), 5–17.
- HUBER, B. (1956). *Handbuch der Pflanzenphysiologie Encyclopedia of Plant Physiology*, chap. Die Gefäßleitung, (pp. 541–582). Springer.
- IKEGAMI, K., OKAMOTO, M., SEO, M., & KOSHIBA, T. (2009). Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *Journal of Plant Research*, 122(2), 235–243.
- IMES, D., MUMM, P., BÖHM, J., AL-RASHEID, K. A., MARTEN, I., GEIGER, D., & HEDRICH, R. (2013). Open stomata 1 (OST 1) kinase controls R-type anion channel QUAC 1 in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal*, 74(3), 372–382.

- INAMDAR, J., PATEL, R., & BHATT, D. (1971). Structure and development of stomata in some leptosporangiate ferns. *Annals of Botany*, 35(3), 643–651.
- INOUE, S.-I., & KINOSHITA, T. (2017). Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 174(2), 531–538.
- ISHIKAWA, H., AIZAWA, H., KISHIRA, H., OGAWA, T., & SAKATA, M. (1983). Light-induced changes of membrane potential in guard cells of *Vicia faba*. *Plant and Cell Physiology*, 24(4), 769–772.
- ISLAM, M. M., MUNEMASA, S., HOSSAIN, M. A., NAKAMURA, Y., MORI, I. C., & MURATA, Y. (2010). Roles of AtTPC1, vacuolar two pore channel 1, in Arabidopsis stomatal closure. *Plant and Cell Physiology*, 51(2), 302–311.
- IUCHI, S., KOBAYASHI, M., TAJI, T., NARAMOTO, M., SEKI, M., KATO, T., TABATA, S., KAKUBARI, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., & SHINOZAKI, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 27(4), 325–333.
- JAISWAL, J. (2001). Calcium—how and why? *Journal of Biosciences*, 26(3), 357–363.
- JAQUINOD, M., VILLIERS, F., KIEFFER-JAQUINOD, S., HUGOUVIEUX, V., BRULEY, C., GARIN, J., & BOURGUIGNON, J. (2007). A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(3), 394–412.
- JEANGUENIN, L., ALCON, C., DUBY, G., BOEGLIN, M., CHÉREL, I., GAILLARD, I., ZIMMERMANN, S., SENTENAC, H., & VÉRY, A.-A. (2011). AtKC1 is a general modulator of Arabidopsis inward Shaker channel activity. *The Plant Journal*, 67(4), 570–582.
- JENTSCH, T. J. (2008). CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(1), 3–36.
- JEZEK, M., & BLATT, M. R. (2017). The membrane transport system of the guard cell and its integration for stomatal dynamics. *Plant Physiology*, 174(2), 487–519.
- JONES, R. J., & MANSFIELD, T. (1970). Suppression of stomatal opening in leaves treated with abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 21(3), 714–719.

- JOSSIER, M., KRONIEWICZ, L., DALMAS, F., LE THIEC, D., EPHRITIKHINE, G., THOMINE, S., BARBIER-BRYGOO, H., VAVASSEUR, A., FILLEUR, S., & LEONHARDT, N. (2010). The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLC_c, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *The Plant Journal*, 64(4), 563–576.
- KELLER, B. U., HEDRICH, R., & RASCHKE, K. (1989). Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature*, 341(6241), 450–453.
- KIM, T., BÖHMER, M., HU, H., NISHIMURA, N., & SCHROEDER, J. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 561–591.
- KINOSHITA, T., DOI, M., SUETSUGU, N., KAGAWA, T., WADA, M., & SHIMAZAKI, K.-I. (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, 414(6864), 656–660.
- KLUGE, M., & TING, I. P. (2012). *Crassulacean acid metabolism: analysis of an ecological adaptation*, vol. 30. Springer Science & Business Media.
- KOERS, S., GUZEL-DEĞER, A., MARTEN, I., & ROELFSEMA, M. (2011). Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels. *The Plant Journal*, 68, 670–680.
- KOLB, C., NAGEL, M.-K., KALINOWSKA, K., HAGMANN, J., ICHIKAWA, M., ANZENBERGER, F., ALKOFER, A., SATO, M. H., BRAUN, P., & ISONO, E. (2015). Fyve1 is essential for vacuole biogenesis and intracellular trafficking in arabidopsis. *Plant physiology*, 167(4), 1361–1373.
- 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.
- KOLLIST, H., NUHKAT, M., & ROELFSEMA, M. R. G. (2014). Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytologist*, 203(1), 44–62.
- KOLUKISA OĞLU, Ü., WEINL, S., BLAZEVIĆ, D., BATIŠTIĆ, O., & KUDLA, J. (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiology*, 134(1), 43–58.
- KOMIS, G., LUPTOVČIAK, I., OVEČKA, M., SAMAKOVLI, D., ŠAMAJOVÁ, O., & ŠAMAJ, J. (2017). Katanin effects on dynamics of cortical microtubules and mitotic

- arrays in *Arabidopsis thaliana* revealed by advanced live-cell imaging. *Frontiers in Plant Science*, 8, 866.
- KONG, D., HU, H.-C., OKUMA, E., LEE, Y., LEE, H. S., MUNEMASA, S., CHO, D., JU, C., PEDOEIM, L., RODRIGUEZ, B., ET AL. (2016). L-Met activates Arabidopsis GLR Ca²⁺ channels upstream of ROS production and regulates stomatal movement. *Cell Reports*, 17(10), 2553–2561.
- KONRAD, K. R., MAIERHOFER, T., & HEDRICH, R. (2018). Spatio-temporal aspects of Ca²⁺ signalling: lessons from guard cells and pollen tubes. *Journal of Experimental Botany*, 69(17), 4195–4214.
- KOSTER, K. L., BALSAMO, R. A., ESPINOZA, C., & OLIVER, M. J. (2010). Desiccation sensitivity and tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: assessing limits and damage. *Plant Growth Regulation*, 62(3), 293–302.
- KUDLA, J., BATISTIČ, O., & HASHIMOTO, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell*, 22(3), 541–563.
- KUDLA, J., XU, Q., HARTER, K., GRUISSEM, W., & LUAN, S. (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4718–4723.
- KUHN, J. M., BOISSON-DERNIER, A., DIZON, M. B., MAKTABI, M. H., & SCHROEDER, J. I. (2006). The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in Arabidopsis, and effects of abh1 on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiology*, 140(1), 127–139.
- KUO, M. M.-C., SAIMI, Y., KUNG, C., & CHOE, S. (2007). Patch clamp and phenotypic analyses of a prokaryotic cyclic nucleotide-gated K⁺ channel using *Escherichia coli* as a host. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24294–24301.
- KURUSU, T., KUCHITSU, K., NAKANO, M., NAKAYAMA, Y., & IIDA, H. (2013). Plant mechanosensing and Ca²⁺ transport. *Trends in Plant Science*, 18(4), 227–233.
- KURUSU, T., NISHIKAWA, D., YAMAZAKI, Y., GOTOH, M., NAKANO, M., HAMADA, H., YAMANAKA, T., IIDA, K., NAKAGAWA, Y., SAJI, H., ET AL. (2012). Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca²⁺ influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells. *BMC Plant Biology*, 12(1), 11.

- KWAK, J. M., MORI, I. C., PEI, Z.-M., LEONHARDT, N., TORRES, M. A., DANGL, J. L., BLOOM, R. E., BODDE, S., JONES, J. D., & SCHROEDER, J. I. (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 22(11), 2623–2633.
- LAANEMETS, K., BRANDT, B., LI, J., MERILO, E., WANG, Y.-F., KESHWANI, M. M., TAYLOR, S. S., KOLLIST, H., & SCHROEDER, J. I. (2013). Calcium-dependent and-independent stomatal signaling network and compensatory feedback control of stomatal opening via Ca²⁺ sensitivity priming. *Plant Physiology*, 163, 504–513.
- LACOMBE, B., BECKER, D., HEDRICH, R., DESALLE, R., HOLLMANN, M., KWAK, J. M., SCHROEDER, J. I., LE NOVÈRE, N., NAM, H. G., SPALDING, E. P., ET AL. (2001). The identity of plant glutamate receptors. *Science*, 292(5521), 1486–1487.
- LAM, H.-M., CHIU, J., HSIEH, M.-H., MEISEL, L., OLIVEIRA, I. C., SHIN, M., & CORUZZI, G. (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*, 396(6707), 125–126.
- LANGEBARTELS, C., ERNST, D., KANGASJÄRVI, J., & SANDERMANN JR, H. (2000). [47] Ozone effects on plant defense. In *Methods in Enzymology*, vol. 319, (pp. 520–535). Elsevier.
- LATZ, A., BECKER, D., HEKMAN, M., MÜLLER, T., BEYHL, D., MARTEN, I., EING, C., FISCHER, A., DUNKEL, M., BERTEL, A., ET AL. (2007). TPK1, a Ca²⁺-regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore K⁺ channel is activated by 14-3-3 proteins. *The Plant Journal*, 52(3), 449–459.
- LEBAUDY, A., VAVASSEUR, A., HOSY, E., DREYER, I., LEONHARDT, N., THIBAUD, J.-B., VÉRY, A.-A., SIMONNEAU, T., & SENTENAC, H. (2008). Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13), 5271–5276.
- LEBAUDY, A., VÉRY, A.-A., & SENTENAC, H. (2007). K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Letters*, 581(12), 2357–2366.
- LECKIE, C. P., MCAINSH, M. R., ALLEN, G. J., SANDERS, D., & HETHERINGTON, A. M. (1998). Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15837–15842.
- LEE, C. P., MAKSAEV, G., JENSEN, G. S., MURCHA, M. W., WILSON, M. E., FRICKER, M., HELL, R., HASWELL, E. S., MILLAR, A. H., & SWEETLOVE, L. J.

- (2016). MSL 1 is a mechanosensitive ion channel that dissipates mitochondrial membrane potential and maintains redox homeostasis in mitochondria during abiotic stress. *The Plant Journal*, 88(5), 809–825.
- LEE, K. H., PIAO, H. L., KIM, H.-Y., CHOI, S. M., JIANG, F., HARTUNG, W., HWANG, I., KWAK, J. M., LEE, I.-J., & HWANG, I. (2006). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell*, 126(6), 1109–1120.
- LEE, S. C., LAN, W., BUCHANAN, B. B., & LUAN, S. (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21419–21424.
- LEE, S. M., KIM, H. S., HAN, H. J., MOON, B. C., KIM, C. Y., HARPER, J. F., & CHUNG, W. S. (2007). Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited Ca^{2+} -ATPase (ACA11) that is localized to vacuole membranes in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 581(21), 3943–3949.
- LEIGH, R. A. (2001). Potassium homeostasis and membrane transport. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164(2), 193–198.
- LEONHARDT, N., KWAK, J. M., ROBERT, N., WANER, D., LEONHARDT, G., & SCHROEDER, J. I. (2004). Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *The Plant Cell*, 16(3), 596–615.
- LEUNG, J., BOUVIER-DURAND, M., MORRIS, P.-C., GUERRIER, D., CHEFDOR, F., & GIRAUDAT, J. (1994). *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, 264(5164), 1448–1452.
- LEUNG, J., MERLOT, S., & GIRAUDAT, J. (1997). The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *The Plant Cell*, 9(5), 759–771.
- LEVCHENKO, V., GUINOT, D., KLEIN, M., ROELFSEMA, M., HEDRICH, R., & DIETRICH, P. (2008). Stringent control of cytoplasmic Ca^{2+} in guard cells of intact plants compared to their counterparts in epidermal strips or guard cell protoplasts. *Protoplasma*, 233(1-2), 61–72.
- LEVCHENKO, V., KONRAD, K. R., DIETRICH, P., ROELFSEMA, M. R. G., & HEDRICH, R. (2005). Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without

- preceding Ca²⁺ signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(11), 4203–4208.
- LEW, R. R. (2004). Osmotic effects on the electrical properties of Arabidopsis root hair vacuoles in situ. *Plant Physiology*, 134(1), 352–360.
- LEYMARIE, J., LASCEVE, G., & VAVASSEUR, A. (1999). Elevated CO₂ enhances stomatal responses to osmotic stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 22(3), 301–308.
- LEYMARIE, J., VAVASSEUR, A., & LASCÈVE, G. (1998). CO₂ sensing in stomata of *abi1-1* and *abi2-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(7), 539–543.
- LI, J., WANG, X.-Q., WATSON, M. B., & ASSMANN, S. M. (2000). Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science*, 287(5451), 300–303.
- LI, X., CHANROJ, S., WU, Z., ROMANOWSKY, S. M., HARPER, J. F., & SZE, H. (2008). A distinct endosomal Ca²⁺/Mn²⁺ pump affects root growth through the secretory process. *Plant Physiology*, 147(4), 1675–1689.
- LIANG, F., CUNNINGHAM, K. W., HARPER, J. F., & SZE, H. (1997). ECA1 complements yeast mutants defective in Ca²⁺ pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca²⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(16), 8579–8584.
- LIM, C., BAEK, W., JUNG, J., KIM, J.-H., & LEE, S. (2015). Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15251–15270.
- LIN, Z., LI, Y., ZHANG, Z., LIU, X., HSU, C.-C., DU, Y., SANG, T., ZHU, C., WANG, Y., SATHEESH, V., ET AL. (2020). A RAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. *Nature Communications*, 11(1), 1–10.
- LIND, C., DREYER, I., LÓPEZ-SANJURJO, E. J., VON MEYER, K., ISHIZAKI, K., KOHCHI, T., LANG, D., ZHAO, Y., KREUZER, I., AL-RASHEID, K. A., ET AL. (2015). Stomatal guard cells co-opted an ancient ABA-dependent desiccation survival system to regulate stomatal closure. *Current Biology*, 25(7), 928–935.
- LINDER, B., & RASCHKE, K. (1992). A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Letters*, 313(1), 27–30.

- LIU, K., & LUAN, S. (1998). Voltage-dependent K⁺ channels as targets of osmosensing in guard cells. *The Plant Cell*, 10(11), 1957–1970.
- LIU, Y., MAIERHOFER, T., RYBAK, K., SKLENAR, J., BREAKSPEAR, A., JOHNSTON, M. G., FLIEGMANN, J., HUANG, S., ROELFSEMA, M. R. G., FELIX, G., ET AL. (2019). Anion channel SLAH3 is a regulatory target of chitin receptor-associated kinase PBL27 in microbial stomatal closure. *eLife*, 8, e44474.
- LOCK, J. T., PARKER, I., & SMITH, I. F. (2015). A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicators for imaging local Ca²⁺ signals in cultured cells. *Cell Calcium*, 58(6), 638–648.
- LOGAN, D. C., & KNIGHT, M. R. (2003). Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiology*, 133(1), 21–24.
- LUAN, S. (2009). The CBL–CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in Plant Science*, 14(1), 37–42.
- LUCAS, J. R., & RENZAGLIA, K. S. (2002). Structure and function of hornwort stomata. *Microscopy and Microanalysis*, 8(S02), 1090–1091.
- LUCAS, W. J., & LEE, J.-Y. (2004). Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(9), 712–726.
- MA, J., GORYAYNOV, A., SARMA, A., & YANG, W. (2012). Self-regulated viscous channel in the nuclear pore complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19), 7326–7331.
- MA, Y., SZOSTKIEWICZ, I., KORTE, A., MOES, D., YANG, Y., CHRISTMANN, A., & GRILL, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930), 1064–1068.
- MAATHUIS, F. J. (2011). Vacuolar two-pore K⁺ channels act as vacuolar osmosensors. *New Phytologist*, 191(1), 84–91.
- MACALISTER, C. A., & BERGMANN, D. C. (2011). Sequence and function of basic helix–loop–helix proteins required for stomatal development in *Arabidopsis* are deeply conserved in land plants. *Evolution & Development*, 13(2), 182–192.
- MACALISTER, C. A., OHASHI-ITO, K., & BERGMANN, D. C. (2007). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, 445(7127), 537–540.

- MACROBBIE, E. (1987). Ionic Relations of Guard Cells. In *Stomatal Function*, (pp. 125–162). Stanford University Press.
- MACROBBIE, E. A. (2006). Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 1135–1140.
- MAIERHOFER, T. (2012). *Funktionelle Charakterisierung von SLAC1-homologen Anionenkanälen aus Arabidopsis thaliana*. Ph.D. thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- MANSFIELD, T., & JONES, R. J. (1971). Effects of abscisic acid on potassium uptake and starch content of stomatal guard cells. *Planta*, 101(2), 147–158.
- MANSFIELD, T., & WILLMER, C. (1969). Stomatal Responses to light and carbon dioxide in the Hart's-Tongue Fern, *Phyllitis scolopendrium*, NEWM. *New Phytologist*, 68(1), 63–66.
- MARMONT, G. (1949). Studies on the axon membrane. I. A new method. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 34(3), 351–382.
- MARŠÁLEK, B., ZAHRADNÍČKOVÁ, H., & HRONKOVÁ, M. (1992). Extracellular production of abscisic acid by soil algae under salt, acid or drought stress. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 47c(9-10), 701–704.
- MARTEN, H. (2008). *Rolle und Regulation von Anionenkanälen während der Stomabewegung als Reaktion auf Licht, CO₂ und Wasserstress*. Ph.D. thesis, Julius-Maximilians-Universität.
- MARTEN, H., HEDRICH, R., & ROELFSEMA, M. R. G. (2007a). Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner. *The Plant Journal*, 50(1), 29–39.
- MARTEN, H., KONRAD, K., DIETRICH, P., ROELFSEMA, M., & HEDRICH, R. (2007b). Ca²⁺-dependent and-independent abscisic acid activation of plasma membrane anion channels in guard cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology*, 143(1), 28–37.
- MATASCI, N., HUNG, L.-H., YAN, Z., CARPENTER, E. J., WICKETT, N. J., MIRARAB, S., NGUYEN, N., WARNOW, T., AYYAMPALAYAM, S., BARKER, M., ET AL. (2014). Data access for the 1,000 Plants (1KP) project. *Gigascience*, 3(1), 17.

- MATSUOKA, K., HIGUCHI, T., MAESHIMA, M., & NAKAMURA, K. (1997). A vacuolar-type H⁺-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *The Plant Cell*, 9(4), 533–546.
- MAUREL, C., BOURSAC, Y., LUU, D.-T., SANTONI, V., SHAHZAD, Z., & VERDOUCQ, L. (2015). Aquaporins in plants. *Physiological Reviews*, 95(4), 1321–1358.
- MAUREL, C., TACNET, F., GÜCLÜ, J., GUERN, J., & RIPOCHE, P. (1997). Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 7103–7108.
- MCADAM, S. A., & BRODRIBB, T. J. (2012). Fern and lycophyte guard cells do not respond to endogenous abscisic acid. *The Plant Cell Online*, 24(4), 1510–1521.
- MCADAM, S. A., & BRODRIBB, T. J. (2013). Ancestral stomatal control results in a canalization of fern and lycophyte adaptation to drought. *New Phytologist*, 198(2), 429–441.
- MCADAM, S. A., & BRODRIBB, T. J. (2015). The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapor pressure deficit. *Plant Physiology*, 167(3), 833–843.
- MCADAM, S. A., & BRODRIBB, T. J. (2016). Linking turgor with ABA biosynthesis: implications for stomatal responses to vapor pressure deficit across land plants. *Plant Physiology*, 171(3), 2008–2016.
- MCADAM, S. A. M., BRODRIBB, T. J., BANKS, J. A., HEDRICH, R., ATALLAH, N. M., CAI, C., GERINGER, M. A., LIND, C., NICHOLS, D. S., STACHOWSKI, K., GEIGER, D., & SUSSMILCH, F. C. (2016). Abscisic acid controlled sex before transpiration in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(45), 12862–12867.
- MCAINSH, M. R. (1990). Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca²⁺ precedes stomatal closure. *Nature*, 343(6254), 186–188.
- MCAINSH, M. R., & HETHERINGTON, A. M. (1998). Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. *Trends in Plant Science*, 3(1), 32–36.
- MCAINSH, M. R., WEBB, A. A., TAYLOR, J. E., & HETHERINGTON, A. M. (1995). Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. *The Plant Cell*, 7(8), 1207–1219.

- MCCORMACK, E., TSAI, Y.-C., & BRAAM, J. (2005). Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends in Plant Science*, *10*(8), 383–389.
- MEINHARD, M., RODRIGUEZ, P. L., & GRILL, E. (2002). The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta*, *214*(5), 775–782.
- MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., KOCZAN, J., NOMURA, K., & HE, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, *126*(5), 969–980.
- MERCED, A., & RENZAGLIA, K. (2014). Developmental changes in guard cell wall structure and pectin composition in the moss *Funaria*: implications for function and evolution of stomata. *Annals of Botany*, *114*(5), 1001–1010.
- MERCED, A., & RENZAGLIA, K. S. (2017). Structure, function and evolution of stomata from a bryological perspective. *Bryophyte Diversity and Evolution*, *39*(1), 7–20.
- MERCED, A., & RENZAGLIA, K. S. (2018). Contrasting pectin polymers in guard cell walls of *Arabidopsis* and the hornwort *Phaeoceros* reflect physiological differences. *Annals of Botany*, *123*(4), 579–585.
- MERILO, E., LAANEMETS, K., HU, H., XUE, S., JAKOBSON, L., TULVA, I., GONZALEZ-GUZMAN, M., RODRIGUEZ, P. L., SCHROEDER, J. I., BROSCHE, M., ET AL. (2013). PYR/RCAR receptors contribute to ozone-, reduced air humidity-, darkness-, and CO₂-induced stomatal regulation. *Plant Physiology*, *162*(3), 1652–1668.
- MERLOT, S., GOSTI, F., GUERRIER, D., VAVASSEUR, A., & GIRAUDAT, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant Journal*, *25*(3), 295–303.
- MERLOT, S., MUSTILLI, A.-C., GENTY, B., NORTH, H., LEFEBVRE, V., SOTTA, B., VAVASSEUR, A., & GIRAUDAT, J. (2002). Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *The Plant Journal*, *30*(5), 601–609.
- MEYER, K., LEUBE, M. P., & GRILL, E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, *264*(5164), 1452–1455.
- MEYER, S., MUMM, P., IMES, D., ENDLER, A., WEDER, B., AL-RASHEID, K. A., GEIGER, D., MARTEN, I., MARTINOIA, E., & HEDRICH, R. (2010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal*, *63*(6), 1054–1062.

- MEYER, S., SCHOLZ-STARKE, J., DE ANGELI, A., KOVERMANN, P., BURLA, B., GAMBALE, F., & MARTINOIA, E. (2011). Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *The Plant Journal*, 67(2), 247–257.
- MEYERHOFF, O., MÜLLER, K., ROELFSEMA, M. R. G., LATZ, A., LACOMBE, B., HEDRICH, R., DIETRICH, P., & BECKER, D. (2005). AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta*, 222(3), 418–427.
- MILLS, R. F., DOHERTY, M. L., LÓPEZ-MARQUÉS, R. L., WEIMAR, T., DUPREE, P., PALMGREN, M. G., PITTMAN, J. K., & WILLIAMS, L. E. (2008). ECA3, a Golgi-localized P2A-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(1), 116–128.
- MINAMI, A., NAGAO, M., ARAKAWA, K., FUJIKAWA, S., & TAKEZAWA, D. (2003). Abscisic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *Journal of Plant Physiology*, 160(5), 475–483.
- MITTELHEUSER, C. J., & VAN STEVENINCK, R. (1969). Stomatal closure and inhibition of transpiration induced by (RS)-abscisic acid. *Nature*, 221(5177), 281–282.
- MORI, I. C., MURATA, Y., YANG, Y., MUNEMASA, S., WANG, Y.-F., ANDREOLI, S., TIRIAC, H., ALONSO, J. M., HARPER, J. F., ECKER, J. R., ET AL. (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biology*, 4(10), e327.
- MORI, K., RENHU, N., NAITO, M., NAKAMURA, A., SHIBA, H., YAMAMOTO, T., SUZAKI, T., IIDA, H., & MIURA, K. (2018). Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 mediate cold-induced cytosolic Ca²⁺ increase and cold tolerance in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 8, 550.
- MOSHELION, M., MORAN, N., & CHAUMONT, F. (2004). Dynamic changes in the osmotic water permeability of protoplast plasma membrane. *Plant Physiology*, 135(4), 2301–2317.
- MÜLLER, H. M., SCHÄFER, N., BAUER, H., GEIGER, D., LAUTNER, S., FROMM, J., RIEDERER, M., BUENO, A., NUSSBAUMER, T., MAYER, K., ET AL. (2017). The desert plant *Phoenix dactylifera* closes stomata via nitrate-regulated SLAC 1 anion channel. *New Phytologist*, 216(1), 150–162.

- MUMM, P., WOLF, T., FROMM, J., ROELFSEMA, M. R. G., & MARTEN, I. (2011). Cell type-specific regulation of ion channels within the maize stomatal complex. *Plant and Cell Physiology*, 52(8), 1365–1375.
- MUNEMASA, S., HAUSER, F., PARK, J., WAADT, R., BRANDT, B., & SCHROEDER, J. I. (2015). Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 154–162.
- MUNEMASA, S., ODA, K., WATANABE-SUGIMOTO, M., NAKAMURA, Y., SHIMOISHI, Y., & MURATA, Y. (2007). The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in Arabidopsis guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiology*, 143(3), 1398–1407.
- MURATA, Y., PEI, Z.-M., MORI, I. C., & SCHROEDER, J. (2001). Abscisic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *The Plant Cell*, 13(11), 2513–2523.
- MUSTILLI, A.-C., MERLOT, S., VAVASSEUR, A., FENZI, F., & GIRAUDAT, J. (2002). Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant Cell*, 14(12), 3089–3099.
- NAKAMURA, R. L., MCKENDREE JR, 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 Physiology*, 109(2), 371–374.
- NEGI, J., MATSUDA, O., NAGASAWA, T., OBA, Y., TAKAHASHI, H., KAWAIYAMADA, M., UCHIMIYA, H., HASHIMOTO, M., & IBA, K. (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*, 452(7186), 483–486.
- NG, B., & BARRY, P. H. (1995). The measurement of ionic conductivities and mobilities of certain less common organic ions needed for junction potential corrections in electrophysiology. *Journal of Neuroscience Methods*, 56(1), 37–41.
- NIEMIETZ, C. M., & TYERMAN, S. D. (1997). Characterization of water channels in wheat root membrane vesicles. *Plant Physiology*, 115(2), 561–567.

- NIMIGEAN, C. M., SHANE, T., & MILLER, C. (2004). A cyclic nucleotide modulated prokaryotic K⁺ channel. *The Journal of General Physiology*, 124(3), 203–210.
- NOUR-ELDIN, H. H., HANSEN, B. G., NØRHOLM, M. H., JENSEN, J. K., & HALKIER, B. A. (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Research*, 34(18), e122–e122.
- OHASHI-ITO, K., & BERGMANN, D. C. (2006). *Arabidopsis* FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *The Plant Cell*, 18(10), 2493–2505.
- OPARKA, K. J., & ROBERTS, A. G. (2001). Plasmodesmata. A not so open-and-shut case. *Plant Physiology*, 125(1), 123–126.
- OREOPOULOS, J., BERMAN, R., & BROWNE, M. (2014). Spinning-disk confocal microscopy: present technology and future trends. In *Methods in Cell Biology*, vol. 123, (pp. 153–175). Elsevier.
- OSAKABE, Y., ARINAGA, N., UMEZAWA, T., KATSURA, S., NAGAMACHI, K., TANAKA, H., OHIRAKI, H., YAMADA, K., SEO, S.-U., ABO, M., ET AL. (2013). Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26, 609–624.
- OUTLAW, W. H., & LOWRY, O. H. (1977). Organic acid and potassium accumulation in guard cells during stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(10), 4434–4438.
- OUTLAW, W. H., & MANCHESTER, J. (1979). Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. *Plant Physiology*, 64(1), 79–82.
- PALEVITZ, B., & HEPLER, P. (1985). Changes in dye coupling of stomatal cells of *Allium* and *Commelina* demonstrated by microinjection of Lucifer yellow. *Planta*, 164(4), 473–479.
- PANDEY, S., ZHANG, W., & ASSMANN, S. M. (2007). Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters*, 581(12), 2325–2336.
- PAPAZIAN, D., SCHWARZ, T., TEMPEL, B., JAN, Y., & JAN, L. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*, 237(4816), 749–753.
- PARK, S.-Y., FUNG, P., NISHIMURA, N., JENSEN, D. R., FUJII, H., ZHAO, Y., LUMBA, S., SANTIAGO, J., RODRIGUES, A., TSZ-FUNG, F. C., ET AL. (2009). Abscisic

- acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324(5930), 1068–1071.
- PATON, J. A., & PEARCE, J. V. (1957). The occurrence, structure and functions of the stomata in British bryophytes. *Transactions of the British Bryological Society*, 3(2), 228–259.
- PEI, Z.-M., KUCHITSU, K., WARD, J. M., SCHWARZ, M., & SCHROEDER, J. I. (1997). Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *The Plant Cell*, 9(3), 409–423.
- PEI, Z.-M., MURATA, Y., BENNING, G., THOMINE, S., KLÜSENER, B., ALLEN, G. J., GRILL, E., & SCHROEDER, J. I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406(6797), 731–734.
- PEITER, E., MAATHUIS, F. J., MILLS, L. N., KNIGHT, H., PELLOUX, J., HETHERINGTON, A. M., & SANDERS, D. (2005). The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature*, 434(7031), 404–408.
- PENNY, M., KELDAY, L., & BOWLING, D. (1976). Active chloride transport in the leaf epidermis of *Commelina communis* in relation to stomatal activity. *Planta*, 130(3), 291–294.
- PEROCHON, A., ALDON, D., GALAUD, J.-P., & RANTY, B. (2011). Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. *Biochimie*, 93(12), 2048–2053.
- PIERCE, M., & RASCHKE, K. (1980). Correlation between loss of turgor and accumulation of abscisic acid in detached leaves. *Planta*, 148(2), 174–182.
- PITTMAN, J., & HIRSCHI, K. (2016). CAX-ing a wide net: Cation/H⁺ transporters in metal remediation and abiotic stress signalling. *Plant Biology*, 18(5), 741–749.
- PORSCH, O. (1905). *Der Spaltöffnungsapparat im Lichte der Phylogenie*. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- PRESSEL, S., RENZAGLIA, K. S., CLYMO, R. S., & DUCKETT, J. G. (2018). Hornwort stomata do not respond actively to exogenous and environmental cues. *Annals of Botany*, 122(1), 45–57.
- PRICE, M. B., JELESKO, J., & OKUMOTO, S. (2012). Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins. *Frontiers in Plant Science*, 3, 235.

- QI, Z., STEPHENS, N. R., & SPALDING, E. P. (2006). Calcium entry mediated by GLR3.3, an Arabidopsis glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiology*, 142(3), 963–971.
- QIU, Y.-L., LI, L., WANG, B., CHEN, Z., KNOOP, V., GROTH-MALONEK, M., DOMBROVSKA, O., LEE, J., KENT, L., REST, J., ET AL. (2006). The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15511–15516.
- QUINTERO, F. J., BLATT, M. R., & PARDO, J. M. (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters 1. *FEBS Letters*, 471(2-3), 224–228.
- RAGHAVENDRA, A. (1980). Chloride and nitrate stimulate stomatal opening and decrease potassium uptake and malate production in epidermal tissues of *Commelina benghalensis*. *Functional Plant Biology*, 7(6), 663–669.
- RANF, S., WÜNNENBERG, P., LEE, J., BECKER, D., DUNKEL, M., HEDRICH, R., SCHEEL, D., & DIETRICH, P. (2008). Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca²⁺ signals induced by abiotic and biotic stresses. *The Plant Journal*, 53(2), 287–299.
- RASBAND, W. (1997–2018). Imagej. Bethesda, MD: US National Institutes of Health. URL <https://imagej.nih.gov/ij/>
- RASCHKE, K. (1975). Simultaneous requirement of carbon dioxide and abscisic acid for stomatal closing in *Xanthium strumarium* L. *Planta*, 125(3), 243–259.
- 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(1), 84–87.
- RAVEN, J. A. (2002). Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist*, 153(3), 371–386.
- REINTANZ, B., SZYROKI, A., IVASHIKINA, N., ACHE, P., GODDE, M., BECKER, D., PALME, K., & HEDRICH, R. (2002). AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel α -subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 4079–4084.
- RENZAGLIA, K. S., VILLARREAL, J. C., PIATKOWSKI, B. T., LUCAS, J. R., & MERCED, A. (2017). Hornwort stomata: architecture and fate shared with 400-million-year-old fossil plants without leaves. *Plant Physiology*, 174(2), 788–797.

- 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), 647–656.
- ROBARDS, A. W., & GUNNING, B. E. (1976). *Intercellular communication in plants: studies on plasmodesmata*. Springer-Verlag.
- ROBERTS, A., & OPARKA, K. (2003). Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell & Environment*, 26(1), 103–124.
- RODRIGUEZ, P. L. (1998). Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 38(6), 919–927.
- ROELFSEMA, M., & HEDRICH, R. (2005). In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist*, 167(3), 665–691.
- ROELFSEMA, M., & HEDRICH, R. (2010). Making sense out of Ca²⁺ signals: their role in regulating stomatal movements. *Plant, Cell & Environment*, 33(3), 305–321.
- ROELFSEMA, M., HEDRICH, R., & GEIGER, D. (2012). Anion channels: master switches of stress responses. *Trends in Plant Science*, 17(4), 221–229.
- ROELFSEMA, M., STEINMEYER, R., STAAL, M., & HEDRICH, R. (2001). Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant Journal*, 26(1), 1–13.
- ROELFSEMA, M. R. G., HANSTEIN, S., FELLE, H. H., & HEDRICH, R. (2002). CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *The Plant Journal*, 32(1), 65–75.
- ROELFSEMA, M. R. G., LEVCHENKO, V., & HEDRICH, R. (2004). ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *The Plant Journal*, 37(4), 578–588.
- ROELFSEMA, M. R. G., & PRINS, H. B. (1997). Ion channels in guard cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 202(1), 18–27.
- RUI, Y., & ANDERSON, C. T. (2016). Functional analysis of cellulose and xyloglucan in the walls of stomatal guard cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 170(3), 1398–1419.
- RUSZALA, E. M., BEERLING, D. J., FRANKS, P. J., CHATER, C., CASSON, S. A., GRAY, J. E., & HETHERINGTON, A. M. (2011). Land plants acquired active stomatal control early in their evolutionary history. *Current Biology*, 21(12), 1030–1035.

- SACK, F. D. (1987). The development and structure of stomata. In E. Zeiger, G. D. Farquhar, & I. Cowan (Eds.) *Stomatal Function*. Stanford University Press Stanford, CA.
- SACK, F. D., & PAOLILLO JR, D. (1985). Incomplete cytokinesis in *Funaria* stomata. *American Journal of Botany*, 72(9), 1325–1333.
- SAEZ, A., APOSTOLOVA, N., GONZALEZ-GUZMAN, M., GONZALEZ-GARCIA, M. P., NICOLAS, C., LORENZO, O., & RODRIGUEZ, P. L. (2004). Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *The Plant Journal*, 37(3), 354–369.
- SAGER, R., & LEE, J.-Y. (2014). Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6337–6358.
- SAKATA, Y., KOMATSU, K., & TAKEZAWA, D. (2014). ABA as a universal plant hormone. In *Progress in Botany*, (pp. 57–96). Springer.
- SAMPATHKUMAR, A., LINDEBOOM, J. J., DEBOLT, S., GUTIERREZ, R., EHRHARDT, D. W., KETELAAR, T., & PERSSON, S. (2011). Live cell imaging reveals structural associations between the actin and microtubule cytoskeleton in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(6), 2302–2313.
- SANDERS, D., BROWNLEE, C., & HARPER, J. F. (1999). Communicating with calcium. *The Plant Cell*, 11(4), 691–706.
- SANDERS, D., PELLOUX, J., BROWNLEE, C., & HARPER, J. F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell Online*, 14(suppl 1), S401–S417.
- SANTELIA, D., & LAWSON, T. (2016). Rethinking guard cell metabolism. *Plant Physiology*, 172(3), 1371–1392.
- SARUHASHI, M., GHOSH, T. K., ARAI, K., ISHIZAKI, Y., HAGIWARA, K., KOMATSU, K., SHIWA, Y., IZUMIKAWA, K., YOSHIKAWA, H., UMEZAWA, T., ET AL. (2015). Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(46), E6388–E6396.
- SASAKI, T., MORI, I. C., FURUICHI, T., MUNEMASA, S., TOYOOKA, K., MATSUOKA, K., MURATA, Y., & YAMAMOTO, Y. (2010). Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. *Plant and Cell Physiology*, 51(3), 354–365.

- SASAKI, T., YAMAMOTO, Y., EZAKI, B., KATSUHARA, M., AHN, S. J., RYAN, P. R., DELHAIZE, E., & MATSUMOTO, H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal*, 37(5), 645–653.
- SATO, A., SATO, Y., FUKAO, Y., FUJIWARA, M., UMEZAWA, T., SHINOZAKI, K., HIBI, T., TANIGUCHI, M., MIYAKE, H., GOTO, D. B., ET AL. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochemical Journal*, 424(3), 439–448.
- SCHACHTMAN, D. P., SCHROEDER, J. I., LUCAS, W. J., ANDERSON, J. A., & GABER, R. F. (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science*, 258(5088), 1654–1658.
- SCHERZER, S. (2012). *Biophysikalische Analyse und Rekonstitution des schnellen ABA-Signaltransduktionsweges aus Arabidopsis thaliana*. Ph.D. thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- SCHERZER, S., MAIERHOFER, T., AL-RASHEID, K. A., GEIGER, D., & HEDRICH, R. (2012). Multiple calcium-dependent kinases modulate ABA-activated guard cell anion channels. *Molecular Plant*, 5(6), 1409–1412.
- SCHEURING, D., SCHÖLLER, M., KLEINE-VEHN, J., & LÖFKE, C. (2015). Vacuolar staining methods in plant cells. In *Plant Cell Expansion*, (pp. 83–92). Springer.
- SCHIØTT, M., ROMANOWSKY, S. M., BÆKGAARD, L., JAKOBSEN, M. K., PALMGREN, M. G., & HARPER, J. F. (2004). A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(25), 9502–9507.
- SCHMIDT, C., SCHELLE, I., LIAO, Y.-J., & SCHROEDER, J. I. (1995). Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(21), 9535–9539.
- SCHMIDT, C., & SCHROEDER, J. I. (1994). Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells (large nitrate permeability). *Plant Physiology*, 106(1), 383–391.
- SCHÖNKNECHT, G. (2013). Calcium signals from the vacuole. *Plants*, 2(4), 589–614.

- SCHÖNKNECHT, G., SPOORMAKER, P., STEINMEYER, R., BRÜGGEMAN, L., ACHE, P., DUTTA, R., REINTANZ, B., GODDE, M., HEDRICH, R., & PALME, K. (2002). KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel. *FEBS Letters*, 511(1-3), 28–32.
- SCHROEDER, J., HEDRICH, R., & FERNANDEZ, J. (1984). Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, 312(5992), 361–362.
- SCHROEDER, J. I. (1988). K⁺ transport properties of K⁺ channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *The Journal of General Physiology*, 92(5), 667–683.
- SCHROEDER, J. I., ALLEN, G. J., HUGOUVIEUX, V., KWAK, J. M., & WANER, D. (2001). Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1), 627–658.
- SCHROEDER, J. I., & HAGIWARA, S. (1989). Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature*, 338(6214), 427–430.
- SCHROEDER, J. I., & HAGIWARA, S. (1990). Repetitive increases in cytosolic Ca²⁺ of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca²⁺ permeable channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(23), 9305–9309.
- SCHROEDER, J. I., & KELLER, B. U. (1992). Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(11), 5025–5029.
- SCHROEDER, J. I., RASCHKE, K., & NEHER, E. (1987). Voltage dependence of k⁺ channels in guard-cell protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(12), 4108–4112.
- SCHWARTZ, A., ILAN, N., & GRANTZ, D. A. (1988). Calcium effects on stomatal movement in *Commelina communis* L.: use of EGTA to modulate stomatal response to light, KCl and CO₂. *Plant Physiology*, 87(3), 583–587.
- SENTENAC, H., BONNEAUD, N., MINET, M., LACROUTE, F., SALMON, J.-M., GAYMARD, F., & GRIGNON, C. (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*, 256(5057), 663–665.
- SHEEN, J. (1998). Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3), 975–980.

- SHI, J., KIM, K.-N., RITZ, O., ALBRECHT, V., GUPTA, R., HARTER, K., LUAN, S., & KUDLA, J. (1999). Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 11(12), 2393–2405.
- SHIGAKI, T., & HIRSCHI, K. (2006). Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H⁺ exchangers in plants. *Plant Biology*, 8(04), 419–429.
- SHIMAZAKI, K., IINO, M., & ZEIGER, E. (1986). Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, 319(6051), 324–326.
- SHOPE, J. C., DEWALD, D. B., & MOTT, K. A. (2003). Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization. *Plant Physiology*, 133(3), 1314–1321.
- SIEGEL, R. S., XUE, S., MURATA, Y., YANG, Y., NISHIMURA, N., WANG, A., & SCHROEDER, J. I. (2009). Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K⁺ channels in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal*, 59(2), 207–220.
- SIERLA, M., HÖRAK, H., OVERMYER, K., WASZCZAK, C., YARMOLINSKY, D., MAIERHOFER, T., VAINONEN, J. P., SALOJÄRVI, J., DENESSIOUK, K., LAANEMETS, K., ET AL. (2018). The receptor-like pseudokinase GHR1 is required for stomatal closure. *The Plant Cell*, 30(11), 2813–2837.
- SIMEUNOVIC, A., MAIR, A., WURZINGER, B., & TEIGE, M. (2016). Know where your clients are: subcellular localization and targets of calcium-dependent protein kinases. *Journal of Experimental Botany*, 67(13), 3855–3872.
- SIRICHANDRA, C., GU, D., HU, H.-C., DAVANTURE, M., LEE, S., DJAOUI, M., VALLOT, B., ZIVY, M., LEUNG, J., MERLOT, S., ET AL. (2009). Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Letters*, 583(18), 2982–2986.
- SITTE, P., ZIEGLER, H., EHRENDORFER, F., & BRESINSKY, A. (1998). *Strasburger Lehrbuch der Botanik*. G. Fischer.
- SNEDDEN, W. A., & FROMM, H. (2001). Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist*, 151(1), 35–66.
- STAEL, S., WURZINGER, B., MAIR, A., MEHLMER, N., VOTHKNECHT, U. C., & TEIGE, M. (2011). Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1525–1542.

- STANGE, A. (2010). *Beziehung zwischen Ca^{2+} -Homöostase und Aktivität der S-Typ Anionenkanäle in Schließzellen*. Ph.D. thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- STANGE, A., HEDRICH, R., & ROELFSEMA, M. (2010). Ca^{2+} -dependent activation of guard cell anion channels, triggered by hyperpolarization, is promoted by prolonged depolarization. *The Plant Journal*, 62(2), 265–276.
- STEVENSON, S. R., KAMISUGI, Y., TRINH, C. H., SCHMUTZ, J., JENKINS, J. W., GRIMWOOD, J., MUCHERO, W., TUSKAN, G. A., RENSING, S. A., LANG, D., ET AL. (2016). Genetic analysis of *Physcomitrella patens* identifies *ABSCISIC ACID NON-RESPONSIVE*, a regulator of ABA responses unique to basal land plants and required for desiccation tolerance. *The Plant Cell*, 28(6), 1310–1327.
- STEWART, W. W. (1978). Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell*, 14(3), 741–759.
- STOCKER, O. (1956a). *Handbuch der Pflanzenphysiologie Encyclopedia of Plant Physiology*, chap. Einführung, (pp. 1 – 9). Springer.
- STOCKER, O. (1956b). *Handbuch der Pflanzenphysiologie Encyclopedia of Plant Physiology*, chap. Wasseraufnahme und Wasserspeicherung bei Thallophyten, (pp. 160 – 172). Springer.
- STOELZLE, S., KAGAWA, T., WADA, M., HEDRICH, R., & DIETRICH, P. (2003). Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 1456–1461.
- STRASBURGER, E. (1866 - 1867). Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Spaltöffnungen. In N. Pringsheim (Ed.) *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik*, vol. 5, (pp. 297 – 342). Verlag von Wilhelm Engelmann.
- SUN, Y., HARPAZI, B., WIJERATHNA-YAPA, A., MERILO, E., DE VRIES, J., MICHAELI, D., GAL, M., CUMING, A. C., KOLLIST, H., & MOSQUINA, A. (2019). A ligand-independent origin of abscisic acid perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(49), 24892–24899.
- SUSSMILCH, F. C., BRODRIBB, T. J., & MCADAM, S. A. (2017). What are the evolutionary origins of stomatal responses to abscisic acid in land plants? *Journal of Integrative Plant Biology*, 59(4), 240–260.
- SUSSMILCH, F. C., ROELFSEMA, M. R. G., & HEDRICH, R. (2019a). On the origins of osmotically driven stomatal movements. *New Phytologist*, 222(1), 84–90.

- SUSSMILCH, F. C., SCHULTZ, J., HEDRICH, R., & ROELFSEMA, M. R. G. (2019b). Acquiring control: the evolution of stomatal signalling pathways. *Trends in Plant Science*, 24(4), 342–351.
- SZE, H., LI, X., & PALMGREN, M. G. (1999). Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *The Plant Cell*, 11(4), 677–689.
- SZE, H., LIANG, F., HWANG, I., CURRAN, A. C., & HARPER, J. F. (2000). Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast. *Annual Review of Plant Biology*, 51(1), 433–462.
- SZYROKI, A., IVASHIKINA, N., DIETRICH, P., ROELFSEMA, M. R. G., ACHE, P., REINTANZ, B., DEEKEN, R., GODDE, M., FELLE, H., STEINMEYER, R., ET AL. (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2917–2921.
- TAKAHASHI, Y., ZHANG, J., HSU, P.-K., CECILIATO, P. H., ZHANG, L., DUBEAUX, G., MUNEMASA, S., GE, C., ZHAO, Y., HAUSER, F., ET AL. (2020). MAP3Kinase-dependent SnRK2-kinase activation is required for abscisic acid signal transduction and rapid osmotic stress response. *Nature Communications*, 11(1), 1–12.
- TAKEZAWA, D., KOMATSU, K., & SAKATA, Y. (2011). ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone? *Journal of Plant Research*, 124(4), 437–453.
- TALBOTT, L. D., & ZEIGER, E. (1996). Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. *Plant Physiology*, 111(4), 1051–1057.
- TALKE, I. N., BLAUDEZ, D., MAATHUIS, F. J., & SANDERS, D. (2003). CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends in Plant Science*, 8(6), 286–293.
- TANAKA, Y., KUTSUNA, N., KANAZAWA, Y., KONDO, N., HASEZAWA, S., & SANO, T. (2007). Intra-vacuolar reserves of membranes during stomatal closure: the possible role of guard cell vacuoles estimated by 3-D reconstruction. *Plant and Cell Physiology*, 48(8), 1159–1169.
- TEARDO, E., CARRARETTO, L., DE BORTOLI, S., COSTA, A., BEHERA, S., WAGNER, R., SCHIAVO, F. L., FORMENTIN, E., & SZABO, I. (2015). Alternative splicing-mediated targeting of the Arabidopsis GLUTAMATE RECEPTOR3.5 to mitochondria affects organelle morphology. *Plant Physiology*, 167(1), 216–227.

- TEMPEL, B. L., PAPAIZIAN, D. M., SCHWARZ, T. L., JAN, Y. N., & JAN, L. Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science*, 237(4816), 770–775.
- TERRY, B., & ROBARDS, A. (1987). Hydrodynamic radius alone governs the mobility of molecules through plasmodesmata. *Planta*, 171(2), 145–157.
- THOMAS, D., TOVEY, S., COLLINS, T., BOOTMAN, M., BERRIDGE, M., & LIPP, P. (2000). A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium*, 28(4), 213–223.
- THOR, K., JIANG, S., MICHARD, E., GEORGE, J., SCHERZER, S., HUANG, S., DINDAS, J., DERBYSHIRE, P., LEITÃO, N., DEFALCO, T. A., ET AL. (2020). The calcium-permeable channel OSCA1.3 regulates plant stomatal immunity. *Nature*, (pp. 1–8).
- TIAN, W., HOU, C., REN, Z., WANG, C., ZHAO, F., DAHLBECK, D., HU, S., ZHANG, L., NIU, Q., LI, L., ET AL. (2019). A calmodulin-gated calcium channel links pathogen patterns to plant immunity. *Nature*, 572(7767), 131–135.
- TREWAVAS, A. (1999). Le calcium, c'est la vie: calcium makes waves. *Plant Physiology*, 120(1), 1–6.
- UMEZAWA, T., SUGIYAMA, N., MIZOGUCHI, M., HAYASHI, S., MYOUGA, F., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., ISHIHAMA, Y., HIRAYAMA, T., & SHINOZAKI, K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41), 17588–17593.
- VAHISALU, T., KOLLIST, H., WANG, Y., NISHIMURA, N., CHAN, W., VALERIO, G., LAMMINMÄKI, A., BROSCHE, M., MOLDAU, H., DESIKAN, R., ET AL. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, 452(7186), 487–491.
- VAN KIRK, C. A., & RASCHKE, K. (1978). Presence of chloride reduces malate production in epidermis during stomatal opening. *Plant Physiology*, 61(3), 361–364.
- VENEMA, K., QUINTERO, F. J., PARDO, J. M., & DONAIRE, J. P. (2002). The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(4), 2413–2418.

- VÉRY, A.-A., GAYMARD, F., BOSSEUX, C., SENTENAC, H., & THIBAUD, J.-B. (1995). Expression of a cloned plant K⁺ channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents. *The Plant Journal*, 7(2), 321–332.
- VILLARREAL, J. C., & RENZAGLIA, K. S. (2015). The hornworts: important advancements in early land plant evolution. *Journal of Bryology*, 37(3), 157–170.
- VIOTTI, C., BUBECK, J., STIERHOF, Y.-D., KREBS, M., LANGHANS, M., VAN DEN BERG, W., VAN DONGEN, W., RICHTER, S., GELDNER, N., TAKANO, J., ET AL. (2010). Endocytic and secretory traffic in *Arabidopsis* merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *The Plant Cell*, 22(4), 1344–1357.
- VLAD, F., RUBIO, S., RODRIGUES, A., SIRICHANDRA, C., BELIN, C., ROBERT, N., LEUNG, J., RODRIGUEZ, P. L., LAURIÈRE, C., & MERLOT, S. (2009). Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *The Plant*, 21(10), 3170–3184.
- VOELKER, C., SCHMIDT, D., MUELLER-ROEBER, B., & CZEMPINSKI, K. (2006). Members of the *Arabidopsis* AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels *in planta*. *The Plant Journal*, 48(2), 296–306.
- VON DER FECHT-BARTENBACH, J., BOGNER, M., DYNOWSKI, M., & LUDEWIG, U. (2010). CLC-b-mediated NO₃⁻/H⁺ exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles. *Plant and Cell Physiology*, 51(6), 960–968.
- VOSS, L. J., HEDRICH, R., & ROELFSEMA, M. R. G. (2016). Current injection provokes rapid expansion of the guard cell cytosolic volume and triggers Ca²⁺ signals. *Molecular Plant*, 9(3), 471–480.
- VOSS, L. J., MCADAM, S. A., KNOBLAUCH, M., RATHJE, J. M., BRODRIBB, T., HEDRICH, R., & ROELFSEMA, M. R. G. (2018). Guard cells in fern stomata are connected by plasmodesmata, but control cytosolic Ca²⁺ levels autonomously. *New Phytologist*, 219(1), 206–215.
- WAGNER, C. A., FRIEDRICH, B., SETIAWAN, I., LANG, F., & BRÖER, S. (2000). The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 10(1-2), 1–12.
- WALTON, D. C. (1980). Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), 453–489.

- WAN, X., STEUDLE, E., & HARTUNG, W. (2004). Gating of water channels (aquaporins) in cortical cells of young corn roots by mechanical stimuli (pressure pulses): effects of ABA and of HgCl₂. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 411–422.
- WANG, C., LIU, Y., LI, S.-S., & HAN, G.-Z. (2015a). Insights into the origin and evolution of the plant hormone signaling machinery. *Plant Physiology*, 167(3), 872–886.
- WANG, Y., DINDAS, J., RIENMÜLLER, F., KREBS, M., WAADT, R., SCHUMACHER, K., WU, W.-H., HEDRICH, R., & ROELFSEMA, M. R. G. (2015b). Cytosolic Ca²⁺ signals enhance the vacuolar ion conductivity of bulging *Arabidopsis* root hair cells. *Molecular Plant*, 8(11), 1665–1674.
- WANG, Y., NOGUCHI, K., ONO, N., INOUE, S.-I., TERASHIMA, I., & KINOSHITA, T. (2014). Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 533–538.
- WANG, Y.-F., MUNEMASA, S., NISHIMURA, N., REN, H.-M., ROBERT, N., HAN, M., PUZŇRJOVA, I., KOLLIST, H., LEE, S., MORI, I., ET AL. (2013). Identification of cyclic GMP-activated non-selective Ca²⁺-permeable cation channels and associated *CNGC5* & *CNGC6* genes in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiology*, 163, 578–590.
- WARD, J., MÄSER, P., & SCHROEDER, J. (2009). Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology, and Functional Genomics Analyses. *Annual Review of Physiology*, 71, 59–82.
- WARD, J. M., & SCHROEDER, J. I. (1994). Calcium-activated K⁺ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *The Plant Cell*, 6(5), 669–683.
- WARNE, T. R., & HICKOK, L. G. (1991). Control of sexual development in gametophytes of *Ceratopteris richardii*: antheridiogen and abscisic acid. *Botanical Gazette*, 152(2), 148–153.
- WEBB, A. A., LARMAN, M. G., MONTGOMERY, L. T., TAYLOR, J. E., & HETHERINGTON, A. M. (2001). The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. *The Plant Journal*, 26(3), 351–362.
- WEBB, A. A., MCAINSH, M. R., MANSFIELD, T. A., & HETHERINGTON, A. M. (1996). Carbon dioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium. *The Plant Journal*, 9(3), 297–304.

- WEGE, S., DE ANGELI, A., DROILLARD, M.-J., KRONIEWICZ, L., MERLOT, S., CORNU, D., GAMBALE, F., MARTINOIA, E., BARBIER-BRYGOO, H., THOMINE, S., ET AL. (2014). Phosphorylation of the vacuolar anion exchanger AtCLCa is required for the stomatal response to abscisic acid. *Science Signaling*, 7(333), ra65.
- WEINL, S., & KUDLA, J. (2009). The CBL–CIPK Ca²⁺-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist*, 184(3), 517–528.
- WERNER, O., ESPÍN, R. M. R., BOPP, M., & ATZORN, R. (1991). Abscisic-acid-induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. *Planta*, 186(1), 99–103.
- WHITE, P. J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 171–189.
- WICKETT, N. J., MIRARAB, S., NGUYEN, N., WARNOW, T., CARPENTER, E., MATA-SCI, N., AYYAMPALAYAM, S., BARKER, M. S., BURLEIGH, J. G., GITZENDANNER, M. A., ET AL. (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(45), E4859–E4868.
- WIDHOLM, J. M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, 47(4), 189–194.
- WILLE, A. C., & LUCAS, W. J. (1984). Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. *Planta*, 160(2), 129–142.
- WILLMER, C., & FRICKER, M. (1996). *Stomata*, chap. Stomatal responses to environmental factors, (pp. 126–191). Chapman and Hall, 2nd ed.
- WILLMER, C., & MANSFIELD, T. (1969). A critical examination of the use of detached epidermis in studies of stomatal physiology. *New Phytologist*, 68(2), 363–375.
- WILLMER, C., & PALLAS JR, J. (1973). A survey of stomatal movements and associated potassium fluxes in the plant kingdom. *Canadian Journal of Botany*, 51(1), 37–42.
- WILLMER, C., & SEXTON, R. (1979). Stomata and plasmodesmata. *Protoplasma*, 100(1), 113–124.
- WOOD, N. T., ALLAN, A. C., HALEY, A., VIRY-MOUSSAÏD, M., & TREWAVAS, A. J. (2000). The characterization of differential calcium signalling in tobacco guard cells. *The Plant Journal*, 24(3), 335–344.

- WRIGHT, S. (1969). An increase in the 'inhibitor- β ' content of detached wheat leaves following a period of wilting. *Planta*, 86(1), 10–20.
- WRIGHT, S., & HIRON, R. (1969). (+)-Abscisic acid, the growth inhibitor induced in detached wheat leaves by a period of wilting. *Nature*, 224(5220), 719–720.
- WU, F., CHI, Y., JIANG, Z., XU, Y., XIE, L., HUANG, F., WAN, D., NI, J., YUAN, F., WU, X., ET AL. (2020). Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis*. *Nature*, 578(7796), 577–581.
- WU, J., LEWIS, A. H., & GRANDL, J. (2017). Touch, tension, and transduction—the function and regulation of Piezo ion channels. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(1), 57–71.
- XU, Z.-Y., LEE, K. H., DONG, T., JEONG, J. C., JIN, J. B., KANNO, Y., KIM, D. H., KIM, S. Y., SEO, M., BRESSAN, R. A., ET AL. (2012). A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(5), 2184–2199.
- XUE, S., HU, H., RIES, A., MERILO, E., KOLLIST, H., & SCHROEDER, J. I. (2011). Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO₂ signal transduction in guard cell. *The EMBO Journal*, 30(8), 1645–1658.
- YANG, Y., COSTA, A., LEONHARDT, N., SIEGEL, R., & SCHROEDER, J. (2008). Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods*, 4(1), 6.
- YOKOI, S., QUINTERO, F. J., CUBERO, B., RUIZ, M. T., BRESSAN, R. A., HASEGAWA, P. M., & PARDO, J. M. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal*, 30(5), 529–539.
- YOSHIDA, R., HOB0, T., ICHIMURA, K., MIZOGUCHI, T., TAKAHASHI, F., ARONSO, J., ECKER, J. R., & SHINOZAKI, K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 43(12), 1473–1483.
- YOSHIDA, R., MORI, I. C., KAMIZONO, N., SHICHIRI, Y., SHIMATANI, T., MIYATA, F., HONDA, K., & IWAI, S. (2016). Glutamate functions in stomatal closure in *Arabidopsis* and fava bean. *Journal of Plant Research*, 129(1), 39–49.

- YUAN, F., YANG, H., XUE, Y., KONG, D., YE, R., LI, C., ZHANG, J., THEPRUNGS-IRIKUL, L., SHRIFT, T., KRICHILSKY, B., ET AL. (2014). OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*, 514(7522), 367–378.
- ZEEVAART, J., & CREELMAN, R. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1), 439–473.
- ZELMAN, A. K., DAWE, A., BERKOWITZ, G. A., & GEHRING, C. (2012). Evolutionary and structural perspectives of plant cyclic nucleotide-gated cation channels. *Frontiers in Plant Science*, 3, 95.
- ZHANG, A., REN, H.-M., TAN, Y.-Q., QI, G.-N., YAO, F.-Y., WU, G.-L., YANG, L.-W., HUSSAIN, J., SUN, S.-J., & WANG, Y.-F. (2016). S-type anion channels SLAC1 and SLAH3 function as essential negative regulators of inward K^+ channels and stomatal opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 28(4), 949–965.
- ZHANG, M., WANG, D., KANG, Y., WU, J.-X., YAO, F., PAN, C., YAN, Z., SONG, C., & CHEN, L. (2018). Structure of the mechanosensitive OSCA channels. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(9), 850–858.
- ZHANG, W., FAN, L.-M., & WU, W.-H. (2007). Osmo-sensitive and stretch-activated calcium-permeable channels in *Vicia faba* guard cells are regulated by actin dynamics. *Plant Physiology*, 143(3), 1140–1151.
- ZIEGLER, H. (1987). The evolution of stomata. In *Stomatal Function*, (pp. 29–57). Stanford University Press, Stanford, CA.
- ZIELINSKI, R. E. (1998). Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 697–725.

5 Anhang

5.1 Ergänzende Abbildungen

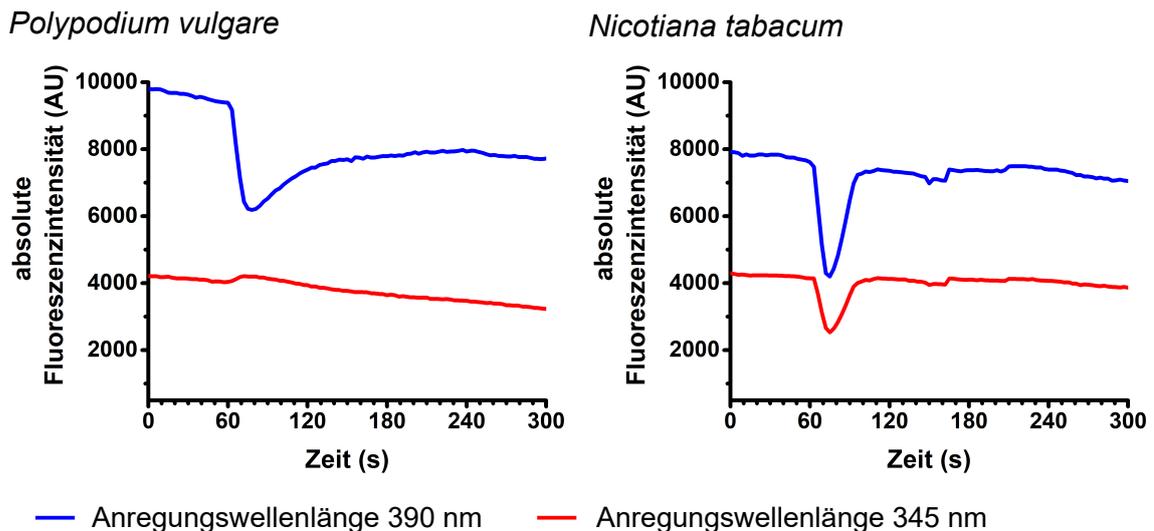


Abb. 5.1: Vergleich der absoluten Fluoreszenzintensitäten von Fura-2 bei beiden Anregungswellenlängen während der Durchführung hyperpolarisierender Spannungspulse. Änderung der absoluten Intensitäten von Fura-2 während eines hyperpolarisierenden Spannungspulses bei den beiden Anregungswellenlängen 345 (rot) und 390 nm (blau). Gezeigt wird jeweils eine repräsentative Zelle von *Nicotiana tabacum* und *Polypodium vulgare*. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität von Fura-2 während der Hyperpolarisierung bei Anregung mit der Wellenlänge 345 nm tritt in *Polypodium vulgare* nicht auf. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität wird in *Nicotiana tabacum* durch die Vergrößerung des cytosolischen Volumens verursacht, die in *Polypodium vulgare* nicht erkennbar ist.

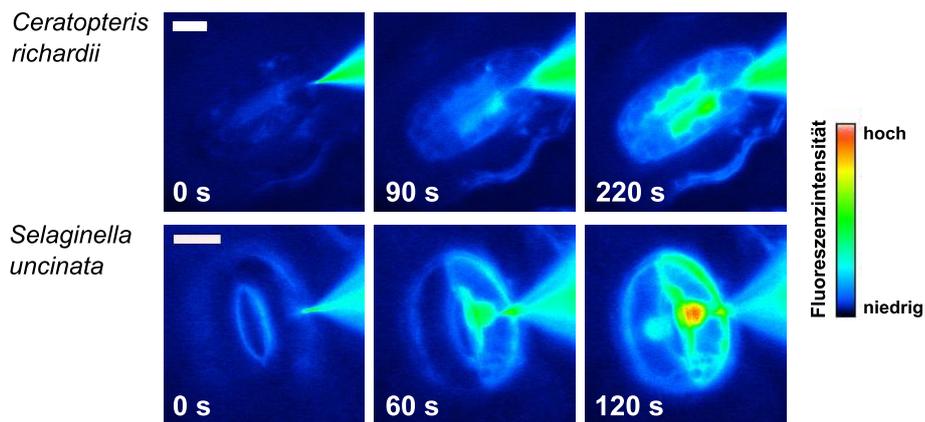


Abb. 5.2: Beladung von Schließzellen der Arten *Ceratopteris richardii* (oben) und *Selaginella uncinata* (unten) mit Fura-2 und Übergang des Fluoreszenzfarbstoffs in die Nachbarschließzelle. In Falschfarben dargestellte Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei der Wellenlängen 345 vor und während der iontophoretischen Beladung mit Fura-2. Scalebar: 10 μm .

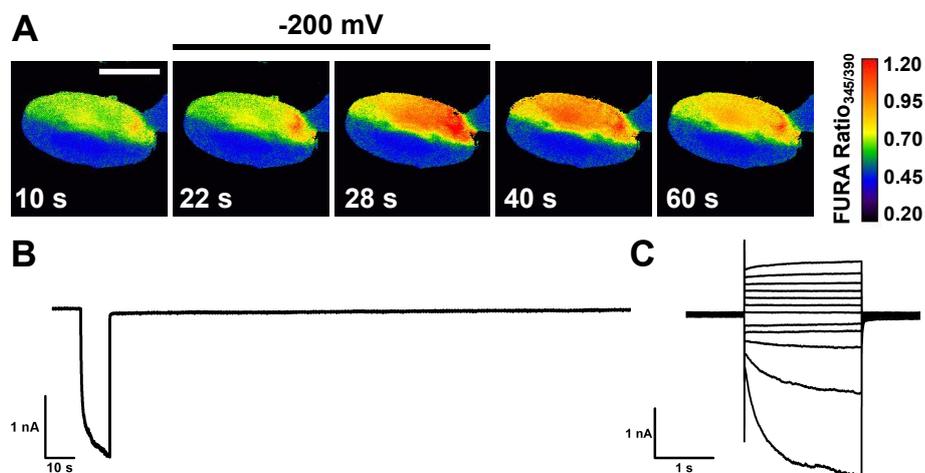


Abb. 5.3: Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration während einer Hyperpolarisierung in *Ceratopteris richardii* (A) In Falschfarben dargestelltes Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Fura-2 bei den Wellenlängen 345 und 390 nm vor, während und nach einem 10 s andauernden hyperpolarisierenden Spannungspuls. Start des Pulses: $t = 20$ s Scalebar: 20 μm . (B) Appliziertes Pulsprotokoll und Stromspur für das in (A) gezeigte Experiment. (C) Spannungsabhängige Ströme in einer Schließzelle von *Ceratopteris richardii*. Nach dem Einstich wurden ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV für 2 Sekunden Testpulse im Bereich von +20 bis -180 mV in Schritten von 20 mV appliziert.

5.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABI	ABA-insensitive
ACA	Autoinhibited Calcium-ATPase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
AKT	<i>Arabidopsis thaliana</i> K ⁺ Transporter
ALMT	Aluminum Activated Malate Transporter
AM	Acetoxymethyl Ester
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	Benzylaminopurin
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
BCECF	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Coulomb
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium(-Ion)
[Ca ²⁺] _{cyt}	cytosolische Calciumkonzentration
CaM	Calmodulin
CAX	Cation Exchanger
CBL	CalcineurinB-like Protein
CDPK	Ca ²⁺ Dependent Protein Kinase
CIPK	Calcineurin B-like Interacting Protein Kinases
Cl ⁻	Chlorid
CLC	Chloride Channel
CLSM	engl.: Confocal Laser Scanning Microscope
CNGC	Cyclic Nucleotide Gated Channel
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPK	Ca ²⁺ Dependent Protein Kinase

Cs ⁺	Cäsium(-Ion)
CsCl	Cäsiumchlorid
cyt	cytosolisch
DA/AD	Digital-Analog/Analog-Digital
DACC	Depolarisationsaktivierte Calciumkanäle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECA	ER-type Calcium-ATPase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii/et aliae/et alia
EtOH	Ethanol
F	Faraday-Konstante
F ₀	Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0
F _{max}	maximale Fluoreszenzintensität
F _{min}	minimale Fluoreszenzintensität
fmol	Femtomol
f _{net}	Ionenfluss in mol/sek
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GC1	Schließzellspezifischer Promotor pGC1(At1g22690)
Gent	Gentamycin
GFP	Green Fluorescent Protein
GHR	Guard Cell Hydrogen Peroxide-Resistant
GLR	Glutamate Receptor Like channel
GORK	Guardcell Outward Rectifying K ⁺ Channel
h	Stunde
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HACC	Hyperpolarisationsaktivierte Calciumkanäle
HMA1	Heavy Metal ATPase 1

Hz	Hertz
I	Strom
$I_{\text{Anion}}^{\text{max}}$	Maximale Stromstärke des Anionenausstroms in A
$I_{\text{K}}^{\text{max}}$	Maximale Stromstärke des Kaliumeinstroms in A
I_{ion}	Ionenstrom
K	Kalium
K^+	Kalium(-Ion)
K_{d}	Dissoziationskonstante
K_{in}	Kalium-Einwärtsstrom
K_{out}	Kalium-Auswärtsstrom
Kan	Kanamycin
KAT	K^+ -channel in <i>Arabidopsis thaliana</i>
KCl	Kaliumchlorid
KGlukonat	Kaliumglukonat
KUP/HAK/KT	K^+ uptake/HighAffinity K^+/K^+ Transport
l	Liter
La^{3+}	Lanthan(-Ion)
LaCl_3	Lanthanchlorid
LB	Lysogeny Broth
LY	Lucifer Yellow
M	Molar
max	maximal
MAMPs	Microbial Associated Molecular Patterns
MAP3K	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MCA	Mid1-Complementing Activity
MCUC	Mitochondrial Calcium Uniporter
mg	Milligramm
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol	Mol = 6×10^{23} Teilchen
ms	Millisekunde
MSCs	Mechanosensitive Kanäle
mV	Millivolt
$M\Omega$	Megaohm
μg	Mikrogramm

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
n	Anzahl
nA	Nanoampere
NaCl	Natriumchlorid
NAA	1-Naphthylethylsäure
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NHX	Na^+/H^+ -Exchanger
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO^{3-}	Nitrat(-Ion)
NSCCs	Nonselective Cation Channels
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
O_2	Sauerstoff
OG-BAPTA	Oregon Green 488 BAPTA-1
OSCA	Reduced Hyperosmolalityinduced Calcium Increase
OST	Open Stomata
pA	Picoampere
PAR	Photosynthetically Active Radiation
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentia Hydrogenii
pl	Picoliter
pmol	Picomol
PPase	Pyrophosphatase
PYR/PYL/RCAR	Pyrabactin Resistance/PYR1-Like/Regulatory Component of ABA Receptor
QUAC	Quick Anion Channel
R	Ratio
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
ROS	Reactive Oxygen Species
R-Typ	Rapid-type
s, sek	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

SE	Standard Error, Standardfehler
SLAC	Slow Anion Channel(-Associated)
SLAH	SLAC1-Homologue
SnRK	SNF-related serine/threonine-protein kinase
S-Typ	Slow-type
SOC	Super Optimal Broth (SOB) + Glukose
SV	Slow Vacuolar
t	Zeitpunkt
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TEVC	Two Electrode Voltage Clamp
TPC	Two Pore Channel
TPK	Two Pore K ⁺ -Channel
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USER	Uracil Specific Excision Reagent
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _H	Haltespannung
V _T	Testspannung
V-ATPase	Vakuoläre ATPase
VHA	Vacuolar-type H ⁺ -ATPase
V-PPase	Vakuoläre Pyrophosphatase
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
YEB	Yeast Extract Broth
YFP	Yellow Fluorescent Protein
%	Prozent
~	ungefähr

5.3 Publikationsliste

VOSS, L. J., HEDRICH, R., & ROELFSEMA, M. R. G. (2016). Current injection provokes rapid expansion of the guard cell cytosolic volume and triggers Ca²⁺ signals. *Molecular Plant*, 9(3), 471-480.

VOSS, L. J., MCADAM, S. A., KNOBLAUCH, M., RATHJE, J. M., BRODRIBB, T., HEDRICH, R., & ROELFSEMA, M. R. G. (2018). Guard cells in fern stomata are connected by plasmodesmata, but control cytosolic Ca²⁺ levels autonomously. *New Phytologist*, 219(1), 206-215.

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den Personen bedanken, die auf verschiedene Art und Weise dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit entstehen konnte:

Dabei danke ich Herrn **Prof. Dr. Rainer Hedrich** für die Möglichkeit, am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik diese Promotion anzufertigen.

Meinem Betreuer und Erstgutachter **PD Dr. Rob Roelfsema** möchte ich besonders für die Einführung in die Elektrophysiologie, für die Beantwortung meiner vielen Fragen und für rege Diskussionen danken. Auf jeden Fall habe ich dadurch sehr viel gelernt.

Bei **PD Dr. Ulrich Terpitz** bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Doktorarbeit.

Für Hilfsbereitschaft im Laboralltag und im Allgemeinen bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Botanik I. Ganz besonders bei **Timo** (für sehr gute Laborgemeinschaft), bei **Ayşin** (Teşekkür - for making the beginning of my worklife here so much easier and funnier!!!) und **Maris** (Kiitoksia paljon, oli kiva tutustua sinuun!), bei **Anna-Lena** und **Hanna** (meine beiden Doktorarbeits-Homies), **Eva** (unter anderem für die morgendlichen Fahrradfahrten zum Institut), **Bea** und **Kai**. DANKE!!!

Für die Hilfe bei der Korrektur auch nochmal Danke an **Anna-Lena** und **Kai**.

Vor allem für die Zeit des Schreibens bedanke ich mich bei **Caroline Weidmann** für einen schönen Arbeitsplatz in der Teilbibliothek, wo ein Großteil dieser Arbeit entstanden ist, für Lebkuchen im August und vor allem für die gute Gesellschaft.

Ein riesengroßes Dankeschön geht auch an meine Freunde »außerhalb der Biologie« und natürlich meine Familie:

Mama und **Papa**, endlich ist es geschafft! Vielen Dank für eure Unterstützung und überhaupt!

Inga, **Norah** und **Amel**, danke für den trubeligen Alltag als Ausgleich zur Doktorarbeit. Ihr seid toll!

Kai, danke für alles! Schön, dass wir uns getroffen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: »**Änderungen der Membranspannung und der Osmolarität als Auslöser für Calciumsignale in Pflanzen – Studien an Schließzellen von *Nicotiana tabacum* und *Polypodium vulgare***« eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel, verwendet zu haben.

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

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Würzburg, den

Lena Johanna Voß