

**Rolle und Regulation von Anionenkanälen während der
Stomabewegung als Reaktion auf Licht, CO₂ und Wasserstress**

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

vorgelegt von

Holger Marten

aus Frankfurt

Würzburg 2008

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

Gutachter:.....

Gutachter:.....

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Funktion der Stomata.....	2
1.2 Grundlagen der Stomabewegung.....	6
1.2.1 H ⁺ -ATPasen, der Motor der Stomaöffnung.....	8
1.2.2 Aufnahme und Abgabe von Kalium.....	11
1.2.3 Anionen sind die Gegenionen von Kalium.....	15
1.2.4 Calcium induziert Stomabewegungen.....	20
1.2.5 Koordination des Membrantransports.....	23
1.3 Stimuli der Stomabewegungen.....	26
1.3.1 Die Reaktion auf photosynthetisch aktive Strahlung.....	26
1.3.2 Blaulicht spezifische Stomaöffnung.....	29
1.3.3 Abscisinsäure schließt die Stomata.....	33
1.3.4 Interaktionen der Regulationswege.....	39
1.4 Aufgabenstellung der Arbeit.....	40
2. Ergebnisse.....	41
Kapitel I: Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a Phototropin-dependent manner.....	41
Kapitel II: Ca ²⁺ -Dependent and -Independent Abscisic Acid Activation of Plasma Membrane Anion Channels in Guard Cells of <i>Nicotiana tabacum</i>	53
Kapitel III: Silencing of <i>NtMPK4</i> impairs CO ₂ -induced stomatal closure, activation of anion channels and cytoplasmic Ca ²⁺ -signals in <i>Nicotiana tabacum</i> guard cells.....	64
Kapitel IV: Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO ₂ and abscisic acid.....	90
3. Diskussion.....	102
3.1 Rolle der Anionenkanäle und der Plasmamembran H ⁺ -ATPase bei der Stomabewegung.....	104
3.1.1 Einfluss von Licht, CO ₂ und ABA auf Anionenkanäle und H ⁺ -ATPase.....	104

3.1.2	Zeitliche Regulierung der Anionenkanäle und der H ⁺ -ATPase bei der Stomabewegung.....	106
3.2	Die Funktion von Ca ²⁺ bei den Stomabewegungen	111
3.2.1	Ca ²⁺ als Botenstoff bei der Stomaöffnung.....	111
3.2.2	Ca ²⁺ als Botenstoff bei dem Stomaschluss	113
3.2.3	Mögliche Aufgaben von Ca ²⁺ bei dem Stomaschluss	116
3.2.4	Ca ²⁺ abhängige und unabhängige Komponenten des ABA Signaltransduktionsweges	118
3.3	Wahrnehmung der Stimuli für die Stomabewegung	120
3.3.1	Die ABA Rezeption.....	120
3.3.2	Die Rolle von CO ₂ bei der PAR Reaktion.....	121
3.3.3	Phototropin-Blaulichtrezeptoren regulieren die H ⁺ -ATPase und die Anionenkanäle.....	125
3.4	Modelle für die Signalwege von ABA, PAR/CO ₂ und Blaulicht.....	127
3.5	Interaktionen von Licht, CO ₂ und ABA bei der Stomabewegung.....	129
3.6	Ausblick.....	131
4.	Zusammenfassung.....	133
5.	Summary.....	136
6.	Referenzen.....	139
7.	Anhang.....	167
	Veröffentlichungsverzeichnis	167
	Lebenslauf.....	168
	Eidesstattliche Erklärung.....	169
	Danksagung.....	170

1. Einleitung

Pflanzen sind überwiegend photoautotrophe Organismen und produzieren mit der Energie des Sonnenlichtes während der Photosynthese Adenosintriphosphat (ATP) und Reduktionsäquivalente wie NADPH. Deren Energie bzw. Reduktionspotential wird dann ausgenutzt um Kohlendioxid (CO_2) zu reduzieren und Zucker als Energieträger und Kohlenstoffquelle zu synthetisieren. Aufgrund des dadurch bedingten CO_2 Verbrauch benötigen sie während der Photosynthese einen ständigen Nachschub an diesem Gas. Die Konzentration von CO_2 ist in der Atmosphäre mit durchschnittlich ca. 375 Teilen pro Millionen (ppm) relativ gering, weswegen es oft zum limitierenden Faktor für die Photosynthese werden kann.

Wasser ist neben seiner essentiellen Funktion als intra- und extrazelluläres Lösungsmittel ein weiteres wichtiges Substrat bei der Photosynthese und wird dabei als Elektronendonator zur Reduktion des CO_2 benötigt. Landpflanzen beziehen ihr Wasser in der Regel aus der Wurzel und verlieren es über Verdunstung durch die oberirdischen Organe. Um nun die Verdunstung über die relativ große Oberfläche der Pflanze so gering zu halten, dass ein Welken vermieden wird, sind Abschlussgewebe oberirdischer Pflanzenteile Wasser abweisend beschichtet. Blätter besitzen hierfür eine Kutikula, welche allerdings die Diffusion von vielen Gasen in und aus dem Blatt behindert.

Zur Bewältigung dieses Problems haben sich Poren in der Epidermis der Blätter entwickelt, deren Öffnungsweite in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen kontrolliert wird. Diese Poren bestehen aus zwei parallel orientierten Zellen, so genannten Schließzellen, welche zusammen mit den bei manchen Spezies vorhandenen Nebenzellen einen Stomakomplex bilden. Die Öffnungsweite der Stomata wird durch den Innendruck (Turgor) der beiden Schließzellen reguliert. Ist er gering, so sind die Stomata geschlossen. Steigt er an, bewegen sich die Schließzellen aufgrund von spezifisch orientierten Zellwandverstärkungen auseinander. Aufgebaut wird dieser Turgor durch osmotisch aktive Substanzen, deren Konzentration durch Transport- oder Biosyntheseprozesse reguliert werden kann. Der

1. Einleitung

Transport über die Membran wird von integralen Membranproteinen ausgeführt, die mehr oder weniger spezifisch bestimmte Molekül- und Ionensorten passiv entlang eines Gradienten oder aktiv gegen einen elektrochemischen Gradienten befördern können.

Mit Hilfe dieser Transportprozesse und der Möglichkeit diese zu steuern, kann der Turgor der Stomata und somit deren Öffnungsweite dynamisch angepasst werden. Das ist für die Pflanze notwendig, um die Transpiration und den photosynthetischen Bedarf an CO₂ aufeinander abzustimmen und zu optimieren. So öffnen Stomata, wenn der interzelluläre CO₂ Gehalt sinkt bzw. wenn dieser durch Photosyntheseaktivität erniedrigt wird und wenn Blaulicht auf die Schließzellen trifft (Roelfsema & Hedrich, 2005 und Referenzen darin). Umgekehrt schließen Stomata, wenn der CO₂ Gehalt in den Interzellularen ansteigt und wenn die Pflanze Wasserstress ausgesetzt ist (Roelfsema & Hedrich, 2005 und Referenzen darin). Diese Stimuli lösen eine Signaltransduktion innerhalb der Pflanze und der Schließzellen aus, die unter anderem zu den Transportproteinen führt und diese, abhängig von deren Funktion bei der Stomabewegung, aktiviert oder deaktiviert.

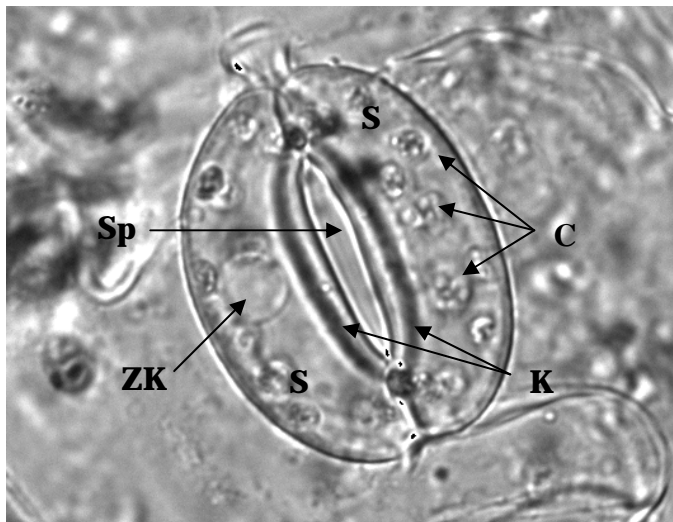


Abb. 1.1: Stoma von *Nicotiana tabacum*. Durchlichtbild eines Stomas in präparativ abgezogener Blattepidermis. Zwei Schließzellen (S) umgeben den stomatären Spalt (Sp), welcher von der Kutikularlippe (K) begrenzt wird. Im Zytosol der Zellen sind Chloroplasten (C) und Zellkern (ZK) erkennbar.

1.1 Funktion der Stomata

Stomata kommen nahezu überall in der Luft-exponierten Epidermis von Pflanzen vor, in allen Blütenteilen, auf sich entwickelnden Früchten, auf unverholzten Sprossachsen und natürlich in Blättern (Willmer & Fricker, 1996). In manchen Fällen finden sich Stomata jedoch

1. Einleitung

sogar an kuriosen Orten wie Wurzeln (Christodoulakis *et al.*, 2002). Stomata können in Blättern hauptsächlich auf der abaxialen Seite (hypostomatisch), auf der adaxialen (hyperstomatisch), oder auf beiden Seiten vorkommen (amphistomatisch). Die meisten Pflanzen gehören zu der amphistomatischen Gruppe, welche vermutlich aufgrund der kürzeren Diffusionswege für CO₂ am effizientesten Photosynthese betreiben können. Hypostomatisch sind vor allem Bäume. Eventuell haben diese dadurch einen Vorteil bei intensiver Sonneneinstrahlung, da die Blattunterseite etwas weniger erhitzt und somit potentiell weniger Wasser verdunstet als die Oberseite (Willmer & Fricker, 1996). Hyperstomatisch wiederum sind vor allem Wasserpflanzen mit schwimmenden Blättern, bei denen nur die Blattoberseite Kontakt zur Luft hat (Willmer & Fricker, 1996). Unterhalb der Stomata befindet sich in der Regel eine substomatäre Höhle, die in Verbindung mit den Interzellularen steht und einen effektiven Gasaustausch mit den photosynthetisch aktiven Geweben, dem Palisaden- und Schwammparenchym, ermöglicht.

Die Schließzellen können von nierenförmiger oder von hantelförmiger Gestalt sein, letztere kommen allerdings nur bei Gräsern vor und werden daher als „Gräser-Typ“ bezeichnet. Beide Typen besitzen ein spezifisches radiales Muster an Zellulosemikrofibrillen in der Zellwand. Dieses sorgt bei nierenförmigen Schließzellen dafür, dass sich diese beim Öffnen nach außen hin voneinander weg biegen (DeMichele & Sharpe, 1973). Bei Schließzellen des Gräser-Typs schwellen die hantelförmigen Enden der Zellen so an, dass sich die Zellen parallel voneinander entfernen (Shoemaker & Srivastava, 1973).

Beim Öffnen der Stomata kommt es zu einer Vervielfachung des Innendruckes (Turgor) in den Schließzellen. In der gut untersuchten Pflanze *Vicia faba* kann dieser von 1 bis auf 4 MPa ansteigen (Franks *et al.*, 1998, 2001). Die Erhöhung des Turgors läuft parallel mit einer Volumen- und Oberflächenzunahme der Schließzellen, die knapp 40% betragen kann (Raschke & Dickerson, 1973; Franks *et al.*, 2001; Shope *et al.*, 2003). Das resultiert aus deren dreieckigem Querschnitt, der während der Öffnung erst elliptisch und dann kreisförmig wird, sowie aus einer Ausdehnung der longitudinalen Achse der Schließzellen (Shope *et al.*, 2003). Um ein Schwellen und Schrumpfen der Schließzellen zu ermöglichen, kommt es zu einer Internalisierung und Remobilisierung von Membran, d.h. beim Schließen der Stomata wird die Membranfläche reduziert und umgekehrt beim Öffnen durch Fusion von Vesikeln

1. Einleitung

mit der Zellmembran vergrößert (Shope *et al.*, 2003; Meckel *et al.*, 2004, Shope & Mott, 2006; Tanaka *et al.*, 2007).

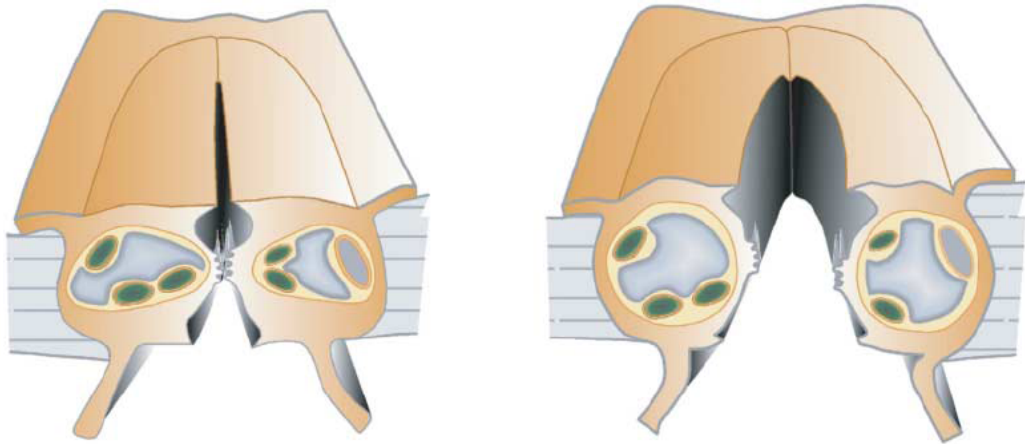


Abb. 1.2: Schließzell-Formveränderungen während der Stomaöffnung, nach Roelfsema & Hedrich, 2005 (reproduziert mit Erlaubnis von *New Phytologist*). Während der Turgorzunahme bei der Öffnung der Stomata verändert sich die Form der Schließzellen von dreieckig (links) zu rund (rechts). Gleichzeitig vergrößert sich deren Oberfläche und die umgebende Zellwand wird dünner.

Einen Einfluss auf die Öffnungsweite der Stomata haben auch die im Vergleich zu Schließzellen wesentlich größeren Epidermiszellen, die an die Schließzellen grenzen und von außen auf diese drücken. Die Epidermiszellen haben durch ihre Größe den „mechanical Advantage“ (DeMichele & Sharpe 1973) und können bei geschlossenen Stomata bis zu dem Zweifachen an Druck kompensieren und reduzieren so die Stomataöffnung (Klein *et al.*, 1996). Von der Pflanze wird dies z.B. ausgenutzt, um die Stomata nachts geschlossen zu halten. Vor der Morgendämmerung sinkt dann der Turgor der Epidermiszellen und dessen antagonistische Wirkung wird reduziert (Klein *et al.*, 1996). Ein weiterer Punkt ist, dass die Stomata positives Feedback beim Öffnen bekommen, da durch deren Transpiration die viel größeren Epidermiszellen schneller Turgor verlieren als die Schließzellen und der Gegendruck der Epidermis nachlässt (Klein *et al.*, 1996).

1. Einleitung

Der Turgor der Schließzellen und dessen Änderungen, die letztlich zum Öffnen und Schließen der Stomata führen, hängen von der Konzentration an osmotisch aktiven Substanzen in den Schließzellen ab. Eine osmotische Steuerung der Stomata wird dadurch ermöglicht, dass sie nicht über Plasmodesmen mit benachbarten Zellen verbunden sind und somit unabhängig von diesen ihren Turgor regulieren können (Wille *et al.*, 1984). Als Osmotika werden Zucker sowie organische und anorganische Ionen benutzt, die aufgrund ihrer Ladung oder polaren Eigenschaften in wässriger Umgebung gut löslich sind. Um diese osmotisch aktiven Substanzen herum bildet sich aufgrund des ebenfalls polaren Charakters der Wassermoleküle eine Hydrathülle, die durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird. Im Wasser gelöste Substanzen üben durch Verdünnung des Wassers einen entropischen Effekt aus, d.h. die Ordnung des Systems „Wasser“ wird gestört und die freie Energie des Wassers herabgesetzt (Taiz & Zeiger, 2000). Als Maß für diese freie Energie des Wassers kann man das Wasserpotential (ψ) ansehen. Es wird mit der Gleichung $\psi = \psi_s + \psi_p + \psi_g$ beschrieben. Das ist die Summe aus dem osmotischen Potential von im Wasser gelösten Substanzen (ψ_s , „solute“), dem Turgordruck (ψ_p , „pressure“; Abweichung vom Atmosphärendruck) und der Schwerkraft (ψ_g , „gravity“). Als Referenz gilt reines Wasser bei atmosphärischem Druck und Temperatur. Das Wasser bewegt sich von einem Ort hohen Potentials zu einem Ort niedrigen Potentials. Für Schließzellen heißt dies, dass bei der Aufnahme oder Bildung von Osmotika das Wasserpotential in der Zelle herabgesetzt wird und Wasser aus dem Extrazellularraum (Apoplasten) einströmt. Bei einer Verringerung der Konzentration gelöster Substanzen bewegt sich das Wasser in den Apoplasten.

Die Bewegung von Wasser über die Plasmamembran wird vermutlich von Aquaporinen erleichtert. Aquaporine sind Wasser-permeable Proteine, die in Schließzellen gefunden wurden, bzw. deren Existenz indirekt nachgewiesen worden ist (Frayssé *et al.*, 2005; Shope & Mott, 2006; Sarda *et al.*, 1997). Diese Aquaporine scheinen allerdings nicht nur Wasser leiten zu können, sondern als „Nebeneffekt“ auch die Diffusion von CO₂ über die Plasmamembran zu erleichtern (Uehlein *et al.*, 2003).

Die in den Schließzellen befindlichen osmotisch aktiven Substanzen werden nur zum Teil im Zytosol belassen, ein großer Teil wird in die Vakuole transportiert und dort gespeichert (Boller & Wiemken, 1986; Martinoia *et al.*, 2007; MacRobbie, 2006). Das ist notwendig, da zu

hohe Ionenkonzentrationen im Zytosol toxisch sein können. Die Kompartimentierung ermöglicht der Zelle auch, bei Stomabewegungen die Zusammensetzung des Zytosols relativ konstant zu halten, während sich der Ionengehalt der Vakuole stark verändern kann (MacRobbie, 2006).

1.2 Grundlagen der Stomabewegungen

Am Anfang des 19. Jahrhunderts wurde davon ausgegangen, dass im Licht, welches für die Stomata ein Signal zum öffnen darstellt, Stärke aus den Schließzell-Chloroplasten in Zucker konvertiert wird und so den Turgor steigert (Strugger & Weber, 1926). Stärke kann nämlich in das Disaccharid Saccharose und dieses wiederum in seine Bausteine Fructose und Glukose gespalten werden, welche alle osmotisch aktiv sind. Später wurde tatsächlich gezeigt, dass sich der Stärkegehalt der Chloroplasten in Schließzellen der Saubohne *Vicia faba* invers zur Öffnungsweite verhält, der Saccharose Gehalt jedoch mit der Öffnungsweite bzw. anhaltender Öffnungsdauer zunimmt (Outlaw & Manchester, 1979; Olsen *et al.*, 2002; Talbott & Zeiger, 1993; 1996).

Diese Hypothese zur Stärke-abhängigen Stomabewegung in Schließzellen hat sich in der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* nicht bestätigt. Hier wurde in einer Stärke defizienten Mutante ein normales Öffnungsverhalten der Stomata unter Photosynthese fördernden Bedingungen gefunden, jedoch fehlende Öffnung im Dunkeln und reduzierte in schwachem Blaulicht (Lascève *et al.*, 1997). Dieser Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass während der Photosynthese direkt organische Osmotika aus dieser abgezweigt werden, ohne Umweg über Stärke. Zudem wurde andersherum sogar beobachtet, dass *A. thaliana* Schließzellen Stärke bei der Stomaöffnung im Licht auf- und beim Schließen im Dunkeln abbauen können, wie es auch für Mesophyllzellen üblich ist (Stadler *et al.*, 2003). Das entspräche vom Prinzip dem Gegenteil der von Strugger & Weber (1926) aufgestellten Theorie.

Trotzdem scheinen Schließzellen fähig zu sein Saccharose zu akkumulieren, was wegen der geringen Konzentration des Enzyms Rubisco und somit geringer photosynthetischer CO₂

1. Einleitung

Fixierung (Reckman *et al.*, 1990) durch eine Aufnahme von Zucker aus dem Apoplasten geschehen könnte. So können Schließzellen Mono- und Disaccharide im Protonensymport aus ihrer Umgebung aufnehmen (Reddy & Das, 1986; Ritte *et al.*, 1999), sowie Glukose für die Stärkebildung in ihre Chloroplasten importieren (Overlach *et al.*, 1993).

Während aktive Aufnahmesysteme für Zucker bekannt sind und die langsame Stomaöffnung somit durch Zucker unterstützt werden kann, sind mögliche Abgabesysteme bisher nicht beschrieben worden. Stomaschlussbewegungen können innerhalb weniger Minuten stattfinden und die hierfür benötigten osmotischen Änderungen können kaum durch die Synthese von großen Mengen an Stärke, noch durch einen aktiven Transport der Zucker ausreichend bewerkstelligt werden (Roelfsema & Hedrich, 2005).

Besser verstanden ist in diesem Zusammenhang die Situation bei einer anderen Klasse wichtiger Osmotika, den organischen und anorganischen Ionen. Von dem Kation Kalium war ebenfalls schon früh bekannt, dass es in Schließzellen akkumulieren kann. So hat Macallum 1905 davon Gebrauch gemacht, dass Kalium zusammen mit einem Kobalt-Natrium-Nitratsalz in orangefarbenen Kristallen ausfällt und gezeigt, dass in Schließzellen wesentlich mehr Kalium vorhanden ist, als in anderem pflanzlichen Gewebe. Nachdem eine Korrelation zwischen Stomata-Öffnungsweite und Kaliumgehalt später tatsächlich bewiesen werden konnte, wurde dann auch das Vorhandensein von anionischen Gegenionen postuliert (Fischer, 1968; Humble & Raschke, 1971). Denn der Transport von Kalium alleine würde zu einer starken Veränderung des Membranpotentials führen. Humble & Raschke (1971) haben ein theoretisches Membranpotential von 10^4 V errechnet, falls die bei ihren Experimenten beobachtete Kaliumaufnahme nicht durch Anionen kompensiert werden würde.

Inzwischen weiß man, dass die Aufnahme und Kompartimentierung von Ionen zum großen Teil durch die Tätigkeit von H^+ -ATPasen ermöglicht wird, welche in der Plasma- und der Vakuolenmembran (Tonoplasten) sitzen. Die H^+ -ATPasen energetisieren diese Membranen, indem sie einen großen H^+ - und somit pH-Gradienten aufbauen und indem sie durch den aktiven Transport von Ladungen (H^+) einen Potentialunterschied über die jeweilige Membran generieren (Pandey *et al.*, 2007 und Referenzen darin). Beides wird für den

1. Einleitung

Transport von Ionen ausgenutzt. Der H^+ -Gradient für sekundär aktiven Transport wie Antiport und Symport und das Membranpotential für „passiven“ Transport entlang eines elektrischen Gradienten, bis zur Einstellung des elektrochemischen Gleichgewichts der fließenden Ionen (Nernst-Potential) (Roelfsema & Hedrich, 2005; Pandey *et al.*, 2007 und Referenzen darin). Zusätzlich zur Aufnahme von Ionen können innerhalb der Schließzellen auch organische Anionen synthetisiert werden und zum Turgor beitragen (Allaway, 1973).

Die Abgabe von Ionen kann theoretisch durch eine Abnahme der ATPase Aktivität und somit des sekundär aktiven Transports und des Potentialunterschiedes über die Membran induziert werden. Zusätzlich können Ionenkanäle spannungsunabhängig aktiviert werden und der folgende Ionenfluss führt unter Umständen zu einer weiteren Verringerung des Potentialunterschieds. Eine fortschreitende Depolarisation der Membranen kann daraufhin spannungsabhängig weitere Ionenkanäle aktivieren und so zu Efflux aus Vakuole und Zytosol führen (Pandey *et al.*, 2007 und Referenzen darin).

1.2.1 H^+ -ATPasen, der Motor der Stomaöffnung

Die Plasmamembran (PM) H^+ -ATPasen hydrolysieren ihrem Namen entsprechend ATP und transportieren dabei Protonen über die Plasmamembran. Sie bilden zusammen mit P-Typ ATPasen aus anderen Organismen eine Gen-Superfamilie und kommen in allen untersuchten pflanzlichen Geweben vor. Jedoch sind einige ihrer Mitglieder bevorzugt in bestimmten Geweben anzutreffen (Sussman & Harper, 1989). So werden in *Vicia faba* Schließzellen vor allem die H^+ -ATPasen VHA1 und 2 (Hentzen *et al.*, 1996), in *Arabidopsis thaliana* AHA1, 2 und 5 (von 11 Mitgliedern) exprimiert (Ueno *et al.*, 2005). Da Schließzellen wegen ihrer hohen Transportaktivität auf die von den H^+ -ATPasen generierte „proton motive force“ angewiesen sind, werden die ATPasen hier auch besonders hoch exprimiert (Becker *et al.*, 1993; Ueno *et al.*, 2005). Die H^+ -ATPasen hydrolysieren 1 ATP pro Proton (Briskin *et al.*, 1995) und können so zu tatsächlich gemessenen Plasmamembran-Hyperpolarisationen von bis zu -260mV und theoretisch errechneten von -320mV führen (Lohse & Hedrich, 1992).

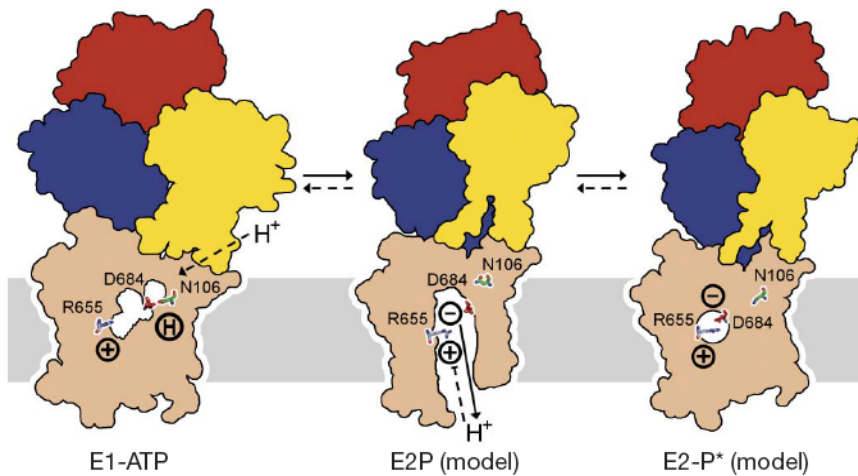


Abb. 1.3: Arbeitsmodell der Plasmamembran H⁺-ATPase, nach Pedersen *et al.*, 2007. Asp (D) 684 ist der zentrale H⁺ Donor/Akzeptor der H⁺-ATPase und kleidet mit Arg (R) 655 eine zentrale, mit Wasser gefüllte Höhlung aus. In der E1 Konformation existiert eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asp 684 und Asn (N) 106 und stabilisiert die protonierte Form von Asp 684 (E1-ATP Struktur). Konformationsänderungen in der Transmembranregion sorgen für eine Öffnung der zentralen Höhlung und eine H⁺ Freisetzung auf der extrazellulären Seite (E2P-Struktur). Eine Annäherung der positiven Ladung von Arg 655 an Asp 684 unterstützt die Freisetzung und verhindert eine Wiederbindung eines H⁺. Danach schließt sich die zentrale Höhlung (E2P*), die H⁺-ATPase wird dephosphoryliert und geht in die E1 Konformation zurück

Die Plasmamembran H⁺-ATPasen gehören zu der sog. P-Typ Familie, deren Bezeichnung von einem Aspartyl-Phosphat (P-) Intermediat während ihres Reaktionszyklus herrührt. Diese H⁺-ATPasen werden durch eine autoinhibitorische C-terminale Domäne (R-Domain) reguliert (Palmgren *et al.*, 1991), die an einem Threoninrest phosphoryliert werden kann und damit einem regulatorischen 14-3-3 Protein die Bindung ermöglicht (Svennelid *et al.*, 1999). Dieses 14-3-3 Protein hält die H⁺-ATPase in ihrer aktiven Form (Marra *et al.*, 1994). Deaktiviert werden könnte die H⁺-ATPase durch die Phosphatase Aktivität einer Protein Phosphatase 2A (Cameni *et al.*, 2000; Fuglsang *et al.*, 2006). Weitere Regulatoren sind zytosolischer pH-Wert und Calcium-Ionen. So ist die H⁺-ATPase bei unter Normalbedingungen vorherrschenden pH-Werten von 7.5 bis 7.8 nur moderat aktiv, wohingegen sie durch eine zytosolische Ansäuerung ihre Aktivität erhöht und bei pH 6.8 ein Maximum erreicht (Becker *et al.*, 1993). Erhöhte zytosolische Calcium-Konzentrationen führen eventuell zu einer Deaktivierung der Protonenpumpe, wie das in Mikrosomen, hergestellt aus einer Plasmamembran-Fraktion, von Kinoshita *et al.*, (1995) beobachtet wurde.

1. Einleitung

Verantwortlich dafür könnte eine Interaktion mit CIPK/PKS (CBL Interacting Protein Kinase) sein, die durch Ca^{2+} bindende Proteine reguliert werden oder eine Regulation durch CDPKs (Ca²⁺ Dependent Protein Kinase). So wurde von Fuglsang *et al.* (2007) eine Bindung von PKS5 an AHA2 und eine darauf folgende Phosphorylierung beobachtet, welche die Bindung des regulatorischen 14-3-3 Proteins inhibiert. Die Interaktion von CDPKs in verschiedenen Spezies mit Plasmamembran lokalisierten H^+ -ATPasen wurde auch schon beschrieben (Rutschmann *et al.*, 2002; Lino *et al.*, 1998), allerdings ist die Bedeutung dessen für Schließzellen unbekannt.

Protonen werden nicht nur in den Apoplasten gepumpt sondern auch in die Vakuole, wodurch diese mit pH-Wert 3 bis 6 einen deutlich niedrigeren pH als das Zytosol hat (Sze *et al.*, 1999). Somit kann der Protonengradient auch hier für sekundär aktiven Transport benutzt werden. Zusätzlich wird auch ein negatives Tonoplastenpotential aufgebaut (Vakuolenseite positiv). Dessen Größenordnung wurde bisher in Schließzellen noch nicht bestimmt und auf ca. -30mV geschätzt (Martinoia *et al.*, 2007). In anderen Geweben, wie z.B. Wurzeln, kann es jedoch bekanntermaßen -10 bis -100mV erreichen (Lew, 2004; Walker *et al.*, 1996).

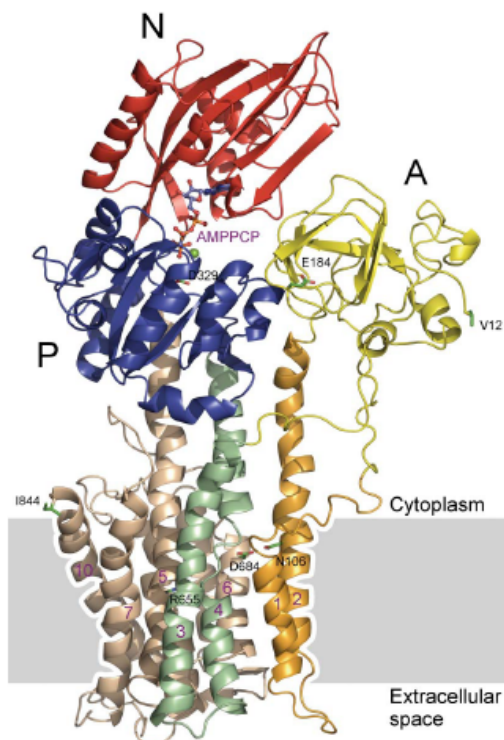


Abb. 1.4: Struktur der H^+ -ATPase AHA2 von *A. thaliana*, nach Pedersen *et al.*, 2007. Die autoinhibitorische Domäne ist nicht dargestellt, anstelle von ATP ist ein nicht-hydrolysierbares Analog (AMPPCP) an die Nukleotid-bindende Domäne (N, rot) gebunden. Gezeigt sind außerdem die 10 Transmembranhelices (orange, grün und braun), die Phosphorylierungsdomäne (P, blau) und die Aktuator-Domäne (A, gelb)

1. Einleitung

Für die Translokation von Protonen in die Vakuole sind zwei Klassen von Pumpen zuständig: die V-Typ-ATPasen und die Pyrophosphatasen (Hedrich *et al.*, 1986; 1989; Sze *et al.*, 1999). Die V-Typ-ATPasen funktionieren wie die F₁/F₀ ATPasen der Mitochondrien, wobei ein ATP hydrolysierender Komplex während der H⁺ Translokation gegen einen Membran durchspannenden Komplex rotiert (Kluge *et al.*, 2003; Imamura *et al.*, 2003). Diese ATPasen werden durch den Redoxstatus der Zelle und durch die zytosolische Nukleotidkonzentration reguliert (Kluge *et al.*, 2003). Außerdem wird die ATPase auch interessanterweise durch Phospholipide aktiviert und durch Glykolipide deaktiviert, wodurch der Zusammensetzung des Tonoplasten eine regulatorische Funktion zukommt (Yamaguchi & Kasamo, 2001).

Nur einen geringen Beitrag zum Protonengradienten liefern vermutlich die Pyrophosphatasen des Tonoplasten. Diese Proteine hydrolysieren Pyrophosphat (PP_i) und pumpen dabei H⁺ über die Membran, die Verfügbarkeit von PP_i für den Pumpvorgang ist jedoch in bereits ausgewachsenen Geweben begrenzt (Drozdowicz & Rea, 2001).

1.2.2 Aufnahme und Abgabe von Kalium

Kaliumionen (K⁺) werden von Schließzellen als einziges Kation in solchen Konzentrationen aufgenommen, dass dieser Vorgang eine parallel zunehmende Stomata-Öffnungsweite erklären kann, vorausgesetzt dass ein entsprechendes Gegenion vorhanden ist (Fischer, 1968; Humble & Raschke, 1971). Andere Alkali-Kationen können ebenfalls aufgenommen werden. Diese sind aber im Regelfall nicht in entsprechenden Konzentrationen im Apoplasten der Pflanze verfügbar und außer Rubidium (Rb⁺) weniger effizient oder verändern das normale Öffnungs- und Schließverhalten der Stomata signifikant (Humble & Hsiao, 1969; Jarvis & Mansfield 1980).

Als potentielle Aufnahme- und Abgabe-Systeme für K⁺ wurden vor allem zwei Gruppen an Kaliumkanälen in der Plasmamembran von Schließzellen identifiziert, die sich darin unterscheiden, bei welcher elektrischen Potentialdifferenz über die Membran sie aktiv sind. Zuständig für die Abgabe sind auswärtsgerichtete Kaliumkanäle, die bei positiv

1. Einleitung

werdenden Potentialen ab ca. -50mV aktivieren (Roelfsema & Hedrich, 2005 und Referenzen darin). Verantwortlich für die Aufnahme sind einwärtsgerichtete Kaliumkanäle, die bei negativer werdenden Potentialen ab ca. -100mV aktivieren (Roelfsema & Hedrich, 2005 und Referenzen darin). Eine dritte Gruppe von Kaliumkanälen sind die spannungsunabhängigen Kanäle, die bei physiologischen Potentialen keine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit besitzen. Diese wurden in Schließzellen noch nicht elektrophysiologisch nachgewiesen und scheinen für die Stomabewegung somit keine große Bedeutung zu haben (Roelfsema & Hedrich, 2005).

In Übereinstimmung damit, dass neben K^+ auch andere Kationen zu einer Stomaöffnung führen können, sind Kaliumkanäle auch für andere Kationen permeabel. So wurde für die elektrophysiologisch gut charakterisierte *Vicia faba* folgende Permeabilitätsreihenfolge für Kaliumein- und Auswärtsgerichteter aufgestellt: $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Li^+ \gg Cs^+$ (Schroeder, 1988).

Die einwärts- und auswärtsgerichteten Kaliumkanäle der Schließzell-Plasmamembran gehören zur Familie der Shaker-Kanäle. Diese bestehen aus sechs Transmembrandomänen mit einer konservierten amphiphilen Porenregion zwischen der fünften und sechsten Transmembran-Domäne (Uozumi *et al.*, 1995, 1998). Die vierte Transmembran-Domäne besteht größtenteils aus positiv geladenen Aminosäuren und funktioniert als Spannungssensor (Marten & Hoshi, 1998; Latorre, 2003). Shaker-Kanäle tetramersieren in der Membran um einen Kanal zu bilden, wodurch in ihrer Mitte eine funktionelle Pore entsteht. Wichtig hierfür scheint der C-Terminus der Kanaluntereinheiten zu sein, der ein Oligomerisierungsmotiv besitzt (Daram *et al.*, 1997; Erhardt *et al.*, 1997). Da in Schließzellen von *Arabidopsis* mindestens 6 verschiedene Kaliumkanäle exprimiert werden, nämlich KAT1, KAT2, AKT1, AKT2/3, AtKC1 und GORK (Pilot *et al.*, 2001, Szyroki *et al.*, 2001; Ache *et al.*, 2000), kann es auch zu einer heteromeren Zusammenlagerung der Kanaluntereinheiten kommen (Dreyer *et al.*, 1997, Pilot *et al.*, 2001). KAT1, KAT2 und AKT1 kodieren für einwärtsgerichtete Kaliumkanäle, AtKC1 scheint kein funktioneller Kanal zu sein und eventuell nur regulatorische Funktionen zu besitzen (Reintanz *et al.*, 2002) und AKT2/3, der in heterologen Expressionssystemen einen weitgehend spannungsunabhängigen Kanal darstellt (Marten *et al.*, 1999), nur als Heteromer vorzukommen (Ivashikina *et al.*, 2003).

1. Einleitung

GORK kodiert den bisher einzigen gefundenen auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanal in Schließzellen (Ache *et al.*, 2000). Folglich führt eine „knock-out“ Mutation dieses Kanals zu einem Verlust der zeitabhängigen K^+ Auswärtsströme (Hosy *et al.*, 2003).

Die einwärts- und auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle zeigen nach spannungsabhängiger Aktivierung keine oder kaum Inaktivierung und können daher für langfristigen K^+ In- oder Efflux sorgen (Schroeder, 1988; Blatt, 1992). Es gibt jedoch verschiedene Möglichkeiten für die Regulation ihrer Aktivität und ihrer spannungsabhängigen Aktivierung. Die Aktivierung der auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle ist von der extrazellulären K^+ -Konzentration abhängig, wobei sich ihr Aktivierungspotential bei steigenden extrazellulären K^+ -Konzentrationen ins positive verschiebt (Blatt, 1988, Schroeder, 1988). Dadurch wird gewährleistet, dass die Auswärtsgleichrichter positiv vom Nernst-Potential für K^+ aktivieren und dieses nicht durch diese Kanäle aufgenommen wird (Blatt, 1988; Ache *et al.* 2000). Die Abhängigkeit der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle von der extrazellulären K^+ -Konzentration ist hingegen noch nicht vollständig geklärt. Während Hertel *et al.* (2005) gezeigt hat, dass bei niedrigen mikromolaren K^+ -Konzentrationen Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle wie deren tierische Homologe inaktivieren (Baukrowitz & Yellen, 1995, Pardo *et al.*, 1992), wurde von Brüggemann *et al.* (1999) diese Inaktivierung nicht beobachtet. Eine Inaktivierung des Einwärtsgleichrichters wäre sinnvoll, da es sonst bei sehr niedrigen K^+ -Konzentrationen und Potentialen positiv des Nernst-Potentials auch zu einem Efflux durch die geöffneten einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle kommen kann.

Neben der extrazellulären K^+ -Konzentration werden Kaliumkanäle auch durch den pH-Wert und Calcium-Ionen (Ca^{2+}) reguliert. So führt beim einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal eine Alkalisierung des zytosolischen pH-Wertes zu einer spannungsunabhängigen Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit (Schroeder & Hagiwara, 1989; Blatt, 1992; Grabov & Blatt, 1997). Erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen hingegen verschieben das Aktivierungspotential der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle zu negativeren Potentialen. Als mögliche Ursachen für diese Ca^{2+} -Abhängigkeit wurde in *Vicia faba* durch Proteinphosphatase-2B Inhibitoren eine Ca^{2+} abhängige Protein-Phosphatase identifiziert (Luan *et al.*, 1993), sowie in *Arabidopsis thaliana* eine Ca^{2+} abhängige Protein Kinase (CDPK)

1. Einleitung

(Li *et al.*, 1998). Auswärtsgleichrichtende Kaliumkanäle deaktivieren bei sinkendem zytosolischen pH-Wert spannungsunabhängig, werden aber nicht durch Ca^{2+} reguliert (Blatt, 1992; Miedema & Assmann, 1996; Roelfsema & Prins, 1998).

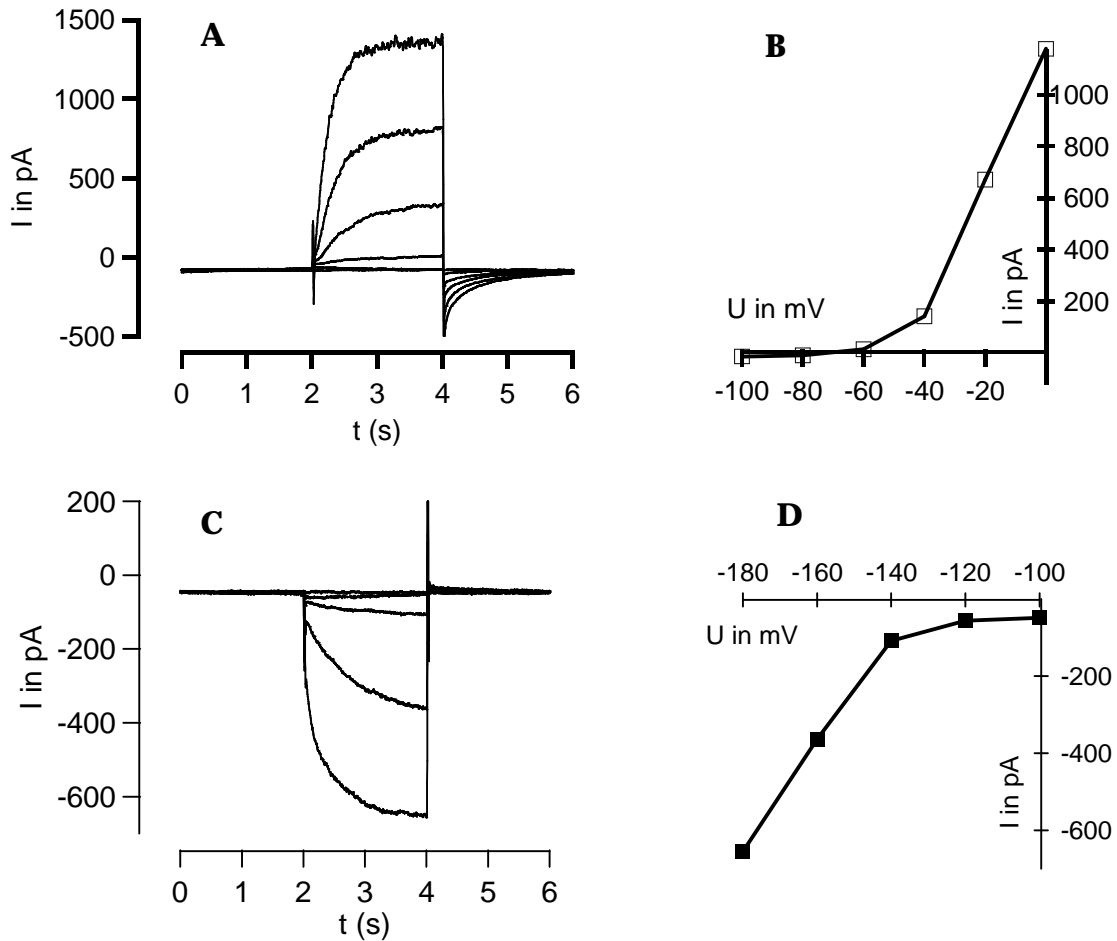


Abb. 1.5: Kaliumströme über die Schließzell-Plasmamembran.

(A) Spannungsabhängige auswärtsgleichrichtende Kaliumkanäle in *N. tabacum*. Die Plasmamembran wurde bei -100mV geklemmt und Testspannungen von -100 bis 0mV in 20mV Sprüngen für je 2 Sekunden angelegt. **(B)** Strom-Spannungskurve der Gleichgewichtsströme nach 2 Sekunden von der Zelle in A. Auswärtsgleichrichtende Kaliumkanäle aktivieren zwischen -80 und -60mV und erreichen zwischen -40 und -20mV ihre maximale Offenwahrscheinlichkeit. **(C)** Spannungsabhängige einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle in einer Schließzelle von *N. tabacum*. Die Plasmamembran wurde bei -100mV geklemmt und Testspannungen von -100 bis -180mV in -20mV Sprüngen für je 2 Sekunden angelegt. **(D)** Strom-Spannungskurve der Gleichgewichtsströme nach 2 Sekunden von der Zelle in C. Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle aktivieren zwischen -120 und -140mV und erreichen zwischen -160 und -180mV ihre maximale Offenwahrscheinlichkeit.

1. Einleitung

Zwischen der Aufnahme des K^+ durch die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle bei Öffnung der Stomata und der Abgabe durch auswärtsgerichtete Kaliumkanäle beim Schließen der Stomata findet für einen Großteil dieses Kations noch die Kompartimentierung in die Vakuole statt. Über die Kaliumaufnahme in die Vakuole ist wenig bekannt. Sie könnte eventuell über NHX oder CHX Transporter stattfinden, die in anderen Geweben für den Antiport von Na^+ und K^+ mit Protonen verantwortlich sind (Venema *et al.*, 2003; Cellier *et al.*, 2004). Die Abgabe könnte über 3 Klassen K^+ permeabler Kanäle erfolgen, slow vacuolar (SV), fast vacuolar (FV) und den hauptsächlich in Schließzellen exprimierten vacuolar- K^+ -selective channel (VK) (Hedrich *et al.*, 1986; Hedrich & Neher, 1987; Schulz-Lessdorf *et al.*, 1995; Allen & Sanders, 1996; Ward & Schroeder, 1994; Martinoia *et al.*, 2000 und Referenzen darin).

SV und FV Kanäle aktivieren bei Depolarisation des Tonoplasten, während VK Kanäle nicht spannungsabhängig sind. Auf genetischer Ebene könnten FV und VK Kanäle von den TPK (Two Pore K-Channels) kodiert werden, die alle außer TPK4 in der Vakuolenmembran anzutreffen sind. Ein möglicher Kandidat für den VK ist TPK1, der einen spannungsunabhängigen und K^+ -selektiven Kanal kodiert (Bihler *et al.*, 2005). SV und FV unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre Namensgebende langsame bzw. schnelle Aktivierungsgeschwindigkeit und deren Calcium-Sensitivität. So sind FV Ca^{2+} inhibiert (Hedrich *et al.*, 1986), während SV als auch VK durch Ca^{2+} aktiviert werden (Hedrich & Neher, 1987; Martinoia *et al.*, und Referenzen darin). Letzterer hat auch eine hohe Ca^{2+} Leitfähigkeit und wird deshalb eher als ein Ca^{2+} Kanal betrachtet (siehe auch Abschnitt 1.2.4).

1.2.3 Anionen sind die Gegenionen von Kalium

Die Beobachtung, dass K^+ beim Öffnen der Stomata in Schließzellen akkumuliert, hat die Frage aufgeworfen wie die positiven Ladungen im Zytosol elektrisch kompensiert werden. Als einfache Lösung bietet sich dabei eine gleichzeitige Akkumulation von negativen Ladungen, also Anionen, an. Humble & Raschke (1971) haben gesehen, dass die Cl^- Konzentration in sich öffnenden Stomata ansteigen kann. Unter den von ihnen gewählten Bedingungen war das aber nicht ausreichend, um die K^+ Aufnahme elektrisch zu

1. Einleitung

kompensieren und so wurde zusätzlich die Synthese von organischen Anionen als Ausgleich für K^+ postuliert. Allaway (1973) hat dann beobachtet, dass in *Vicia faba* die Malat-Konzentration in Schließzellen bei der Stomataöffnung von durchschnittlich 38 auf 75mM ansteigt. Die Bildung von Malat hängt dabei von der Verfügbarkeit von Cl^- im Apoplasten ab. So kann sich in Abwesenheit von extrazellulärem Cl^- die Malat-Konzentration in offenen Stomata auf 145mM annähernd verdoppeln (Raschke & Schnabl, 1978). Malat wird in den Schließzellen durch Reduktion des bei der Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat synthetisierten Oxalacetats gebildet (Asai *et al.*, 2000). Diese Synthesereaktion wird durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) initiiert, von der die Schließzellen ihre eigene Isoform besitzen. Um genügend Malat während der Stomaöffnung produzieren zu können, ist die Aktivität der Schließzell-PEPC ungefähr 10fach höher als die der PEPC im Mesophyll (Outlaw, 1980). Die PEPC wird in einer Form der negativen Rückkopplung durch steigende Malat-Konzentrationen inhibiert. In Schließzellen jedoch wird die PEPC beim Öffnen der Stomata durch Phosphorylierung aktiviert und hierdurch der Effekt von Malat abgeschwächt, weswegen Malat in höheren Konzentrationen akkumulieren kann (Zhang *et al.*, 1994; Cotellet *et al.*, 1999).

Zusätzlich zur Bildung von Malat können Schließzellen verschiedene Anionen aus dem Apoplasten aufnehmen. Das ist wegen des Umkehrpotentials der verschiedenen Anionen, das in der Regel positiv vom Membranpotential liegt, nur durch einen aktiven Transport möglich. In *Arabidopsis thaliana* wurde in diesem Zusammenhang in der Plasmamembran der NO_3^- -Protonen Symporter CHL1 gefunden und gezeigt, dass dieser zu einer Öffnung der Stomata durch Nitratakkumulation beitragen kann (Guo *et al.*, 2003). Da abhängig von der Cl^- -Verfügbarkeit auch die Cl^- -Konzentration in Schließzellen während der Öffnung ansteigen kann (Van Kirk & Raschke, 1978; Penny *et al.*, 1976; MacRobbie, 1984), wird ein Symport von Cl^- mit Protonen ebenfalls vermutet.

Bei der Öffnung der Stomata werden die Anionen nun teilweise in die Vakuole aufgenommen, was über Kanäle stattfinden könnte. So haben Pei *et al.* (1996) CDPK aktivierte, Cl^- und Malat leitende Einwärts-Kanäle in der Vakuolenmembran beschrieben. Bei dem in der Regel negativen Tonoplasten-Potential könnten Anionen durch solche Kanäle passiv von dem Zytosol an die Vakuole abgegeben werden und bei einer Depolarisierung

1. Einleitung

wieder zurück fließen. Bei einem Tonoplastenpotential von nur -30mV könnten monovalente Anionen so bis zur ca. 5fachen und divalente Anionen sogar bis zur 10fachen Konzentration in der Vakuole akkumulieren (Martinoia *et al.*, 2007). Mögliche Kandidaten für solche vakuolären Anionenkanäle und auch für Transporter wären Homologe der tierischen CLC-Kanäle. Diese wurden im Tonoplasten und anderen Endomembranen gefunden und sind für Anionen permeabel (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000; Lurin *et al.*, 2000; Geelen *et al.*, 2000; De Angeli *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2006; Endler *et al.*, 2006). In Reis wurden z.B. die Kanäle OsCLC-1 und 2 identifiziert, die für Cl⁻ Leitfähig sind und in der Vakuolenmembran anzutreffen sind (Nakamura *et al.*, 2006). AtCLCa ist hingegen ein H⁺/NO₃⁻-Antiporter von *Arabidopsis thaliana*, der ebenfalls im Tonoplasten vorkommt und Nitrat in der Vakuole bis zum 50 fachen der zellulären Konzentration anhäufen kann (DeAngeli *et al.*, 2006). Neben den CLCs existiert in *Arabidopsis* noch ein Homolog zum tierischen Natrium/Dicarboxylat-Kotransporter, der Malat-Carrier AtMDT, der für die Aufnahme von Malat in die Vakuole zuständig ist (Emmerlich *et al.*, 2003; Hurth *et al.*, 2005).

Im Zuge des Stomaschlusses werden die Anionen vermutlich spannungsabhängig über Kanäle wieder von der Vakuole an das Zytosol abgegeben. Der Efflux von Anionen aus dem Zytosol wird daraufhin von zwei Kanälen ermöglicht, die in Anlehnung an ihre Aktivierungs- und Deaktivierungs-Geschwindigkeiten als langsamer oder (Slow) S-Typ (Schroeder & Hagiwara, 1989; Linder & Raschke, 1992) und schneller oder (Rapid) R-Typ Anionenkanal bezeichnet werden (Keller *et al.*, 1989; Hedrich *et al.*, 1990). Ihre Namensgebenden Aktivierungskinetiken unterscheiden sich um ca. den Faktor 1000 und liegen beim S-Typ zwischen 5-60 Sekunden (Linder & Raschke, 1992) und beim R-Typ bei 10-50 Millisekunden (Keller *et al.*, 1989). Der R-Typ zeigt im Gegensatz zum S-Typ eine Inaktivierung mit einer Halb-maximalen Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit nach 10-12 Sekunden (Hedrich *et al.*, 1990).

Beide Kanäle werden durch Depolarisation der Plasmamembran aktiviert, der S-Typ zeigt schon einen Strom bei Spannungen um -200mV (Linder & Raschke, 1992), der R-Typ ab -100mV (Keller *et al.*, 1989). Das Aktivierungspotential des R-Typs kann jedoch durch das Phytohormon Auxin und externe organische Anionen wie Malat, Propionat und Acetat zu stark negativen Werten verschoben werden (Hedrich & Marten, 1993, Dietrich & Hedrich,

1. Einleitung

1998). Im Fall von Malat kann dies durchaus eine Änderung des Aktivierungspotentials um bis zu -80 mV bedeuten (Hedrich & Marten, 1993).

Beide Kanaltypen können in derselben Schließzelle nebeneinander vorkommen. In Schließzellen von Epidermispräparationen konnte dabei beobachtet werden, dass die Zusammensetzung des Anionenstroms aus diesen Kanälen manipuliert werden kann. Inaktivierung des R-Typ bei -40mV bzw. Deaktivierung des S-Typ bei -200mV führt zu einem verschwinden des einen und einem auftauchen des jeweils anderen Kanals (Raschke, 2003; Raschke *et al.*, 2003). In outside-out patches von Protoplasten kann man auch eine Konvertierung des R-Typ zu einer Art S-Typ beobachten (Dietrich & Hedrich, 1994). Das hat zu der bisher ungeklärten Frage geführt, ob es sich womöglich bei den Kanälen nur um einen Kanal mit zwei verschiedenen Kinetiken handelt. Die „Ein-Kanal-Hypothese“ wird durch einige Gemeinsamkeiten der beiden Kanäle unterstützt. Zum einen ist die Permeabilität für verschiedene Anionen ähnlich, beim R-Typ ergibt sich die Reihenfolge $\text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{Malat}^{2-}$ (Dietrich & Hedrich, 1994; Hedrich *et al.*, 1990), beim S-Typ $\text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- \sim \text{I}^- > \text{Malat}^{2-}$ (Schmidt & Schroeder, 1994). Zum anderen hat die Einzelkanalleitfähigkeit beider Kanäle ungefähr dieselbe Größenordnung und wird in der Regel mit 30-40pS angegeben (Keller *et al.*, 1989; Linder & Raschke, 1992; Dietrich & Hedrich, 1994). Beide Anionenkanäle werden außerdem durch die Anwesenheit von zytoplasmatischem Ca^{2+} und Nukleotiden aktiviert (Schroeder & Hagiwara, 1989; Hedrich *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1995). Die Aktivierung der Kanäle durch Nukleotide unterscheidet sich jedoch. Während der S-Typ ATP benötigt und durch Kinasen reguliert wird (Schmidt *et al.*, 1995), wird der R-Typ unspezifisch und auch über nicht hydrolysierbare Nukleotide aktiviert (Hedrich *et al.*, 1990). Der R-Typ zeigt noch zwei weitere Regulationsmechanismen. Erstens ist er durch den pH-Wert reguliert und zeigt bei niedrigem zytoplasmatischen pH eine gesteigerte Einzelkanal-Offenwahrscheinlichkeit (Schulz-Lessdorf *et al.*, 1996). Zweitens zeigt er einen „feed-forward“ stimulierten Anionenefflux aus der Zelle, da durch apoplastisch vorliegendes Chlorid dessen Einzelkanalleitfähigkeit erhöht wird (Hedrich & Marten, 1993; Lohse & Hedrich, 1995; Dietrich & Hedrich, 1998).

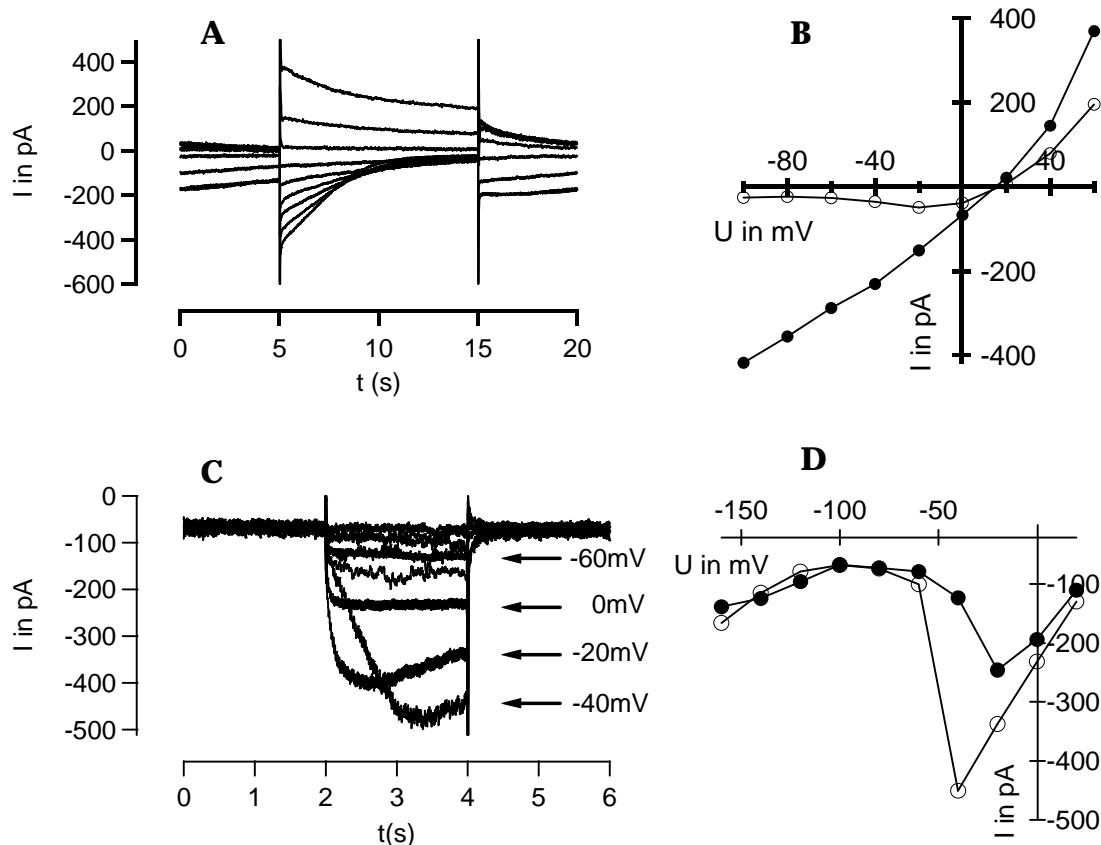


Abb. 1.6: Typische Ströme durch die S- und R-Typ Anionenkanäle der Plasmamembran. (A) S-Typ Anionenströme in einer Schließzelle von *A. thaliana*. Die Plasmamembran wurde von 0mV Haltespannung ausgehend für 10 Sekunden in 20mV Schritten auf Potentiale zwischen +60 und -100mV geklemmt. **(B)** Strom-Spannungskurven der instantanen- (●) und der Gleichgewichtsströme (○) von der in **A** abgebildeten Zelle. Die instantanen Ströme sind aufgrund des langsamen Schaltverhaltens des Kanals quasi linear. Die Gleichgewichtsströme lassen die leichte Depolarisationsaktivierung des Kanals erkennen, mit einem Maximum an Anionenefflux um -20mV. **(C)** R-Typ Anionenströme in einer Schließzelle von *V. faba*. Die Plasmamembran wurde von -100mV ausgehend für 2 Sekunden in 20mV Schritten auf Potentiale zwischen -160 und 20mV geklemmt. Bei -20 und -40mV ist eine leichte zeitabhängige Inaktivierung des Kanals erkennbar. **(D)** Strom-Spannungskurve der instantanen- (●) und der Gleichgewichtsströme (○) von der in **C** abgebildeten Zelle. Der R-Typ Anionenkanal zeigt eine sehr starke Depolarisationsaktivierung, die aufgrund des schnellen Schaltverhaltens auch in den instantanen Strömen beobachtet werden kann.

Noch nicht ganz geklärt ist die Frage, welche Gene die Plasmamembran-Anionenkanäle kodieren. Identifiziert wurde kürzlich SLAC1 als Bestandteil oder regulatorische Komponente des S-Typ Anionenkanals in *Arabidopsis thaliana* (Vahisalu *et al.*, 2008; Negi *et al.*, 2008). Ist SLAC1 mutiert, sind Stomaschlussreaktionen in der intakten Pflanze stark abgeschwächt und Stomata in Epidermispräparaten schließen im Prinzip nicht mehr (Vahisalu *et al.*, 2008; Negi *et al.*, 2008). SLAC1 wird spezifisch in Schließzellen exprimiert, ist an der Plasmamembran anzufinden und hat eine schwache Homologie zu bakteriellen und

pilzlichen Dicarboxylat/Malat Transportern und könnte daher an der Bildung einer Anionen-leitfähigen Pore beteiligt sein (Vahisalu *et al.*, 2008; Negi *et al.*, 2008). Völlig unbeeinflusst von einer Mutation in SLAC1 sind die R-Typ Anionenkanäle (Vahisalu *et al.*, 2008). Das spricht dagegen, dass R-Typ und S-Typ verschiedene Zustände desselben Kanals sind, es sei denn SLAC1 wird nicht für beide Zustände benötigt. Eine Mutation, die zu einem Verschwinden des R-Typ Anionenkanals führt, ist noch nicht bekannt.

1.2.4 Calcium induziert Stomabewegungen

Als letztes wichtiges Ion sei Calcium (Ca^{2+}) zu nennen, das aufgrund der hohen Affinität und Auskristallisation mit Phosphat nicht als Osmotikum dienen kann, sondern vielmehr als Botenstoff fungiert (Clapham, 1995). Wie schon in vorangehenden Abschnitten angesprochen, hat Ca^{2+} regulatorische Einflüsse auf andere Ionentransportaktivitäten und somit auf die gesamte Osmoregulation. So wurde auch schon früh gezeigt, dass extrazelluläres Ca^{2+} die Stomaöffnung unterdrückt (Raschke, 1975 und Referenzen darin; DeSilva *et al.*, 1985a). Andersherum schließen Stomata in Epidermispräparaten nicht in Antwort auf Dunkelheit und CO_2 , wenn extrazelluläres Ca^{2+} komplett mit EGTA gepuffert wird. (Schwartz *et al.*, 1988). McAinsh (1995) hat in *Commelina communis* gezeigt, dass eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} Konzentration zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt und dieser Vorgang durch Plasmamembran Ca^{2+} Kanal Blocker (Verapamil) zum Teil unterbunden wird. Die zytosolische Ca^{2+} -Erhöhung scheint jedoch nicht einfach durch einen größeren Gradienten zwischen Zytosol und Apoplast hervorgerufen zu werden, sondern der Steuerung durch Ca^{2+} Sensor-Proteine zu unterliegen. So ist in Schließzellen ein Calcium Sensor (CAS) in der Plasmamembran gefunden worden und antisense Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* gegen CAS zeigen eine starke Reduzierung der intrazellulären Ca^{2+} Antwort auf extrazelluläres Ca^{2+} (Han *et al.*, 2003).

Dadurch dass im Apoplasten mit $100\mu\text{M}$ ca. 1000fach mehr Ca^{2+} vorhanden ist als im Zytosol mit $\sim 100\text{nM}$ (Felle *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 2001), kommt es durch Aktivierung von Ca^{2+} Kanälen bei physiologischen Potentialen grundsätzlich zu einem Ca^{2+} -Influx. Um diesen

1. Einleitung

extrem großen Gradienten zu gewährleisten und aufrecht zu erhalten, muss Ca^{2+} aktiv aus dem Zytosol transportiert werden. Dafür gibt es Ca^{2+} Transporter in der Plasmamembran, dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi Apparat und dem Tonoplasten (Sanders *et al.*, 2002). Durch diese Kompartimentierung entsteht auch ein steiler Konzentrationsgradient zu den internen Speichern, von denen die Vakuole den wohl wichtigsten darstellt. Die vakuoläre Ca^{2+} Konzentration von Schließzellen ist zwar nicht genau bekannt, es wird aber davon ausgegangen, dass sie denen anderer Gewebe ähnelt. So wurden in Vakuolen von *Zea mays* und *Riccia fluitans* Wurzeln Ca^{2+} Konzentrationen in der Größenordnung von 1,5 bzw. 2,3mM gemessen (Felle, 1988).

In der Plasmamembran wie auch im Tonoplasten haben P-Typ ATPasen des ACA-Typs (Autoinhibierte-Calcium-ATPasen) die Funktion, Ca^{2+} aus dem Zytosol zu entfernen. Sie hydrolysieren ähnlich der Plasmamembran H^{+} -ATPase direkt ATP und bilden eine phosphorylierte Zwischenform, wobei sie Ca^{2+} über die Membran pumpen (Sze *et al.*, 2000; Sanders *et al.*, 2002). Die ACA-ATPasen besitzen eine autoinhibitorische N-terminale Domäne und werden durch Calmodulin stimuliert und durch CDPK-Phosphorylierung (Calcium Dependent Protein Kinase) deaktiviert (Sze *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2000; Harper *et al.*, 1998). Bei diesen Ca^{2+} ATPasen verhindert Calmodulin Bindung die Phosphorylierung und andersherum Phosphorylierung die Calmodulin Bindung, wodurch interessanterweise zwei Calcium-Signalwege einen diametralen Einfluss haben und sich gegenseitig regulieren (Hwang *et al.*, 2000).

In der Vakuole gibt es zusätzlich zu den Ca^{2+} ATPasen noch CAX (Cation eXchanger), welche als $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Antiporter funktionieren (Hirschi *et al.*, 1996, Shigaki & Hirschi, 2006). Diese beiden Transportproteinklassen scheinen verschiedene Aufgaben zu erfüllen, da die ATPasen hohe Affinität und niedrige Transport-Kapazität haben (Sze *et al.*, 2000), während CAX niedrige Affinität und hohe Kapazität hat (Hirschi *et al.*, 1996). So könnte die ATPase unter Normalbedingungen den Ca^{2+} Spiegel im Zytosol stabil halten, während die Funktion von CAX eine Kompartimentierung von Ca^{2+} nach starken Erhöhungen der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration sein könnte (Shigaki & Hirschi, 2006; Pittman & Hirschi, 2003). Die CAX werden vor allem durch verschiedene CXIP (Cation eXchanger Interacting Protein) aktiviert, die an die bei CAX ebenfalls vorhandene autoinhibitorische N-terminale Domäne binden

1. Einleitung

(Cheng & Hirschi, 2003; Cheng *et al.*, 2004). Es gibt auch Hinweise, dass H^+ / Ca^{2+} Antiporter nicht nur in der Vakuole, sondern auch in der Plasmamembran sitzen (Kasai & Muto, 1990), bzw. dass die Ca^{2+} -ATPase einen Protonen-Antiport katalysiert (Rasi-Caldogno *et al.*, 1987; Luoni *et al.*, 2000).

Ca^{2+} Freisetzung aus der Vakuole, wie auch Influx über die Plasmamembran aus dem Apoplasten, erfolgt vermutlich aufgrund des hohen Konzentrationsgradienten passiv. Im Tonoplasten sind durch IP_3 , IP_6 und durch cyclische ADP-Ribose aktivierte Ca^{2+} Kanäle beschrieben worden (Allen *et al.*, 1995; Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003; Leckie *et al.*, 1998). Neben diesen gibt es auch die VVCa Kanäle (Vacuolar Voltage gated Calcium channel), die bei starker Depolarisation des Tonoplasten und Alkalisierung der Vakuole aktivieren (Allen & Sanders, 1994). Auf genetischer Ebene wurde bisher nur der SV-Kanal (TPC1) als ein möglicher Ca^{2+} Kanal beschrieben. Dieser ist für Ca^{2+} leitfähig und könnte daher einen bei positiven Tonoplasten-Potentialen aktivierenden Ca^{2+} Kanal kodieren. Der SV Kanal wird durch Ca^{2+} /Calmodulin, Ca^{2+} und Mg^{2+} aktiviert und durch zytosolische Ansäuerung inhibiert (Bethke & Jones, 1994; Hedrich & Neher, 1987; Carpaneto *et al.*, 2001; Schulz-Lessdorf & Hedrich, 1995).

Die für den Influx zuständigen Ca^{2+} Kanäle der Plasmamembran können durch Dehnung der Plasmamembran („stretch activated“) und durch deren Hyperpolarisation (Hyperpolarization Activated Ca²⁺ Channels, „HACC´s“) aktiviert werden (Cosgrove & Hedrich, 1991; Lohse & Hedrich, 1992; Grabov & Blatt, 1998; Grabov & Blatt, 1999). HACC Aktivierung kann außerdem durch ABA und H_2O_2 erfolgen (Hetherington & Brownlee, 2004). Eine weitere Regulationsmöglichkeit dieser Kanäle ist eine Verschiebung ihres Aktivierungspotentials in positive Richtung durch (De-) Phosphorylierung sowie durch Bindung divalenter Kationen an eine externe Bindungsstelle (Kohler *et al.*, 2002; Hamilton *et al.*, 2001). Mögliche Gene für Plasmamembran lokalisierte Ca^{2+} Kanäle, zu denen man in Schließzellen einen physiologischen Bezug aufbauen konnte, sind bisher noch nicht molekular charakterisiert worden (Hetherington & Brownlee, 2004).

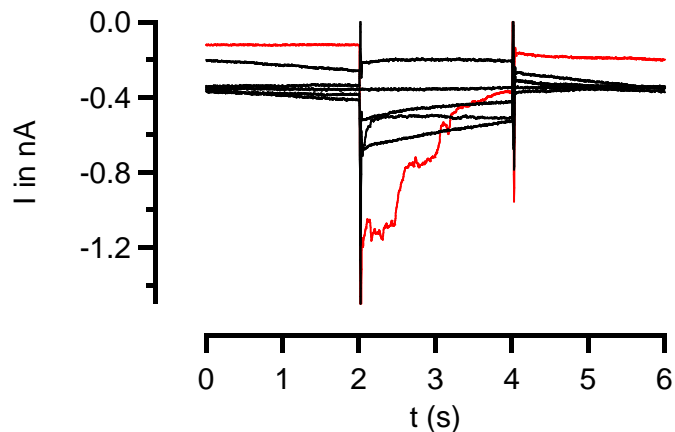


Abb. 1.7: Ca^{2+} Influx durch HACCs. Ströme über die Plasmamembran einer Schließzelle von *N. tabacum*. Ausgehend von einer Haltespannung um -100mV wurden für 2 Sekunden in 20mV Schritten Testspannungen von -180 bis -80mV angelegt. Bei -180mV (rot) aktivieren HACCs und der resultierende Ca^{2+} Influx führt zu einer starken Aktivierung von S-Typ Anionenkanälen bei den darauf folgenden Testspannungen (schwarz).

1.2.5 Koordination des Membrantransports

Die beschriebenen Transporter und Transportprozesse wirken logischerweise bei der Bewegung der Stomata zusammen, da Ionenflüsse über Plasma- und Vakuolenmembran koordinierte Abläufe sind und aufeinander aufbauen. Grundlegend ist eine Energetisierung beider Membranen durch H^+ -ATPasen. Diese haben über die Polarisierung der Membran einen Einfluss auf die Aktivierung von Ionenkanälen und die Fließrichtung von Ionen im elektrischen Feld. Zudem ermöglichen sie durch die Bildung eines Protonen-Gradienten einen H^+ gekoppelten sekundär aktiven Transport durch Sym- und Antiporter.

Für die Öffnung der Stomata müssen prinzipiell zwei Voraussetzungen gegeben sein: Erstens muss die H^+ -ATPase aktiv genug sein, um die Membran auf hyperpolarisierte Potentiale zu bringen. Das sorgt negativ des K^+ -Umkehrpotentials für eine K^+ -Aufnahme durch einwärtsgerichtete Kaliumkanäle, die in diesem Spannungsbereich aktivieren (Pandey *et al.*, 2007 und Referenzen darin; Roelfsema & Hedrich, 2005 und Referenzen darin). Zweitens müssen die Anionenkanäle im Hyperpolarisationsbereich inaktiv sein, um die H^+ -ATPase nicht kurz zu schließen. Ein Großteil des K^+ wird dann in die Vakuole weitertransportiert, vielleicht über die NHX oder CHX Antiporter (Venema *et al.*, 2003; Cellier *et al.*, 2004). Für den Ladungsausgleich müssen nun Anionen in das Zytoplasma aufgenommen oder synthetisiert werden, was durch Symport mit Protonen über die

1. Einleitung

Plasmamembran (Guo *et al.*, 2003), oder durch eine Bildung von Malat in der Zelle durch Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat stattfinden kann (Asai *et al.*, 2000). Malat wiederum versorgt die Zelle mit Protonen, da es größtenteils in die Vakuole transportiert wird und hier wegen des sauren pH-Wertes einfach negativ geladen vorliegen sollte (Roelfsema & Hedrich, 2005). Eine Ansäuerung des Zytosols wiederum sorgt für eine Aktivierung der H⁺-ATPase und somit verstärkte Pumpleistung. Die Anionen gelangen vermutlich über Kanäle, Antiporter wie *AtCLCa* oder im Falle von Malat auch durch den Transporter *AtDT* in die Vakuole (Emmerlich *et al.*, 2003; DeAngeli *et al.*, 2006). Neben Ionentransport wird auch Zuckertransport über die Plasmamembran durch die „proton motive force“ angetrieben, hier findet sich in *Arabidopsis* Schließzellen der Symporter *AtSTP1*, dessen Rolle bei der Öffnung der Stomata allerdings noch nicht geklärt ist (Stadler *et al.*, 2003). Die Aufnahme und eventuell auch Bildung von Mono- und Disacchariden trägt vor allem nach der initialisierenden morgendlichen Öffnung der Stomata durch Ionen wesentlich zum Turgor bei (Talbot & Zeiger, 1996). Dabei werden die Zucker eventuell entweder passiv entlang eines Konzentrationsgradienten durch eine Permease in die Vakuole transportiert oder über Protonenantiport aufgenommen (Martinoia *et al.*, 2000; Neuhaus, 2007).

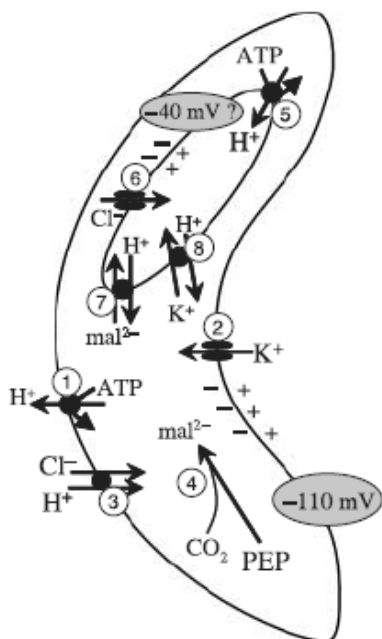


Abb. 1.8: Ionentransportaktivitäten bei der Stomaöffnung, nach Roelfsema & Hedrich, 2005(reproduziert mit Erlaubnis von *New Phytologist*).

- 1.: Die Plasmamembran H⁺-ATPase pumpt H⁺ aus der Zelle, was die Membran hyperpolarisiert und einen H⁺-Gradienten aufbaut.
- 2.: Einwärtsgerichtete K⁺-Kanäle aktivieren aufgrund der Plasmamembran Hyperpolarisation
- 3.: Anionen/H⁺ Symport wird durch den H⁺ Gradienten angetrieben
- 4.: Malat wird von der PEPC im Zytosol synthetisiert
- 5.: Die V-Typ-ATPase pumpt H⁺ in die Vakuole und baut hier ebenfalls ein Potential und einen H⁺-Gradienten auf
- 6.: Cl⁻ strömt aufgrund des Tonoplastenpotentials in die Vakuole
- 7.: Malat wird durch den Antiporter *AtDT* in die Vakuole transportiert
- 8.: K⁺ wird eventuell über *NHX* oder *CHX* Antiporter in die Vakuole transportiert

Das Schließen der Stomata ist von den Ionenflussrichtungen her betrachtet im Prinzip eine Umkehrung der genannten Vorgänge. Da dabei aber weniger aktive Prozesse beteiligt sind,

1. Einleitung

geht der Stomaschluss schneller. Beispielsweise kann die externe Applikation von ABA innerhalb von 10min zu einem Schließen der Stomata führen, was mindestens doppelt so schnell ist, wie die Stomaöffnung im Licht (Roelfsema *et al.*, 2004). Beim Stomaschluss deaktiviert die Plasmamembran H^+ -ATPase und/oder Anionenkanäle werden aktiviert bzw. aktivieren spannungsabhängig und führen so zu einer Depolarisation (Roelfsema & Hedrich, 2005; Pandey *et al.*, 2007). Das führt zu einer Aktivierung von auswärtsgerichtenden Kaliumkanälen und entsprechendem K^+ -Efflux (Roelfsema *et al.*, 2001, 2002). Das K^+ in der Vakuole gelangt vermutlich passiv über K^+ leitende Kanäle in das Zytosol, ebenso wie die Anionen (Roelfsema & Hedrich, 2005). Die Freisetzung von Zuckern aus der Vakuole könnte durch Zucker/Protonen Cotransporter wie *AtSUT4* erfolgen. Dieser ist in Mesophyll Tonoplasten gefunden worden (Endler *et al.*, 2006) und aufgrund der hohen Protonenkonzentration in der Vakuole vermutlich für Export von Zuckern aus der Vakuole zuständig (Neuhaus *et al.*, 2007). Wie Zucker aus dem Zytosol in den Apoplasten gelangt ist jedoch noch unklar, denkbar wären dafür z.B. Permeasen.

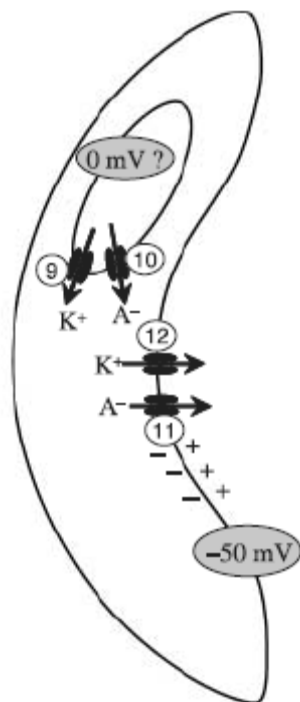


Abb. 1.9: Ionentransportaktivitäten beim Stomaschluss, nach Roelfsema & Hedrich, 2005 (reproduziert mit Erlaubnis von *New Phytologist*).

Ausbleibender H^+ -Transport in die Vakuole und in den Apoplasten depolarisiert den Tonoplasten und die Plasmamembran. Das führt zu

9.: K^+ -Efflux aus der Vakuole

10.: Anionen-Efflux aus der Vakuole

11.: Aufgrund aktivierender Anionenkanäle fließen Anionen aus der Zelle, das depolarisiert die Plasmamembran weiter

12.: Spannungsabhängig aktivieren auswärtsgerichtende K^+ -Kanäle

1.3 Stimuli der Stomabewegungen

Die Öffnungsweite der Stomata und deren Änderungen sind an die photosynthetischen Bedürfnisse und an den Wasserhaushalt der Pflanze angepasst. Wird CO_2 für die Photosynthese gebraucht öffnen die Stomata, während sie bei zu hohem Wasserverlust schließen. Die Öffnung der Stomata kann in C_3 und C_4 -Pflanzen von 3 verschiedenen Signalen ausgelöst werden: (I) Blaulicht, (II) photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) und (III) niedriger inter- bzw. intrazellulärer CO_2 Partialdruck. PAR signalisiert der Pflanze, dass die Stomata öffnen sollen damit CO_2 für die Photosynthese aufgenommen werden kann. Blaulicht hat zudem noch einen PAR unabhängigen Effekt und kann bei geringen Intensitäten zusätzlich zu der PAR bedingten Öffnung wirken (Iino *et al.*, 1985). Niedriger CO_2 Partialdruck wiederum signalisiert der Pflanze, dass dieser für die Photosynthese zu einem limitierenden Faktor werden kann.

Zum Stomaschluss führen dagegen: (I) Wasserstress bzw. Abscisinsäure (ABA) sowie (II) hoher CO_2 Partialdruck. Wasserstress bewirkt als Schutzmechanismus ein Schließen der Stomata, um weiteren übermäßigen Wasserverlust und potentielle Schädigungen durch Austrocknen zu vermeiden. Ein hoher CO_2 Partialdruck signalisiert der Pflanze, dass genug CO_2 für die Photosynthese vorhanden ist und die Stomata schließen können, um unnötigen Wasserverlust zu vermeiden.

1.3.1 Die Reaktion auf photosynthetisch aktive Strahlung

Bei hohen Flussraten übt Licht einen Effekt auf die Stomaöffnung aus, welcher sowohl von Blau- als auch Rotlicht hervorgerufen wird. Beide Wellenlängenbereiche stimulieren die Photosynthese und aktivieren den Photosynthetic-Active-Radiation (PAR) Signalweg. Dass die Photosynthese für diesen Effekt verantwortlich ist, kann man anhand von mit dem Photosyntheseinhibitor DCMU behandelten Pflanzen oder Epidermispräparaten zeigen

1. Einleitung

(Raschke, 1975 und Referenzen darin; Schwartz & Zeiger, 1984; Olsen *et al.*, 2002). Diese reagieren nicht mehr auf PAR aber noch immer auf niedrige CO₂ Konzentrationen, wodurch auch die Hypothese aufgekomen ist, dass PAR über eine photosynthetisch erniedrigte CO₂ Konzentration wirkt (Allaway & Mansfield, 1967). Umgekehrt reagieren Schließzellen in Epidermispräparaten nur auf Rotlicht, wenn gleichzeitig die CO₂ Konzentration im Medium niedrig ist (Olsen *et al.*, 2002).

Der Effekt von PAR scheint nicht direkt auf die Schließzellen zu wirken, sondern über die Bestrahlung des Mesophylls seinen vollen Einfluss zu entfalten. So öffnen z.B. bei *Zea mays* Stomata auf der oberen und unteren Blattepidermis bei PAR Bestrahlung gleich, obwohl auf der bestrahlten Seite die Lichtintensität ca. 200fach größer ist (Raschke *et al.*, 1978). Elektrophysiologisch zeigen Schließzellen keine Reaktion wenn sie direkt von PAR bestrahlt werden, sondern nur wenn das Mesophyll um die Spaltöffnung herum großflächig beleuchtet wird (Roelfsema *et al.*, 2002). Das deutet darauf hin, dass es nur zu einer Antwort der Schließzellen kommt, wenn sich auch die CO₂ Konzentration in den Interzellularen ändert. Ein Gegenargument dazu ist allerdings, dass Schließzell-Protoplasten bei Rotlichtbestrahlung einen kleinen Pumpstrom, bzw. eine um ca. 20% verstärkte Ansäuerung des umgebenden Mediums zeigen können und somit die Bestrahlung direkt wahrzunehmen scheinen (Serrano *et al.*, 1988; Tominaga *et al.*, 2001). In einer Studie von Taylor & Assmann (2002) wurde ein Rotlicht induzierter Pumpstrom in Schließzell-Protoplasten jedoch nicht beobachtet und daher ist die Relevanz dieser von Serrano *et al.* (1988) gemachten Entdeckung weiterhin unklar.

PAR wirkt zwar höchstwahrscheinlich über eine Änderung in der CO₂ Konzentration, aber wie das im Endeffekt von den Schließzellen wahrgenommen wird ist noch nicht bekannt. Bisher konnte noch keine der zahlreich dazu aufgestellten Hypothesen bewiesen werden. Auch über die Signaltransduktion während der Antwort auf CO₂ ist noch nicht viel publiziert worden.

Eine Signaltransduktionskomponente ist wahrscheinlich die hauptsächlich in Schließzellen exprimierte Protein-Kinase HT1 (High leaf Temperature), welche einen CO₂ insensitiven, geschlossene Stomata Phänotyp erzeugt (Hashimoto *et al.*, 2006). Zwei anorganischen

1. Einleitung

Botenstoffen wird ebenfalls eine Funktion während der CO₂ Antwort zugeschrieben, nämlich Ca²⁺ Ionen und Wasserstoffperoxid. So wurde eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration in ca. 2 von 3 Schließzellen von *Commelina communis* bei CO₂ Gabe beobachtet (Webb *et al.*, 1996). Zudem reagieren Stomata schwächer auf hohes CO₂, wenn externes Ca²⁺ gepuffert, Ca²⁺ Kanäle geblockt oder Calmodulin Antagonisten verabreicht werden (Schwartz *et al.*, 1988; Cousson *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2002). Allerdings zeigten zum einen in der Arbeit von Webb *et al.* (1996) 9 von 33 Zellen keinerlei Ca²⁺ Erhöhung. Zum anderen scheinen niedrige atmosphärische CO₂ Konzentrationen spontan auftretende Ca²⁺ „Spitzen“ in *A. thaliana* hervorzurufen und hohe CO₂ Konzentrationen die Häufigkeit dieser Ca²⁺-Spitzen zu unterdrücken (Young *et al.*, 2006). Eine Pufferung des intrazellulären Ca²⁺ Spiegels mit BAPTA konnte in derselben Studie eine dauerhafte Reaktion auf hohe CO₂ Konzentrationen unterbinden, jedoch kam es zu einem transienten Stomaschluss. Das legt die Folgerung nahe, dass es bei der CO₂ Antwort Ca²⁺ abhängige als auch unabhängige Phasen gibt (Young *et al.*, 2006).

Über Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als Botenstoff bei der CO₂ Antwort ist noch weniger bekannt als über Ca²⁺. Die Konzentration an H₂O₂ scheint in Schließzellen von Epidermispräparaten anzusteigen, wenn diese Bicarbonat ausgesetzt werden, welches bei saurem pH-Wert CO₂ freisetzt (Kolla *et al.*, 2006). Wird dieses H₂O₂ abgefangen oder dessen Bildung inhibiert, ist auch die Antwort auf Bicarbonat reduziert (Kolla *et al.*, 2006).

Auf elektrophysiologischer Ebene konnte bei einem Wechsel von niedrigen CO₂ Konzentrationen zu hohen eine verstärkte Leitfähigkeit von S-Typ Anionenkanälen (Brearley *et al.*, 1997; Roelfsema *et al.*, 2002; Raschke *et al.*, 2003) bzw. verstärkter Anionenefflux und eine erhöhte apoplastische Anionenkonzentration beobachtet werden (Hanstein & Felle, 2002). Die Anionenkanalaktivierung und der darauf folgende Anionenefflux führen vermutlich zu einer Depolarisation der Schließzell-Plasmamembran. Der Anionenefflux hat im Licht und im Dunkeln dasselbe Ausmaß, weshalb die oft geäußerte Vermutung, es könnte sich bei dem CO₂ Signal um ein (Zwischen-) Produkt der Photosynthese handeln nicht zuzutreffen scheint (Hanstein & Felle, 2002). Ein von Brearley (1997) gezeigter Effekt von CO₂ auf die Aktivität von Kaliumkanälen konnte in der intakten Pflanze nicht bestätigt werden (Roelfsema *et al.*, 2002). Da die Aktivierung der Anionenkanäle bei hohem CO₂

jedoch ausreicht um die Schließzellmembran zu depolarisieren, erfolgt eine Umkehr des K⁺ Fluxes auch ohne Veränderung der Kaliumkanalaktivität (Roelfsema *et al.*, 2002).

1.3.2 Blaublicht spezifische Stomaöffnung

Eine durch blaues Licht spezifisch ausgelöste Stomaöffnung kann in vielen C₃, C₄ und fakultativen CAM Pflanzen im C₃, aber nicht im CAM Modus beobachtet werden (Shimazaki *et al.*, 2007). Der Blaublichteffekt ist besonders unter Bedingungen mit hoher, den PAR Effekt sättigender Rotlicht Hintergrund Bestrahlung ausgeprägt (Shimazaki *et al.*, 2007). Das bedeutet, dass beide Effekte additiv sind und verschiedenen Ursprung haben, also nicht beide über die Erniedrigung der interzellulären CO₂ Konzentration wirken. In intakten Pflanzen hat Blaublicht im Vergleich zu Rotlicht (PAR) eine 20mal höhere Quanteneffizienz bei der Induktion der Stomaöffnung (Shimazaki *et al.*, 2007 und Referenzen darin), zudem reichen auch schon kurze Lichtpulse aus, um hier eine Öffnung zu induzieren (Iino *et al.*, 1985). Blaublicht wird im Gegensatz zu PAR von den einzelnen Schließzellen wahrgenommen und nicht indirekt durch das Mesophyll ausgelöst (Assmann *et al.*, 1985). Das bedeutet, dass die Schließzellen ihren eigenen Rezeptor besitzen. Die Blaublicht-Rezeption wurde zuerst dem Blaublicht absorbierenden Carotinoid Zeaxanthin zugeschrieben, da in mehreren Studien scheinbar gezeigt wurde, dass die Reaktivität auf Blaublicht mit dem Gehalt an Zeaxanthin zusammen hängt (Zeiger & Zhu, 1998; Talbott *et al.*, 2003). Allerdings ist bei Carotinoid-Biosynthese gehemmtem *Triticum aestivum* trotzdem noch eine Blaublicht induzierte Stomaöffnung vorzufinden (Karlsson *et al.*, 1983) und bei der Zeaxanthin defizienten Mutante *npq1* von *Arabidopsis thaliana* ein Blaublicht Effekt vorhanden (Eckert *et al.*, 2000; Kinoshita *et al.*, 2001). Trotzdem wird dem Zeaxanthin immer wieder eine Funktion bei der Stomaöffnung zugeschrieben, denn die von Frechilla *et al.* (2000) beschriebene spezifische Grünlicht-Reversibilität der Blaublicht-induzierten Stomaöffnung funktioniert nicht in *npq1* (Talbott *et al.*, 2006).

Von Kinoshita *et al.* (2001) wurde aber ein anderer viel versprechender Blaublicht-Rezeptor in *A. thaliana* mit der Blaublicht-induzierten Stomaöffnung in Verbindung gebracht. Kinoshita *et*

1. Einleitung

al. (2001) haben gesehen, dass die Abwesenheit der Blaulicht absorbierenden Serin/Threonin Kinasen Phototropin 1 und 2 zu einem Blaulicht-insensitiven Stomata-Phänotyp führt. Phototropin 1 war zwar schon vorher als Blaulichtrezeptor bekannt, da aber beide Phototropine für den Phototropismus zuständig sind und in Schließzellen redundant und bei den gleichen Lichtintensitäten funktionieren, ergeben die Einzelmutanten keinen stomatären Phänotyp (Christie *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 2001).

Diese so genannten Phototropine (PHOTs) absorbieren UV-A sowie Blaulicht und regulieren neben der Bewegung der Stomata, ihrem Namen entsprechend, phototropistische Blaulichteffekte, zu denen Wachstumsbewegungen, Bewegung von Chloroplasten und Blattexpansion zählt (Briggs & Christie, 2002). Die genannten Effekte von Phototropinen können in *A. thaliana* bei Wellenlängen von 350 bis ca. 500nm beobachtet werden, mit einer maximalen Effizienz um 450 nm (Christie *et al.*, 1998). Phototropine sind Rezeptorkinasen, welche an der Plasmamembran vorzufinden sind (Sakamoto & Briggs, 2002; Harada *et al.*, 2003). Sie bestehen aus einer C-terminalen Serin/Threonin-Kinase und 2 LOV (Light-Oxygen-Voltage) Domänen, die beide ein Flavinmononucleotid (FMN) als Chromophor binden (Christie *et al.*, 1999). Bei Bestrahlung wird dieses FMN kovalent mit einem Cystein-Rest verknüpft (Swartz *et al.*, 2001), was zu Konformationsänderungen zwischen LOV2 und der Kinasedomäne führt (Tokutomi *et al.*, 2007). Das Phototropin wird danach autophosphoryliert (Christie *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2001) und kann ein regulatorisches 14-3-3 Protein binden (Kinoshita *et al.*, 2003). Infolge dieser 14-3-3 Bindung könnten die Phototropine wiederum die Plasmamembran H⁺-ATPase aktivieren, denn diese zeigt zeitlich leicht verzögert eine Aktivitätssteigerung (Kinoshita *et al.*, 2003).

Die beiden LOV Domänen der Phototropine sind funktional nicht identisch und besitzen unterschiedliche photochemische Eigenschaften (Salomon *et al.*, 2000; Kasahara *et al.*, 2002). Für den Phototropismus scheinen die LOV2 Domänen maßgeblich verantwortlich zu sein, während eine Funktion der LOV1 Domänen noch ungewiss ist (Cho *et al.*, 2007; Christie *et al.*, 2002). Möglicherweise ist LOV1 für eine Abschwächung der durch LOV2 induzierten Kinase-Aktivität der Phototropine zuständig, da LOV1 die Aktivierung von LOV2 zu 3 bis 4fach höheren Blaulichtflussraten verschiebt (Matsuoka & Tokutomi, 2005).

1. Einleitung

Ein in der Signalkette unterhalb von den Phototropinen befindliches Zielprotein, welches direkt von den Blaulichtrezeptoren phosphoryliert wird, ist noch nicht bekannt. Allerdings ist dadurch, dass Kinasedomänen allein zu einer konstitutiven Blaulichtantwort führen, erkennbar, dass die Kinaseaktivität für den Blaulichteffekt wichtig ist (Kong *et al.*, 2007). Auch wenn ansonsten über die Kinaseaktivität wenig bekannt ist, so hat man schon Proteine gefunden, die mit den Phototropinen interagieren. Dementsprechend scheint PHOT1 in *A. thaliana* an RPT2 zu binden und diese Interaktion für die Stomataöffnung durch dieses Phototropin notwendig zu sein (Inada *et al.*, 2004). Ebenfalls an PHOT1, allerdings in *Vicia faba*, scheint VIPIP (Phototropin Interacting Protein) zu binden. Dieses Protein ist mit kortikalen Mikrotubuli assoziiert und steuert deren Reorganisation während der Blaulichtantwort (Emi *et al.*, 2005). Von Mao *et al.* (2005) wurde auch eine Funktion für COP1 (Constitutive Photomorphogenesis 1) bei der Signaltransduktion während der stomatären Blaulichtantwort beschrieben, wobei allerdings fraglich ist, wie ein Kern-lokalisiertes Protein die Blaulicht induzierte Stomaöffnung beeinflusst.

Der Effekt, der die Öffnung der Stomata initiiert, ist die Aktivierung der Plasmamembran H^+ -ATPase. Das konnte sowohl durch eine Ansäuerung des Mediums um Schließzellprotoplasten und Epidermispräparate (Shimazaki *et al.*, 1986; Roelfsema *et al.*, 1998), als auch elektrophysiologisch in Protoplasten und Schließzellen der intakten Pflanze gezeigt werden (Assmann *et al.*, 1985, Roelfsema *et al.*, 2001). Damit zusammenhängend konnte eine Phosphorylierung der H^+ -ATPase in Antwort auf Blaulicht, eine Bindung eines regulatorischen 14-3-3 Proteins, sowie ein darauf folgender Anstieg deren ATP-Hydrolyse und Pump-Aktivität gefunden werden (Kinoshita & Shimazaki, 1999). Phosphorylierung der H^+ -ATPase wie auch Pumpstrom sind nach ungefähr 3min maximal und nehmen dann ab, um auf einem leicht erhöhten „steady-state“ Niveau zu verbleiben (Assmann *et al.*, 1985; Kinoshita & Shimazaki, 1999; Roelfsema *et al.*, 2001). An dem Signalweg zwischen den Phototropinen und dieser Aktivierung der H^+ -ATPase scheinen Proteinphosphatasen vom Typ PP1 beteiligt zu sein. Werden diese inhibiert, so unterbleibt auch die Blaulicht induzierte Phosphorylierung der H^+ -ATPase und deren Pumpstrom (Takemiya *et al.*, 2006). Da die H^+ -ATPase bei gleichzeitig geringer Aktivität der Anionenkanäle die Plasmamembran hyperpolarisieren kann, können nun infolgedessen K^+ durch die einwärtsgerichteten

Allerdings fehlt hierbei noch ein direkter Nachweis, dass Ca^{2+} Kanäle aktiviert werden, bzw. Phototropin Aktivierung die Ca^{2+} Konzentration verändert. Für ganze Blätter und Cotyledonen konnte hingegen schon nachgewiesen werden, dass Blaulichtbestrahlung Phototropin abhängig einen Ca^{2+} Influx sofort nach Bestrahlung hervorruft, bzw. dass im Mesophyll innerhalb einiger Minuten Ca^{2+} Kanäle aktiviert werden (Babourina *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2003; Stoelzle *et al.*, 2003).

1.3.3 Abscisinsäure schließt die Stomata

Neben den Stoma-Antworten auf Licht und CO_2 , also Stimuli welche auf die Optimierung der Photosynthese zielen, reagieren Schließzellen auch auf den Wasserstatus der Pflanze. Dabei muss eventuell unterschieden werden zwischen Wasserstress aufgrund sinkendem atmosphärischem Wasserpotential und sinkendem Wasserpotential im Boden (Assmann *et al.*, 2000). Eine Aufteilung in diese beiden „Arten“ von Wasserstress ist aber fragwürdig, da ein Unterschied in den Signaltransduktionswegen noch nicht mit Sicherheit gezeigt werden konnte (Yoshida *et al.*, 2002; 2006; Xie *et al.*, 2006). Daher soll im Folgenden nur das hauptsächlich untersuchte sinkende Wasserpotential im Boden vorgestellt werden.

Ein sinkendes Wasserpotential im Boden führt zu einer Produktion von ABA und ABA-Glycosylester (ABA-GE) in den Wurzeln und verstärkte Transpiration zu deren Mobilisierung (Hartung *et al.*, 2002). Als Folge gelangen ABA und seine Glykosylester in das Xylem und kommen mit dem Transpirationsstrom zu den Stomata (Hartung *et al.*, 2002; Wilkinson & Davies, 2002). ABA-GE stellt eine inaktive Transportform von ABA dar und wird im Blatt von Glykosidasen in die aktive Form gespalten (Sautere *et al.*, 2002). Ebenso wird ABA bei Wasserstress direkt im Blatt aus gespeichertem ABA-GE gebildet, was durch eine Polymerisierung von β -Glykosidasen und eine dadurch gesteigerte Hydrolyseaktivität ausgelöst wird (Lee *et al.*, 2006). Zusätzlich zu der Aufnahme von ABA könnten Schließzellen auch fähig sein dieses selbst zu produzieren. Ein Hinweis darauf ist, dass die Expressionsrate des in die ABA-Biosynthese involvierten Gens Aldehyd Oxidase 3 während Trockenstress ansteigt (Koiwai *et al.*, 2004).

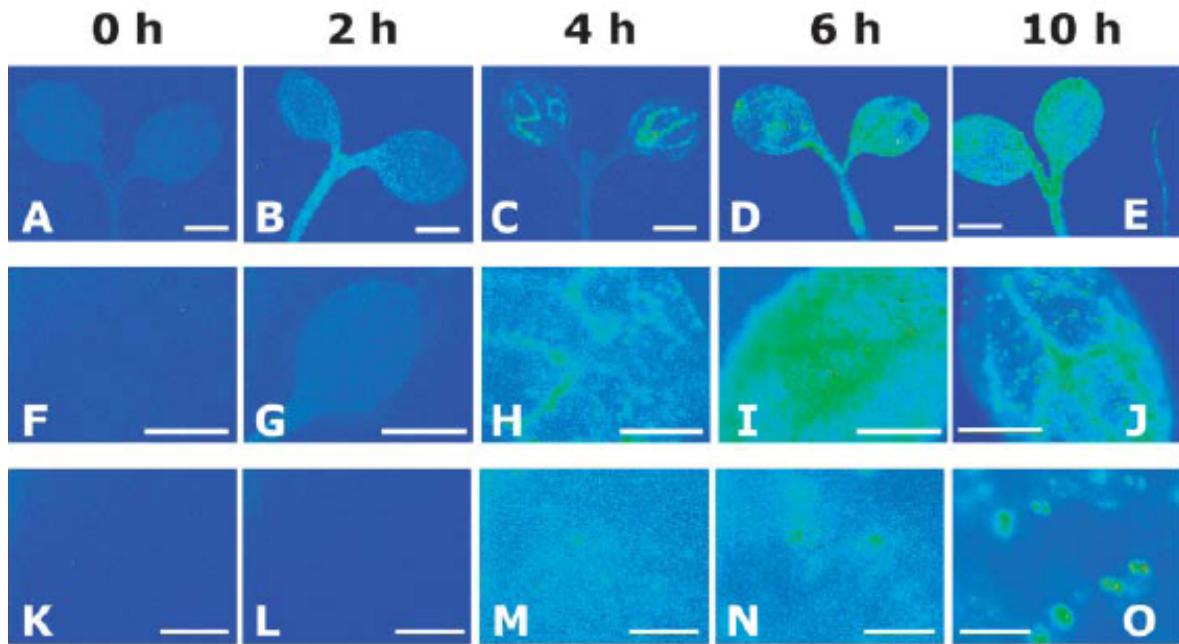


Abb. 1.11: Dynamik der Induktion des ABA Reporters *AtHB6* als Fusionsprotein mit Luziferase durch Wasserstress an der Wurzel, aus Cristmann *et al.*, 2005 . A, F und K zeigen die Luziferase Hintergrundaktivität. B-E zeigen die Reporterexpression in Cotyledonen und Spross zu den angegebenen Zeiten nach Einsetzen des Wasserstresses. G-J zeigen eine Vergrößerung der Cotyledonen und L-O zeigen die Expression in Schließzellen. Nach 4h ist die Expression vor allem in den vaskulären Geweben anzufinden (C, H). Nach 6h ist die Expression über Cotyledonen und Spross verteilt und teilweise auch in Schließzellen anzutreffen (D, I, N). Nach 10h ist die Expression wieder verstärkt in den vaskulären Geweben und stark in den Schließzellen (E, J, O).

Die durch ABA in den Schließzellen ausgelöste Signaltransduktion scheint relativ komplex zu sein und von vielen Faktoren beeinflusst zu werden. Die ersten identifizierten an den Signalwegen beteiligten Komponenten sind ABI1 und 2 (ABA Insensitive), welche Proteinphosphatasen vom Typ 2C (PP2C) darstellen. ABI1 und 2 wurden dadurch entdeckt, dass Pflanzen mit Punktmutationen in deren kodierenden Genen bei Keimung und Wachstum nicht durch ABA inhibiert werden (Koornneef *et al.*, 1984). Zudem beeinflusst ABA in diesen Pflanzen nicht mehr die zum Schließen notwendigen Ionentransportaktivitäten der Schließzellen, was zu stärker geöffneten Stomata führt (Roelfsema & Prins, 1995; Armstrong *et al.*, 1995; Pei *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1999). Diese PP2Cs und weitere inzwischen bekannte (AHG3, HAB1, HAB2 und AHG1) stellen allesamt negative Regulatoren der ABA Antwort dar, die ihrerseits reguliert werden (Hirayama & Shinozaki, 2007). So ist von ABI1 bekannt, dass es durch Phosphatidat (PA) inhibiert wird, welches wiederum von der Phospholipase D (PLD) durch Lipidspaltung während der ABA

1. Einleitung

Antwort produziert wird (Mishra *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004). PLD ihrerseits wird von der an der ABA Signaltransduktion beteiligten G-Protein *alpha* Untereinheit GPA1 bei deren Aktivierung und dem damit verbundenen GDP/GTP Austausch freigesetzt (Zhao & Wang, 2004).

Eine Funktion der PP2Cs könnte die ABA abhängige Regulation verschiedener Kinasen sein. So scheint ein Wildtyp ABI1 erforderlich zu sein, damit die SNF1-related-kinase SnRK2.6, wegen des knockout Phänotyps auch bekannt als OST1 (Open Stomata), während der ABA Antwort aktiviert werden kann (Yoshida *et al.*, 2006). OST1 ist nicht die einzige SnRK, die an der ABA Signaltransduktion beteiligt zu sein scheint. So führen Loss-of-function Mutanten von OST1 und anderen SnRK2- und SnRK3-Typ Kinasen entweder zu ABA hyper- oder insensitiven Phänotypen (Guo *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2006; Ohta *et al.*, 2003). Diese Kinasen sind nicht nur aus *Arabidopsis thaliana* bekannt, sondern z.B. auch aus *Vicia faba*, wo noch vor OST1 die dazu homologe Kinase AAPK (ABA Activated Protein Kinase) entdeckt wurde (Li *et al.*, 1996; 2000).

AAPK und OST1 werden Ca^{2+} unabhängig während der ABA Antwort aktiviert (Li *et al.*, 2000; Mustilli *et al.*, 2002), während eine andere Klasse der SnRKs, die SnRK3 Kinasen (auch CIPK, CBL Interacting Protein Kinase) mit verschiedenen Ca^{2+} bindenden Proteinen assoziieren (Guo *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; D'Angelo *et al.*, 2006). Zudem binden einige der an der ABA Antwort beteiligten Kinasen, die sog. CDPKs (Calcium Dependent Protein Kinase), direkt Ca^{2+} . (Cheng *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2006). Diese CDPKs scheinen die ABA induzierte Gen-Expression zu beeinflussen (Choi *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2007), sowie Auswirkungen auf Schließzell-Ionenkanäle zu haben. So sind Ca^{2+} und S-Typ Anionenkanäle in *cpk3/cpk6* Mutanten weniger durch ABA aktiviert als dies im Wildtyp zu sehen ist (Mori *et al.*, 2006).

Die Beteiligung Ca^{2+} abhängiger Kinasen an der ABA-Antwort korreliert mit der Tatsache, dass bei verschiedenen Spezies während ABA Gabe Ca^{2+} im Zytosol ansteigen kann (Schroeder & Hagiwara, 1990; McAinsh *et al.*, 1990, 1992; Gilroy *et al.*, 1991; Allan *et al.*, 1994; Staxen *et al.*, 1999; Webb *et al.*, 2001). Dass Ca^{2+} wichtig für die ABA-Antwort ist wurde dadurch gezeigt, dass hohe extrazelluläre Ca^{2+} Konzentrationen eine ABA verstärkende

1. Einleitung

Wirkung und Ca^{2+} Kanalblocker bzw. Ca^{2+} Puffer eine inhibierende haben (DeSilva *et al.*, 1985a; 1985b; Webb *et al.*, 2001). In einigen Studien mit *Commelina communis* wurden jedoch auch Antworten ohne einen zytosolischen Anstieg von Ca^{2+} beobachtet, so dass dieser nicht zwingend erforderlich für eine Reaktion zu sein scheint (McAinsh *et al.*, 1990, 1992; Gilroy *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1994). Zudem konnten zwar in Schließzellprotoplasten von *Vicia faba* Antworten mit Ca^{2+} -Anstieg beobachtet werden (Schroeder & Hagiwara, 1990), nicht jedoch in intakten Pflanzen derselben Spezies (Levchenko *et al.*, 2005).

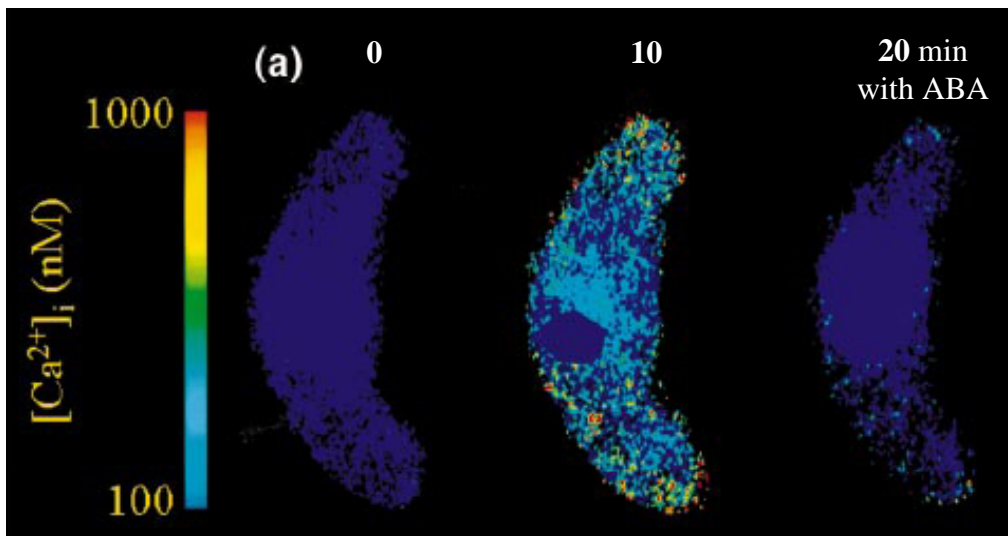


Abb. 1.12: Zytosolische Ca^{2+} Änderung nach ABA Applikation, aus Webb *et al.*, 2001. *Commelina communis* Schließzellen in Epidermispräparaten wurden mit FURA2 beladen und $1 \mu\text{M}$ ABA ausgesetzt. Nach 10min ABA Applikation ist ein transientes Ca^{2+} Signal im Zytosol zu sehen, das nach 20min wieder verschwunden ist.

Da ein Anstieg jedoch oft beobachtet werden konnte, bzw. die verstärkende Wirkung von Ca^{2+} auf die ABA Antwort gezeigt wurde, geht man davon aus, dass Ca^{2+} eine wichtige Rolle spielt. Dabei wird nicht nur einem Ca^{2+} Anstieg an sich, sondern auch dem Muster des Anstiegs eine Bedeutung bzw. Funktion zugeordnet. So werden nach ABA-Gabe gelegentlich Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet (Staxen *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Ebenso können Oszillationen auch von anderen Stimuli wie externes Ca^{2+} , Kälte oder oxidativen Stress ausgelöst werden und scheinen ein Stimuli spezifisches Muster (Frequenz und Dauer) zu haben, welches zu der jeweiligen Schließzellreaktion führt (Allen *et al.*, 2000). Experimente mit künstlich erzeugten Ca^{2+} Oszillationen haben gezeigt, dass transiente Ca^{2+} Erhöhungen zwar zu einem Stomaschluss führen, jedoch eine bestimmte Oszillationsfrequenz bzw. eine

1. Einleitung

bestimmte Anzahl an Oszillationsspitzen nötig ist, um Schließzellen langfristig auf „Schließen“ zu programmieren und ein Wiederöffnen zu unterbinden (Allen *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004). Allerdings wurde im Widerspruch zu dieser Theorie auch schon beobachtet, dass ABA zu einer Inhibition von Ca^{2+} Oszillationen führen kann (Klüsener *et al.*, 2002).

In dem Fall, dass die zytosolische Ca^{2+} Konzentration bei der ABA-Antwort ansteigt, könnte es durch hyperpolarisations-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle (HACC's) in die Zelle gelangen (Grabov & Blatt, 1998). Diese wurden in patch-clamp Untersuchungen in *V. faba* Schließzell-Protoplasten stark durch ABA aktiviert (Hamilton *et al.*, 2000), bzw. in *A. thaliana* durch H_2O_2 Bildung nach ABA Gabe stimuliert (Pei *et al.*, 2000). Für eine extrazelluläre Herkunft des Ca^{2+} spricht auch die Beobachtung, dass wenn Ca^{2+} im externen Medium fehlt, die zytosolische Ca^{2+} Erhöhung ausbleibt (Klüsener *et al.*, 2002). Eine andere Möglichkeit wäre auch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern durch cADP-Ribose (cADPR) (Wu *et al.*, 1997; Lekie *et al.*, 1998) und Inositolphosphate wie Inositol-(1,4,5)-Triphosphat (IP_3) und myo-inositol Hexakisphosphat (IP_6) (Gilroy *et al.*, 1990; Lemtiri-Chlieh, 2003), die angeblich allesamt zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus der Vakuole führen (Lekie *et al.*, 1998; Alexandre *et al.*, 1990; Lemtiri-Chlieh, 2003).

Von den oben genannten Signalmolekülen (cADPR, IP_3 , IP_6) war jedoch *in planta* nur cADPR fähig, bei Injektion in einzelne Schließzellen eine kleine elektrophysiologisch sichtbare Reaktion hervorzurufen, weswegen deren Beteiligung an der ABA induzierten Stomaschlussreaktion noch fragwürdig ist (Levchenko *et al.*, 2005). Zudem ist ein IP_3 Rezeptor in Pflanzen noch nicht gefunden worden, weshalb noch in Diskussion ist ob IP_3 *in planta* in IP_6 konvertiert wird und darüber die beobachteten Effekte ausübt (Krinke *et al.*, 2007 und Referenzen darin).

Falls IP_3 oder IP_6 dennoch eine Funktion haben, so wirken sie eventuell über eine Stimulation der Bildung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), darunter H_2O_2 , welches wiederum auf Ca^{2+} Kanäle wirkt und Stomaschluss hervorruft (McAinsh *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2003). Eine Quelle für diese ABA induzierte ROS Produktion könnten in Schließzellen exprimierte NADPH-Oxidasen sein. So zeigt eine *A. thaliana* Mutante, welcher die Oxidase Untereinheiten *AtrbohD* und *AtrbohF* fehlen, einen reduzierten Stomaschluss nach ABA

1. Einleitung

Gabe (Kwak *et al.*, 2003). Zudem kommt es in dieser weder zu Ca^{2+} Anstieg, ROS Produktion noch Stimulation von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran (Kwak *et al.*, 2003). Die von ROS ausgelösten Effekte könnten über diverse Stress induzierte MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase) arbeiten. Wird z.B. eine p38 ähnliche MAPK in *Vicia faba* inhibiert, unterbleibt eine ABA-Reaktion und H_2O_2 induzierter Stomaschluss (Jiang *et al.*, 2007). Ebenso werden in *A. thaliana* die MAP-Kinasen AtMPK1, 2 und 3 durch H_2O_2 aktiviert, deren Rolle bei der ABA Antwort ist jedoch noch unerforscht (Gudesblat *et al.*, 2007; Ortiz-Masia *et al.*, 2007). In der Signaltransduktionskette ebenfalls nach ROS scheint die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) zu stehen, welches wiederum zur Produktion von der schon angesprochenen cADPR führt (Neill *et al.*, 2002; García-Mata *et al.*, 2002; Bright *et al.*, 2006).

Letztendlich führt ABA zu einer Aktivierung von in der Plasmamembran befindlichen Anionenkanälen und zu Anionenefflux aus dem Zytosol (Thiel *et al.*, 1992; Pei *et al.*, 1997; Raschke *et al.*, 2003; Roelfsema *et al.*, 2004; Levchenko *et al.*, 2005). Das gilt sowohl für R- als auch S-Typ Anionenkanäle (Roelfsema *et al.*, 2004). Die Anionenkanäle zeigen nach ABA Stimulation eine transiente Aktivierung mit einem Maximum nach 2 bis 5min, woraufhin ihre Aktivität wieder zurückgeht. Das Niveau vor ABA-Gabe wird jedoch erst nach Entfernung des ABA erreicht (Roelfsema *et al.*, 2004; Levchenko *et al.*, 2005). Als ein Regulator für diese Aktivierung der Anionenkanäle und auch der an der ABA Antwort beteiligten Ca^{2+} permeablen Kanäle könnte in *A. thaliana* das Membran lokalisierte ATP-binding-Cassette (ABC-) Protein AtMRP5 dienen. In *mrp5* fehlen nämlich die Antworten der genannten Kanäle, allerdings ist nicht bekannt wie genau dieses Protein die Ionenkanäle beeinflusst (Suh *et al.*, 2007).

Die Anionenkanalaktivierung führt zu einer Depolarisation der Plasmamembran und damit auch zu einer spannungsabhängigen Aktivierung der auswärtsgerichteten Kaliumkanäle (Roelfsema *et al.*, 2004). Zusätzlich zu einer spannungsabhängigen Aktivierung ist in Protoplasten und isolierter Epidermis oftmals eine Erhöhung der Leitfähigkeit auswärtsgerichteter Kaliumkanäle und eine Erniedrigung der Leitfähigkeit einwärtsgerichteter Kaliumkanäle beobachtet worden (Thiel *et al.*, 1992; Blatt & Armstrong, 1993; Schwartz *et al.*, 1994). Dabei scheint die erhöhte Leitfähigkeit auswärtsgerichteter Kaliumkanäle mit einer zytosolischen Alkalisierung während ABA

Exposition zu korrelieren (Blatt & Armstrong, 1993). Die Inaktivierung der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle hingegen scheint von der Produktion von H_2O_2 abhängig zu sein, da sie durch Katalase verhindert wird (Xiao *et al.*, 2001). Allerdings ist sie trotz der Ca^{2+} Empfindlichkeit der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle nicht von einer zytosolischen Ca^{2+} Erhöhung abhängig, da sie auch auftritt wenn kein Ca^{2+} Influx stattfindet (Romano *et al.*, 2000). In der intakten Pflanze konnte ein ABA induzierter Effekt auf auswärtsgerichtete Kaliumkanäle jedoch nicht gefunden werden (Roelfsema *et al.*, 2004). Aufgrund der letztlich spannungsabhängigen Kontrolle der Kaliumkanalaktivität scheint eine veränderte Leitfähigkeit auch im Prinzip nicht notwendig zu sein (Roelfsema & Hedrich, 2005).

1.3.4 Interaktionen der Schließzellantworten

Die geschilderten Signalwege und Antworten auf CO_2 , Blaulicht und ABA können in der intakten Pflanze nicht als isolierte Funktionen betrachtet werden, da sie miteinander interagieren. So schließen die Stomata bei verschiedenen Spezies in hohem atmosphärischem CO_2 Partialdruck nur, wenn gleichzeitig ABA gegeben wird (Raschke, 1975; Leymarie *et al.*, 1998a). Umgekehrt reagieren Stomata besser auf ABA wenn CO_2 erhöht ist (Raschke, 1975; Leymarie *et al.*, 1999). Eine gewisse Konvergenz dieser beiden Antworten erscheint schon deswegen logisch, da Teile der Signaltransduktion bei beiden gleich sind, wie z.B. die Produktion von H_2O_2 und dadurch ausgelöste Prozesse. Auch zeigen die ABA insensitiven *A. thaliana* Mutanten *abi1* und *abi2* bei Messungen der Stomata-Öffnungsweite eine abgeschwächte Antwort auf CO_2 sowie auf Licht (Leymarie *et al.*, 1998b). Die Einflussnahme der ABA- auf die (Blau-)Lichtantwort zeigt sich auch daran, dass der Blaulicht induzierte Pumpstrom durch ABA verringert wird (Goh *et al.*, 1996). Die Blaulichtantwort von Stomata wird wiederum durch Rotlicht bzw. eine Erniedrigung der interzellulären CO_2 Konzentration verstärkt (Assmann, 1988). Ein verstärkendes oder abschwächendes Zusammenwirken der einzelnen Signaltransduktionswege sorgt für die Integration aller für die Regulation der Stomata wichtigen Signale und optimiert somit die Photosynthese und die Transpiration ohne Information außer Acht zu lassen.

1.4 Aufgabenstellung der Arbeit

Stomata regulieren durch ihr Öffnungs- und Schließverhalten in Antwort auf verschiedene Stimuli den pflanzlichen Gasaustausch. Wichtige Reize zum Öffnen sind photosynthetisch aktive Strahlung (PAR), eine niedrige interzelluläre CO₂ Konzentration sowie Blaulicht. Der Stomaschluss hingegen wird durch ABA und hohe CO₂ Konzentrationen induziert. Die einzelnen Stimuli werden von den Schließzellen wahrgenommen und diese Information wird in die Steuerung von Ionen transportaktivitäten umgesetzt, welche dann zu einer Bewegung der Stomata führen. Wie diese Stimuli im Einzelnen wahrgenommen werden und wie die Signalweiterleitung zu den involvierten Ionen transportaktivitäten funktioniert, ist allerdings nur lückenhaft bekannt. Ebenso sind die elektrophysiologisch messbaren Transportprozesse in der intakten Pflanze wenig charakterisiert, da bisher vielfach auf Epidermispräparate und Protoplasten zurückgegriffen wurde. Deshalb wurde im Zuge dieser Arbeit hauptsächlich die Rolle und Regulation von Anionenkanälen in der Plasmamembran von Schließzellen intakter Pflanzen in Antwort auf ABA, PAR, CO₂ und Blaulicht untersucht. Für die Bearbeitung dieser Aufgabe wurde in der intakten Pflanze mittels der Double-Electrode-Voltage-Clamp (DEVC) Technik elektrophysiologisch betrachtet, ob Anionenkanäle bei Stimuli, die zu Stomaöffnung führen, inhibiert und bei Stimuli, die zu Stomaschluss führen, aktiviert werden. Neben der Aktivität der Anionenkanäle wurden mögliche Komponenten in der Wahrnehmung der Stimuli und der darauf folgenden Signaltransduktion untersucht, welche im Endeffekt die Anionenkanalaktivität beeinflussen. Ein Schwerpunkt lag bei der fluorometrischen Betrachtung von Ca²⁺-Ionen, deren Rolle bei der Stomaregulation noch kontrovers diskutiert wird. Ein weiterer Schwerpunkt war die Wahrnehmung und Signaltransduktion von CO₂. Neben der DEVC Methode kamen dabei auch ergänzende Gaswechsel- und Chlorophyllfluoreszenz-Messungen zum Einsatz.

2. Ergebnisse

Kapitel I: Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner

Holger Marten, Rainer Hedrich und M. Rob G. Roelfsema

Publiziert in: The Plant Journal, April 2007, Vol. 50, Seiten 29-39

Eigene Beteiligung an der Arbeit:

- Biophysikalische Messung der Anionen- und Protonenströme über die Schließzell-Plasmamembran in intakten *Vicia faba* und *Arabidopsis thaliana* Pflanzen während der Antwort auf Blaulicht mit Hilfe der DEVC Einstich-Methode;
- Untersuchung der Rolle von Phototropinen bei der elektrophysiologisch messbaren Schließzell-Reaktion auf Blaulicht in der *phot1/phot2* Doppelmutante von *A. thaliana*;
- Biophysikalische Charakterisierung der Anionenkanäle in der Schließzell-Plasmamembran von *A. thaliana* in Epidermispräparaten mittels der DEVC Einstich-Technik;
- Auswertung der Daten.

Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner

Holger Marten, Rainer Hedrich and M. Rob G. Roelfsema*

Molecular Plant Physiology and Biophysics, Julius-von-Sachs Institute for Biosciences, Biocenter, Würzburg University, Julius-von-Sachs-Platz 2, D-97082 Würzburg, Germany

Received 15 September 2006; revised 13 November 2006; accepted 20 November 2006.

*For correspondence (fax +49 931 8886158; e-mail roelfsem@botanik.uni-wuerzburg.de).

Summary

Guard cells respond to light through two independent signalling pathways. The first pathway is initiated by photosynthetically active radiation and has been associated with changes in the intercellular CO₂ concentration, leading to inhibition of plasma membrane anion channels. The second response is blue-light-specific and so far has been restricted to the activation of plasma membrane H⁺-ATPases. In a search for interactions of both signalling pathways, guard cells of *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* were studied in intact plants. *Vicia faba* guard cells recorded in CO₂-free air responded to blue light with a transient outward plasma membrane current that had an average peak value of 17 pA. In line with previous reports, changes in the current–voltage relation of the plasma membrane indicate that this outward current is based on the activation of H⁺-ATPases. However, when *V. faba* guard cells were blue-light-stimulated in air with 700 µl l⁻¹ CO₂, the outward current increased to 56 pA. The increase in current was linked to inhibition of S-type anion channels. Blue light also inhibited plasma membrane anion channels in *A. thaliana* guard cells, but not in the *phot1 phot2* double mutant. These results show that blue light inhibits plasma membrane anion channels through a pathway involving phototropins, in addition to the stimulation of guard cell plasma membrane H⁺-ATPases.

Keywords: stomata, guard cell, anion channel, H⁺-ATPase, blue light, CO₂-response.

Introduction

Stomata can be regarded as hydraulically driven valves in the leaf surface of land plants that open in the light to facilitate CO₂ uptake, required for photosynthetic carbon fixation. Opening of stomata is provoked by two guard cells that respond to light through two separate signalling pathways (Assmann and Shimazaki, 1999; Roelfsema and Hedrich, 2005). One pathway depends specifically on blue light and is initiated by two phototropins, while the other pathway is stimulated by photosynthetically active radiation. Both pathways promote hyper-polarization of the guard cell plasma membrane, which leads to enhanced K⁺ uptake via inward-rectifying channels (Roelfsema *et al.*, 2001, 2002). Uptake of K⁺ ions, in combination with the accumulation of anions, increases the osmotic potential of guard cells. As a result, the guard cells swell and bend, thereby pushing the stomatal pore open and enabling gas exchange between the leaf interior and the atmosphere (Roelfsema and Hedrich, 2005).

Guard cells of *Arabidopsis thaliana* sense blue light through two phototropin receptor kinases (Briggs and

Christie, 2002; Kinoshita *et al.*, 2001) associated with the plasma membrane (Harada *et al.*, 2003; Sakamoto and Briggs, 2002). Upon stimulation by blue light, photoreceptors become phosphorylated and bind 14-3-3 proteins, which presumably maintain the receptor kinases in an active state (Kinoshita *et al.*, 2003). Downstream of the receptors, blue light leads to phosphorylation of the C-terminus of plasma membrane H⁺-ATPases (Kinoshita and Shimazaki, 1999). This C-terminus functions as an auto-inhibitory domain and is released from the catalytic side of the H⁺-ATPase after phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins. Activation of plasma membrane H⁺-ATPases by blue light results in an outward current across the plasma membrane (Assmann *et al.*, 1985) and extracellular acidification by guard cell protoplasts (Shimazaki *et al.*, 1986).

Photosynthetically active radiation does not affect guard cell transport directly, but seems to act via changes in the inter- and intracellular CO₂ concentration (Roelfsema *et al.*, 2002). Due to photosynthesis, the intercellular CO₂ level drops in the light and leads to deactivation of plasma

membrane anion channels (Brearley *et al.*, 1997; Raschke *et al.*, 2003; Roelfsema *et al.*, 2002). The signaling pathway that deactivates anion channels at low CO₂ concentrations is still debated (Vavasseur and Raghavendra, 2005), but may involve changes in the apoplastic malate concentration (Hedrich *et al.*, 1994) or cytoplasmic Ca²⁺ (Webb *et al.*, 1996).

Light thus stimulates H⁺-ATPases via the blue-light-dependent pathway and inhibits anion channels via the photosynthetically active radiation pathway. Both events require coordination, as H⁺-ATPases cannot hyper-polarize the plasma membrane when anion channels provide a large shunt conductance. Likewise, anion channel deactivation cannot induce hyper-polarization of the plasma membrane without H⁺-ATPases being activated. This suggests that stomatal opening requires activation of both the blue-light-dependent and the photosynthetically active radiation pathway. Experimental data, however, argue against this theory, as red light can stimulate stomatal opening in the *phot1/phot2* deletion mutant (Kinoshita *et al.*, 2001), and blue light stimulates stomatal opening in albino plants (Karlsson, 1986; Roelfsema *et al.*, 2006). We therefore reasoned that both responses must be interconnected, and searched for links between the two signaling pathways. Our studies reveal that blue light not only stimulates plasma membrane H⁺-ATPases, but also inhibits anion channels in guard cells of *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana*.

Results

Blue-light-induced outward currents in *Vicia faba* guard cells are enhanced by CO₂

Blue light, applied in addition to red light irradiance, triggers outward currents that hyper-polarize the plasma membrane

of *Vicia faba* guard cells (Roelfsema and Hedrich, 2005; Roelfsema *et al.*, 2001, and references therein). We modified the experimental set-up used by Roelfsema *et al.* (2001) so that guard cells in intact plants could be stimulated with CO₂, in addition to red and blue light. In the customized set-up, leaves were attached with their adaxial side to an acrylic glass holder, located in the focal plane of an inverted microscope. The abaxial epidermis was thus directed downwards, and guard cells in this cell layer were impaled with double-barrelled electrodes.

The interaction between CO₂ and blue-light signalling was studied by exposing guard cells to blue light in the presence or absence of CO₂. Figure 1(a) shows the current trace of a *V. faba* guard cell in an intact plant, clamped at a membrane potential of -100 mV and illuminated with red light (500 μmol m⁻² sec⁻¹). The first stimulation with blue light (200 μmol m⁻² sec⁻¹) was carried out in CO₂-free air and resulted in an outward current peaking at 18 pA, 100 sec after stimulus onset (Figure 1a, far left). After termination of the first blue-light response, the guard cell was exposed to air with 700 μl l⁻¹ CO₂, which induced a slow rise in inward current (Figure 1a, arrow), probably due to the activation of S-type anion channels (Brearley *et al.*, 1997; Raschke *et al.*, 2003; Roelfsema *et al.*, 2002). In the presence of CO₂, blue light triggered a transient outward current again (Figure 1a, right), but the current peaked after 150 sec and increased to 50 pA. Averaged current traces of guard cells in CO₂-free air (Figure 1b) or in air with 700 μl l⁻¹ CO₂ (Figure 1c) confirm an enhanced blue-light response in the presence of CO₂. The average peak current of cells stimulated with blue light was 17 pA (SE = 3, n = 12) in CO₂-free air, and 56 pA (SE = 7, n = 11) in air with 700 μl l⁻¹ CO₂. The timing of blue-light-induced outward currents also depended on the presence of CO₂. The average time between onset of the blue-light

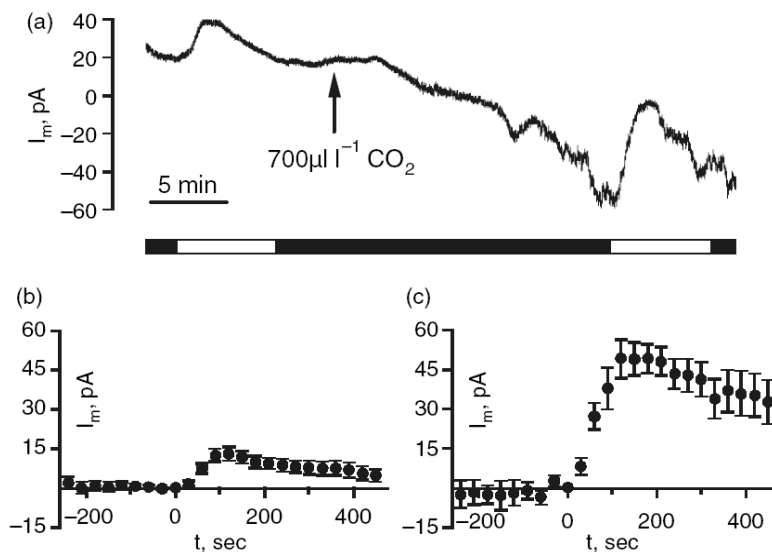


Figure 1. CO₂ enhances blue-light-induced outward plasma membrane currents of guard cells. (a) Current trace of a *Vicia faba* guard cell in an intact plant clamped to -100 mV and exposed twice to blue light as indicated by the white areas in the bar below the graph. A flow of CO₂-free air directed at the guard cell was changed to air with 700 μl l⁻¹ as indicated by the arrow. Note the greater current change induced by blue light in the presence of CO₂.

(b, c) Averaged current trace of *V. faba* guard cells measured in (b) CO₂-free air and (c) air with 700 μl l⁻¹ CO₂. The cells were exposed to blue light at t = 0 sec. Error bars represent SE (n = 12 for cells in CO₂-free air and n = 11 for cells in 700 μl l⁻¹ CO₂).

stimulus and the peak current was 84 sec (SE = 6, $n = 12$) in CO₂-free air, and increased significantly ($P < 0.05$) to 217 sec (SE = 60, $n = 11$) in air with 700 $\mu\text{l l}^{-1}$ CO₂. Apparently, CO₂ enhances the magnitude of blue-light-triggered outward currents and delays the time to peak.

Guard cell current–voltage relations are altered by blue light

So far, blue light has only been reported to stimulate plasma membrane H⁺-ATPases in guard cells. The most obvious explanation for CO₂ stimulation of the blue-light response is therefore a higher degree of activation of H⁺-ATPases. Alternatively, blue light may affect other ion transport processes in addition to stimulation of H⁺-ATPases. Both possibilities were tested, with guard cells that were kept at a holding potential of -100 mV and being voltage stimulated with ramps from -100 to $+40$ mV at intervals of 30 sec (Figure 2). In these experiments, the impalement electrodes were filled with 300 mM CsCl to block outward-rectifying K⁺ channels (Roelfsema *et al.*, 2004). Application of blue light under CO₂-free conditions induced a shift of currents that was equal in size for the whole voltage range tested (Figure 2a, $n = 5$). Such a shift of the current–voltage curve was expected as a result of activation of H⁺-ATPases, as the current carried by this H⁺ pump is virtually voltage-independent in the range

tested (Lohse and Hedrich, 1992; Taylor and Assmann, 2001). In contrast, blue light applied in the presence of 700 $\mu\text{l l}^{-1}$ CO₂ induced a change in the slope of the current–voltage relation (Figure 2b, $n = 5$). This suggests that, in the presence of CO₂, blue light regulates a voltage-dependent ion transporter in addition to the H⁺-ATPase.

Blue light elicited changes in the current–voltage relation that were transient in nature, just as seen for the current responses shown in Figure 1. The maximal change in the current–voltage profile was observed 1–3 min after the onset of the blue-light stimulus. Thereafter, the response was partially reversed, even though the illumination was continued. Such a transient response was observed in the absence (Figure 2a) as well as in the presence of CO₂ (Figure 2b).

Blue-light-dependent inhibition of S-type anion channels

Blue light may inhibit S-type anion channels as these channels are activated by CO₂ (Brearley *et al.*, 1997; Raschke *et al.*, 2003; Roelfsema *et al.*, 2002), and the properties of the conductance recorded with 700 $\mu\text{l l}^{-1}$ CO₂ resemble those of anion channels. The current before blue-light application reverses at 25 mV (Figure 2b, lower part), close to the estimated Nernst potential for Cl[−] (Roelfsema *et al.*, 2004). S-type anion channels are characterized by their slow

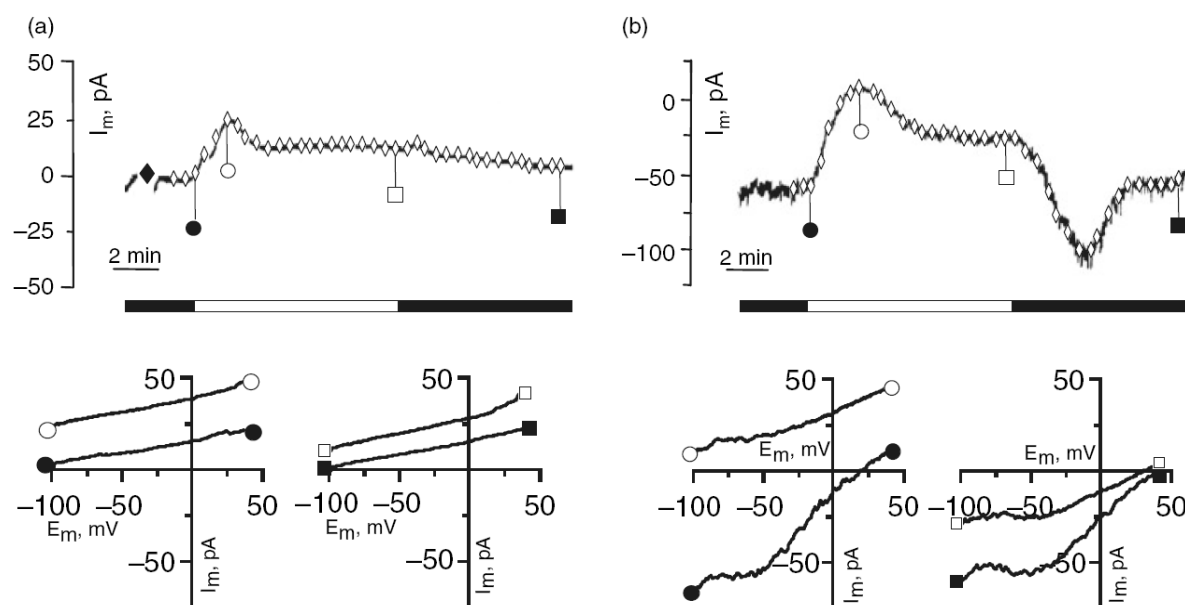


Figure 2. CO₂ affects blue-light-induced changes in current–voltage relations of the guard cell plasma membrane.

Vicia faba guard cells exposed to blue light in (a) CO₂-free air and (b) air with 700 $\mu\text{l l}^{-1}$ CO₂.

Upper traces: plasma membrane current recorded at a holding potential of -100 mV. The cell was exposed to blue light as indicated by the white areas in the bar below the trace. Outward K⁺ channels were blocked with 300 mM CsCl in the micro-electrode. Where indicated, the traces are interrupted by long voltage clamp protocols (◆) or repetitive short voltage ramps (◇).

Lower graphs: current–voltage relations of the same cells as in the upper traces, recorded before (●), during (○, □) and after (■) application of blue light. Current–voltage relations were obtained using voltage ramps from a holding potential of -100 to $+40$ mV in 1.5 sec. Symbols in the graphs correspond to those below the current traces.

32 Holger Marten et al.

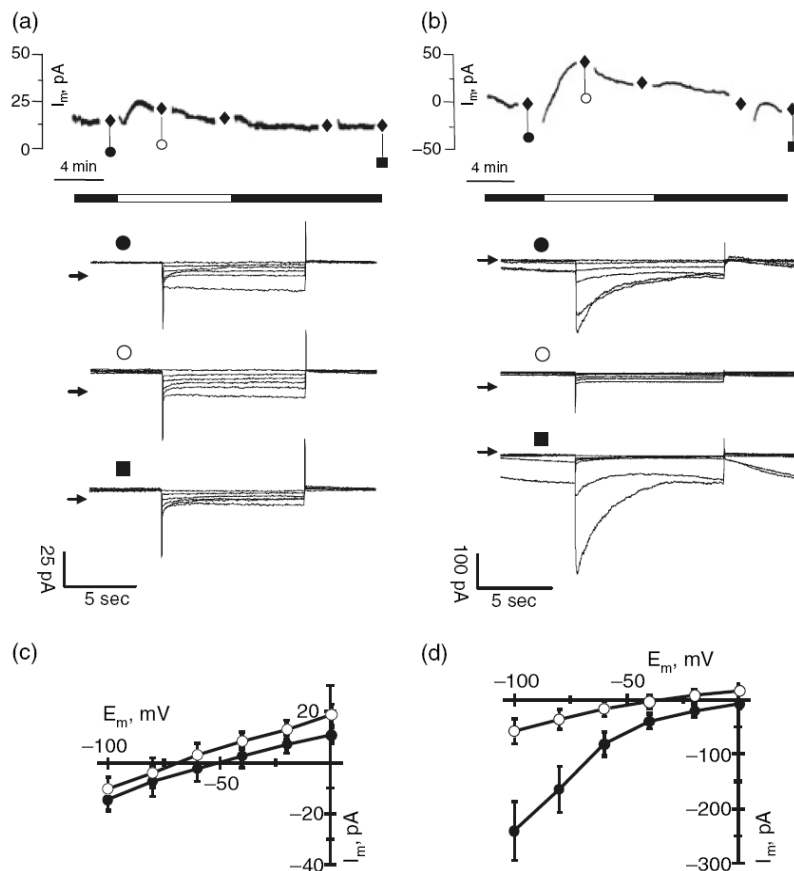


Figure 3. Blue light inhibits S-type anion channels in *Vicia faba* guard cells.

(a, b) Upper traces: plasma membrane currents recorded at a holding potential of 0 mV, for a guard cell in (a) CO₂-free air and (b) air with 700 μl l⁻¹ CO₂. The guard cells were exposed to blue light as indicated by the white area in the bar below the trace. Outward K⁺ channels were blocked with 300 mM CsCl in the micro-electrode. Where indicated, the trace is interrupted by long voltage steps to more negative test potentials (◆). Lower traces: current traces obtained with long voltage steps (10 sec) from 0 to -100 mV with -20 mV increments, recorded before (●), during (○) and after (■) application of blue light. Symbols correspond to those below the upper traces. Arrows indicate the 0 pA level. Note the activity of slowly deactivating channels, typical for S-type anion channels, in the presence of CO₂ recorded after stepping the plasma membrane to potentials that are more negative than -20 mV.

(c, d) Average current-voltage relations of guard cells recorded before (●) and during (○) exposure to blue light. The cells were measured in (c) CO₂-free air (*n* = 3) or (d) air with 700 μl l⁻¹ CO₂ (*n* = 8). Error bars represent the standard error.

deactivation after stepping the membrane potential from a holding potential of 0 mV to more negative potentials (Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992). Guard cells were therefore clamped from a holding potential of 0 mV stepwise to -100 mV with -20 mV increments. For guard cells exposed to CO₂-free air, activity of S-type anion channels was not observed (Figure 3a, *n* = 3). The currents at all test potentials shifted to more positive values during exposure to blue light. In line with Figure 2(a), blue light induced a small shift in the average instantaneous current-voltage relation to more positive values (Figure 3c). In the presence of 700 μl l⁻¹ CO₂, potentials that are more negative than -20 mV elicited inward currents characterized by slow deactivation kinetics (Figure 3b, *n* = 8), as expected for S-type anion channels (Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992). Blue light inhibited the activity of these channels, a process that was reversed after turning off the stimulus (Figure 3b). In the presence of 700 μl l⁻¹ CO₂, blue light also caused a much more pronounced change in the average instantaneous current-voltage relation (Figure 3d). Under these conditions, blue light altered the slope of the current-voltage relation, in line with the deactivation of S-type anion channels.

Blue-light-induced conductance changes in *Arabidopsis thaliana* guard cells

Vicia faba has mostly been the species of choice to study blue-light-induced plasma membrane conductance changes in guard cells (Assmann *et al.*, 1985; Shimazaki *et al.*, 1986; Taylor and Assmann, 2001). A few studies have been conducted with *Arabidopsis thaliana* and revealed that guard cells of this species respond to blue light in a very similar manner. Guard cells of both species possess phototropins (Kinoshita *et al.*, 2001, 2003), and blue light activates plasma membrane H⁺-ATPases in both species through binding of 14-3-3 proteins (Kinoshita and Shimazaki, 1999; Ueno *et al.*, 2005). We studied single guard cells of *Arabidopsis* in intact plants. During the recordings, the leaves were illuminated with red light (500 μmol m⁻² sec⁻¹) and kept in air with an ambient CO₂ concentration (350 μl l⁻¹). Guard cells were impaled with double-barrelled micro-electrodes filled with CsCl and clamped to a membrane potential of -100 mV. Blue light (200 μmol m⁻² sec⁻¹) elicited outward plasma membrane currents with an average value of 10 pA (SE = 2, *n* = 5) after 2 min (Figure 4a). In guard cells of *V. faba*, recorded under identical conditions, blue light induced a current of

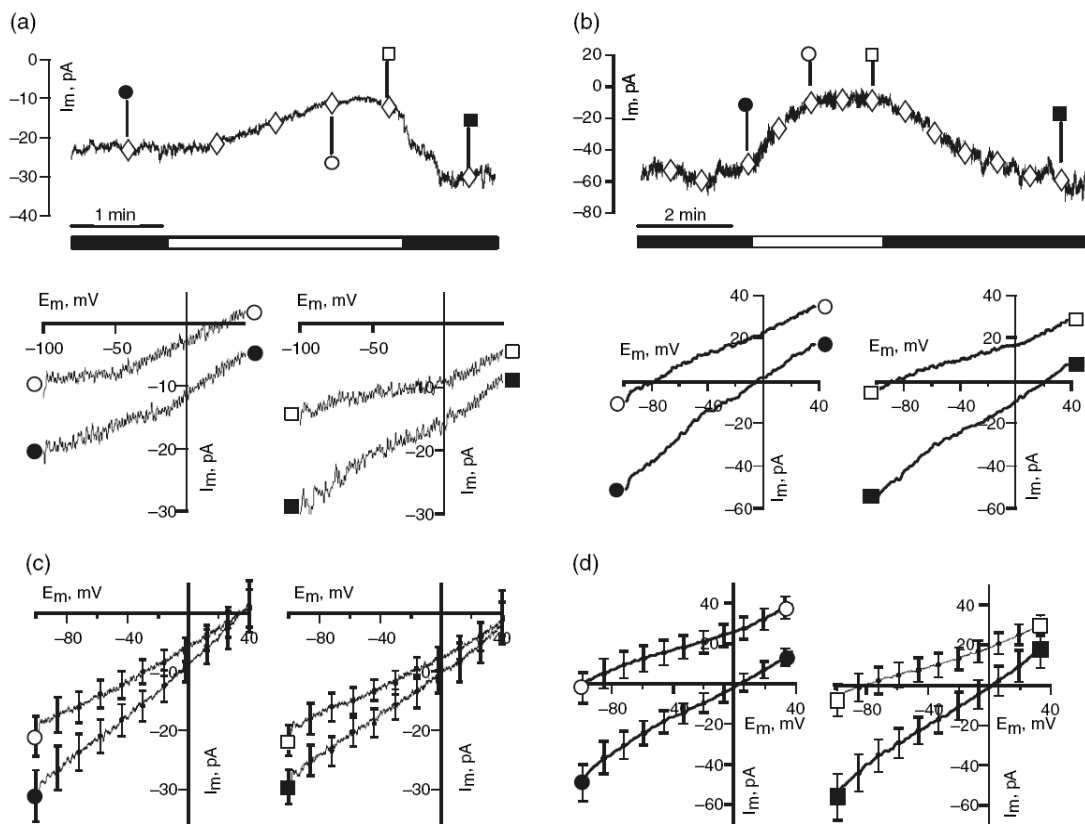


Figure 4. Blue-light responses of *Arabidopsis* (a, c) and *Vicia faba* (b, d) guard cells.

Guard cells in intact plants were impaled with electrodes containing 300 mM CsCl to block outward K^+ channels. The cells were clamped to a holding potential of -100 mV and stimulated with blue light as indicated by the white area in the bar below the trace. Where indicated, the traces were interrupted by short voltage ramps (\diamond).

Lower graphs in (a) and (b): current–voltage relations of the same cells as in the upper trace, recorded before (\bullet), during (\circ , \square) and after (\blacksquare) application of blue light. Current–voltage relations were obtained using voltage ramps from a holding potential of -100 to $+40$ mV in 1.5 sec. Symbols in the graphs correspond to those below and above the current traces.

(c, d) Average current–voltage relations obtained with voltage ramps as in (a) and (b) for *Arabidopsis* and *V. faba* guard cells measured before (\bullet) during (\circ , \square) and after (\blacksquare) application of blue light. Error bars represent SE ($n = 5$ for *A. thaliana* and $n = 8$ for *V. faba*).

39 pA (SE = 11, $n = 8$) after 2 min (Figure 4b). The four times greater outward current in *V. faba* may relate to the four times larger cell surface of these guard cells compared to those of *A. thaliana* (Langer *et al.*, 2004). In both species, blue light reversibly altered the slope of the current–voltage relation of the guard cell plasma membrane (Figure 4a,b). The slope of the averaged current–voltage relation changed after onset of blue light, from 0.22 to 0.14 pA mV^{-1} in *A. thaliana* (Figure 4c, left), and from 0.42 to 0.26 pA mV^{-1} in *V. faba* (Figure 4d, left). In line with the smaller outward current, the change in the current–voltage relation was thus less pronounced for guard cells of *A. thaliana* than for those of *V. faba* (Figure 4c,d).

S-type anion channels in *Arabidopsis* guard cells

The change in slope of the current–voltage relation indicates that blue light deactivates anion channels in

A. thaliana, just as in *V. faba*. In guard cells of *V. faba*, two types of anion channels were identified, which exhibited either slow (*S*-type) (Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Hagiwara, 1989) or rapid (*R*-type) deactivation kinetics (Hedrich *et al.*, 1990; Keller *et al.*, 1989). Both types of channels were also recorded in *A. thaliana* guard cell protoplasts (Pei *et al.*, 1997, 2000; Wang *et al.*, 2001), but these anion channels have yet not been characterized for intact *Arabidopsis* guard cells. In *V. faba*, anion channels are more permeable for NO_3^- than for Cl^- (Dietrich and Hedrich, 1998; Schmidt and Schroeder, 1994). Taking advantage of this property, the influence of NO_3^- on the plasma membrane conductance of *Arabidopsis* guard cells was studied. Stomatal opening was provoked in epidermal strips bathed in solutions with Cl^- or NO_3^- . Subsequently, guard cells were impaled with double-barrelled electrodes containing the same anion as present during stomatal opening. During the voltage clamp recordings, the extracellular solution

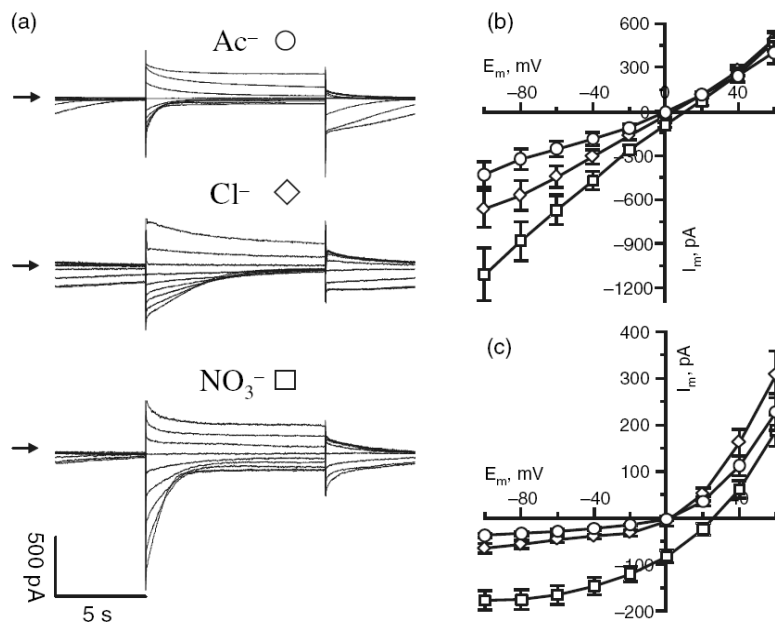


Figure 5. S-type anion channels in Arabidopsis guard cells.

(a) Guard cells in epidermal strips opened in the presence of Cl⁻ (upper and middle traces) or NO₃⁻ (lower traces) and impaled with double-barrelled micro-electrodes filled with 300 mM CsAc, CsCl or CsNO₃. The plasma membrane was kept at a holding potential of 0 mV and clamped stepwise to long (10 sec) test pulses ranging from +60 to -100 mV, with -20 mV increments. All cells were recorded in a bath solution with 50 mM CsCl, 1 mM CaCl₂ and 1 mM MES/BTP, pH 6.0.

(b, c) Averaged current-voltage relation of cells impaled with electrodes filled with 300 mM CsAc (○) CsCl (◇) or CsNO₃ (□) recorded as in (a). Instantaneous currents (b) were sampled at the start of the current traces, and steady-state currents (c) were sampled after 10 sec. Error bars represent SE ($n = 9-10$).

contained 52 mM Cl⁻, but no NO₃⁻. Guard cells were clamped from a holding potential of 0 mV stepwise to potentials ranging from +60 to -100 mV, with -20 mV increments (Figure 5a). At negative potentials, slowly deactivating channels were present that conducted larger currents in guard cells opened with NO₃⁻ than in those opened with Cl⁻ (Figure 5a-c). The reversal potential of these channels was shifted to more positive values in the presence of cytoplasmic NO₃⁻ (Figure 5b,c).

The properties of the channels recorded in Arabidopsis thus resemble those of S-type anion channels in guard cells of other species (Linder and Raschke, 1992; Schmidt and Schroeder, 1994). For S-type anion channels of Arabidopsis, we found that the velocity of deactivation at -100 mV was significantly faster ($P < 0.05$) in NO₃⁻ than in Cl⁻. The half-time of deactivation was 1.3 sec (SE = 0.3, $n = 9$) with Cl⁻, and this decreased to 0.5 sec (SE = 0.2, $n = 10$) with NO₃⁻. This shows that NO₃⁻ not only permeates these channels, but also affects gating, as previously shown for R-type channels of *V. faba* (Dietrich and Hedrich, 1998). Patch-clamp studies with guard cell protoplasts of *A. thaliana* revealed that S-type channels are blocked by acetate (Ac⁻) applied from the cytoplasmic side (Pei *et al.*, 1997). Guard cells were therefore impaled with micro-electrodes containing CsAc. In the presence of Ac⁻, the currents were slightly reduced in amplitude (Figure 5a-c), but the velocity of deactivation did not change significantly ($P > 0.05$). This suggests that the block with Ac⁻ was not as efficient as in protoplasts studied with the patch clamp technique (Pei *et al.*, 1997).

Blue-light inhibition of S-type anion channels depends on phototropins

Guard cells of *A. thaliana* in intact plants were impaled with CsCl-filled micro-electrodes and clamped to a holding potential of 0 mV. Blue light was applied in addition to red light, and induced an outward current in wild-type guard cells, but not in the *phot1 phot2* double mutant (Figure 6a,b, upper traces, $n = 8$). The plasma membrane was clamped stepwise to potentials more negative than 0 mV before, during and after the application of blue light. Blue light inhibited the currents carried by S-type anion channels in wild-type guard cells (Figure 6a, lower traces, and Figure 6c), but not in guard cells of the *phot1 phot2* double mutant (Figure 6b, lower traces, and Figure 6c). The inhibition of S-type anion channels by blue light thus occurs through a phototropin-dependent signalling pathway.

Discussion

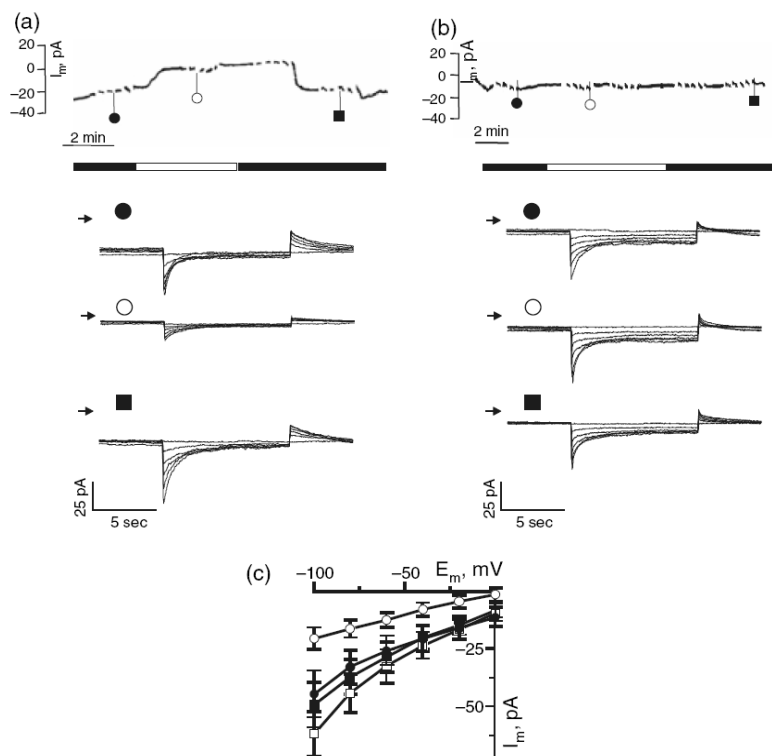
Blue-light-induced conductance changes at the guard cell plasma membrane

A blue-light-specific response of guard cells, acting parallel to photosynthetically active radiation, was already recognized by Iino *et al.* (1985). This guard cell response was linked to the activation of plasma membrane H⁺-ATPases, because of outward plasma membrane currents triggered by blue light (Assmann *et al.*, 1985) and extracellular acidification of guard cell protoplasts (Shimazaki *et al.*, 1986). Activation of H⁺-

Figure 6. Blue-light inhibition of plasma membrane S-type anion channel depends on phototropins.

(a, b) Upper traces: plasma membrane current of *A. thaliana* guard cells of (a) wild-type and (b) the *phot1 phot2* double mutant, clamped to 0 mV and exposed to blue light as indicated by the white area in the bars below the traces. The cells were continuously illuminated with red light and kept in air with $350 \mu\text{l l}^{-1} \text{CO}_2$. The current traces are interrupted by step protocols, in which the cells are clamped to more negative potentials. Lower traces: current traces of guard cells clamped from a holding potential of 0 mV stepwise to -100 mV with -20 mV increments, before (●), during (○) and after (■) the application of blue light; symbols correspond to those below the upper traces. Arrows indicate the 0 pA level. Blue light inhibits S-type anion channels in wild-type (a) but not in the *phot1 phot2* double mutant (b).

(c) Average data for the instantaneous current-voltage relation of wild-type (●, ○) and *phot1 phot2* (●, □) guard cells before (●, ■) and after (○, □) the onset of blue light. The current-voltage data were obtained from traces as shown in (a) and (b); error bars represent the standard error ($n = 8$).



ATPases presumably corresponds to the blue-light-induced outward peak current of 17 pA measured in *V. faba* guard cells under CO_2 -free conditions (Figure 2). Under these conditions, blue light causes a change in the current-voltage relation that is in agreement with the activation of plasma membrane H^+ -ATPases. In the presence of $700 \mu\text{l l}^{-1} \text{CO}_2$, however, blue light triggers a much larger outward current of 56 pA. Blue light also inhibits S-type anion channels, suggesting that the decrease in anion channel activity adds approximately 39 pA (at a holding potential of -100 mV) to the change in plasma membrane current.

Blue-light-specific stimulation of stomatal opening in *Arabidopsis* is most likely initiated by phototropins, as stomata in leaves of the *phot1 phot2* double mutant lack this response (Kinoshita *et al.*, 2001). In addition, the blue-light-sensing cryptochromes and the COP1 protein acting downstream affect the blue-light responsiveness of guard cells. Stomata of the *cry1 cry2* double mutant open less in blue light, whereas stomata of CRY-over-expressing lines are over-sensitive to blue light (Mao *et al.*, 2005). In the dark, cryptochromes are localized to the nucleus (Chen *et al.*, 2004), suggesting that these photoreceptors regulate the expression of genes encoding components of the signalling chain for the blue light signal in guard cells. Because of their association with the plasma membrane

(Harada *et al.*, 2003; Sakamoto and Briggs, 2002), phototropins are the most likely candidates for initiation of blue-light-induced stomatal opening, which involves the induction of outward current within 30 sec after blue light application (Figure 1c). Two types of phototropins were identified for guard cells of *A. thaliana* as well as for *V. faba* (Kinoshita *et al.*, 2003), suggesting that this signal pathway is present in various plant species. Blue light stimulates the protein kinase activity of the phototropins (Briggs and Christie, 2002), which is followed by binding of 14-3-3 proteins (Kinoshita *et al.*, 2003). The sequence of events following the activation of phototropins is not known in detail, but involves protein-protein interactions (Inada *et al.*, 2004). In *A. thaliana*, as well as *V. faba*, the signalling pathway initiated by blue light leads to the phosphorylation of plasma membrane H^+ -ATPases (Kinoshita and Shimazaki, 1999; Ueno *et al.*, 2005), resulting in an enhanced extrusion of H^+ from guard cells (Kinoshita and Shimazaki, 1999; Kinoshita *et al.*, 2001). In addition, blue light was found to inhibit S-type anion channels in guard cells of both plant species (Figures 3 and 6), but not in the *phot1 phot2* double mutant. This suggests that S-type anion channels are inhibited by blue light through a similar phosphorylation-dependent pathway as for blue-light activation of H^+ -ATPases.

Regulation of guard cell ion transport by multiple signals

A number of environmental conditions are recognized by guard cells and influence stomatal movement (Assmann and Shimazaki, 1999; Roelfsema and Hedrich, 2005). It is evident that these signals regulate a restricted number of ion transport proteins in the plasma membrane of guard cells. High concentrations of CO₂ activate S-type anion channels, but this response is counteracted by blue light (Figures 1–3). Likewise, blue light stimulates the plasma membrane H⁺-ATPase of guard cells, but this response is inhibited in the presence of ABA (Zhang *et al.*, 2004). ABA not only inhibits the H⁺-ATPase, but also activates plasma membrane anion channels in a transient manner (Levchenko *et al.*, 2005; Roelfsema *et al.*, 2004). For the coordination of guard cell responses to multiple signals, repetitive changes in the cytoplasmic free Ca²⁺ concentration may play an important role (Ng *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 2001). Alternatively, the protein kinases and phosphatases involved in various signalling pathways (Riera *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2006) may interact directly and modulate the activity of ion transport proteins through their phosphorylation status.

The regulation of ion transport by light in guard cells cannot be simply extrapolated to other cell types. In contrast to guard cells, blue light has been shown to activate anion channels in hypocotyl cells of etiolated *Arabidopsis* seedlings (Cho and Spalding, 1996), just as photosynthetically active radiation triggers activation of anion channels in mesophyll cells (Elzenga and Van Volkenburgh, 1997; Elzenga *et al.*, 1995), but inhibits anion channels in guard cells (Roelfsema *et al.*, 2002).

Timing of blue-light-induced conductance changes

The outward current triggered by blue light reaches a peak value after 1–3 min and levels off to some extent thereafter. This result is in line with blue-light-induced phosphorylation of the H⁺-ATPase in *V. faba* guard cell protoplasts (Kinoshita and Shimazaki, 1999). Phosphorylation of the H⁺-ATPase is maximal 2.5 min after blue light onset, and the degree of phosphorylation levels off during prolonged illumination. A transient response was also observed for the deactivation of S-type anion channels (Figure 2b), indicating that this channel is regulated through a similar mechanism as the H⁺-ATPase. However, the time between the onset of the blue-light stimulus and the occurrence of the peak current was longer in air with 700 µl l⁻¹ CO₂ than in CO₂-free air. This suggests that the activation of H⁺-ATPases precedes the deactivation of S-type anion channels.

The sequential activation of H⁺-ATPases and deactivation of anion channels explains why blue light efficiently induces stomatal opening (Sharkey and Raschke, 1981). Sole activation of plasma membrane H⁺-ATPases by blue light would

have been less effective, as active anion channels would short-circuit the H⁺ current and prevent hyper-polarization. The shunt conductance of anion channels, activated by CO₂ in *V. faba* guard cells, can apparently be turned off by blue light. Due to the coincident deactivation of anion channels and activation of plasma membrane H⁺-ATPases, the guard cell plasma membrane will hyper-polarize to values negative of the K⁺ Nernst potential. At these potentials, inward-rectifying K⁺ channels will activate and facilitate the uptake of K⁺ that eventually causes stomatal opening (Roelfsema and Hedrich, 2005).

Two signalling pathways are involved in light-induced stomatal opening

Guard cells are not only responsive to blue light, but also open in the presence of photosynthetically active radiation (Messinger *et al.*, 2006; Roelfsema *et al.*, 2006). Recordings on single guard cells in intact plants suggest that photosynthetically active radiation does not affect guard cells directly, but acts through a change in the intercellular CO₂ concentration (Roelfsema *et al.*, 2002). This finding seems to contradict experiments with isolated epidermal strips. In isolated strips, stomata are responsive to red light, even though these preparations are devoid of viable mesophyll cells (Olsen *et al.*, 2002). These contradictory results may originate from the low rate of diffusion of CO₂ from guard cells in epidermal strips bathed in experimental solutions. In epidermal strips, guard cells may therefore lower their own CO₂ concentration through photosynthesis (Outlaw, 1989). In intact *V. faba* leaves, however, CO₂ readily diffuses through the intercellular spaces (Pieruschka *et al.*, 2006), and guard cells are able to monitor the photosynthetic activity of the mesophyll. In the light, mesophyll cells will lower the intercellular CO₂ concentration (Hanstein *et al.*, 2001; Roelfsema *et al.*, 2002) and thus induce stomatal opening. Due to the lower stomatal resistance, the uptake of CO₂ into the leaf will increase and cause an increase of the intercellular CO₂ concentration again.

The question emerges as to why guard cells operate two light-signalling pathways that lead to the same response. The advantage of two separate pathways may be explained by differences concerning feedback (Assmann and Shimazaki, 1999; Raschke, 1975; Roelfsema and Hedrich, 2005). The response to photosynthetically active radiation couples changes in photosynthetic activity to adaptation of the stomatal aperture, operating in a feedback loop. The blue-light response is more direct and may provide a means to quickly respond to altered light conditions, such as sun flecks in a cloudy sky (Zeiger and Field, 1982). For fast responses to altered light conditions, guard cells appear to monitor incoming light using phototropins that alter the activity of both H⁺-ATPases and anion channels, thereby provoking fast changes in stomatal opening.

Experimental procedures

Plant material

Vicia faba (L.) plants Französische Weisskeimige, (Gebag, Hannover, Germany), were grown in a greenhouse, and measurements were carried out on the two youngest fully unfolded leaves of 3–4-week-old-plants. *Arabidopsis thaliana* (Col-0) plants and the *phot1 phot2* deletion mutant (kindly provided by M. Wada, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan) were grown in climate cabinets with a day/night cycle of 16/8 h, with temperature cycling between 22/16°C and illuminated with fluorescent tubes (L36W/25, Osram; <http://www.osram.de>) at a photon flux density of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

Experimental set-up for impalement

Plants were placed next to an inverted microscope (IM 35, Carl Zeiss, <http://www.zeiss.com/>), and the adaxial side of a leaf was mounted on an acrylic glass holder in the focal plane of the microscope, using double-sided adhesive tape. In this experimental configuration, the abaxial side was directed downwards and accessible for impalement with double-barrelled micro-electrodes. A flow of air (0.4 l min^{-1}) was directed on the leaf via a suspensor ($14 \times 2 \text{ mm}$), which was either CO_2 -free or contained 350 or $700 \mu\text{l l}^{-1} \text{CO}_2$ (Roelfsema *et al.*, 2002). Leaves were illuminated with red light from the microscope lamp, passed through a long-pass glass filter ($\lambda_{1/2}$ 610 nm, RD610, Schott; <http://www.schott.com>) and focused on the adaxial side on an area of 2 cm in diameter and with a photon flux density of $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. Blue light was obtained using a broad-band-pass filter transmitting 360–500 nm (DT-Blue, Linos Photonics; (<http://www.linos.com>)) and projected via an objective (Epiplan LD 50x/0.050, Carl Zeiss) on the abaxial side of the leaf. The area of blue light illumination was 0.43 mm in diameter, and the photon flux density was $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. The radiation was measured with a LI-COR (<http://www.licor.com>) 250 light meter (quantum sensor LI-190, LI-COR).

The S-type anion channels of *A. thaliana* guard cells were characterized using epidermal strips obtained from the adaxial side of wild-type leaves (Roelfsema and Prins, 1997). Directly after peeling, the epidermis was attached to microscope slides covered with medical adhesive (Medical Adhesive B, Aromando; <http://www.amt-med.de>). The microscope slides were transferred to Petri dishes filled with 50 mM KCl, 0.05 mM CaCl_2 , 1 mM 2-(N-Morpholino)ethane sulfonic acid and Bis-Tris propane (MES/BTP), pH 6.0; for experiments with NO_3^- , 50 mM KCl was replaced with 50 mM KNO_3 . Stomatal opening was induced with white light at a photon flux density of $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. After 2 h, the microscope slides were mounted in measuring chambers, and guard cell responses were recorded in a bath solution containing 50 mM CsCl, 1.0 mM CaCl_2 and 1 mM MES/BTP, pH 6.0.

Electrodes and electrical configuration

Guard cells were impaled with double-barrelled electrodes using a lightweight micro-manipulator (MM3A, Kleindiek Nanotechnik; <http://www.nanotechnik.com>) holding a double-barrelled electrode pulled from borosilicate glass capillaries (inner diameter 0.58 mm, outer diameter 1.0 mm; Hilgenberg; <http://www.hilgenberg-gmbh.de>), as described (Roelfsema *et al.*, 2001). The electrodes were filled with 300 mM KCl, 300 mM CsCl, CsAc or CsNO_3 and connected using Ag/AgCl half cells to head stages (HS-2A \times 0.01;

Axon Instruments, <http://www.axon.com>) with an input resistance of approximately $10^{13} \Omega$. The tip resistance of the double-barrelled electrodes ranged from 90–150 M Ω for guard cells of *V. faba* and from 120–220 M Ω for those of *A. thaliana*. The reference electrode, a 50 mM KCl and 1.5% agarose salt bridge, connected to an AgCl/Cl half cell, was placed via holes in the acrylic glass holder on the adaxial side of the leaf. The surface potential across the cuticle (Roelfsema *et al.*, 2001), measured using blunt single-barrelled electrodes ($R_{\text{tip}} < 20 \text{ M}\Omega$), was 12 mV (SD = 12, $n = 23$) for *V. faba*, and 5 mV (SD = 10, $n = 19$) for *A. thaliana*. The membrane potential was clamped to test voltages using an integrated micro-electrode and differential amplifier (Geneclamp 500, Axon Instruments). Voltage step protocols were applied via an ITC-16 interface (Instrutech Corp.; <http://www.instrutech.com>) under the control of Pulse software (Heka; <http://www.heka.com>). Current data obtained during voltage clamp were low-pass-filtered using an eight-pole Bessel filter at 200 Hz for voltage ramps, 20 Hz for 10 sec test pulses, and 10 Hz for long-term registrations. Data were sampled at at least three times the filter frequency. Long-term current registrations interrupted by voltage clamp protocols were recorded with a chart recorder and digitized afterwards.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to R.H. and M.R.G.R.

References

- Assmann, S.M. and Shimazaki, K.I. (1999) The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol.* **119**, 809–815.
- Assmann, S.M., Simoncini, L. and Schroeder, J.I. (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, **318**, 285–287.
- Brearley, J., Venis, M.A. and Blatt, M.R. (1997) The effect of elevated CO_2 concentrations on K^+ and anion channels of *Vicia faba* L. guard cells. *Planta*, **203**, 145–154.
- Briggs, W.R. and Christie, J.M. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* **7**, 204–210.
- Chen, M., Chory, J. and Fankhauser, C. (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 87–117.
- Cho, M.H. and Spalding, E.P. (1996) An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 8134–8138.
- Dietrich, P. and Hedrich, R. (1998) Anions permeate and gate GCAC1, a voltage-dependent guard cell anion channel. *Plant J.* **15**, 479–487.
- Elzenga, J.T.M. and Van Volkenburgh, E. (1997) Characterization of a light-controlled anion channel in the plasma membrane of mesophyll cells of pea. *Plant Physiol.* **113**, 1419–1426.
- Elzenga, J.T., Prins-Hidde, B.A. and Van Volkenburgh, E. (1995) Light-induced membrane potential changes of epidermal and mesophyll cells in growing leaves of *Pisum sativum*. *Planta*, **197**, 127–134.
- Hanstein, S., De Beer, D. and Felle, H.H. (2001) Miniaturised carbon dioxide sensor designed for measurements within plant leaves. *Sens. Actuators, B*, **81**, 107–114.
- Harada, A., Sakai, T. and Okada, K. (2003) *phot1* and *phot2* mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca^{2+} differently in *Arabidopsis* leaves. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 8583–8588.
- Hedrich, R., Busch, H. and Raschke, K. (1990) Calcium ion and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion

- channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J.* **9**, 3889–3892.
- Hedrich, R., Marten, I., Lohse, G., Dietrich, P., Winter, H., Lohaus, G. and Heldt, H.W. (1994) Malate-sensitive anion channels enable guard cells to sense changes in the ambient CO₂ concentration. *Plant J.* **6**, 741–748.
- Iino, M., Ogawa, T. and Zeiger, E. (1985) Kinetic properties of the blue-light response of stomata. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**, 8019–8023.
- Inada, S., Ohgishi, M., Mayama, T., Okada, K. and Sakai, T. (2004) RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **16**, 887–896.
- Karlsson, P.E. (1986) Blue light regulation of stomata in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings: I. Influence of red background illumination and initial conductance level. *Physiol. Plant.* **66**, 202–206.
- Keller, B.U., Hedrich, R. and Raschke, K. (1989) Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature*, **341**, 450–453.
- Kinoshita, T. and Shimazaki, K.I. (1999) Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* **18**, 5548–5558.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M. and Shimazaki, K.I. (2001) phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, **414**, 656–660.
- Kinoshita, T., Emi, T., Tominaga, M., Sakamoto, K., Shigenaga, A., Doi, M. and Shimazaki, K.I. (2003) Blue-light- and phosphorylation-dependent binding of a 14–3-3 protein to phototropins in stomatal guard cells of broad bean. *Plant Physiol.* **133**, 1453–1463.
- Langer, K., Levchenko, V., Fromm, J., Geiger, D., Steinmeyer, R., Lautner, S., Ache, P. and Hedrich, R. (2004) The poplar K⁺ channel KPT1 is associated with K⁺ uptake during stomatal opening and bud development. *Plant J.* **37**, 828–838.
- Levchenko, V., Konrad, K.R., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G. and Hedrich, R. (2005) Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 4203–4208.
- Linder, B. and Raschke, K. (1992) A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Lett.* **313**, 27–30.
- Lohse, G. and Hedrich, R. (1992) Characterization of the plasma-membrane H⁺-ATPase from *Vicia faba* guard cells. *Planta*, **188**, 206–214.
- Mao, J., Zhang, Y.C., Sang, Y., Li, Q.H. and Yang, H.Q. (2005) A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 12270–12275.
- Messinger, S.M., Buckley, T.N. and Mott, K.A. (2006) Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO₂. *Plant Physiol.* **140**, 771–778.
- Ng, C.K.Y., McAinsh, M.R., Gray, J.E., Hunt, L., Leckie, C.P., Mills, L. and Hetherington, A.M. (2001) Calcium-based signalling systems in guard cells. *New Phytol.* **151**, 109–120.
- Olsen, R.L., Pratt, R.B., Gump, P., Kemper, A. and Tallman, G. (2002) Red light activates a chloroplast-dependent ion uptake mechanism for stomatal opening under reduced CO₂ concentrations in *Vicia* spp. *New Phytol.* **153**, 497–508.
- Outlaw, W.H. (1989) Critical examination of the quantitative evidence for and against photosynthetic CO₂ fixation by guard cells. *Physiol. Plant.* **77**, 275–281.
- Pei, Z.M., Kuchitsu, K., Ward, J.M., Schwarz, M. and Schroeder, J.I. (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell*, **9**, 409–423.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E. and Schroeder, J.I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, **406**, 731–734.
- Pieruschka, R., Schurr, U., Jensen, M., Wolff, W.F. and Jahnke, S. (2006) Lateral diffusion of CO₂ from shaded to illuminated leaf parts affects photosynthesis inside homobaric leaves. *New Phytol.* **169**, 779–787.
- Raschke, K. (1975) Stomatal action. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **26**, 309–340.
- Raschke, K., Shabahang, M. and Wolf, R. (2003) The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. *Planta*, **217**, 639–650.
- Riera, M., Valon, C., Fenzi, F., Giraudat, J. and Leung, J. (2005) The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signalling components. *Physiol. Plant.* **123**, 111–119.
- Roelfsema, M.R.G. and Hedrich, R. (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol.* **167**, 665–691.
- Roelfsema, M.R.G. and Prins, H.B.A. (1997) Ion channels in guard cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, **202**, 18–27.
- Roelfsema, M.R.G., Steinmeyer, R., Staal, M. and Hedrich, R. (2001) Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant J.* **26**, 1–13.
- Roelfsema, M.R.G., Hanstein, S., Felle, H.H. and Hedrich, R. (2002) CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant J.* **32**, 65–75.
- Roelfsema, M.R.G., Levchenko, V. and Hedrich, R. (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J.* **37**, 578–588.
- Roelfsema, M.R.G., Konrad, K.R., Marten, H., Psaras, G.K., Hartung, W. and Hedrich, R. (2006) Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO₂ and abscisic acid. *Plant Cell Environ.* **29**, 1595–1605.
- Sakamoto, K. and Briggs, W.R. (2002) Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell*, **14**, 1723–1735.
- Schmidt, C. and Schroeder, J.I. (1994) Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells: large nitrate permeability. *Plant Physiol.* **106**, 383–391.
- Schroeder, J.I. and Hagiwara, S. (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature*, **338**, 427–430.
- Schroeder, J.I. and Keller, B.U. (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 5025–5029.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M. and Waren, D. (2001) Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 627–658.
- Sharkey, T.D. and Raschke, K. (1981) Effect of light quality on stomatal opening in leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol.* **68**, 1170–1174.
- Shimazaki, K., Iino, M. and Zeiger, E. (1986) Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, **319**, 324–326.
- Taylor, A.R. and Assmann, S.M. (2001) Apparent absence of a redox requirement for blue light activation of pump current in broad bean guard cells. *Plant Physiol.* **125**, 329–338.
- Ueno, K., Kinoshita, T., Inoue, S., Emi, T. and Shimazaki, K. (2005) Biochemical characterization of plasma membrane H⁺-ATPase

- activation in guard cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana* in response to blue light. *Plant Cell Physiol.* **46**, 955–963.
- Vavasseur, A. and Raghavendra, A.S.** (2005) Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytol.* **165**, 665–682.
- Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M. and Assmann, S.M.** (2001) G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science*, **292**, 2070–2072.
- Webb, A.R., McAinsh, M.R., Mansfield, T.A. and Hetherington, A.M.** (1996) Carbon dioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium. *Plant J.* **9**, 287–304.
- Young, J.J., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E. and Schroeder, J.I.** (2006) CO₂ signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 7506–7511.
- Zeiger, E. and Field, C.** (1982) Photocontrol of the functional coupling between photosynthesis and stomatal conductance in the intact leaf: blue light and PAR-dependent photosystems in guard cells. *Plant Physiol.* **70**, 370–375.
- Zhang, X., Wang, H.B., Takemiya, A., Song, C.P., Kinoshita, T. and Shimazaki, K.I.** (2004) Inhibition of blue light-dependent H⁺ pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cell protoplasts. *Plant Physiol.* **136**, 4150–4158.

**Kapitel II: Ca²⁺-Dependent and -Independent Abscisic Acid
Activation of Plasma Membrane Anion Channels
in Guard Cells of *Nicotiana tabacum***

**Holger Marten, Kai R. Konrad, Petra Dietrich, M. Rob G. Roelfsema
und Rainer Hedrich**

Publiziert in: Plant Physiology, Januar 2007, Vol. 143, Seiten 28-37

Eigene Beteiligung an der Arbeit:

- Biophysikalische Untersuchung der Antworten von Schließzellen auf extrazellulär applizierte Abscisinsäure (ABA) in intakten *Nicotiana tabacum* Pflanzen mit der DEVC Einstich-Methode;
- Fluorometrische Untersuchung der zytosolischen Ca²⁺ Konzentration in Schließzellen von intakten *N. tabacum* Pflanzen während der Antwort auf ABA;
- Auswertung der Daten.

Ca²⁺-Dependent and -Independent Abscisic Acid Activation of Plasma Membrane Anion Channels in Guard Cells of *Nicotiana tabacum*¹

Holger Marten², Kai R. Konrad², Petra Dietrich³, M. Rob G. Roelfsema, and Rainer Hedrich*

University of Wurzburg, Biocenter, Molecular Plant Physiology and Biophysics, Julius-von-Sachs Institute for Biosciences, D-97082 Wurzburg, Germany

Drought induces stomatal closure, a response that is associated with the activation of plasma membrane anion channels in guard cells, by the phytohormone abscisic acid (ABA). In several species, this response is associated with changes in the cytoplasmic free Ca²⁺ concentration. In *Vicia faba*, however, guard cell anion channels activate in a Ca²⁺-independent manner. Because of potential differences between species, *Nicotiana tabacum* guard cells were studied in intact plants, with simultaneous recordings of the plasma membrane conductance and the cytoplasmic free Ca²⁺ concentration. ABA triggered transient rises in cytoplasmic Ca²⁺ in the majority of the guard cells (14 out of 19). In seven out of 14 guard cells, the change in cytoplasmic free Ca²⁺ closely matched the activation of anion channels, while the Ca²⁺ rise was delayed in seven other cells. In the remaining five cells, ABA stimulated anion channels without a change in the cytoplasmic Ca²⁺ level. Even though ABA could activate anion channels in *N. tabacum* guard cells independent of a rise in the cytoplasmic Ca²⁺ concentration, patch clamp experiments showed that anion channels in these cells are stimulated by elevated Ca²⁺ in an ATP-dependent manner. Guard cells thus seem to have evolved both Ca²⁺-independent and -dependent ABA signaling pathways. Guard cells of *N. tabacum* apparently utilize both pathways, while ABA signaling in *V. faba* seems to be restricted to the Ca²⁺-independent pathway.

The aperture of stomata is determined by two guard cells that surround the stomatal pore. Guard cells are devoid of plasmodesmata (Wille and Lucas, 1984) and thus function virtually autonomously. During drought, stomata close to reduce the loss of water via transpiration, a response that depends on the phytohormone abscisic acid (ABA; Assmann and Shimazaki, 1999; Schroeder et al., 2001; Roelfsema and Hedrich, 2005). ABA triggers the efflux of K⁺ salts from the guard cell, thereby reducing the osmotic potential of the cell and causing stomatal closure. The efflux of K⁺ salts is driven through depolarization of the plasma membrane, which allows K⁺ extrusion through outward rectifying K⁺ channels. Two mechanisms could mediate the ABA-induced depolarization of guard cells: activation of anion channels and/or inhibition of H⁺-ATPases in the plasma membrane.

In guard cells of *Vicia faba* studied in intact plants, ABA triggers a transient activation of R- and S-type anion channels (Roelfsema et al., 2001). A peak in anion channel activity is found after approximately 5 min;

during prolonged stimulation, the activity of anion channels levels off, but a prestimulus value is only observed after removal of ABA. This led to the suggestion that the first phase of this ABA response induces fast stomatal closure, while the second phase inhibits reopening of the stomata (Roelfsema and Hedrich, 2005). The extent to which ABA may inhibit plasma membrane H⁺-ATPases is not known in detail, but ABA was shown to inhibit blue light-induced activation of H⁺-ATPases in guard cells (Zhang et al., 2004).

Various lines of evidence predicted an important role of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in ABA activation of anion channels in guard cells (Hetherington and Brownlee, 2004). Both R- and S-type anion channels in *V. faba* guard cells are stimulated by cytoplasmic Ca²⁺ (Schroeder and Hagiwara, 1989; Hedrich et al., 1990), and ABA can induce cytoplasmic Ca²⁺ transients in guard cells in isolated epidermal strips or epidermal fragments of *Commelina communis* (McAinsh et al., 1990; Gilroy et al., 1991) as well as in *Arabidopsis thaliana* (Allen et al., 1999, 2001). In contrast to these data, Levchenko et al. (2005) found that ABA activates anion channels without provoking cytoplasmic Ca²⁺ changes in guard cells of *V. faba*. The differences in results may be due to different experimental conditions, because Levchenko et al. (2005) measured guard cells in intact plants, while previous reports were mainly conducted with isolated epidermal peels. Alternatively, the differences may relate to differences between plant species. In some species, ABA-induced stomatal closure could involve alterations in the cytoplasmic Ca²⁺ concentration of guard cells, whereas in others, stomata close in a Ca²⁺-independent fashion.

¹ This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grants to R.H., M.R.G.R., and P.D.).

² These authors contributed equally to the paper.

³ Present address: Molecular Plant Physiology, University of Erlangen, Staudtstrasse 5, 91058 Erlangen, Germany.

* Corresponding author; e-mail hedrich@botanik.uni-wuerzburg.de; fax 49-931-8886157.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Rainer Hedrich (hedrich@botanik.uni-wuerzburg.de).

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.106.092643

In search of species-specific variation in the anion channel response to ABA, guard cell responses of *Nicotiana tabacum* were compared with those previously obtained for *V. faba* (Levchenko et al., 2005). In contrast to *V. faba*, this plant species can be transformed easily and thus has the advantage that it can be used for molecular biological approaches. The size of *N. tabacum* stomata is similar to that of *V. faba* and *C. communis*, which is a prerequisite for long-term intracellular recordings. For these reasons, *N. tabacum* and its close relative, *Nicotiana benthamiana*, already were the species of choice in several studies (Armstrong et al., 1995; Leyman et al., 1999; Hunt et al., 2003; von Caemmerer et al., 2004). We found that ABA activates anion channels in guard cells of intact plants, in a similar manner as previously observed for *V. faba*. However, in contrast to previous results with *V. faba*, the majority of *N. tabacum* guard cells showed an ABA-induced rise in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration. Patch clamp experiments with *N. tabacum* guard cell protoplasts revealed that cytoplasmic Ca^{2+} as well as ABA enhance anion channel activity. These data suggest species-specific differences concerning the role of cytoplasmic Ca^{2+} changes in guard cell responses to ABA.

RESULTS

Guard Cell Recordings in Intact *N. tabacum* Plants

Guard cells of *N. tabacum* were studied in intact plants using double- and triple-barreled microelec-

trodes. The adaxial side of a mature leaf was attached to a plexiglass holder, enabling impalement of guard cells at the abaxial epidermis (Fig. 1, A and B). Two barrels of the microelectrodes were used to register and manipulate the membrane potential, while the Ca^{2+} reporter dye FURA2 could be injected with triple-barreled electrodes. After impalement, most electrodes were positioned in the cytoplasm, as judged from the distribution of FURA2 throughout the guard cell (Fig. 1C). In seven out of 49 cells, however, the dye did not spread through the cell but remained in a confined compartment (Fig. 1D). These electrodes were probably placed in the vacuole based on the size and localization of the fluorescent compartment. In these cells, the voltage dependence of K^+ channels was less steep compared to cells in which the electrode was located in the cytoplasm (data not shown). Most likely, the vacuolar membrane acts as a resistor connected in series with that of the plasma membrane. In some cells, the FURA2 initially loaded into the cytoplasm slowly appeared in the vacuole, indicating that *N. tabacum* guard cells are able to transport FURA2 from the cytoplasm to the vacuole (Fig. 1, E and F). The FURA2 ratio measurements therefore were only carried out from cytoplasm-rich areas.

In the absence of ABA, the conductance of the guard cell plasma membrane in *V. faba* and Arabidopsis is dominated by two types of K^+ -selective channels, which were also recognized in guard cells of *N. benthamiana* (Armstrong et al., 1995). In *N. tabacum* guard cells in intact plants, outward rectifying channels

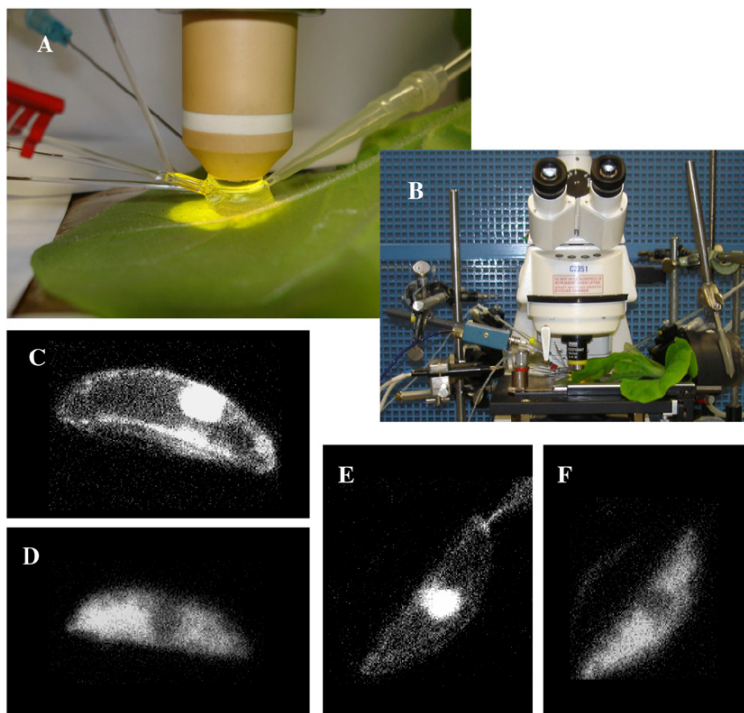


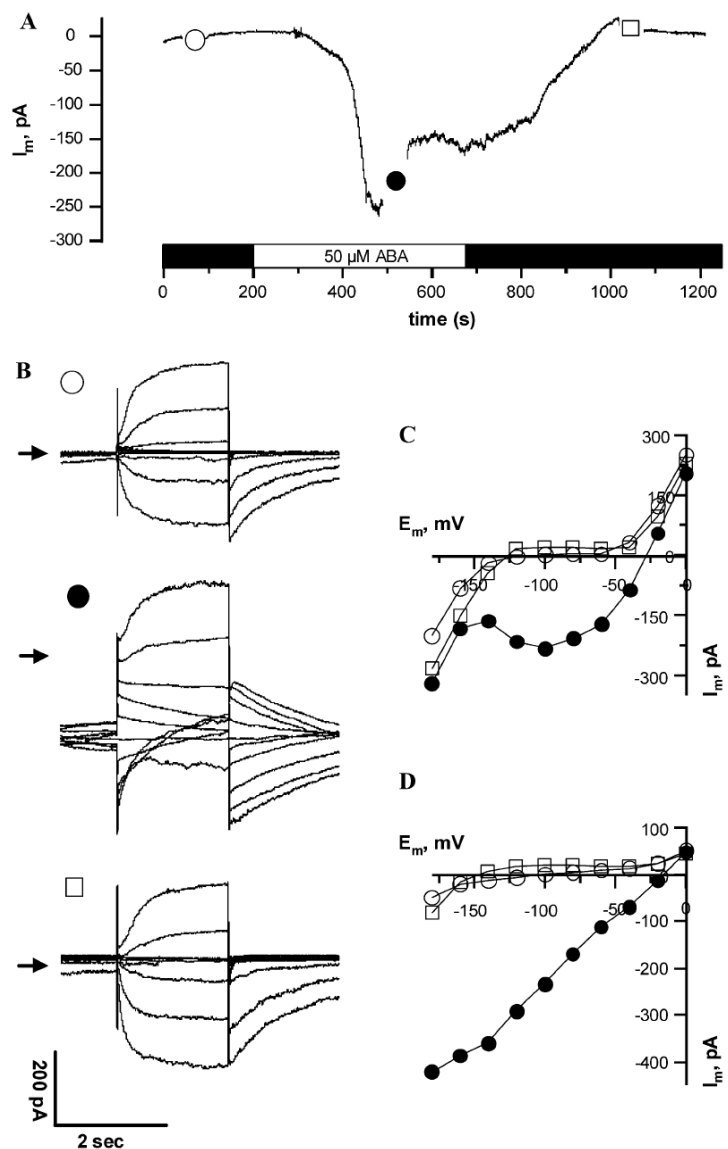
Figure 1. Guard cells in intact *N. tabacum* plants impaled with triple-barreled electrodes. A, Close up of an *N. tabacum* leaf impaled with triple-barreled electrode (left), guard cells in the abaxial epidermis were visualized with a water emersion objective (middle). Experimental solutions were perfused through a hypodermic needle (left back) over the cuticle to a suction pipette (right). B, Overview of the experimental setup with the upright microscope (middle), microelectrode amplifiers (left), and the *N. tabacum* plant (right). C, *N. tabacum* guard cell impaled with a triple-barreled electrode, through which FURA2 was injected, located with the tip in the cytoplasm. D, Guard cell injected with FURA2 through a triple-barreled electrode with the tip in the vacuole. E, Guard cell injected with FURA2 in the cytoplasm, but in which the FURA slowly appeared in the vacuole. F, Same guard cell as in E but 15 min later.

Marten et al.

activated at potentials positive of -60 mV, while inward channels were observed at potentials negative of -120 mV (Fig. 2B). At a holding potential of -100 mV, both time-dependent channels are not active, and, therefore, this potential was chosen to resolve ABA activation of anion channels (Roelfsema et al., 2004). ABA application triggered an inward current, after a lag time of 90 s ($SE = 12$, $n = 27$) that peaked after 268 s ($SE = 26$, $n = 27$) and partially deactivated again during prolonged stimulation with ABA. Before and during the application of ABA, the cells were clamped stepwise to potentials ranging from -180 mV to 0 mV with 20 -mV increments (Fig. 2B). ABA stimulated the instantaneous conductance but had little effect on out-

ward rectifying channels. The effect of ABA on inward rectifying channels was masked by the large activity of instantaneous currents (Fig. 2, C and D). The reversal potential of the instantaneous current in the presence of ABA shifted from values negative of -100 mV to -20 mV (Fig. 2D). The current voltage relation was linear, indicating that ABA activated S-type anion channels in these cells. The activation of R-type anion channels by ABA was not observed, even though this channel type was found in *N. tabacum* guard cells with patch clamp (data not shown). These data reveal that ABA stimulates S-type anion channels in guard cells of *N. tabacum* in a very similar manner as previously observed for *V. faba* (Roelfsema et al., 2004; Levchenko et al., 2005).

Figure 2. ABA-induced changes in the plasma membrane conductance of an *N. tabacum* guard cell. A, Current trace of a guard cell clamped to a holding potential of -100 mV and exposed to $50 \mu\text{M}$ ABA (as indicated by the bar below the graph). Symbols indicate the time points at which voltage clamp step protocols were applied. B, Current traces from test pulses of the same cell as in A, symbols correlate. Arrows indicate the 0 pA level. Cells were clamped from a holding potential of -100 mV to potentials ranging from -180 to 0 mV with 20 -mV increments. Note that the introduction of ABA (●) caused a dramatic increase of currents measured directly after the capacity compensation peak, while ABA had little effect on time-dependent outward currents. The currents virtually recovered to prestimulus values after a washout of ABA (□). C, Steady-state currents, sampled at the end of the 2-s test pulses, plotted against the clamp voltage (symbols correspond to A). Note that ABA increased inward current ranging from -40 to -140 mV and caused a large shift of the zero current potential to more positive values. D, Instantaneous currents, sampled directly after termination of the capacity compensation peak, plotted against the clamp voltage (symbols correspond to A). Note that ABA activated a channel with a linear instantaneous current-voltage relation and a reversal potential at -17 mV.



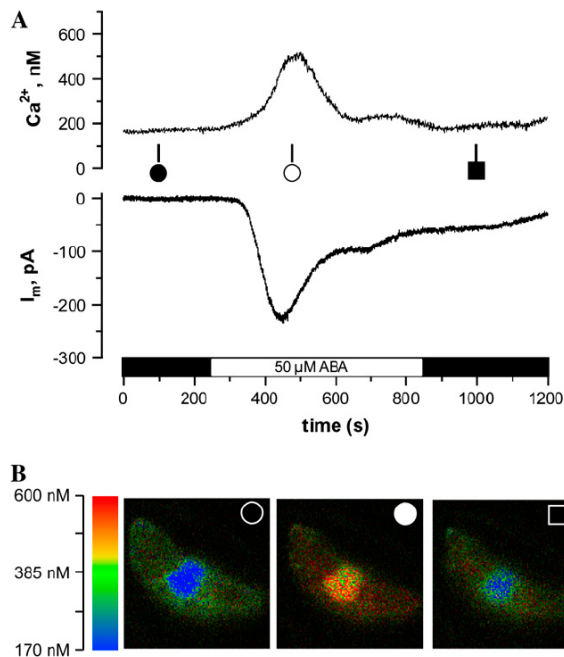


Figure 3. *N. tabacum* guard cell in intact plant, with an ABA-induced rise of the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration, matching an increase of anion currents. A, ABA responses of a guard cell clamped to -100 mV, loaded with FURA2, and exposed to $50 \mu\text{M}$ ABA as indicated by the bar below the graphs. Top trace, Cytoplasmic free Ca^{2+} concentration as calculated from the FURA2 $F_{345}:F_{390}$ fluorescent ratio. Note that ABA induces a transient rise in the free Ca^{2+} concentration. Lower trace, current trace at -100 mV. Note that ABA induces an inward current that matches the rise in the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration. B, False color cytoplasmic free Ca^{2+} images of the same guard cell as in A, before, during, and after the response to ABA (symbols correspond to A). Color codes are linked to free Ca^{2+} concentration in the bar on the left. Note that ABA triggers a rise in the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration throughout the cell, which is most obvious in the area surrounding the nucleus.

ABA-Induced Changes in Cytoplasmic Ca^{2+}

N. tabacum guard cells, loaded with the Ca^{2+} reporter dye FURA2, were exposed to $50 \mu\text{M}$ ABA applied at the cuticle as described above. Guard cells were clamped to -100 mV throughout the experiment to prevent voltage-dependent changes in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration (Grabov and Blatt, 1998; Levchenko et al., 2005). Under these conditions, ABA induced a transient activation of anion channels just as in *V. faba*. Note that in contrast to the latter species, this response was accompanied by an increase in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration in the majority of cells (14 out of 19). In one-half of the cells displaying a rise in cytoplasmic Ca^{2+} , the increase of the Ca^{2+} concentration mirrored changes in the plasma membrane current (Fig. 3A). False color images of the 345:390 nm ratio of FURA2 fluorescence revealed that the free Ca^{2+} concentration rises throughout the cytoplasm,

with the most obvious change in the proximity of the nucleus. Despite the close correspondence between the cytoplasmic Ca^{2+} concentration changes and changes in current observed for seven out of 19 cells, this correlation was absent in all other guard cells. In seven guard cells of *N. tabacum*, the ABA-induced rise in the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration was delayed and did not match the activation state of inward current (Fig. 4A). In another subset of five cells, ABA did not trigger a change in the cytoplasmic Ca^{2+} , even though ABA stimulated anion channels (Fig. 4B). The absence of an ABA-induced rise in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration could not be linked to differences in Ca^{2+} buffering by FURA2. A comparison of the absolute fluorescence of FURA2 revealed a ratio of 0.99 for cells with or without Ca^{2+} changes, respectively. The magnitude of the current changes in cells that displayed a rise in cytoplasmic Ca^{2+} was not significantly different (*t* test, $P > 0.05$) from those that did not show changes in cytoplasmic Ca^{2+} .

Guard cells of *V. faba* and Arabidopsis operate Ca^{2+} -permeable plasma membrane channels that activate upon hyperpolarization (Grabov and Blatt, 1998; Pei et al., 2000). ABA may activate these channels through protein phosphorylation (Köhler and Blatt, 2002) or through an ABA-induced rise in reactive oxygen species (Pei et al., 2000). Based on the latter results, the ABA-induced rise in cytoplasmic Ca^{2+} should be voltage dependent and thus more pronounced at negative voltages. Hyperpolarization of the plasma membrane of *N. tabacum* to -250 mV induced a large rise in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration (data not shown), indicating the guard cells of this species are equipped with the same Ca^{2+} uptake machinery as *V. faba* and Arabidopsis. Guard cells that were left at the free-running membrane potential (average $E_m = -55$ mV, $\text{SE} = 5$, $n = 6$) still displayed ABA-induced changes in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration (Fig. 5A). In line with the properties of hyperpolarization-activated calcium uptake, the ABA-induced rise in cytoplasmic Ca^{2+} was smaller at the free-running potential compared to -100 mV (Fig. 5B).

Patch Clamp Experiments

Anion channels in guard cells were ABA activated through a Ca^{2+} -independent pathway (Fig. 4), even though these channels were previously found to be stimulated by Ca^{2+} in *V. faba* (Schroeder and Hagiwara, 1989; Hedrich et al., 1990) and Arabidopsis (Allen et al., 1999). We therefore tested if anion channel activity in *N. tabacum* guard cells is also affected by cytoplasmic Ca^{2+} . These studies were conducted with the patch clamp technique, which allows precise control of the cytoplasmic composition.

Protoplasts of *N. tabacum* guard cells were patched at conditions that block K^+ channels and allow recordings of anion channels. The nature of the channels recorded under these conditions was tested with voltage clamp protocols from a holding potential of -158 mV to a preconditioning voltage of $+62$ mV

Marten et al.

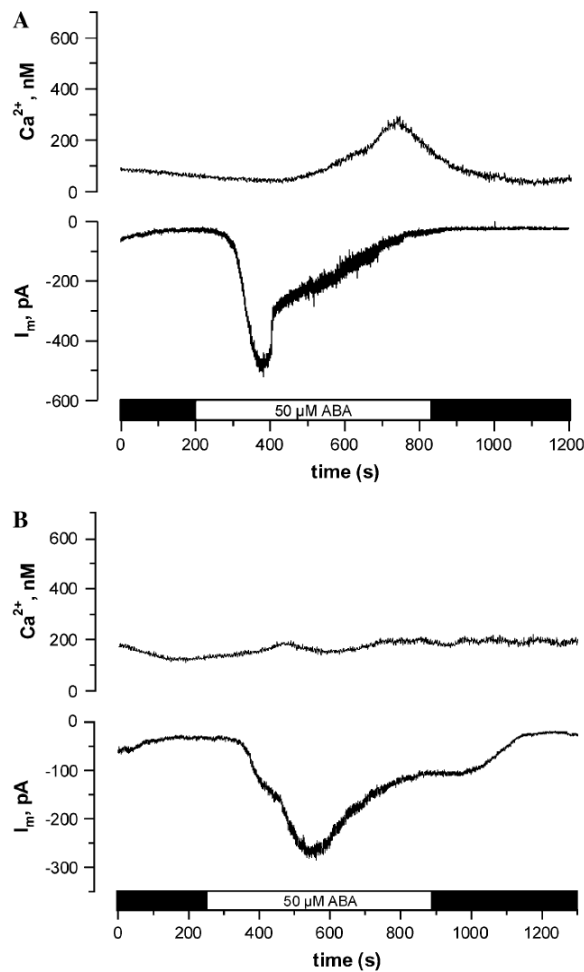


Figure 4. *N. tabacum* guard cells in intact plants, in which ABA induced an increase in anion channel activity, accompanied by a delayed rise in the cytoplasmic free Ca²⁺ concentration (A) or without a change of the Ca²⁺ concentration (B). A and B, ABA responses of guard cells clamped to -100 mV, loaded with FURA2, and exposed to 50 μM ABA as indicated by the bar below the graphs. Top traces, cytoplasmic free Ca²⁺ concentration as calculated from the FURA2 F₃₄₅:F₃₉₀ fluorescent ratio. Note that ABA induces a transient rise in the free Ca²⁺ concentration that is delayed compared to the increase in current in A but no change in the Ca²⁺ concentration in B. Bottom traces, current trace at -100 mV. Note that ABA induces transient increases in inward current in both cells.

and test potentials ranging from +82 to -218 mV. Lowering the extracellular Cl⁻ concentration from 80 to 8 mM shifted the reversal potential of the plasma membrane (Fig. 6A) from 7.5 mV (SE = 0.2, n = 4) to 41.3 mV (SE = 3.5, n = 4). These data show that the channels recorded in these protoplasts have a high permeability for Cl⁻ and a virtually linear current voltage relation, properties that are in line with those of S-type anion channels in other species (Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992).

32

The effect of cytoplasmic Ca²⁺ on S-type channels was tested in experiments with patch pipettes containing 10 mM ATP and either 0, 110, or 380 nM free Ca²⁺. With pipette concentrations of 0 or 110 nM, the activity of anion channels remained virtually constant

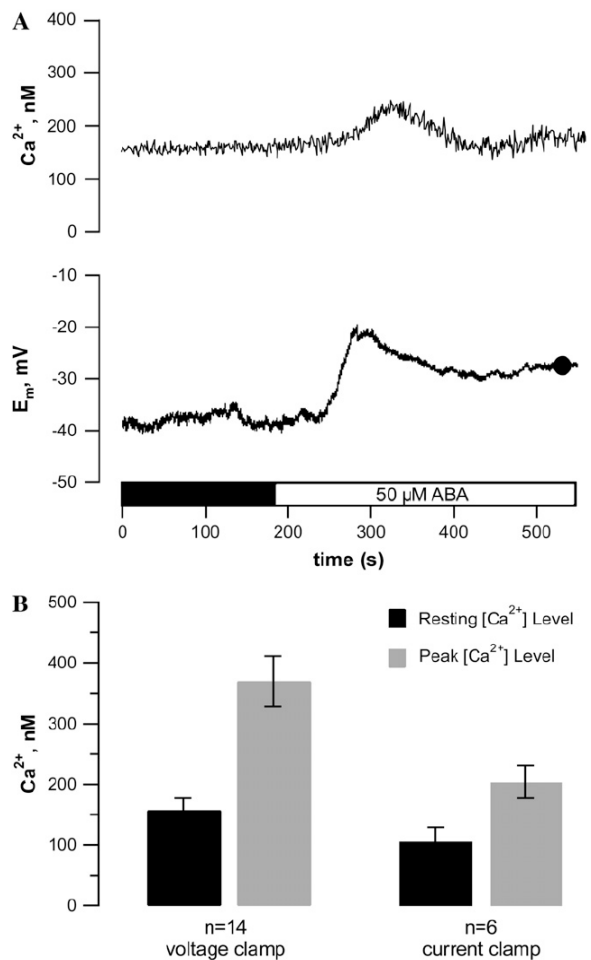


Figure 5. ABA-induced change in free-running membrane potential and cytoplasmic free Ca²⁺ concentration of a *N. tabacum* guard cell in an intact plant. A, ABA response of a guard cell at its free-running membrane potential, loaded with FURA2, and exposed to 50 μM ABA as indicated by the bar below the graphs. Top traces, cytoplasmic free Ca²⁺ concentration as calculated from the FURA2 F₃₄₅:F₃₉₀ fluorescent ratio. Note that ABA induces a transient rise in the free Ca²⁺ concentration that matches the change in free-running membrane potential. Bottom traces, free-running membrane potential of the same cell as in the top trace. B, Average free Ca²⁺ concentration of *N. tabacum* guard cells as calculated from the FURA2 F₃₄₅:F₃₉₀ fluorescent ratio before (black bar) or at the peak of the ABA response (gray bar); cells not showing an ABA-induced change in cytoplasmic free Ca²⁺ were not included. Guard cells were clamped at a holding potential of -100 mV (left bars) or at their free-running membrane potential (average E_m = -55 mV, SE = 5, n = 6, right bars). Error bars represent SE, n is indicated below the bars. Note that the average free Ca²⁺ concentration is lower in cell at their free-running membrane potential and is raised by ABA irrespective of current- or voltage-clamp conditions.

Plant Physiol. Vol. 143, 2007

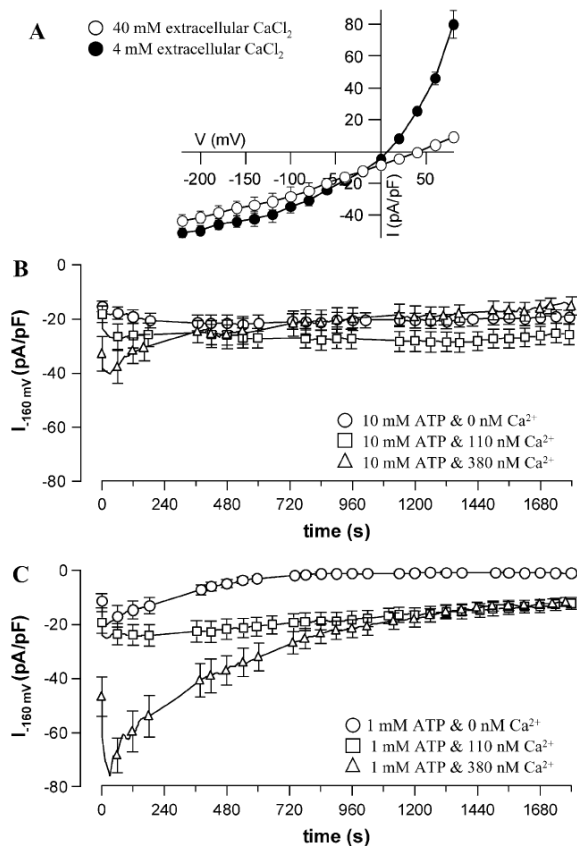


Figure 6. Ca^{2+} -dependent activation of plasma membrane anion channels in guard cell protoplasts of *N. tabacum*. A, Cl^- -induced shift in reversal potential of anion channels. The current-voltage relation was obtained with voltage clamp step protocols from a holding potential of -158 mV to a preconditioning voltage of $+62$ mV and test potentials ranging from $+82$ to -218 mV. Measurements were carried out with a pipette solution containing 10 mM ATP, 110 nM free Ca^{2+} , and 150 mM Cl^- . A change of the extracellular Cl^- concentration from 80 to 8 mM shifted the reversal potential from 7.5 mV (SE = 0.2, $n = 4$) to 41.3 mV (SE = 3.5, $n = 4$). B and C, Kinetics of activation of anion channels in guard cell protoplasts after establishing the whole cell configuration ($t = 0$) with 10 mM ATP (B) or 1 mM ATP (C) in the pipette solution. The plasma membrane was clamped to -158 mV and Ca^{2+} was given via the patch pipette either at a free Ca^{2+} concentration of 0 (\circ), 110 (\square), or 380 (\triangle) nM. Error bars represent SE, $n = 6$ to 12. Note that at 10 mM ATP, 380 nM Ca^{2+} activates anion channels during the first 30 s, but the current decays to the same value as with 0 or 110 nM during prolonged measurements. At 1 mM ATP, 110 and 380 nM Ca^{2+} activate anion channels during the first 30 s and inhibit slow inactivation.

(Fig. 6B). An increase of the Ca^{2+} concentration to 380 nM activated anion channels during the first 30 s, but during prolonged recordings, the activity leveled off to the same value as with 110 or 0 nM Ca^{2+} (Fig. 6B). Apparently, Ca^{2+} stimulates anion channel activity during the first 30 s after establishing the whole cell configuration, but this effect is lost during prolonged

recordings. This suggests that Ca^{2+} diffusing from the patch pipette into the cell initially stimulates anion channels. However, during prolonged recordings, cytoplasmic components provoking this response may diffuse from the cytoplasm into the pipette, causing the effect of Ca^{2+} to diminish in time.

Just as with R- and S-type anion channels in *V. faba* and Arabidopsis (Hedrich et al., 1990; Schwarz and Schroeder, 1998; Allen et al., 1999), the activity of anion channels in *N. tabacum* was modulated by nucleotides. At a reduced ATP concentration of 1 mM, anion channels were activated with 0 nM Ca^{2+} in the pipette during the first 30 s, but their activity decayed thereafter (Fig. 6C). Increasing the cytoplasmic Ca^{2+} concentration to 110 nM inhibited the decay of anion current in time. A further rise to 380 nM enhanced the peak activity of S-type anion channels after 30 s, but afterward, the channels reached the same steady state as with 110 nM Ca^{2+} . These data show that depending on the ATP concentration and the free Ca^{2+} level, Ca^{2+} ions activate anion channels either through stimulation of the peak activity (t approximately 30 s) or through inhibition of slow inactivation (half time approximately 6 min).

ABA probably activates anion channels through an intracellular receptor, because injection of ABA in *V. faba* guard cells of intact plants activates anion channels right away, while external application delayed this response by 1 to 2 min (Levchenko et al., 2005). In line with these results, guard cell anion channels in *V. faba* were activated by ABA applied through the patch clamp pipette (Levchenko et al., 2005). In guard cell protoplasts of *N. tabacum*, ABA did not enhance the peak anion channel activity but delayed the inactivation of anion channels in time (Fig. 7A). The delayed inactivation of anion channels was not accompanied with changes in voltage-dependent gating (Fig. 7B), nor did ABA alter the reversal potential of whole cell current voltage relation (Fig. 7C). The effect of ABA in patch clamp experiments thus was limited to inhibition of S-type anion channel inactivation in *N. tabacum*, while it also enhanced the peak activity of these channels in *V. faba*. These data and the ABA-induced changes in the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration point to species-specific differences in ABA signaling of guard cells.

DISCUSSION

The role of Ca^{2+} in ABA signaling of guard cells has been discussed ever since DeSilva et al. (1985) showed synergism between ABA and extracellular applied Ca^{2+} . This theory gained support by a number of publications, showing that ABA can trigger a single rise or sustained oscillations in the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration of guard cell in several species (McAinsh et al., 1990; Gilroy et al., 1991; Allen et al., 1999; Webb et al., 2001). However, ABA did not trigger a rise of the Ca^{2+} concentration in every guard cell

Marten et al.

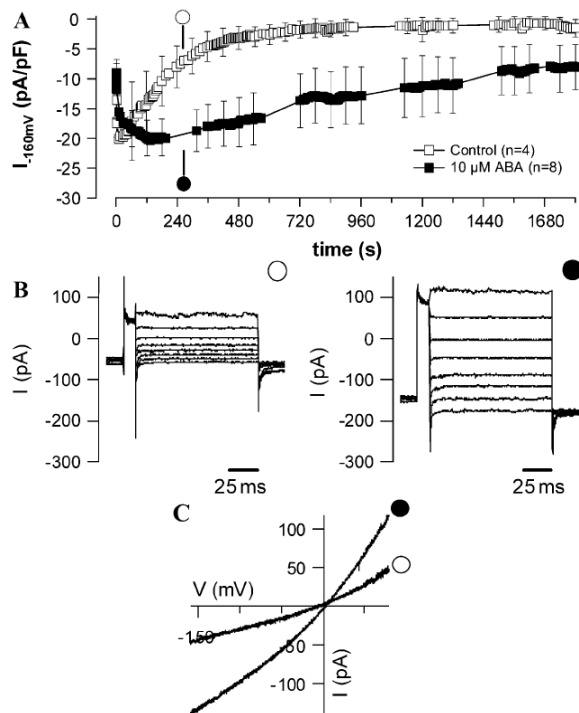


Figure 7. Kinetics of ABA-induced activation of anion channels in guard cell protoplasts from *N. tabacum*. **A**, Average plasma membrane currents at -158 mV of *N. tabacum* guard cell protoplasts, patched with pipettes containing 1 mM ATP and 0 mM free Ca^{2+} . ABA was omitted (\circ) or applied through the patch pipette at a concentration of 10 μM (\bullet). Note that ABA inhibits the time-dependent deactivation of anion channels. **B**, Current traces obtained with voltage clamp step protocols from a holding potential of -158 mV to a preconditioning voltage of $+60$ mV and test potentials ranging from $+82$ to -218 mV. For clarity only current traces of every second voltage step ($\Delta V = -40$ mV) are shown. **C**, Current-voltage relation of representative protoplasts recorded 4.5 min after establishing the whole cell configurations in the presence or absence of 10 μM ABA in the pipette. The protoplasts were challenged with fast voltage clamp ramps from a holding potential of -158 mV to $+82$ mV in $1,500$ ms.

recorded (McAinsh et al., 1990; Gilroy et al., 1991; Allen et al., 1999). Guard cells that did not display a rise in Ca^{2+} still lost turgor (Gilroy et al., 1991) and thus apparently were able to activate anion channels in a Ca^{2+} -independent manner. Such a Ca^{2+} -independent ABA signaling pathway is supported by recent studies, showing that ABA inhibits inward rectifying K^+ channels (Romano et al., 2000) and stimulates anion channels (Levchenko et al., 2005) independent of changes in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration.

Ca^{2+} -Independent ABA Signaling

Anion channels in the plasma membrane of *N. tabacum* guard cells can be activated by ABA through a pathway that does not involve a rise in the cytoplas-

mic Ca^{2+} concentration. This pathway is evident from cells that do not display an ABA-dependent increase in cytoplasmic Ca^{2+} but still activate anion channels (Fig. 4B). ABA did induce a rise in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration of other cells (Fig. 3), but the change of Ca^{2+} level did not necessarily match that of anion channel activation (Fig. 4A). Even though these data suggest that ABA activation of anion channels occurs through a Ca^{2+} -independent mechanism, it could be inhibited in *V. faba* by high concentrations of 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid (BAPTA; Levchenko et al., 2005). Apparently, ABA activation of anion channels in *V. faba* required a basic level of cytoplasmic Ca^{2+} . ABA may thus stimulate anion channel activity by enhancing the affinity for Ca^{2+} of components in the pathway that lead to anion channel activation (Levchenko et al., 2005).

Open Stomata 1 (OST1) of Arabidopsis (Mustilli et al., 2002) and its *V. faba* homolog AAPK (Li et al., 2000) resemble Ca^{2+} -independent protein kinases. A close homolog of OST1, SRK2C was transiently stimulated by drought stress with a very similar time course as the stimulation of guard cell anion channels by ABA (Yoshida et al., 2002). The OST1 kinase interacts with the ABI1 protein kinase, which is also not Ca^{2+} sensitive and acts as a negative regulator of ABA signaling (Bertauche et al., 1996; Merlot et al., 2001). These proteins may thus provide ABA-sensitive, but Ca^{2+} -independent, key elements for activation of anion channels in guard cells.

Ca^{2+} -Dependent ABA Signaling

Even though the ABA-induced activation of plasma membrane anion channels occurs through a Ca^{2+} -independent pathway, the anion channel activity in *N. tabacum* guard cell protoplasts was stimulated by Ca^{2+} (Fig. 6, B and C). This is in line with early reports showing that the activity of R- and S-type anion channels in guard cell protoplasts depends on Ca^{2+} and nucleotides (Schroeder and Hagiwara, 1989; Hedrich et al., 1990; Schmidt et al., 1995). Both channel types, however, seem to be stimulated by nucleotides through different mechanisms. Whereas nonhydrolyzable ATP analogs stimulate R-type channels in *V. faba* guard cells (Hedrich et al., 1990) as well as in Arabidopsis hypocotyl cells (Thomine et al., 1997), the activity of S-type channels strictly depends on hydrolyzable ATP (Schmidt et al., 1995; Allen et al., 1999). This suggests that S-type channels are stimulated through phosphorylation, which is supported by a reduced activation in presence of protein kinase inhibitors (Allen et al., 1999) and a delayed down-regulation by the protein phosphatase inhibitor okadaic acid (Schmidt et al., 1995).

Protein phosphorylation may also stimulate S-type anion channels in *N. tabacum* guard cell protoplasts, because Ca^{2+} activates these channels in a nucleotide-sensitive mechanism. S-type anion channels were stimulated by an elevated Ca^{2+} concentration of 380 nM

in the patch pipette during the first 30 s. During prolonged measurement, the effect of Ca^{2+} was lost, which hints to the diffusion of cytoplasmic proteins that mediate this response. The highest degree of activation was found with 1 mM ATP in the pipette solution, while 10 mM ATP leads to a smaller activation of S-type anion channels. This indicates that apart from a Ca^{2+} -dependent activation mechanism, anion channels are also subject to down-regulation by nucleotides at high concentrations.

It is likely that Ca^{2+} -dependent signaling proteins, such as protein kinases associated with the plasma membrane, forward the Ca^{2+} signal to anion channels. Calcium-dependent protein kinases (CDPK; Hrabak et al., 2003) may represent such regulators, because they seem to be required for the activation of an anion channel in the vacuolar membrane of Arabidopsis guard cells (Pei et al., 1996). Furthermore, these protein kinases are also involved in ABA- and Ca^{2+} -dependent regulation of S-type anion channels and hyperpolarization activated Ca^{2+} channels (Mori et al., 2006). Previously, a CDPK has been identified in *V. faba* guard cells, which was able to phosphorylate the KAT1 channel of Arabidopsis (Li et al., 1998).

Alternatively to CDPKs, calcineurin B-like proteins (CBL) may be involved in Ca^{2+} -dependent regulation of ion channels (Batistic and Kudla, 2004; Hedrich and Kudla, 2006). These Ca^{2+} sensors bind to CBL-interacting protein kinases, which were found to stimulate the AKT1 channel in root cells (Xu et al., 2006). In guard cells of *V. faba*, similar proteins may inhibit the inward K^+ channels, because this response was repressed by inhibitors of calcineurin (Luan et al., 1993). However, an interaction between CBL-interacting protein kinases and plasma membrane anion channels in guard cells has not yet been shown.

Species-Specific ABA-Signaling Pathways

During evolution, two signaling pathways seem to have developed that link perception of ABA to guard cell responses. We found that guard cells of *V. faba* exclusively utilize the Ca^{2+} -independent pathway (Levchenko et al., 2005), while both Ca^{2+} -dependent and -independent responses were found in *N. tabacum*. Based on experiments with the Ca^{2+} reporters FURA2 (Allen et al., 1999; Hetherington and Brownlee, 2004) and cameleon (Allen et al., 2000), ABA also induces Ca^{2+} signals in guard cells of Arabidopsis and *C. communis*, suggesting that Ca^{2+} -dependent processes also play a role in these species.

Apart from the activation of anion channels, ABA also inhibits blue light-induced activation of H^+ -ATPases in guard cells (Goh et al., 1996). This ABA response depends on the protein phosphatases ABI1 and 2 (Roelfsema et al., 1998) and may be mediated through hydrogen peroxide (Zhang et al., 2004). So far, it is not known whether this ABA response, or ABA responses in other cell types, utilizes Ca^{2+} -dependent or -independent signaling pathways. Additional in-

formation obtained with other species or different cell types may reveal the evolutionary origin of both pathways and hint to ecological advantages for plants to use one or the other signaling mechanism.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Nicotiana tabacum L. cv SRI were grown in a greenhouse under HQL-pressure lamps (Philips, Powerstar HQL-E, 400 W) with a day/night cycle of 12/12 h. For patch clamp experiments, the youngest fully unfolded leaves of 3- to 4-week-old plants were used, while the second or third pair of leaves was used for impalement studies.

Protoplast Isolation and Patch Clamp Experiments

Guard cell protoplasts were isolated according to Raschke and Hedrich (1989). Anion currents were studied in the whole-cell configuration of the patch clamp technique (Hamill et al., 1981) using patch pipettes prepared from Kimax-51 glass (Kimble Products) and coated with silicone (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning). Currents were recorded with an EPC-7 patch clamp amplifier (HEKA) and low-pass filtered with an eight-pole Bessel filter at a cutoff frequency of 2 kHz and sampled at 2.5-fold filter frequency. Data were digitized (ITC-16; Instrutech), stored on hard disc, and analyzed with HEKA and Wavemetrics software (HEKA Elektronik). The pipette solution contained 150 mM tetraethylammonium chloride, 2 mM MgCl_2 , 10 mM EGTA, 1 mM MgATP, 10 mM HEPES-Tris, pH 7.2. The bath solution was composed of 40 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Tris, pH 5.6. Protoplasts were characterized by a mean membrane capacitance of 4.4 ± 0.7 pF ($n = 140$). For ABA experiments, (\pm)-cis, trans ABA (Lancaster) was used from methanol stocks.

Recordings on Guard Cells in Intact Leaves

Guard cells in intact plants were impaled and recorded with double- and triple-barreled electrodes as described (Roelfsema et al., 2001; Levchenko et al., 2005). Two barrels were filled with 300 mM KCl for membrane potential measurements and voltage clamp, the third barrel was filled with 2 mM FURA2 (Fluka) for current injection, and with an additional 50 mM BAPTA for calibration of FURA2 in the intact plant (Levchenko et al., 2005). The three barrels of the intracellular electrode were connected to microelectrode amplifiers (VF-102, BioLogic), and the membrane potential was clamped by using a differential amplifier (CA-100, BioLogic). Data were filtered at 250 Hz and sampled at 1 kHz during short pulses, or filtered at 10 Hz and sampled at 33 Hz for long-term registration. The solution on the leaf surface contained 5 mM KCl, 5 mM potassium citrate, pH 6, 0.1 mM CaCl_2 , and 1 mM MgCl_2 .

Ratiometric Fluorescence Spectroscopy

The dual-excitation wavelength of the Ca^{2+} -dependent fluorescent dye FURA2 was used to monitor the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration. FURA2 was loaded into the guard cell cytoplasm or vacuole by iontophoretic micro-injection from the third microelectrode barrel. A loading current up to -350 pA was applied to inject the dye into the cell, during which the holding potential was kept at -100 mV. The injection current therefore was automatically compensated for by a current in the opposite direction through the current injection barrel. Ratiometric fluorescence spectroscopy measurements were carried out by using Metafluor software (Universal Imaging). FURA2 was excited with 200-ms flashes of UV light at 345 and 390 nm with a time interval of 1 s (VisiChrome High speed Polychromator System, VisiTron). The emission signal was filtered with a 510-nm bandpass filter (D510/40 M, AF Analysentechnik) and captured with a cooled CCD camera (CoolSNAP HQ, Roper Scientific). Background fluorescence levels of both wavelengths were taken from a reference region placed within a part of the unloaded neighboring guard cell or neighboring epidermal cells. The intracellular free Ca^{2+} concentration was calculated according to Grynkiewicz et al. (1985) by using the equation:

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

Marten et al.

where K_d represents the binding constant of FURA2 for Ca^{2+} , R represents the 345:390 nm excitation ratio, and R_{\min} and R_{\max} correspond to Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -saturated FURA2, respectively. F_{\min} and F_{\max} give the fluorescence intensity measured at 390 nm with Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -saturated FURA2, respectively. We adapted a K_d of 270 nm, determined in vitro by Levchenko et al (2005). R_{\min} and F_{\min} were defined as the values obtained after simultaneously injecting FURA2 and BAPTA at 0 mV into guard cells of intact plants. The values for R_{\max} and F_{\max} were obtained by clamping the plasma membrane from 0 mV to -250 mV, inducing a saturating influx of Ca^{2+} through hyperpolarization-activated Ca^{2+} channels.

Received November 5, 2006; accepted November 26, 2006; published December 1, 2006.

LITERATURE CITED

- Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411: 1053–1057
- Allen GJ, Chu SP, Schumacher K, Shimazaki CT, Vafeados D, Kemper A, Hawke SD, Tallman G, Tsien RY, Harper JE, et al (2000) Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science* 289: 2338–2342
- Allen GJ, Kuchitsu K, Chu SP, Murata Y, Schroeder JI (1999) *Arabidopsis abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *Plant Cell* 11: 1785–1798
- Armstrong F, Leung J, Grabov A, Brearley J, Giraudat J, Blatt MR (1995) Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K^+ channels is suppressed by *abi1-1*, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9520–9524
- Assmann SM, Shimazaki K (1999) The multisensory guard cell: stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol* 119: 809–815
- Batistic O, Kudla J (2004) Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* 219: 915–924
- Bertauche N, Leung J, Giraudat J (1996) Protein phosphatase activity of abscisic acid insensitive 1 (ABI1) protein from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 241: 193–200
- DeSilva DLR, Hetherington AM, Mansfield TA (1985) Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. *New Phytol* 100: 473–482
- Gilroy S, Fricker MD, Read ND, Trewavas AJ (1991) Role of calcium in signal transduction of Commelina guard cells. *Plant Cell* 3: 333–344
- Goh CH, Kinoshita T, Oku T, Shimazaki K (1996) Inhibition of blue light-dependent H^+ pumping by abscisic acid in *Vicia* guard-cell protoplasts. *Plant Physiol* 111: 433–440
- Grabov A, Blatt MR (1998) Membrane voltage initiates Ca^{2+} waves and potentiates Ca^{2+} increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4778–4783
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv Euro J Physiol* 391: 85–100
- Hedrich R, Busch H, Raschke K (1990) Calcium ion and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J* 9: 3889–3892
- Hedrich R, Kudla J (2006) Calcium signaling plant K^+ uptake networks channel. *Cell* 125: 1221–1223
- Hetherington AM, Brownlee C (2004) The generation of Ca^{2+} signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* 55: 401–427
- Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, Harper JE, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, et al (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* 132: 666–680
- Hunt L, Mills LN, Pical C, Leckie CP, Aitken FL, Kopka J, Mueller-Roeber B, McAinsh MR, Hetherington AM, Gray JE (2003) Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *Plant J* 34: 47–55
- Köhler B, Blatt MR (2002) Protein phosphorylation activates the guard cell Ca^{2+} channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. *Plant J* 32: 185–194
- Levchenko V, Konrad KR, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R (2005) Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca^{2+} signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4203–4208
- Leyman B, Geelen D, Quintero FJ, Blatt MR (1999) A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science* 283: 537–540
- Li J, Lee YR, Assmann SM (1998) Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol* 116: 785–795
- Li J, Wang XQ, Watson MB, Assmann SM (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287: 300–303
- Linder B, Raschke K (1992) A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Lett* 313: 27–30
- Luan S, Li WW, Rusnak F, Assmann SM, Schreiber SL (1993) Immunoprecipitates implicate protein phosphatase regulation of K^+ channels in guard-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2202–2206
- McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM (1990) Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature* 343: 186–188
- 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. *Plant J* 25: 295–303
- Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang Y-F, Andreoli S, Tiriak H, Alonso J, Harper JE, Ecker JR, et al (2006) CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca^{2+} -permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* 4: e327
- Mustilli AC, 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. *Plant Cell* 14: 3089–3099
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* 406: 731–734
- Pei ZM, Ward JM, Harper JE, Schroeder JI (1996) A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *EMBO J* 15: 6564–6574
- Raschke K, Hedrich R (1989) Patch clamp measurements on isolated guard-cell protoplasts and vacuoles. *Methods Enzymol* 174: 312–330
- Roelfsema MRG, Hedrich R (2005) In the light of stomatal opening: new insights into “the Watergate”. *New Phytol* 167: 665–691
- Roelfsema MRG, Levchenko V, Hedrich R (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J* 37: 578–588
- Roelfsema MRG, Staal M, Prins HBA (1998) Blue light-induced apoplastic acidification of *Arabidopsis thaliana* guard cells: inhibition by ABA is mediated through protein phosphatases. *Physiol Plant* 103: 466–474
- Roelfsema MRG, Steinmeyer R, Staal M, Hedrich R (2001) Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant J* 26: 1–13
- Romano LA, Jacob T, Gilroy S, Assmann SM (2000) Increases in cytosolic Ca^{2+} are not required for abscisic acid-inhibition of inward K^+ currents in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 211: 209–217
- Schmidt C, Schelle I, Liao YJ, Schroeder JI (1995) Strong regulation of slow anion channels and abscisic-acid signaling in guard-cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9535–9539
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waren D (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 627–658
- Schroeder JI, Hagiwara S (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 338: 427–430
- Schroeder JI, Keller BU (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5025–5029
- Schwarz M, Schroeder JI (1998) Abscisic acid maintains S-type anion channel activity in ATP-depleted *Vicia faba* guard cells. *FEBS Lett* 428: 177–182

2. Ergebnisse Kapitel II

Abscisic Acid Activation of Anion Channels in *Nicotiana tabacum*

- Thomine S, Guern J, BarbierBrygoo H (1997) Voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyls: nucleotide regulation and pharmacological properties. *Journal of Membrane Biology* 159: 71–82
- von Caemmerer S, Lawson T, Oxborough K, Baker NR, Andrews TJ, Raines CA (2004) Stomatal conductance does not correlate with photosynthetic capacity in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco. *J Exp Bot* 55: 1157–1166
- Webb AA, Larman MG, Montgomery LT, Taylor JE, Hetherington AM (2001) The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. *Plant J* 26: 351–362
- Wille AC, Lucas WJ (1984) Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. *Planta* 160: 129–142
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* 125: 1347–1360
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 43: 1473–1483
- Zhang X, Wang HB, Takemiya A, Song CP, Kinoshita T, Shimazaki K (2004) Inhibition of blue light-dependent H⁺ pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cell protoplasts. *Plant Physiol* 136: 4150–4158

Kapitel III: Silencing of *NtMPK4* impairs CO₂-induced stomatal closure, activation of anion channels and cytoplasmic Ca²⁺-signals in *Nicotiana tabacum* guard cells.

**Holger Marten, Taekyung Hyun, Shigemi Seo, Rainer Hedrich
und M. Rob G. Roelfsema**

Akzeptiert bei: *The Plant Journal*, März 2008

Eigene Beteiligung an der Arbeit:

- Messung der Stomagrößen in *Nicotiana tabacum* WT, in den antisense Linien *NtMPK4*-IR-6 und *NtMPK4*-IR11, sowie in der SIPK über-exprimierenden Linie SIPK^{EE33};
- Biophysikalische Untersuchung der Reaktivität von Schließzellen in intakten *N. tabacum* Wildtyp Pflanzen und der Linie *NtMPK4*-IR11 auf CO₂ und Dunkelheit nach PAR mittels der DEVC Einstich-Methode;
- Fluorometrische Untersuchung der zytosolischen Ca²⁺ Konzentration in Schließzellen von intakten *N. tabacum* Wildtyp Pflanzen und *NtMPK4*-IR11 während der Antwort auf Dunkelheit nach PAR Bestrahlung;
- Auswertung der Daten.

Silencing of *Nt*MPK4 impairs CO₂-induced stomatal closure, activation of anion channels and cytoplasmic Ca²⁺-signals in *Nicotiana tabacum* guard cells.

Holger Marten¹, Taekyung Hyun³, Shigemi Seo², Rainer Hedrich¹ and M. Rob G. Roelfsema^{1}*

1. *Molecular Plant Physiology and Biophysics*

Julius-von-Sachs Institute for Biosciences

Biocenter, Würzburg University

Julius-von-Sachs-Platz 2

D-97082 Würzburg

Germany

2. *Plant-Microbe Interactions Research Unit*

National Institute of Agrobiological Sciences

Tsukuba, Ibaraki 305-8602

Japan

3. *Institute for Pharmaceutical Biology*

Biocenter, Würzburg University

Julius-von-Sachs-Platz 4

D-97082 Würzburg

Germany

Summary

Light-induced stomatal opening in C3- and C4-plants is mediated by two signalling pathways. One pathway is specific for blue light and involves phototropins, while the second pathway depends on Photosynthetic Active Radiation (PAR). Here, the role of *NtMPK4* on light-induced stomatal opening was studied, since silencing of this MAP kinase stimulates stomatal opening. Stomata of *NtMPK4*-silenced plants do not close in elevated atmospheric CO₂ and show a reduced response to PAR. Measurements with multi-barrelled intracellular micro electrodes showed that CO₂ activates plasma membrane anion channels in wild type *N. tabacum* guard cells, but not in *NtMPK4*-silenced cells. Anion channels also were activated after switching off PAR, wild type guard cells. In approximately half of these cells, the activation of anion channels was accompanied by a rise of the cytoplasmic free Ca²⁺ concentration. The activity of anion channels was higher in cells displaying a parallel rise in cytoplasmic Ca²⁺ than in those with steady Ca²⁺ levels. Both the darkness-induced anion channel activation and Ca²⁺-signals were repressed in *NtMPK4*-silenced guard cells. These data indicate that CO₂ and darkness activate anion channels through a Ca²⁺-independent pathway. The initial channel activity, however, is enhanced by rises in the cytoplasmic Ca²⁺ concentration. *NtMPK4* thus has an essential role in CO₂ and darkness induced activation of guard cell anion channels, through Ca²⁺-independent as well as Ca²⁺-dependent signalling pathways in *N. tabacum*.

Introduction

Land plants acquire CO₂ for photosynthesis through stomata, representing microscopic pores in the largely gas-impermeable waxy cuticle covering the leaf surface. Because stomata are non-selective for gasses, these pores also represent leaks for evaporation of H₂O vapour. During drought, excessive loss of H₂O only can be prevented through stomatal closure, which in turn results in a lower rate of CO₂ uptake. Depending on environmental conditions, plants thus need to balance the demand for CO₂ with the availability of H₂O, by altering their

stomatal conductance. In general, stomata of C3- and C4-plants open in the light to meet the photosynthetic demand for CO₂ and close in darkness, or during drought, to limit loss of H₂O. These stomatal responses are executed by two guard cells that surround the pore in the cuticle. Guard cells are able to sense changes in environmental conditions and translate these into stomatal movements (Assmann and Shimazaki 1999; Hetherington 2001; Roelfsema and Hedrich 2005; Schroeder et al. 2001; Shimazaki et al. 2007).

Light is sensed by the guard cells through two signaling pathways that act parallel to each other (Assmann and Shimazaki 1999; Roelfsema and Hedrich 2005; Shimazaki et al. 2007). One pathway is specific for blue light and depends on two phototropins (Kinoshita et al. 2001), which resemble blue light activated protein kinases associated with the plasma membrane (Briggs and Christie 2002). In guard cells, blue light activated phototropins induce a dual effect on plasma membrane ion transport. Blue light stimulates H⁺-ATPases, through phosphorylation of their C-terminus (Kinoshita and Shimazaki 1999) and inhibits anion channels (Marten et al. 2007a). Changes in activity of both ion-transport proteins cause the guard cell plasma membrane to hyperpolarize, which in turn drives K⁺-uptake through inward rectifying K⁺ channels. The accumulation of K⁺-salts causes the guard cell to swell and bend, thereby pushing the stomatal pore open (Roelfsema and Hedrich 2005).

Inhibition of plasma membrane anion channels in guard cells is also exerted by a second signaling pathway that depends on photosynthetic active radiation (PAR). For this response, light probably acts via a decrease in the intercellular CO₂ concentration of the leaf, which is mainly due to photosynthetic CO₂ fixation in mesophyll cells (Roelfsema et al. 2002). High levels of CO₂ stimulate the activity of guard cell anion channels (Brearley et al. 1997; Roelfsema et al. 2002) and a light-dependent reduction of the CO₂ concentration thus leads to deactivation of these channels. In the “*High Temperature 1 (ht1)*” mutant of *A. thaliana*, stomata do not open in CO₂-free air (Hashimoto et al. 2006), suggesting that in this mutant guard cell anion channels are active independent of the CO₂ concentration. In line with the proposed PAR-signal pathway, stomata of the *ht1* mutants are insensitive to PAR as well, while they are still displaying blue light specific opening.

The CO₂ insensitive guard cell phenotype of the *ht 1-1* and *1-2* mutants are due to mutations in a gene with high homology to MAPKK kinases (Ichimura et al. 2002). Both mutations cause a reduced HT1 kinase activity (Hashimoto et al. 2006), suggesting that active HT1 kinases are required for deactivation of anion channels in the absence of CO₂. The HT1

protein may thus be part of a CO₂ signaling pathway in guard cells. Alternatively, this protein kinase may have a role in guard cell development, just as the YODA MAPKK kinase (Bergmann et al. 2004). YODA was shown to phosphorylate the MAPK kinases MKK4 and MKK5, which in turn activate the MAP kinases MPK3 and MPK6 (Wang et al. 2007). Apart from a role in stomatal development, MPK3 and MPK6 have been implicated in biotic- and abiotic stress responses (Asai et al. 2002; Droillard et al. 2002; Kovtun et al. 2000; Menke et al. 2004), just as the homologous genes WIPK and SIPK of *N. tabacum* (Romeis et al. 1999; Seo et al. 1999; Seo et al. 1995; Zhang and Klessig 1998).

The *NtMPK4* encoded MAP kinase of *N. tabacum* is involved in systemic acquired resistance and wounding responses (Gomi et al. 2005). Repression of *NtMPK4* increased the susceptibility to atmospheric ozone, which to some extent may be due to an increased stomatal conductance. Because of this stomatal phenotype of *NtMPK4*-silenced tobacco plants, we studied the properties of guard cells and their responses to CO₂, PAR and ABA. These studies revealed that repression of *NtMPK4* causes loss of stomatal responses to high atmospheric CO₂ concentrations and a severely reduced response to PAR. However, stomata of *NtMPK4*-repressed plants still respond to ABA. An analysis with multi-barrelled intracellular micro electrodes showed that *NtMPK4* is involved in darkness induced, Ca²⁺-independent- and Ca²⁺-dependent, activation of guard cell anion channels.

Results

Repression of NtMPK4 feeds back on guard cell size

Repression of MPK4 in *N. tabacum* does not change the stomatal density (Gomi et al. 2005), but stomata in the abaxial epidermis of *NtMPK4*-silenced plants were found to be increased in size (Fig. 1). A fraction of these stomata had stomatal lips that bended toward each other in the centre of the split, a feature that was not observed for stomata in wild type plants (Fig. 1A and B). Quantification of the stomatal size revealed a broader distribution of guard cell length for *NtMPK4*-silenced plants compared to wild type (Fig. 1C and D). The average size of the stomata increased from 38 µm (SE=0.4, n=234) in wild type, to 48 µm in MPK4IR-11 (SE=0.6, n=228) and 46 µm (SE=0.6, n=322) in MPK4IR-6. This suggests that the activity of *NtMPK4* is important for the control of elongation growth in guard cells.

Plants transformed with an overactive SIPKK, which is able to phosphorylate *NtMPK4* (SIPKK^{EE-34}, Gomi et al., 2005), had stomata with an average length of 42 μm (SE=0.6, n=192). Apparently, the expression of SIPKK^{EE} does not lead to a phenotype inverse to that of *NtMPK4* repression, with respect to guard cell size. The *NtMPK4*-dependent pathway differs in this respect from that in *Arabidopsis* involving YODA, MKK4/MKK5 and MPK3/MPK6. High activity of MPK3 and MPK6 results in loss of stomata, whereas the stomatal density increases after loss of activity of both MPK3 and MPK7 (Wang et al. 2007).

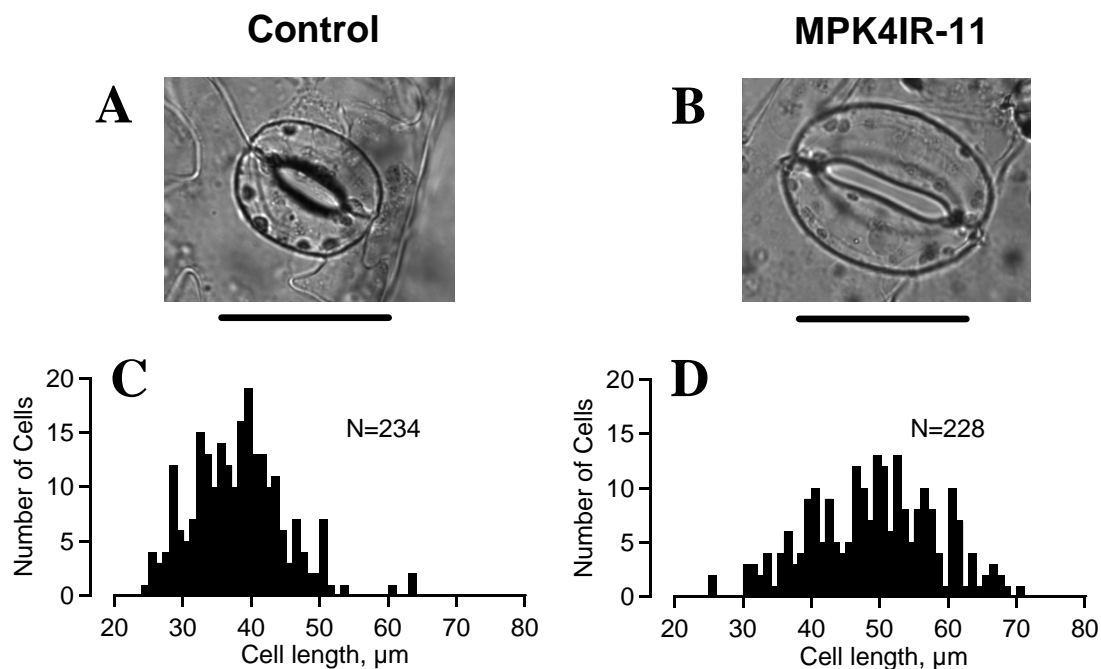


Figure 1. Silencing of *NtMPK4* leads to an increased guard cell size. (A, B) Images of stomata in epidermal strips from the abaxial epidermis of wild type (A) and *NtMPK4-IR11* (B) and leaves, the size of the bars below both images correlates to 50 μm . (C, D) Frequency histogram of guard cell length, plotted against the number of cells with the respective length. “N” represents the number of guard cells analyzed in the abaxial epidermis of wild type (C) and *NtMPK4-IR11* (D). Note, that silencing of *NtMPK4* broadens the distribution of guard cell length and therefore leads to a population of very long guard cells.

Stomata of NtMPK4-silenced plants do not close in response to CO₂

Leaves of *NtMPK4*-silenced *N. tabacum* plants display a higher stomatal conductance than wild type (Gomi et al. 2005). However, the origin of this difference in stomatal opening has remained unknown and therefore was studied with gas exchange measurements. The

difference in stomatal conductance between wild type and *NtMPK4* repressed lines was confirmed for ambient ($350 \mu\text{l l}^{-1}$) as well as elevated ($700 \mu\text{l l}^{-1}$) atmospheric CO_2 . On average the conductance at $350 \mu\text{l l}^{-1}$ was $103 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (SE=16, n=10) for wild type and $168 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (SE=16, n=4) for MPK4IR-11. Similar conductance values of $110 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (SE = 15, N = 7) for wild type and $157 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (SE = 12, N = 6) for MPK4-IR11 were found at $700 \mu\text{l l}^{-1}$.

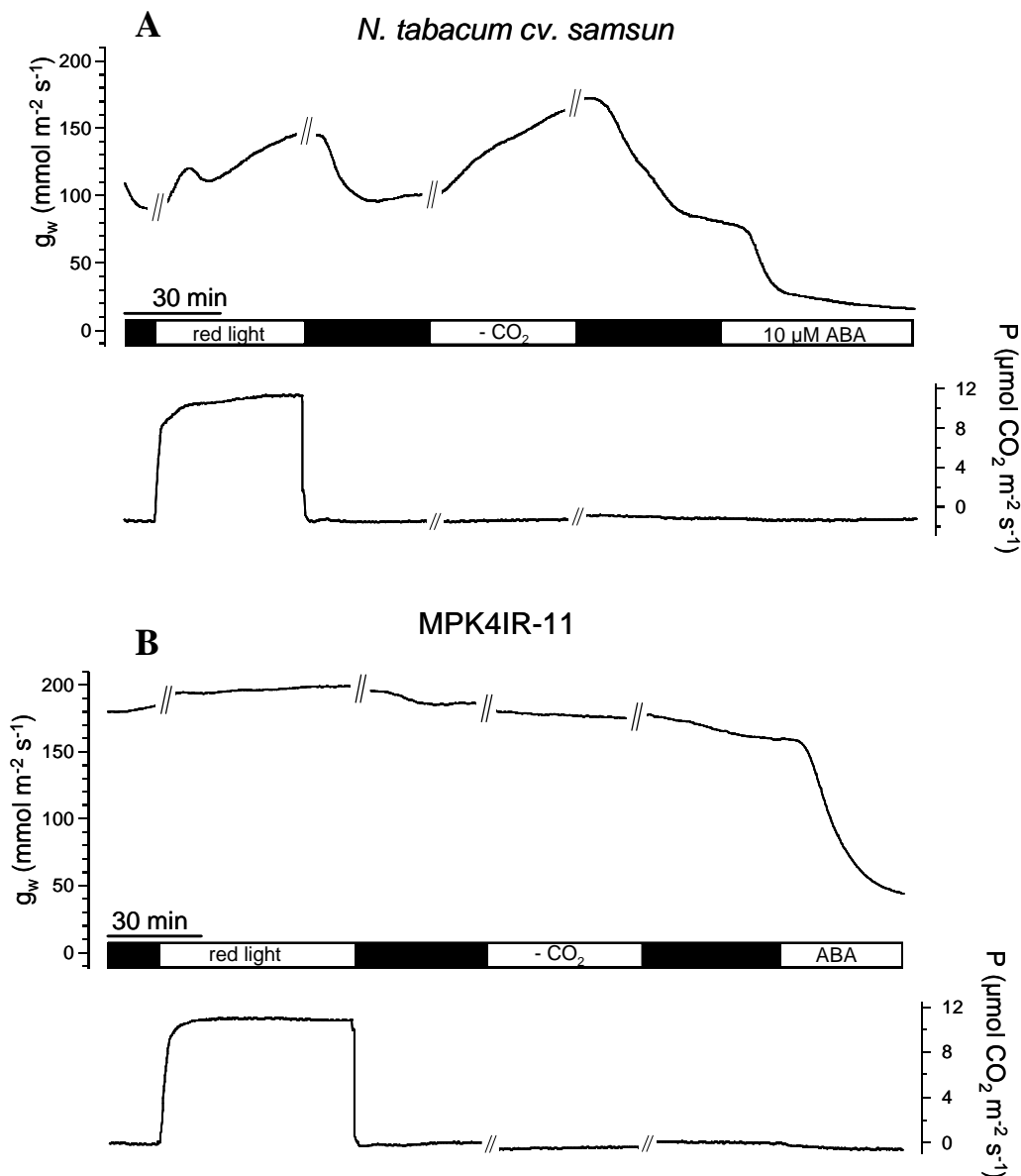


Figure 2. Stomata of *NtMPK4* silenced plants remain open in darkness and at high atmospheric CO_2 concentrations. Changes in stomatal conductance (g_w , upper traces) and photosynthetic activity (P , lower traces) measured on the abaxial side of leaves of wild type (A) and MPK4-IR11 (B). Stomatal movement was triggered with red light ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), CO_2 free air and application of $10 \mu\text{M}$ ABA via the petiole, as indicated by the bar between both traces. Note, that stomatal closure is stimulated by darkness and high atmospheric CO_2 concentrations in wild type, but not in MPK4-IR11.

Red light at a high photon flux density ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) induced stomatal opening in wild type just as lowering the atmospheric CO_2 concentration from 700 to 0 ppm (Fig. 2A). In MPK4IR-11 (Fig. 2B) and MPK4IR-6 (data not shown) both responses were attenuated, since red light induced only a small increase in conductance, whereas stomata of both *Nt*MPK4-silenced lines were completely insensitive to changes in the atmospheric CO_2 concentration (Fig. 2B). The reduced responses to PAR and CO_2 were not due to an inability of MPK4IR plants to change the stomatal conductance, since application of ABA induced stomatal closure in MPK4IR-11 (Fig. 2B) as well as MPK4IR-6 (data not shown).

Stomata of *N. tabacum* showed only small conductance changes in response to blue light ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) given in addition to red light ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). This suggests that guard cells of *N. tabacum* do not display a strong blue light specific response mediated by phototropins (Kinoshita et al. 2001). Gomi et al. (2005) also reported a lower stomatal conductance of plants expressing overactive SIPKK. However, leaves of greenhouse grown, four-week-old, *N. tabacum* plants expressing SIPKK^{EE} did not show this difference in conductance compared to wild type (data not shown). Stomata of SIPKK^{EE} expressing plants showed normal responses to red light, CO_2 and ABA.

CO₂ activation of S-type anion channels is lost in MPK4IR-11

Stomata of the MPK4-silenced lines, MPK4IR-6 and MPK4IR-11, both do not respond to CO_2 , while the MPK4IR-6 line shows a more severe reduction in growth than MPK4IR-11 (Gomi et al. 2005). Larger leaves provide better material for single guard cell studies and we therefore used MPK4IR-11 to record CO_2 -induced changes in ion channel activity. These measurements were conducted with intracellular double barrelled microelectrodes, which were impaled into guard cells of intact *N. tabacum* plants. In wild type guard cells, increasing the atmospheric CO_2 from 0 to $700 \mu\text{l l}^{-1}$, causes a transient increase in inward current (Fig. 3A) with an average peak activity of -109 pA ($\text{SE}=43$, $n=9$) appearing 354 s ($\text{SE}=65$) after stimulus onset. The increase of inward current at the holding potential corresponds to larger instantaneous currents at test potentials ranging from -160 to -20 mV (Fig. 3C) and a shift of the steady state current-voltage curve to more negative values (Fig. 3E). The slow activation of inward currents at -80 and -60 mV (Fig. 3C, middle traces) reveal that the increase in instantaneous current is due to activation of S-type anion channels, as previously shown for *V. faba* (Brearley et al. 1997; Roelfsema et al. 2002). Guard cells of MPK4IR-11 plants showed

none or only small CO₂-induced current changes (Fig. 3B), the average peak amplitude in these cells was 8 pA (SE=5, n=8). In line with the severe reduction of CO₂-induced current changes at the holding potential -100 mV, CO₂ did not alter currents at test potentials ranging from -180 to 60 mV (Fig. 3D and F).

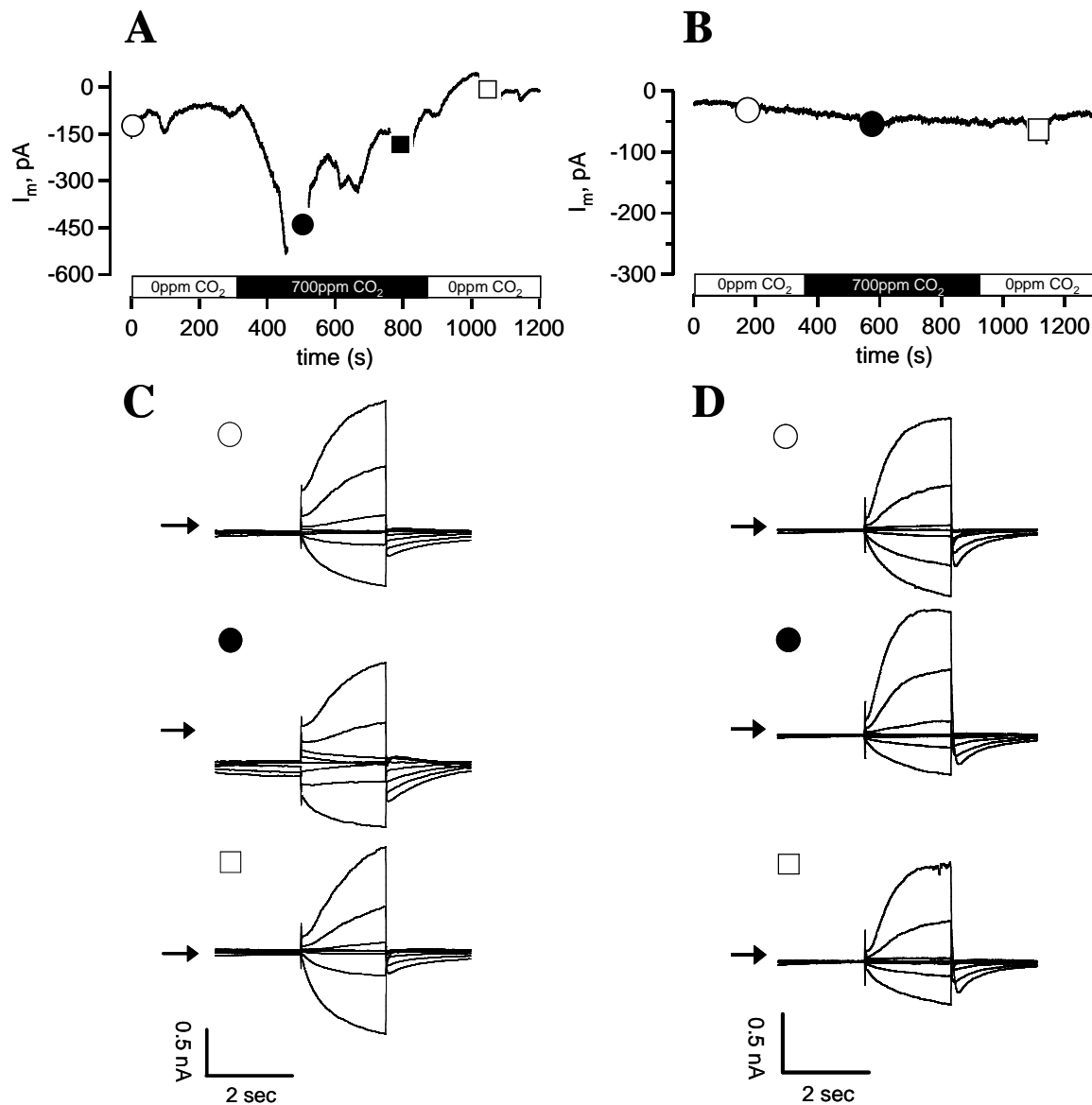


Figure 3 A-D. CO₂ activates plasma membrane anion channels in wild type, but not in *NiMPK4* silenced guard cells. (A, B) Current traces of *N. tabacum* guard cells in intact plants, clamped to a holding potential of -100 mV and stimulated with an increase of the atmospheric CO₂ from 0 to 700 μl l⁻¹, as indicated by the bar below the traces. *Note*, that CO₂ triggers an increase in inward current in wild type (A), but not in MPK4-IR11 (B) guard cells. (C and D) Current traces from the same cells as in A and B (symbols correspond), which were clamped from a holding potential of -100 mV, stepwise to test potentials ranging from -160 to -20 mV. The traces were obtained before (?), during (?) and after (?) exposure to 700 μl l⁻¹. *Note*, that CO₂ stimulates slow activating inward conducting channels, as is obvious at -80 and -60 mV, in wild type (C) but not in the MPK4-IR11 (D) guard cells. Arrows indicate the 0 pA level.

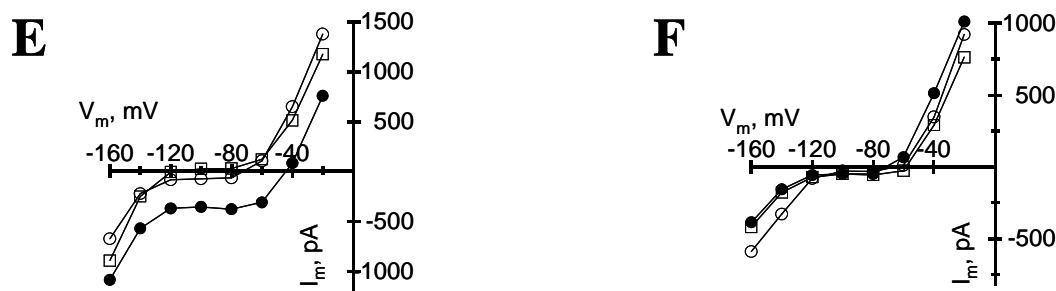


Figure 3 E and F. Steady state current-voltage relation sampled at the end of the 2s test pulses in C and D (symbols correlate). In wild type (E), the introduction of 700 $\mu\text{l l}^{-1}$ CO₂ (?) caused a shift to more negative current values over the whole voltage range. In guard cells of NtMPK4-IR11 (F), no obvious changes in the current-voltage relation could be observed.

Repression of MPK4 impairs dark- induced activation of S-type anion channels

In agreement with the proposed role of CO₂ as an intermediate signal in guard cell responses to PAR, MPK4IR-11 stomata showed a repressed response to high photon flux densities of red light. The influence of PAR on ion channel activity was studied on single guard cells that were studied using a long distance water immersion objective operated with a drop of solution touching the leaf surface. In wild type, switching off red light (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) induced an inward current at the holding potential of -100 mV (Fig. 4A), with an average peak amplitude of -140 pA (SE=42, n=12) 280 s (SE=40) after PAR withdrawal. Just as with the application of CO₂, turning off red light activates channels (Fig. 4C and E) that display a voltage-dependent activation after stepping from -100 mV to -80 and -60 mV and deactivation at -120 and -140 mV (Fig. 4C, middle traces). The dark induced activation of these channels was reduced in MPK4IR-11 guard cells to an average value of -29 pA (SE=13, n=7). In these plants, switching on and off PAR resulted only in minor changes of the instantaneous current-voltage relation of guard cells (Fig. 4F).

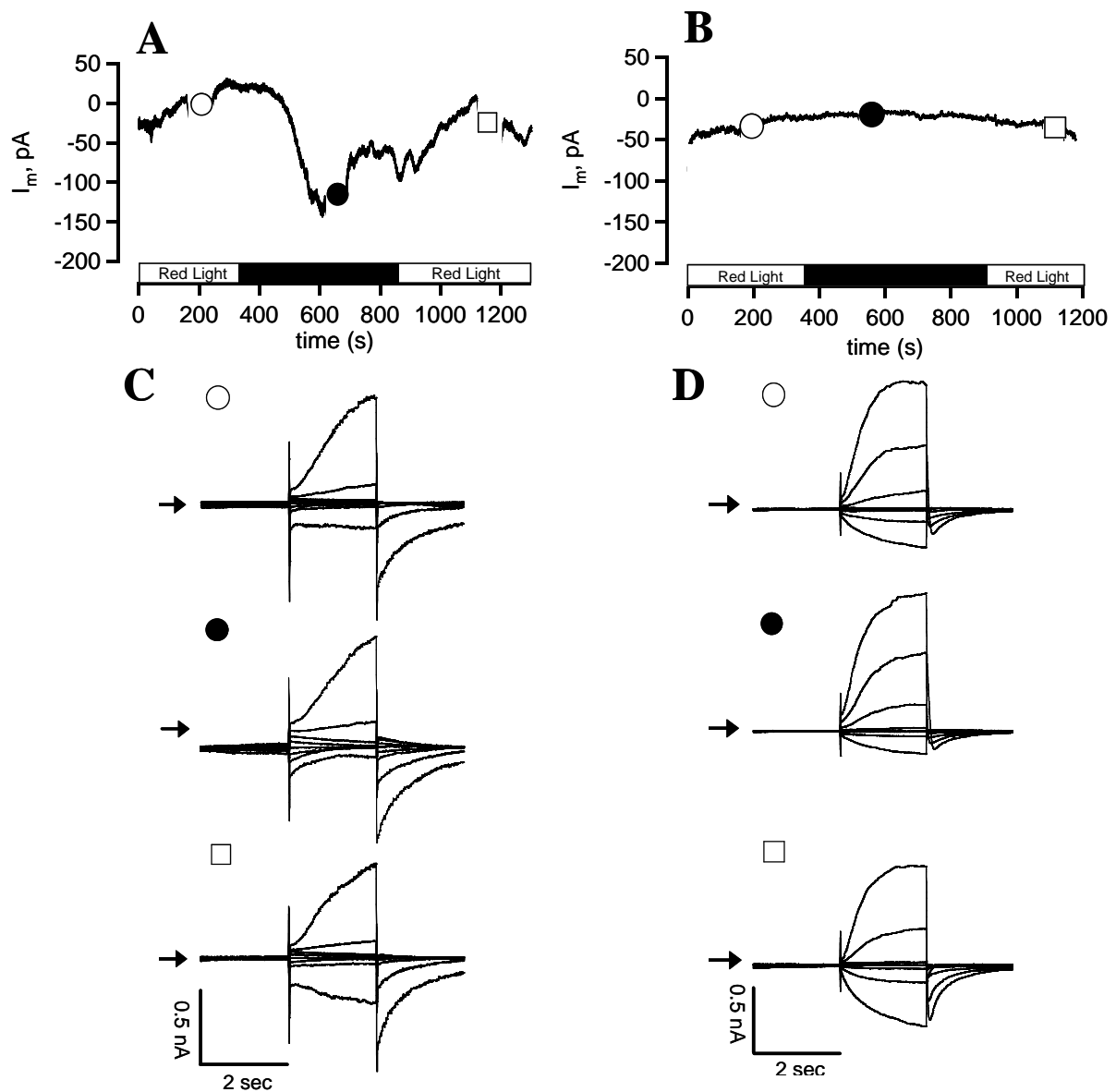


Figure 4 A-D. Switching off red light activates anion channels in wild type *N. tabacum* guard cells, but not in *NtMPK4-IR11*. (A, B) Current traces of *N. tabacum* guard cells clamped to a holding potential of -100 mV and stimulated by switching off red light ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by the microscope lamp, as indicated by the bar below the traces. Note, that darkness causes an increase in inward current in wild type (A), but not in MPK4-IR11 (B) guard cells. (C and D) Current traces from the same cells as in A and B (symbols correspond), which were clamped from a holding potential of -100 mV, stepwise to test potentials ranging from -160 to -20 mV. The traces were obtained before (?), during (?) and after (?) switching off red light ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Note, that switching off red light stimulates inward conducting channels that slowly activate at -80 and -60 mV and slowly deactivate at -120 to -160 mV in wild type (C), but not in the MPK4-IR11 (D) guard cells. Arrows indicate the 0 pA level.

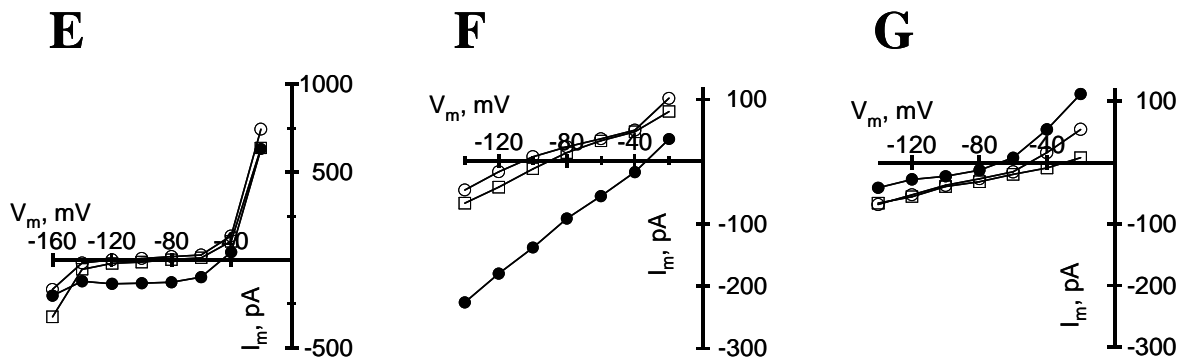


Figure 4 E-G. (E) Steady state current-voltage relation of wild type guard cells sampled at the end of the 2s test pulses in C (symbols correlate). Data were obtained before (?), during (?) and after (?) switching off red light ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (F and G) Instantaneous current voltage-relation of wild type (F) and *NtMPK4-IR11* (G) sampled at the start of the test pulses shown in C and D (symbols correlate). Note, that darkness (?) causes an increase of instantaneous inward currents with linear voltage dependence in wild type guard cells, but not in *NtMPK4-IR11*.

Dark-induced elevation of cytoplasmic Ca^{2+} is associated with anion channel activation

Guard cell responses to CO_2 have been linked to cytoplasmic Ca^{2+} signals, since CO_2 triggers Ca^{2+} rises in *Commelina communis* (Webb et al. 1996) and slows spontaneous repetitive Ca^{2+} rises in *Arabidopsis thaliana* (Young et al. 2006). The Ca^{2+} -response of *N. tabacum* guard cells was studied with triple barrelled electrodes that enable simultaneous clamping of the plasma membrane potential and iontophoretic injection of the Ca^{2+} reporter dye FURA2 (Marten et al. 2007b). Switching off red light ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) triggered repetitive cytoplasmic Ca^{2+} rises that were associated with anion channel activation in 9 out of 16 wild type cells (Fig. 5A). In the remaining 7 cells, inward current activated without a change in the Ca^{2+} level of the guard cells. In 10 out of 13 MPK4IR-11 guard cells tested, both the rise in cytoplasmic Ca^{2+} and changes in plasma membrane current were absent (Fig. 6A). Of the remaining cells, two MPK4IR-11 guard cells displayed only small Ca^{2+} transients ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} < 100 \text{ nM}$), while 1 showed a similar response as wild type (Fig. 6B).

In wild type guard cells, the dark induced rises in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration correlate with increases in anion channel activity (Fig. 5A). But a linear correlation between the cytoplasmic Ca^{2+} level and inward current was not observed. Together with the Ca^{2+} -independent activation of anion channels found in other cells (Fig. 5B), this suggests that anion channels are primarily activated through a Ca^{2+} -independent signalling pathway. However, the average darkness induced increase in anion channel current was larger in cells

displaying a Ca^{2+} signal (Fig. 7A), than in those with steady cytoplasmic Ca^{2+} levels (Fig. 7B). A rise of the cytoplasmic Ca^{2+} level may thus further enhance the darkness-induced anion channel activity.

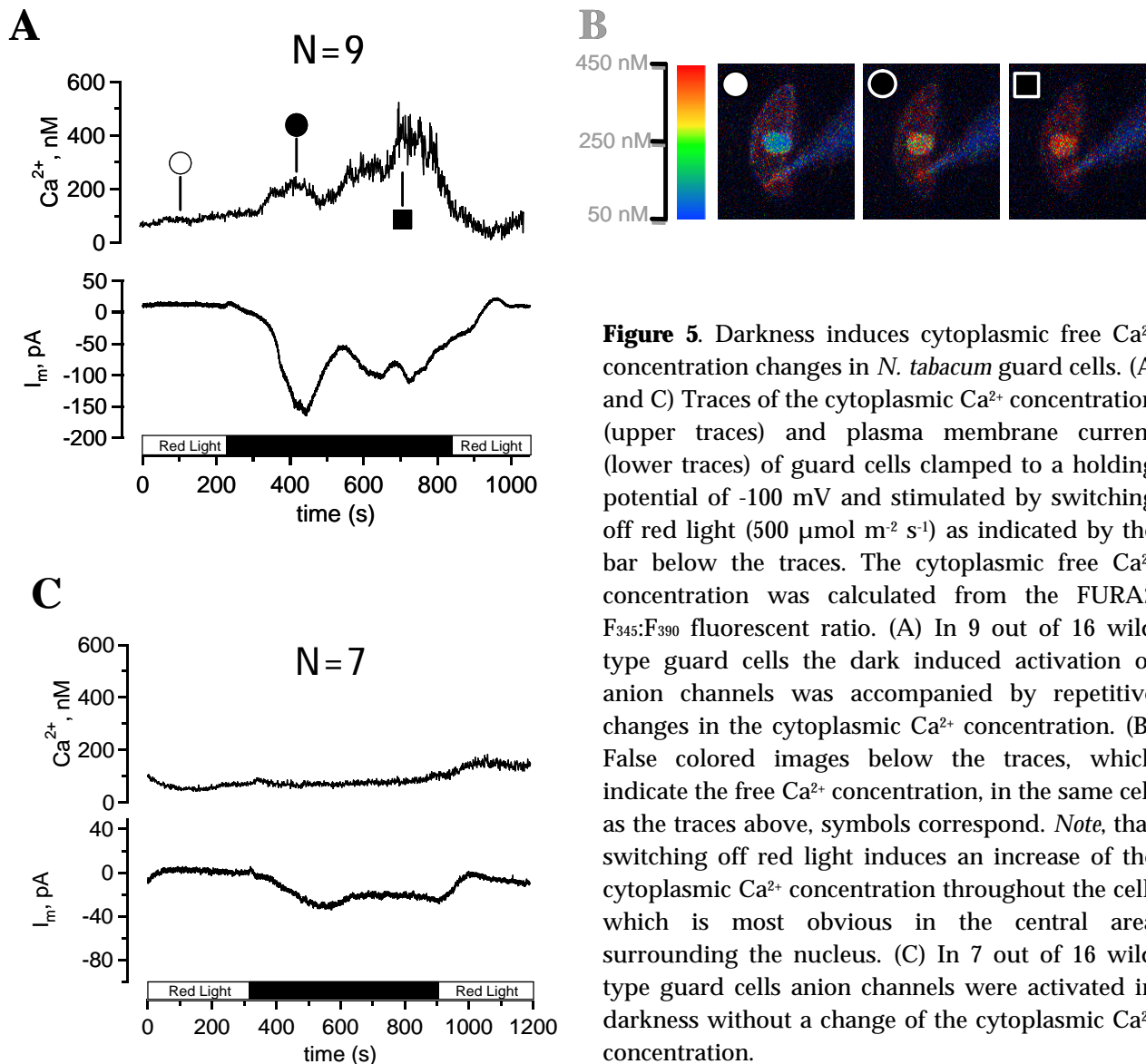


Figure 5. Darkness induces cytoplasmic free Ca^{2+} concentration changes in *N. tabacum* guard cells. (A and C) Traces of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration (upper traces) and plasma membrane current (lower traces) of guard cells clamped to a holding potential of -100 mV and stimulated by switching off red light ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) as indicated by the bar below the traces. The cytoplasmic free Ca^{2+} concentration was calculated from the FURA2 $F_{345}:F_{390}$ fluorescent ratio. (A) In 9 out of 16 wild type guard cells the dark induced activation of anion channels was accompanied by repetitive changes in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration. (B) False colored images below the traces, which indicate the free Ca^{2+} concentration, in the same cell as the traces above, symbols correspond. *Note*, that switching off red light induces an increase of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration throughout the cell, which is most obvious in the central area surrounding the nucleus. (C) In 7 out of 16 wild type guard cells anion channels were activated in darkness without a change of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration.

Guard cells depolarize in darkness independent of a cytoplasmic Ca^{2+} elevation

Ca^{2+} -homeostasis in guard cells depends on the plasma membrane potential, since plasma membrane Ca^{2+} permeable channels are activated upon hyperpolarization (Grabov and Blatt 1998; Hamilton et al. 2000; Levchenko et al. 2005; Pei et al. 2000). Because of this relationship, dark-induced Ca^{2+} signals were studied with wild type *N. tabacum* guard cells in current clamp. In hyperpolarized guard cells, switching off red light caused a reversible

2. Ergebnisse Kapitel III

depolarization, just as previously found for *V. faba* guard cells (Roelfsema et al. 2002). In 4 out of 8 cells a rise in cytoplasmic Ca^{2+} accompanied the change in membrane potential, but the Ca^{2+} rise occurred much later than the depolarization in 2 out of 4 cells (Fig. 8A). Apparently, guard cells can depolarize independent of an increase in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration. Darkness did not elicit membrane potential changes in guard cells of MPK4IR-11 ($n=7$) and in 6 out of 7 cells no change in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration was observed (Fig. 8B).

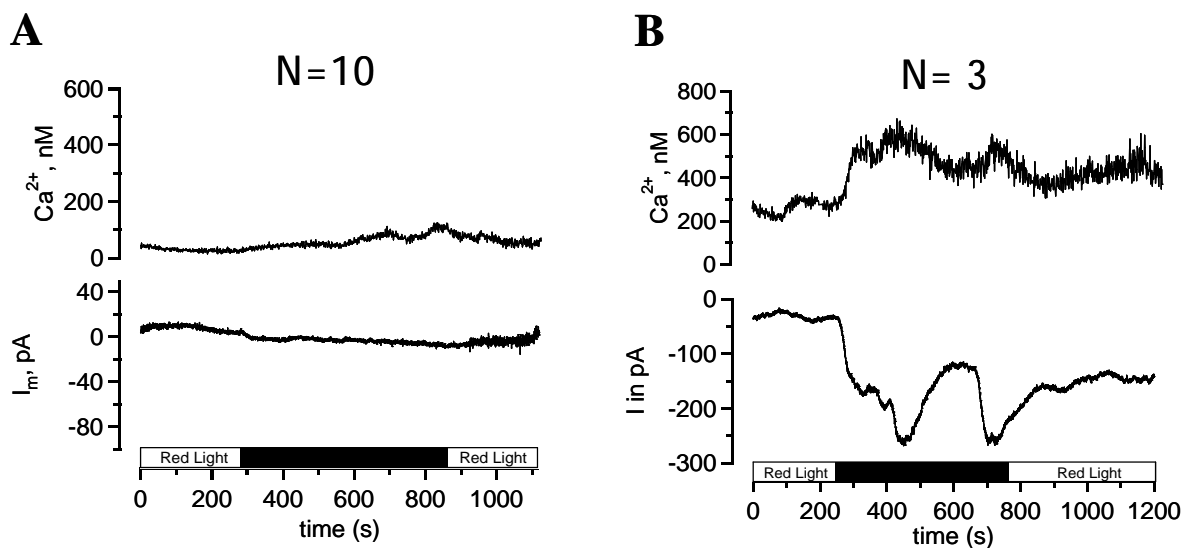


Figure 6. Darkness induced changes in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration are repressed in NtMPK4-IR11 guard cells. (A and B) Traces of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration (upper traces) and plasma membrane current (lower traces) of guard cells clamped to a holding potential of -100 mV and stimulated by switching off red light ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) as indicated by the bar below the traces. The cytoplasmic free Ca^{2+} concentration was calculated from the FURA2 $F_{345}:F_{390}$ fluorescent ratio. (A) In 10 out of 13 NtMPK4-IR11 guard cells recorded, switching off red light did neither affect the activity of anion channels nor the cytoplasmic Ca^{2+} concentration. (B) In 3 out of 13 cells, switching off red light caused increases in inward current ranging from 30 to 270 pA, which were accompanied by changes in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration.

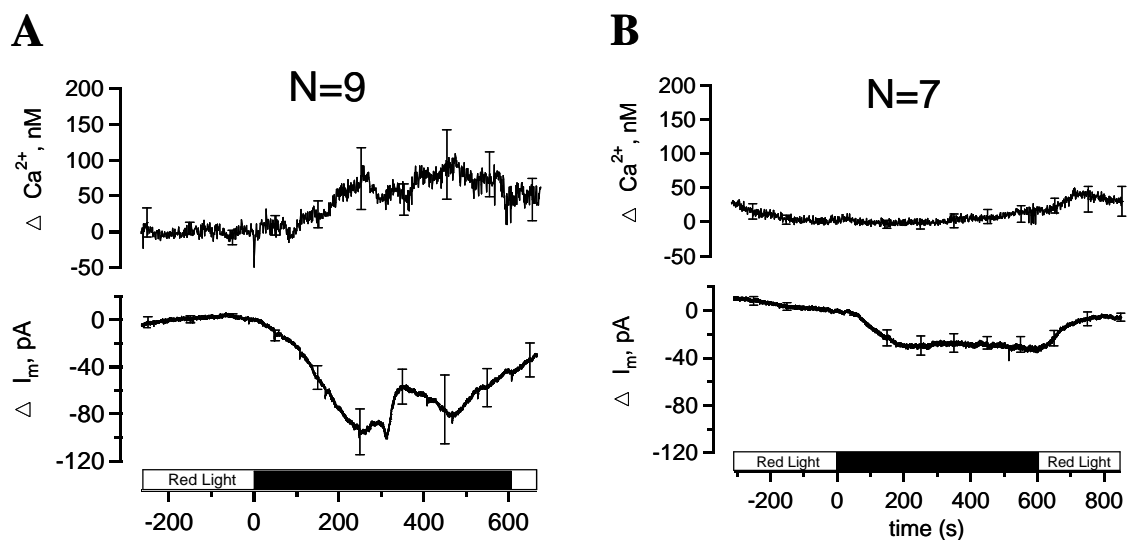


Figure 7. Dark-induced anion channel activation is enhanced in wild type *N. tabacum* guard cells displaying simultaneous cytosolic Ca²⁺ rises. (A and B) Average darkness induced changes of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration (upper traces) and plasma membrane current (lower traces) of guard cells clamped to a holding potential of -100 mV. Changes in the cytoplasmic Ca²⁺ concentration and membrane currents were determined relative to the value measured just before switching off red light (t = 0) as indicated by the bar below the trace. Errors bars represent SE. The measurements were selected for those in which darkness induced a change of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration (A) and those with steady cytoplasmic Ca²⁺ levels (B). N indicates the number of experiments for which the data were averaged. Note, that the average change in anion channel activity is three times larger for guard cells displaying a rise in the cytoplasmic Ca²⁺ concentration, compared to those with steady Ca²⁺ levels.

Discussion

NtMPK4 is important for guard cell responses to CO₂ and PAR

The major function of stomata is to enable uptake of CO₂ into photosynthetic active tissues. In line with this role, guard cells sense changes in the intercellular CO₂ concentration. High CO₂ levels lower the stomatal conductance in the short term through stomatal closure and in the long term by reducing the stomatal density. In *Arabidopsis* the long term response involves the HIC encoded fatty acid elongase (Gray et al. 2000), but apart from this gene product little is known about signalling pathway through which CO₂ controls the stomatal development (Bergmann and Sack 2007; Hetherington and Woodward 2003). In comparison to sparse information on CO₂-dependent regulation of stomatal development, more is known about the mechanism through which CO₂ affects stomatal movement (Roelfsema and Hedrich 2005; Vavasseur and Raghavendra 2005).

MAP kinase signalling pathways are negatively regulating the development of stomata and thus effect stomatal patterning (Bergmann and Sack 2007). Apart from patterning, however, MAP kinases pathways are also important for stomatal responses to CO₂ and PAR (Hashimoto et al. 2006) and may be involved in ABA signalling (Gudesblat et al. 2007; Leung et al. 2006). The *NtMPK4* encoded MAP kinase appears to be essential for CO₂-induced stomatal closure in *N. tabacum*. Stomata of *NtMPK4*-silenced plants remain open at high atmospheric CO₂ levels and display a repressed closure response after switching off PAR. The lack of sensitivity

to PAR is in line with the proposed role of CO₂ in a feedback loop, linking the stomatal aperture to photosynthetic activity (Roelfsema and Hedrich 2005). Switching off PAR will stop photosynthesis in the leaf and cause a rise of the intercellular CO₂ concentration (Hanstein et al. 2001). The dark induced increase in CO₂ subsequently will trigger stomatal closure in wild type (Heath 1959; Roelfsema et al. 2002; Stahl 1920), but not in stomata of *NtMPK4*-repressed plants. Even though the PAR response of *NtMPK4* plants was severely repressed, a residual change of stomatal conductance remained after switching off the illumination. This suggests that *N. tabacum* stomata receive additional PAR-generated signals, apart from changes in the intercellular CO₂ level. Light also affects the apoplastic concentration of several ions such as K⁺, Cl⁻, and Ca²⁺ (Felle et al. 2000; Roelfsema and Hedrich 2002) which could serve as intermediate signals, in addition to CO₂-based signals.

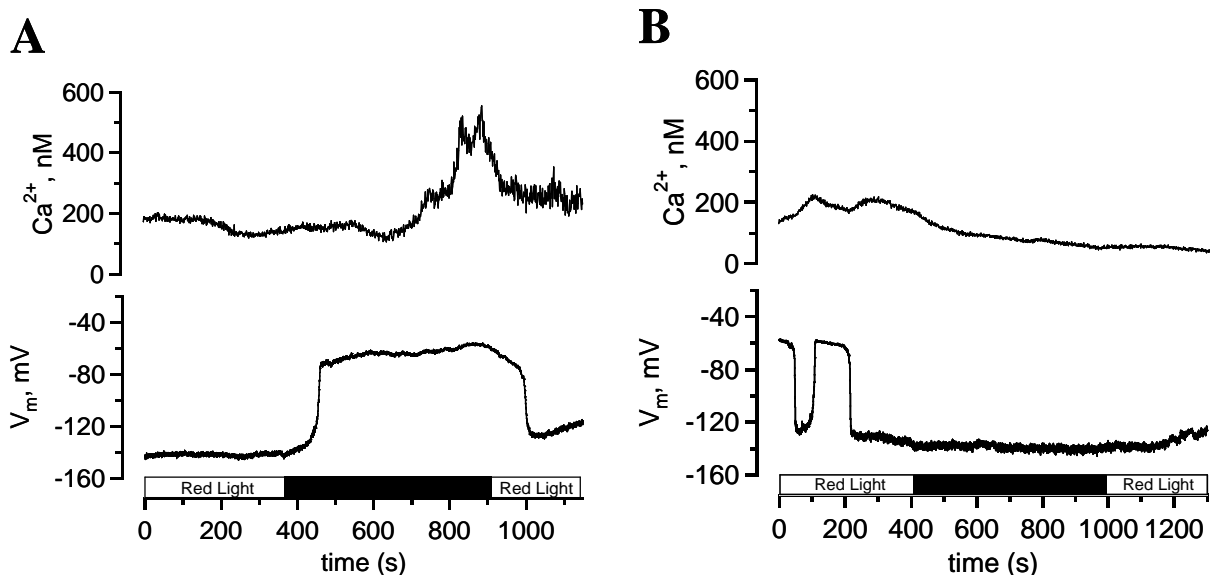


Figure 8. Depolarization of the guard cell plasma membrane is induced by darkness in wild type, but not in *NtMPK4-IR11*. (A and B) Simultaneous measurement of the cytoplasmic free Ca²⁺ concentration (upper traces) and the free running membrane potential (lower traces) of guard cells stimulated by switching off red light (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), as indicated by the bar below the trace. Switching off red light induced a depolarization in wild type guard cells (A), but not in *NtMPK4-IR11* guard cells (B). The depolarization of was accompanied by a change in the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in 4 out of 8 wild type guard cells, whereas a darkness-induced Ca²⁺ rise was observed in only 1 out of 7 MPK4-IR11 guard cells.

In *Arabidopsis*, loss of stomatal CO₂ responses was found for the *ht1*-mutants, which show a reduced activity of the HT1-encoded protein kinase (Hashimoto et al. 2006). The HT1 gene has been classified as a MAPKK kinase (Ichimura et al. 2002), indicating that it functions in a MAP kinase pathway essential for CO₂ responses in guard cells. In accordance with the

phenotype of *NtMPK4*-silenced plants, stomata of *ht1* lack a response to PAR. Despite of these similarities, both plants display the opposite phenotype considering the degree of stomatal opening. Stomata *ht1* remain closed at low atmospheric CO₂ concentrations, whereas those of *NtMPK4*-silenced plants stay opened at high CO₂ levels. This suggests that the signalling pathway involving HT1 acts as a negative regulator of guard cell CO₂ responses, while that of *NtMPK4* represents a positive regulator.

Anion channels are activated through Ca²⁺-dependent and independent mechanisms

Plasma membrane anion channels have been indentified as important targets downstream in the CO₂ signalling pathway, in guard cells of *V. faba* (Brearley et al. 1997; Raschke et al. 2003; Roelfsema et al. 2002). The signalling chain seems to be evolutionary conserved, because S-type anion channels are also activated by CO₂ in guard cells of *N. tabacum* (Fig. 3). Anion channel activation in the presence of CO₂ was suggested to involve changes in cytoplasmic Ca²⁺ (Webb et al. 1996), since CO₂ induces rises in the Ca²⁺ level and plasma membrane anion channels are activated by cytoplasmic Ca²⁺ (Hedrich et al. 1990; Schroeder and Hagiwara 1989). Simultaneous recordings of the plasma membrane conductance and Ca²⁺-imaging imply that indeed elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ level leads to enhanced anion channel activity (Fig. 7). The Ca²⁺-response induced by switching off PAR was observed in only three out of eleven MPK4IR-11 guard cells, suggesting that this response is predominantly mediated through changes in the intercellular CO₂ concentration.

Despite the observed relation between cytoplasmic Ca²⁺ changes and anion channel activity, CO₂ activates anion channels in the absence of Ca²⁺ signals too. This suggests that apart from a Ca²⁺-dependent pathway, anion channels are also stimulated through a Ca²⁺-independent mechanism. The existence of this Ca²⁺-independent pathway is supported by the observation that darkness induces a depolarization of guard cells, independent of a rise in the cytoplasmic Ca²⁺ concentration (Fig. 8). Apparently, CO₂ acts primarily on anion channels via a Ca²⁺-independent pathway, but the activity of anion channels is enhanced when the Ca²⁺ concentration rises.

The occurrence of two CO₂ signalling pathways acting parallel to activate anion channels shows similarity to that previously described for ABA. In guard cells of *V. faba*, this stress hormone activates anion channels independent of Ca²⁺ signals (Levchenko et al. 2005), whereas ABA activates anion channels in the presence of Ca²⁺ rises, in most *N. tabacum* guard

cells (Marten et al. 2007b). The impact of Ca^{2+} rises on anion channels, however, was different for guard cell responses to ABA or CO_2 . In responses to CO_2 , the anion channel activity is elevated at simultaneous Ca^{2+} -rises, but this was not apparent for the ABA response (Marten et al. 2007b).

In guard cells of *N. tabacum* the darkness induced activation of anion channels as well as the induction of a Ca^{2+} signals, depend on *NtMPK4*. Future studies may identify components acting downstream of *NtMPK4*, which in turn could interact with anion- or Ca^{2+} -channels in guard cells. The search for proteins acting upstream of *NtMPK4* may elucidate the MAP kinase chain, which forwards the CO_2 signal, and eventually could uncover the receptor sensing CO_2 in guard cells.

Materials and Methods

Plant material and determination of guard cell size

Nicotiana tabacum var. *Samsun* plants were grown in the greenhouse, additional light was provided by HQL-pressure lamps (Philips, Powerstar HQI-E, 400 W) with a photon flux density of $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a day/night cycle of 12/12 h. All measurements were conducted with the 2nd up to 5th true leaves of 4- to 6-week-old-plants. The isolation of *NtMPK4*-silenced lines IR4 and IR6 and *SIPK^{EE}*-expressing lines 33 and 34 has been described earlier (Gomi et al. 2005). For guard cell size measurements, epidermal strips were peeled from the abaxial side of the leaf. Directly after peeling, the epidermis was attached to microscope slides covered with medical adhesive (Medical adhesive B, Aromando, Düsseldorf, Germany). The microscope slides were transferred to Petri dishes filled with 5 mM KCl, 5 mM K Citrate, pH 6, 0.1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 . Epidermal strips were photographed using a cooled charge-coupled-device camera (CoolSNAP HQ, Roper Scientific, Tuscon AZ) and guard cell size was measured applying a microscopy standard.

Gas exchange measurements

Sections of predarkened *N. tabacum* leaves were enclosed in a sandwich-type cuvette (diameter 2.1 cm) with windows on the upper and lower side. The abaxial side of the leaves

was directed to the upper side of the cuvette and exposed to a gas stream of 0.5 l min^{-1} . Measurements were conducted at a temperature of 24°C and a relative humidity of 47% in darkness, in the presence of red light the temperature and relative humidity changed to 25°C and 44%, respectively. Red light ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) was provided by a halogen lamp, passed through a long-pass glass filter (edge wavelength 610 nm) and projected on the adaxial side of the leaf using fiber optics. The radiation was measured with a LI-COR 250 light meter (Quantum sensor, LI-190, LI-COR, Lincoln NE, USA). Atmospheric CO_2 concentrations ranging from 0 to $700 \mu\text{l l}^{-1}$ were obtained by passing air through a soda lime column and the injection of CO_2 directly into the air stream. Transpiration and CO_2 uptake were measured with the infrared gas analysis technique (Binos 1; Heraeus, Hanau, Germany). Experiments were started at 8 AM.

Experimental setup for impalement

Plants were placed next to the table of an upright microscope (Akioskop 2FS, Carl Zeiss, Jena, Germany). The adaxial side of a leaf was mounted to a plexiglas holder in the focal plane of the microscope, using double sided adhesive tape. In this experimental configuration, the abaxial epidermis was directed upwards and guard cells within this cell layer were accessible for impalement with double- or triple-barreled microelectrodes (Levchenko et al. 2005; Roelfsema et al. 2001). Guard cells were impaled with micro electrodes using a piezo-driven micro manipulator (MM3A, Kleindiek Nanotechnik, Reutlingen, Germany). The impalement was monitored either with a water immersion objective (Achromplan 40x/0.80 W, Carl Zeiss) or with a dry objective (Epiplan LD 0.5x/0.50, Carl Zeiss). The water immersion objective was operated with a drop of perfusion solution connected with the leaf surface, containing 5 mM KCl, 5 mM K Citrate pH=6, 0.1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 . In experiments with the dry objective, the leaf surface below the objective was exposed to a flow of air (0.4 l min^{-1}) passed through a suspensor (14 x 2mm). Guard cells were stimulated by switching from CO_2 -free air to air containing $700 \mu\text{l l}^{-1} \text{ CO}_2$ (Roelfsema et al. 2002). Leaves were illuminated with red light provided by the microscope lamp (12 V/60 W, Zeiss), passed through a long pass glass filter ($\lambda_{1/2}$ 610 nm, RD610, Schott) and focused on the adaxial side at an area of 2 cm in diameter and with a photon flux density of $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Micro electrodes and electrical configuration

The micro electrodes were fabricated from borosilicate glass capillaries (inner diameter, 0.58 mm, outer d., 1.0 mm, Hilgenberg, Malsfeld, Germany), as described (Roelfsema et al. 2001). The capillaries were aligned, heated, twisted 360°, and pre-pulled on a customized vertical electrode puller (L/M-3P-A, List Medical Electronic, Darmstadt, Germany). The final pull was executed on a horizontal laser puller (P2000, Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA). The electrodes were filled with 300 mM KCl for voltage measurement and current injection, while the 3rd barrel of triple barreled electrodes was filled with 2 mM FURA-2 for calcium fluorescence imaging. The tip resistance ranged from 90 to 160 or from 90 to 200 MO for double- and triple barreled electrodes, respectively. The reference electrode, a 50 mM KCl and 1.5% agarose salt bridge, connected to an AgCl/Cl half cell, was placed in the perfusion solution between the objective and cuticle for stimulation with red light, or in a drop of 50 µl perfusion solution on leaf surface during CO₂ exposure experiments. All barrels were connected with Ag/AgCl half cells to headstages (HS 180, BioLogic, Claix, France), with an input resistance $\sim 10^{11}$ Ω. Headstages were coupled to a microelectrode amplifier (VF-102, BioLogic, Claix, France) and the membrane potential was clamped by using a differential amplifier (CA-100, BioLogic). Voltage steps were controlled by the Pulse software (Heka, Lambrecht, Germany) using an ITC-16 interface (Instrutech Corp., Elmont NY, USA). Data were filtered at 250 Hz and sampled at 1 kHz during short pulses, or filtered at 10 Hz and sampled at 33 Hz for long term registration.

Ratiometric fluorescence microscopy

The ratiometric fluorescent calcium indicator dye FURA-2 (Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) was loaded by iontophoretic micro injection into guard cells, applying an injection current of approximately -350 pA to the 3rd microelectrode barrel. During FURA-2-injection, the cell is constantly clamped to -100 mV and thus the injection current from the 3rd barrel is automatically compensated by a current from the 2nd barrel. In approximately 6 out of 7 cells the dye is loaded into the cytoplasm, whereas it localizes in the vacuole of the minority of the injected cells (Marten et al. 2007b). Ratiometric fluorescence spectroscopy measurements were carried out by using METAFLUOR software (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA). FURA-2 was excited with 100 ms flashes of UV light at 345 and 390 nm and a time interval of 0.8 s (VisiChrome High speed Polychromator System, Visitron Systems). The

emission signal was passed through a beam splitter (FT 395, Carl Zeiss), filtered with a 510 nm bandpass filter (D510/40 M, AF Analysentechnik, Tübingen Germany) and captured with a cooled CCD camera (CoolSNAP HQ, Roper Scientific). Background fluorescence levels of both wavelengths were taken from a reference region placed within a part of the unloaded neighboring guard cell or neighboring epidermal cells. The intracellular free Ca^{2+} concentration was calculated according to Grynkiewicz et. al (1985) by using the equation:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = K_d \frac{(R - R_{\min})F_{\min}}{(R_{\max} - R)F_{\max}} \quad [1]$$

where K_d represents the binding constant of FURA-2 for Ca^{2+} , R represents the 345/390 nm excitation ratio, and R_{\min} and R_{\max} correspond to Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -saturated FURA-2, respectively. F_{\min} and F_{\max} give the fluorescence intensity measured at 390 nm with Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -saturated FURA-2, respectively. We here used a K_d of 270 nM, determined *in vitro* by Levchenko et. al (2005). R_{\min} and F_{\min} were defined as the values obtained after simultaneously injecting FURA-2 and BAPTA at 0 mV into guard cells of intact plants. The values for R_{\max} and F_{\max} were obtained by clamping the plasma membrane from 0 mV to -250 mV, inducing a massive and saturating influx of Ca^{2+} through stimulation of hyperpolarization activated Ca^{2+} -channels (Levchenko et al. 2005).

Acknowledgements

This work was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to Rainer Hedrich and M. Rob G. Roelfsema (SPP 1108; HE 1640/19).

References

- Asai,T., Tena,G., Plotnikova,J., Willmann,M.R., Chiu,W.L., Gomez-Gomez,L., Boller,T., Ausubel,F.M., and Sheen,J.** (2002) Map kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**:977-983.
- Assmann,S.M. and Shimazaki,K.** (1999) The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiology* **119**:809-815.
- Bergmann,D.C., Lukowitz,W., and Somerville,C.R.** (2004) Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* **304**:1494-1497.
- Bergmann,D.C. and Sack,F.D.** (2007) Stomatal development. *Annual Review of Plant Biology* **58**:163-181.
- Brearley,J., Venis,M.A., and Blatt,M.R.** (1997) The effect of elevated CO₂ concentrations on K⁺ and anion channels of *Vicia faba* L. guard cells. *Planta* **203**:145-154.
- Briggs,W.R. and Christie,J.M.** (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**:204-210.
- Droillard,M.J., Boudsocq,M., Barbier-Brygoo,H., and Lauriere,C.** (2002) Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions - Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Letters* **527**:43-50.
- Felle,H.H., Hanstein,S., Steinmeyer,R., and Hedrich,R.** (2000) Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness. *Plant Journal* **24**:297-304.
- Gomi,K., Ogawa,D., Katou,S., Kamada,H., Nakajima,N., Saji,H., Soyano,T., Sasabe,M., Machida,Y., Mitsuhara,I., Ohashi,Y., and Seo,S.** (2005) A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in tobacco. *Plant and Cell Physiology* **46**:1902-1914.

- Grabov,A. and 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 of the United States of America* **95**:4778-4783.
- Gray,J.E., Holroyd,G.H., Van der Lee,F.M., Bahrami,A.R., Sijmons,P.C., Woodward,I., Schuch,W., and Hetherington,A.M.** (2000) The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature* **408**:713-716.
- Gudesblat,G.E., Iusem,N.D., and Morris,P.C.** (2007) Guard cell-specific inhibition of *Arabidopsis MPK3* expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytologist* **173**:713-721.
- Hamilton,D.W., Hills,A., Kohler,B., and 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 of the United States of America* **97**:4967-4972.
- Hanstein,S., De Beer,D., and Felle,H.H.** (2001) Miniaturised carbon dioxide sensor designed for measurements within plant leaves. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **81**:107-114.
- Hashimoto,M., Negi,J., Young,J., Israelsson,M., Schroeder,J.I., and Iba,K.** (2006) *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nature Cell Biology* **8**:391-U52.
- Heath,O.V.S.** (1959) Light and carbon dioxide in stomatal movements. *Encyclopedia of plant physiology* **17**:415-464.
- Hedrich,R., Busch,H., and Raschke,K.** (1990) Calcium ion and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO Journal* **9**:3889-3892.
- Hetherington,A.M.** (2001) Guard cell signaling. *Cell* **107**:711-714.
- Hetherington,A.M. and Woodward,F.I.** (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**:901-908.

- Ichimura,K., Shinozaki,K., Tena,G., Sheen,J., Henry,Y., Champion,A., Kreis,M., Zhang,S.Q., Hirt,H., Wilson,C., Heberle-Bors,E., Ellis,B.E., Morris,P.C., Innes,R.W., Ecker,J.R., Scheel,D., Klessig,D.F., Machida,Y., Mundy,J., Ohashi,Y., and Walker,J.C.** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**:301-308.
- Kinoshita,T., Doi,M., Suetsugu,N., Kagawa,T., Wada,M., and Shimazaki,K.** (2001) phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**:656-660.
- Kinoshita,T. and Shimazaki,K.** (1999) Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO Journal* **18**:5548-5558.
- Kovtun,Y., Chiu,W.L., Tena,G., and Sheen,J.** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:2940-2945.
- Leung,J., Orfanidi,S., Chedford,F., Meszaros,T., Bolte,S., Mizoguchi,T., Shinozaki,K., Giraudat,J., and Bogre,L.** (2006) Antagonistic interaction between MAP kinase and protein phosphatase 2C in stress recovery. *Plant Science* **171**:596-606.
- Levchenko,V., Konrad,K.R., Dietrich,P., Roelfsema,M.R.G., and 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**:4203-4208.
- Marten,H., Hedrich,R., and Roelfsema,M.R.G.** (2007a) Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin dependent manner. *The Plant Journal* **50**:29-39.
- Marten,H., Konrad,K.R., Dietrich,P., Roelfsema,M.R.G., and Hedrich,R.** (2007b) Ca²⁺-dependent and -independent abscisic acid activation of plasma membrane anion channels in guard cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology* **143**:28-37.

- Menke,F.L.H., van Pelt,J.A., Pieterse,C.M.J., and Klessig,D.F.** (2004) Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**:897-907.
- Pei,Z.M., Murata,Y., Benning,G., Thomine,S., Klusener,B., Allen,G.J., Grill,E., and Schroeder,J.I.** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* **406**:731-734.
- Raschke,K., Shabahang,M., and Wolf,R.** (2003) The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: Their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. *Planta* **217**:639-650.
- Roelfsema,M.R.G., Hanstein,S., Felle,H.H., and Hedrich,R.** (2002) CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *The Plant Journal* **32**:65-75.
- Roelfsema,M.R.G. and Hedrich,R.** (2005) In the light of stomatal opening: new insights into "the Watergate". *New Phytologist* **167**:665-691.
- Roelfsema,M.R.G. and Hedrich,R.** (2002) Studying guard cells in the intact plant: Modulation of stomatal movement by apoplastic factors. *New Phytologist* **153**:425-431.
- Roelfsema,M.R.G., Steinmeyer,R., Staal M., and Hedrich,R.** (2001) Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant Journal* **26**:1-13.
- Romeis,T., Piedras,P., Zhang,S.Q., Klessig,D.F., Hirt,H., and Jones,J.D.G.** (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**:273-287.
- Schroeder,J.I., Allen,G.J., Hugouvieux,V., Kwak,J.M., and Waren,D.** (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**:627-658.
- Schroeder,J.I. and Hagiwara,S.** (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**:427-430.

- Seo,S., Okamoto,N., Seto,H., Ishizuka,K., Sano,H., and Ohashi,Y.** (1995) Tobacco map kinase - A possible mediator in wound signal-transduction pathways. *Science* **270**:1988-1992.
- Seo,S., Sano,H., and Ohashi,Y.** (1999) Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **11**:289-298.
- Shimazaki,K.I., Doi,M., Assmann,S.M., and Kinoshita,T.** (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annual Review of Plant Biology* **58**:219-247.
- Stahl,E.** (1920) Zur Physiologie und Biologie der Exkrete. *Flora* **13**:1-132.
- Vavasseur,A. and Raghavendra,A.S.** (2005) Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytologist* **165**:665-682.
- Wang,H.C., Ngwenyama,N., Liu,Y.D., Walker,J.C., and Zhang,S.Q.** (2007) Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**:63-73.
- Webb,A.R., McAinsh,M.R., Mansfield,T.A., and Hetherington,A.M.** (1996) Carbon dioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium. *Plant Journal* **9**:287-304.
- Young,J.J., Mehta,S., Israelsson,M., Godoski,J., Grill,E., and Schroeder,J.I.** (2006) CO₂ signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:7506-7511.
- Zhang,S.Q. and Klessig,D.F.** (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:7225-7230.

Kapitel IV: Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO₂ and abscisic acid

**M. Rob G. Roelfsema, Kai R. Konrad, Holger Marten, George K. Psaras,
Wolfram Hartung und Rainer Hedrich**

Publiziert in: Plant, Cell & Environment, August 2006, Vol. 29, Seiten 1595-1605

Eigene Beteiligung an der Arbeit:

- Biophysikalische Charakterisierung von Schließzellen in intakten, mit Norfluorazon gebleichten *Vicia faba* Pflanzen mit Hilfe der DEVC-Technik;
- Auswertung der Daten.

Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO₂ and abscisic acid

M. ROB G. ROELFSEMA^{1*}, KAI R. KONRAD^{1*}, HOLGER MARTEN¹, GEORGE K. PSARAS², WOLFRAM HARTUNG¹ & RAINER HEDRICH¹

¹Molecular Plant Physiology and Biophysics, Julius-von-Sachs Institute for Biosciences, Biocenter, Würzburg University, Julius-von-Sachs-Platz 2, D-97082 Würzburg, Germany and ²Section of Plant Biology, Department of Biology, University of Patras, GR-26500 Patras, Greece

ABSTRACT

Stomatal openings can be stimulated by light through two signalling pathways. The first pathway is blue light specific and involves phototropins, while the second pathway mediates a response to photosynthetically active radiation (PAR). This second pathway was studied with the use of albino *Vicia faba* plants and variegated leaves of *Chlorophytum comosum*. Treatment of *V. faba* with norflurazon (Nf) inhibits the synthesis of carotenoids and leads to albino leaves with guard cells that lack functional green chloroplasts. Guard cells in albino leaf patches of *C. comosum*, however, do contain photosynthetically active chloroplasts. Stomata in albino leaf patches of both plants did not respond to red light, although blue light could still induce stomatal opening. This shows that the response to PAR is not functioning in albino leaf patches, even though guard cells of *C. comosum* harbour chloroplasts. Stomata of Nf-treated plants still responded to CO₂ and abscisic acid (ABA). The size of Nf-treated guard cells was increased, but impalement studies with double-barrelled microelectrodes revealed no changes in ion-transport properties at the plasma membrane of guard cells. Blue light could hyperpolarize albino guard cells by triggering outward currents with peak values of 37 pA in albino plants and 51 pA in green control cells. Because of the inhibition of carotenoid biosynthesis, Nf-treated *V. faba* plants contained only 4% of the ABA content found in green control plants. The ABA dose dependence of anion channel activation in guard cells was shifted in these plants, causing a reduced response to 10 μM ABA. These data show that despite the dramatic changes in physiology caused by Nf, the gross responsiveness of guard cells to blue light, CO₂ and ABA remains unaltered. Stomata in albino leaf patches, however, do not respond to PAR, but require photosynthetically active mesophyll cells for this response.

Key-words: anion channel; H⁺-ATPase; norflurazon; PAR-response; plasma membrane; stomata.

Correspondence: Rainer Hedrich. Fax: +49 931888 6158; e-mail: hedrich@botanik.uni-wuerzburg.de

*Authors contributed equally.

© 2006 The Authors
Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd

INTRODUCTION

Leaves of land plants are covered by waxy cuticle on their epidermis, which prevents excessive loss of water. Within the epidermis, stomata form small adjustable pores, which allow gas exchange between the leaf interior and the atmosphere (Assmann & Shimazaki 1999; Hetherington 2001; Roelfsema & Hedrich 2005). The stomata allow the uptake of CO₂ required for photosynthesis and to this end, C₃ and C₄ plants open their stomata in the light. This response is triggered through at least two independent light signalling pathways (Assmann & Shimazaki 1999; Roelfsema & Hedrich 2005). One pathway has a specific responsiveness to blue light, while the other pathway is stimulated by photosynthetically active radiation (PAR). As suggested by the name, the PAR response is linked to the photosynthetic activity in the leaf. This response is inhibited by 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), which specifically inhibits photosystem II (PSII) (Sharkey & Raschke 1981; Schwartz & Zeiger 1984). The mechanism through which photosynthesis is linked to stomatal movement, however, is still under debate (Messinger, Buckley & Mott 2006).

Several studies have suggested a role for the guard cell chloroplast in the response of the stomata to PAR. Stomatal opening is stimulated by red light in isolated epidermal strips, which are devoid of mesophyll cells, and this response is inhibited by DCMU (Olsen *et al.* 2002). Isolated guard cells are thus most likely responsive to red light through the activity of their chloroplasts. This hypothesis is supported by a patch clamp study that showed activation of plasma membrane H⁺-ATPases by red light (Serrano, Zeiger & Hagiwara 1988). However, this result could not be confirmed in a later study using the same technique (Taylor & Assmann 2001). Single guard cells in intact plants studied with microelectrodes revealed that red light inhibits plasma membrane anion channels (Roelfsema *et al.* 2002). However, this response was only observed by a red light projected on a large area of the leaf including mesophyll cells, but not by a small beam illuminating only a small area with the guard cell recorded. The large beam of red light, not the small beam, induced a change in the intercellular

CO₂ concentration. These observations led to the hypothesis that the guard cell did not respond to red light directly, but rather to lowered intercellular CO₂ concentration induced by PAR. Here, this hypothesis is tested with albino *Vicia faba* plants and variegated leaves of *Chlorophytum comosum*.

Albino plants can be raised through the application of carotenoid synthesis inhibitors like norflurazon (Nf). The herbicide Nf inhibits the conversion of geranylgeranyl diphosphate (GGPP) to carotenoids in the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway (Sandmann, Linden & Boger 1989; Breitenbach, Zhu & Sandmann 2001). Just as in carotenoid-deficient mutants, Nf-inhibition of carotenoid synthesis causes photooxidation of chlorophyll and leads to albino plants (Henson 1984). In these albino plants, plastidogenesis is also destroyed and causes decreased transcription numbers of nuclear-encoded chloroplast genes (Oelmüller & Mohr 1986; Strand *et al.* 2003; McCormac & Terry 2004a). In addition, Nf affects the transcription rates of a large number of other genes encoding proteins that are not transported to chloroplasts (McCormac & Terry 2004b). The latter changes in gene transcription, to some extent, may be due to low levels of the stress hormone abscisic acid (ABA), because it is derived from the carotenoids 9-cis-violaxathin and 9'-cis-neoxathin (Tian, Della-Penna & Zeevaart 2004). Nf therefore also leads to ABA deficiency (Henson 1984).

Albino plants have played an important role in plant biology, helping dissect photosensory systems. In the 1950s, the Galston laboratory used carotenoid-deficient coleoptiles to demonstrate that phototropic curvature does not depend on carotenoids (Bandurski & Galston 1951; Asomaning & Galston 1961). Experiments with Nf-treated maize coleoptiles led to essentially the same conclusion (Vierstra & Poff 1981). In albino *Chenopodium rubrum* plants, blue light can still induce flowering, but these plants have lost sensitivity to red light (Jabben & Deitzer 1979; Bavrina *et al.* 2002). A similar situation was found for light-induced stomatal opening, because the stomata of Nf-treated wheat plants open in blue light (Karlsson, Höglund & Klockare 1983), but do not respond to red light (Karlsson 1986). Likewise, stomata in the white areas of variegated *Hedera helix* leaves did not show a response to red light (Aphalo & Sanchez 1986). These data provide evidence for the role of photosynthetically active mesophyll cells in the PAR response of stomata; however, alternative explanations may apply, such as a general loss of stomatal sensitivity to stimuli acting in green leaves.

Stomata in albino and variegated leaves were tested for responses to several stimuli affecting stomatal movement. Guard cells in Nf-treated albino *V. faba* plants were larger than in green controls, which may be due to a 20× lower level of ABA in these plants. Despite the difference in size, the K⁺-conductances of albino guard cells were not altered. Furthermore, the stomata of Nf plants still responded to CO₂, blue light and ABA, although the ABA concentration dependence of anion channel activation was altered. Stomata in albino leaf patches of Nf-treated *V. faba* plants as

well as *C. comosum* were not responsive to red light, even though the guard cells of *C. comosum* contained functional chloroplasts. This indicates that in intact leaves, mesophyll cells influence guard cells through changes in the intercellular CO₂ concentration, which underlies the stomatal response to PAR.

MATERIALS AND METHODS

Plant growth and gas exchange measurements

Vicia faba (L.) plants (Französische Weisskeimige, Gebag, Hannover, Germany) and *Chlorophytum comosum* (Thumb.) Jacques were grown in a greenhouse. Albino *V. faba* plants were obtained by watering germinated seeds with 100 μM Nf two times a week (Zorial Rapid 80; Syngenta, Basel, Switzerland). Sections of pre-darkened *V. faba* or *C. comosum* leaves were enclosed in a sandwich-type cuvette (2.1 cm diameter) with windows on the upper and lower side. Where indicated, the green area of *C. comosum* leaves was covered with black tape. The abaxial side of the leaves was directed to the upper side of the cuvette and exposed to a gas stream of 0.5 L min⁻¹. Relative humidity was 46%, and the temperature was 24 °C. Transpiration and CO₂ uptake were measured with the infrared gas analysis technique (Binos 1; Heraeus, Hanau, Germany). Experiments were started at 8 AM.

Impalement of guard cells in intact plants

Three to four-week-old-plants were placed next to an inverse microscope (IM 35; Carl Zeiss, Göttingen, Germany). The adaxial side of a leaf was mounted on a plexiglas holder in the focal plane, using double-sided adhesive tape. In this experimental configuration, the abaxial side was facing downwards and was accessible for impalement with double-barreled microelectrodes. The leaves were illuminated with red light from a microscope lamp (12 V/60 W, Zeiss), passed through a long-pass glass filter (610 nm edge wavelength) and focussed on the adaxial side of the leaf at an area 2 cm in diameter, with a photon flux density of 500 μmol m⁻² s⁻¹. Before impalement, stomata were selected for a small aperture (~3 μm), which minimizes the loss of cytoplasm during impalement of guard cells. A small degree of stomatal opening was obtained by passing air over the leaf (0.4 L min⁻¹) via a split (14 × 2 mm). The air was CO₂ free with Nf-treated plants and contained 700 μL l⁻¹ CO₂ with green controls. Blue light was obtained with a band pass filter transmitting wavelengths of 360–500 nm and projected via the objective at the abaxial side of the leaf. The area illuminated with blue light was 0.43 mm in diameter, and the photon flux density was 200 μmol m⁻² s⁻¹. The radiation was measured with a Li-Cor light metre (quantum sensor, LI-190; Li-Cor, Lincoln, NE, USA). The reference electrode, a 50 mM KCl and 1.5% agarose salt bridge, connected to an AgCl/Cl half cell, was inserted into the plexiglas holder on the adaxial side of the leaf. The surface potential across the cuticle was measured

with blunt single-barreled electrodes ($R_{\text{tip}} < 20 \text{ M}\Omega$) and did not differ between Nf and control plants; the average surface potential was 14 mV (Nf-treated leaves, $SD = 10$, $n = 8$; control leaves, $SD = 11$, $n = 9$).

The guard cells were impaled using a micromanipulator (MM3A; Kleindiek Nanotechnik, Reutlingen, Germany). The microelectrodes were pulled from glass capillaries (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Germany) as described earlier (Roelfsema *et al.* 2001). The electrodes were filled with 300 mM KCl, and their resistances ranged from 80 to 150 M Ω . The electrodes were connected via AgCl/CL half cells to headstages (HS-2A \times 0.01; Axon Instruments, Foster City, CA, USA). The membrane potential was clamped to test voltages using an integrated microelectrode and differential amplifier (Geneclamp 500, Axon Instruments). Voltage step protocols were applied via an ITC-16 interface (Instrutech Corp., Elmont, NY, USA) under control of Pulse software (HEKA, Lambrecht, Germany). The data obtained by short pulses were low pass filtered at 200 Hz with eight-pole Bessel (type 92, Frequency Devices, Haverhill, MA, USA) and were sampled at 1 kHz; during long-time sampling, the data were filtered at 10 Hz and sampled at 33.3 Hz.

Protoplast isolation and patch clamp

Guard cell protoplasts were isolated from leaves of 2–4-week-old *V. faba* plants as described by Raschke & Hedrich (1989).

Anion currents were studied in the whole-cell configuration, using patch pipettes prepared from Kimax-51 glass (Kimble Products, Vineland, NY, USA) and coated with silicone (Sylgard 184 silicone elastomer kit; Dow Corning, Auburn, MI, USA). Currents were recorded with an EPC-7 patch-clamp amplifier (HEKA) and low pass filtered with an eight-pole Bessel filter. Whole-cell data were filtered at a cutoff frequency of 2 kHz and sampled at 5 kHz. The data were digitized (ITC-16, Instrutech), stored on hard disk and analysed with Wavemetrics software (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA). The pipette solution contained the following (in mM): tetraethylammonium chloride (TEACl), 150; MgCl₂, 2; ethylene glycol bis(2 aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 10; MgATP, 1; and 2-[-4(-2(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanesulphonic acid (HEPES)-tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) pH 7.2, 10. The bath solution was composed of the following (in mM): CaCl₂, 40; LaCl₃, 100; and methanesulphonic acid (MES)-Tris pH 5.6, 10. (\pm)-Cis, trans ABA (Lancaster, Newgate, UK) was used from ethanol stocks and added to the pipette solution at the desired concentration.

Chlorophyll fluorescence measurements

Chlorophyll fluorescence images were obtained with a confocal laser scanning microscope (LSM 5 Pascal, Zeiss). Chlorophyll was excited at 488 nm with an argon laser (RMC 7812Z, Lasos, Ebersburg, Germany), and emitted

light was passed through a long-pass filter (560 nm). Images were analysed with Axio Vision software (Zeiss).

Quantitative chlorophyll fluorescence measurements were carried out with a microscopy pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) adapted to an upright fluorescence microscope (Axioskop 2FS, Zeiss). Light emitted from a blue light-emitting diode (type NBSG 500; Nichia, Tokyo, Japan) served for fluorescence excitation. This was filtered with a blue filter (BG 39; Schott, Mainz, Germany) and directed via a dichroic beamsplitter mirror (DT Yellow; Balzers, Liechtenstein) towards the objective lens of the microscope. Fluorescence emitted by the chloroplasts was passed through the dichroic mirror, filtered with a red glass filter (RG 645, Schott) and detected with a photomultiplier (type PC/PM-MC, Walz). On its way to the detector, the fluorescence passed an iris diaphragm that could be used to limit the field of detection to a single stoma (Goh, Schreiber & Hedrich 1999). The measurements were carried out with measuring light pulses given at a frequency of 18 Hz in the dark, which corresponds to 0.06 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The fluorescence signal was damped with a time constant of 1 s. Actinic light and saturating light pulses were given at relatively low photon flux densities of 13 and 325 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. These values were optimized for observing CO₂-dependent changes in chlorophyll fluorescence with *C. comosum* (data not shown). During illumination with actinic light, the measuring frequency was increased to 688 Hz. For PAM recordings, the leaves were mounted on a microscope table for impalement studies as previously described, except that an upright microscope was used and the abaxial side of the leaf was thus facing upwards.

RESULTS

Nf bleaches mesophyll and guard cell chloroplasts

Treatment of *V. faba* seedlings with 100 μM Nf, twice a week, resulted in plants that lack chlorophyll and remain smaller than green control plants (Fig. 1a). Leaves of these albino plants often did not unfold completely and developed necrotic spots at high light intensities, indicating injury due to photooxidation (not shown). Nf-treated plants were essentially chlorophyll free which resulted in a lack of photosynthetic activity (Fig. 2b, lower trace).

Inspection under a confocal laser scanning microscope revealed the loss of chlorophylls in guard cells as well (compare Fig. 1b & c). Interestingly, the guard cells of Nf-treated plants were bigger than those of control plants (Fig. 1b & c), resulting in protoplasts with an average diameter of 16.8 μm ($SD = 2.1$, $n = 77$), compared with 14.5 μm ($SD = 1.6$, $n = 63$) in green control plants (Fig. 1d & e). Possibly, the increase in guard cell size is linked to low endogenous levels of ABA in Nf-treated plants, because ABA also decreased the guard cell size in *Tradescantia virginiana* (Franks & Farquhar 2001).

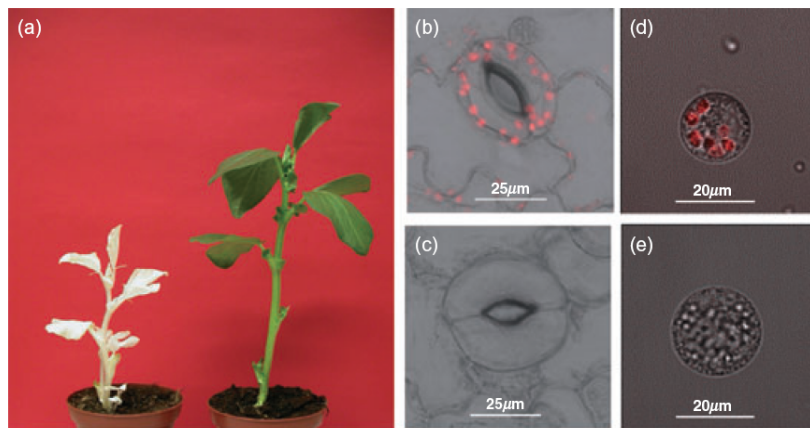


Figure 1. Norflurazon (Nf) bleaches *Vicia faba* plants and increases the size of guard cells. (a) The growth of Nf-treated plants is retarded compared with the green controls, and their leaves often do not unfold completely. Guard cells of Nf-treated plants were larger than those of control plants and completely lack chlorophyll fluorescence (compare b and c). These differences were maintained at the level of guard cell protoplasts (d and e). An average diameter of $16.8 \mu\text{m}$ for albino protoplasts and $14.5 \mu\text{m}$ for green controls was calculated on the basis of whole-cell capacitances of 8.9 pF ($\text{SE} = 0.14$, $n = 77$) and 6.6 pF ($\text{SE} = 0.08$, $n = 63$) and assuming spherical guard cell protoplasts.

Guard cells in albino leaf patches lack a red light response

Responses to light by Nf-treated *V. faba* plants were studied in gas exchange experiments with subsequent red- and blue-light illumination. A high quantum flux density of red light ($630 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) triggered a time-dependent increase in transpiration in green control plants, but not in Nf-treated plants, indicating that the herbicide rendered the stomata insensitive to red light (Fig. 2a & b). In contrast, blue light at a low quantum flux density ($24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) stimulated transpiration in green as well as in Nf plants, although in Nf plants, this response was reduced in amplitude (Fig. 2a & b).

The lack of a response to PAR in albino *V. faba* plants may be due to the loss of photosynthetic capacity in mesophyll cells, but may also have been caused by the loss of chlorophyll in guard cells (Fig. 1b & c). Variegated leaves of *C. comosum* differ in this respect, because mesophyll cells in the white areas of these leaves (Fig. 3a) do not

contain chlorophyll, whereas guard cells contain normal chloroplasts (Fig. 3b). The photosynthetic performance of guard cell chloroplasts was studied with a microscopy PAM. Single stomata in the white area of *C. comosum* leaves were excited at a photon flux density of $0.06 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ to obtain a value for the dark-adapted chlorophyll fluorescence F_0 , and the first saturating light pulse was applied to determine maximum fluorescence (F_m) and variable fluorescence (F_v) ($F_v = F_m - F_0$, Fig. 3c & d). The ratio $F_v:F_m$, which is normally considered a measure of the maximal quantum yield of PSII, was 0.49 ($\text{SD} = 0.04$, $n = 10$). This value is considerably smaller than the normal value of 0.83 found for mesophyll cells of most plant species (Krause & Weis 1991). This difference may reflect a true deficiency in the efficiency of PSII, but it may also reflect a relatively large contribution of non-variable photosystem I (PSI) fluorescence to the overall signal (Schreiber 2004). After the first and simultaneously with the second saturation pulse, continuous actinic light was switched on at a photon flux density of $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 250 s. During the application

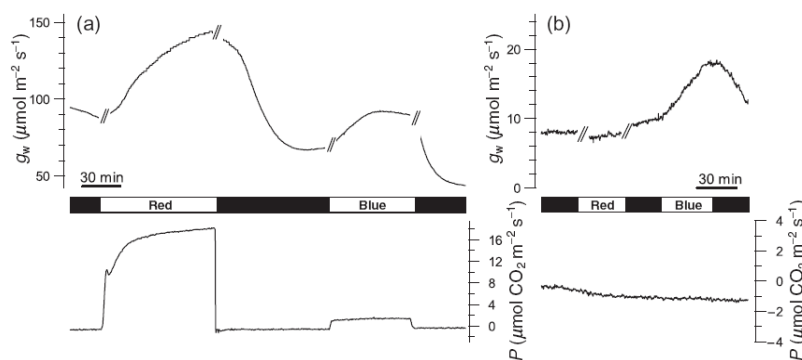


Figure 2. Light-induced stomatal opening in leaves of green (a) and Nf-treated (b) *Vicia faba* plants. Changes in stomatal conductance to H_2O (g_w) (upper traces) and photosynthetic activity (P) (lower traces) were recorded after application of $630 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ red light, or $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ blue light (time points of irradiation are indicated by the bar between the traces). Note that red light induces a time-dependent increase in conductance in green plants but not in Nf plants, while blue light stimulates transpiration in both. The traces are disrupted during temperature transients. Typical responses of Nf-treated and control plants are shown; the responses were reproduced at least three times.

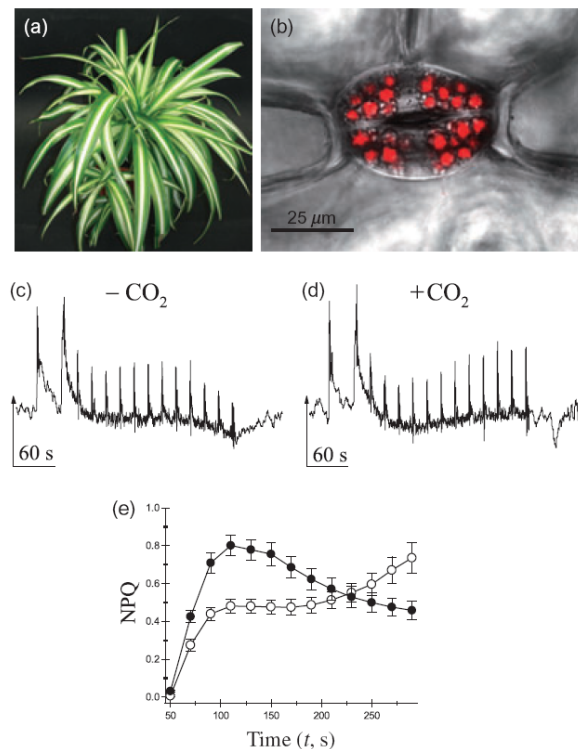


Figure 3. Chlorophyll fluorescence of guard cells located in the white area of variegated *Chlorophytum comosum* leaves. (a) Variegated leaves of *C. comosum* with large albino sections along the central veins. (b) Laser scanning microscope image presenting an overlay of transmitted light and chlorophyll fluorescence from guard cells in the albino leaf section. (c & d) Chlorophyll fluorescence induction curve measured for single stomata in albino leaf patches of *C. comosum*. Chloroplasts were studied with measuring light ($0.06 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), while actinic light and saturating light pulses were given at photon flux densities of 13 and $325 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. Single stomata were measured in CO_2 free air (c) or in air with $350 \mu\text{L l}^{-1} \text{CO}_2$ (d). (e) Changes in the non-photochemical quenching (NPQ) measured for single stomata during induction curves as shown in (c) and (d). Stomata were measured in CO_2 free air (○) and air with $350 \mu\text{L l}^{-1} \text{CO}_2$ (●). Data are the average from 10 stomata; error bars represent SE.

of actinic light, saturating light pulses were applied every 20 s for assessment of the time-dependent changes of F_m' and the derived fluorescence parameters of effective PSII quantum yield $[(F_m' - F)/F_m]$ and non-photochemical quenching (NPQ) $[(F_m - F_m')/F_m]$ (Schreiber 2004). The responses of single stomata were measured in CO_2 free air (Fig. 3c) and in air with $350 \mu\text{L l}^{-1} \text{CO}_2$ (Fig. 3d). While the application of CO_2 did not have much effect on the PSII quantum yield (data not shown), it caused significant differences in the NPQ parameter (Fig. 3e). After the initial increase of NPQ due to 'membrane energization', only in the presence of CO_2 was the typical relaxation of NPQ observed; this response is generally attributed to the onset of ATP consumption in the Calvin-Benson cycle (Schreiber 2004). This strongly suggests that guard cells in albino leaf

patches of *C. comosum* are capable of photosynthesis. A similar conclusion has been drawn on the basis of experiments with isolated guard cells of other species (Outlaw 1989).

The stomata of *C. comosum* were tested for their responsiveness to red light ($630 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and blue light ($24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). When both green and white areas of the leaf were illuminated, the stomata opened in response to both light qualities (Fig. 4a). Visual inspection with a microscope revealed that the stomata in both white and green areas opened (data not shown). In contrast, if red light was projected only on the white area of the leaf, no stomatal opening was observed (Fig. 4b, $n = 4$). Red light also did not cause a measurable uptake of CO_2 , even though the guard cells in these albino leaf patches contain chloroplasts (Fig. 4b). The response of the stomata to blue light illuminating white leaf sections was variable; in two experiments, the transpiration was not stimulated by blue light (not

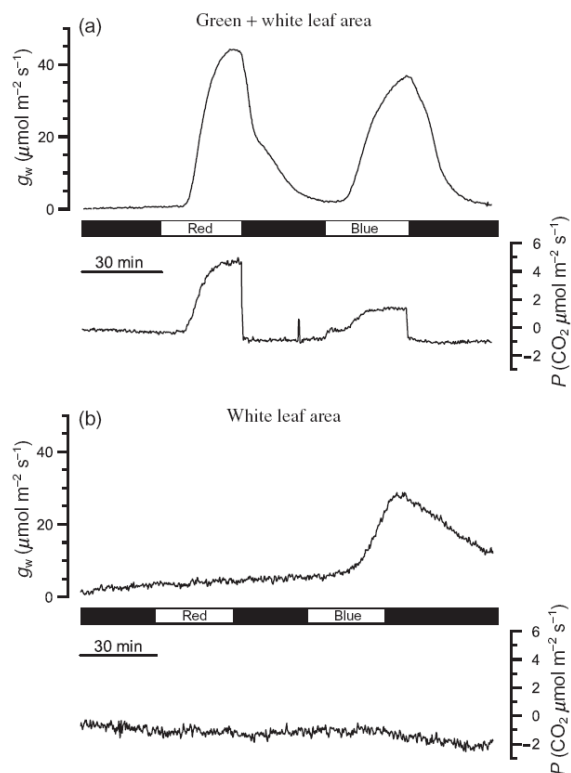


Figure 4. Light-induced stomatal opening in variegated leaves of *Chlorophytum comosum*, illuminated on the green and white areas (a) or white area only (b). Changes in stomatal conductance to H_2O (g_w) (upper traces) and photosynthetic activity (P) (lower traces) were recorded after application of $630 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ red light, or $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ blue light (time points of irradiation are indicated by the bar between the traces). Note that red and blue light shined on both green and white areas induce photosynthesis and a time-dependent increase in conductance. When green areas are covered, photosynthesis cannot be measured, and red light does not lead to an increase in conductance, while blue light induced stomatal opening in two out of four leaves.

shown), while blue light triggered stomatal opening in two other experiments (Fig. 4b).

Stomata of Nf-treated leaves still respond to CO₂

Nf not only induces the loss of chlorophyll, but also alters the expression of a large number of genes including many nuclear-encoded genes of chloroplast proteins (McCormac & Terry 2004a). Albino leaves of *V. faba* therefore may also have lost guard cell sensitivity to intercellular CO₂ concentration. This possibility was tested by comparing the stomatal responses of Nf-treated and control plants to CO₂ (Fig. 5a & b). The stomata of Nf-treated plants opened in CO₂ free air and closed again in air containing 700 $\mu\text{L l}^{-1}$ CO₂, but the response to CO₂ was smaller in amplitude compared with green control plants (Fig. 5a & b). Stomatal closure was also triggered with 100 μM ABA fed through the petiole of leaves, in both Nf-treated and control plants.

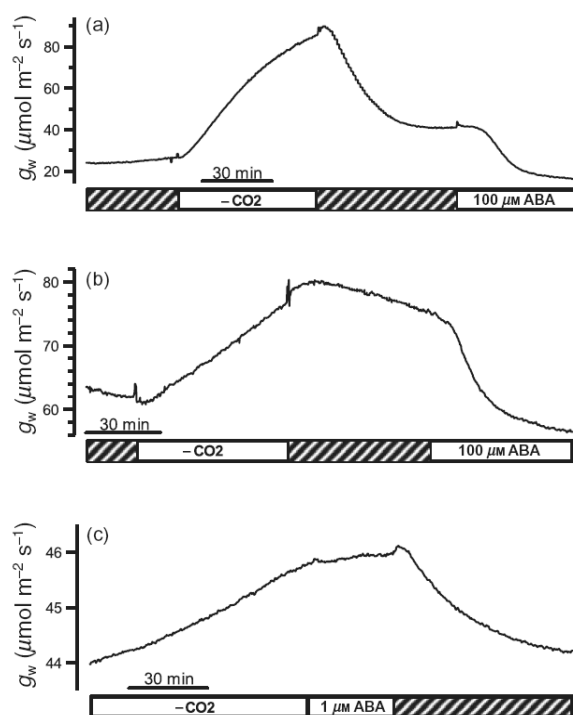


Figure 5. Stomatal responses to CO₂ and abscisic acid (ABA) in green (a) and Nf-treated (b & c) *Vicia faba* leaves. (a & b) Stomatal conductance to H₂O (g_w) recorded in darkness; the atmospheric CO₂ concentration was changed from 700 $\mu\text{L l}^{-1}$ (striped area in the bar below the traces) to CO₂ free air (as indicated in the bar) and afterwards, 100 μM ABA was fed via the petiole (concentration given in the bar). (c) An Nf-treated leaf was kept in CO₂ free air (as indicated in the bar), fed with 1 μM ABA and subsequently exposed to 700 $\mu\text{L l}^{-1}$ CO₂ (striped area in the bar below the traces). Note that CO₂ responsiveness increased, compared with (b), after feeding 1 μM ABA via the petiole. The traces shown represent typical responses that were reproduced at least three times.

In contrast with the smaller response to CO₂, no difference in the ABA-induced velocity of stomatal closure was apparent, between Nf and control leaves (Fig. 5a & b). CO₂-induced stomatal closure in Nf-treated leaves could be accelerated by application of low concentrations of ABA (1 μM) at the petiole. Although this concentration did not initiate stomatal closure (Fig. 5c), its presence accelerated the CO₂-induced decrease in transpiration rate from 13 nmol H₂O m⁻² s⁻² (SD = 9) in the absence of ABA, to 86 nmol H₂O m⁻² s⁻² (SD = 40) in the presence of 1 μM ABA. These results are in accordance with those obtained with *Xanthium strumarium* L., showing that the stomata of this species require low levels of ABA to respond to CO₂ (Raschke 1975a).

Plasma membrane ion transport

Blue light-induced guard cell swelling and stomatal opening most likely depend on the activation of the plasma membrane proton pumps (Assmann, Simoncini & Schroeder 1985; Kinoshita & Shimazaki 1999; Taylor & Assmann 2001). Because of the activation of H⁺ ATPases, blue light can hyperpolarize the plasma membrane of guard cells and drive the uptake of K⁺ via inward rectifying K⁺ channels (Roelfsema *et al.* 2001). The blue light response of guard cells of Nf plants was tested using an impalement technique with double-barrelled microelectrodes. Guard cells were impaled using red light at a photon flux density of 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Stomata that were only slightly opened (aperture ~3 μm) were selected. To obtain this degree of stomatal opening, Nf-treated plants were recorded with CO₂-free air, while green controls were exposed to 700 $\mu\text{L l}^{-1}$ CO₂.

After impalement, all guard cells were in the depolarized state (Roelfsema *et al.* 2001), the average membrane potential of albino guard cells was -59 mV (SD = 10, $n = 10$) and -67 mV with green controls (SD = 14.5, $n = 8$). A beam of blue light (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) projected on guard cells hyperpolarized the plasma membrane of control (not shown) as well as Nf-treated plants (Fig. 6a). In many cases, the guard cells displayed irregular membrane potential changes from the hyperpolarized state to the depolarized state after prolonged illumination (not shown), but returned to a stable depolarized state only after the offset of blue light (Fig. 6a). The changes in plasma membrane current, which underlie the blue light-induced hyperpolarization, were recorded at a holding potential of -100 mV. At this potential, voltage-dependent K⁺ channels are inactive (Fig. 6b–d) and thus pump currents can be recorded at high resolution. The average peak current triggered by blue light was 37 pA (SD = 23, $n = 4$) in guard cells of Nf-treated plants and 51 pA (SD = 14, $n = 5$) in control cells. Blue light thus induced similar plasma membrane currents, despite the higher atmospheric CO₂ concentration used for guard cells in green plants. High concentrations of CO₂ lead to an enhanced blue light response at the guard cell plasma membrane (own unpublished results).

K⁺ uptake and release in guard cells is mediated via two voltage-dependent K⁺ channel types (Roelfsema &

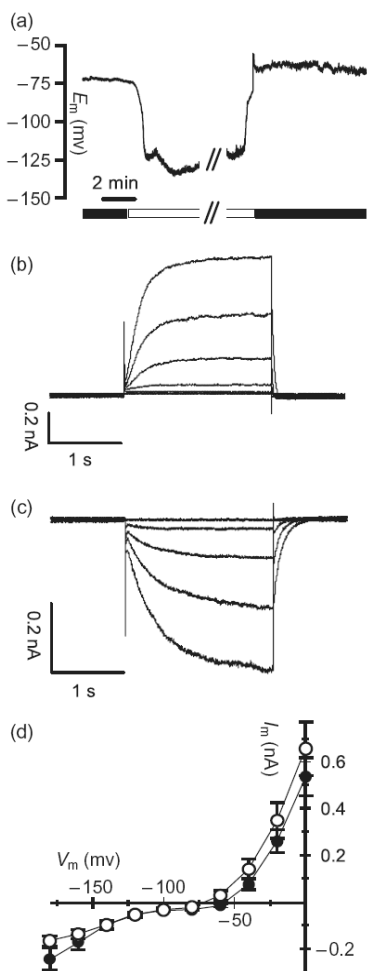


Figure 6. Electrical properties of guard cells in intact albino *Vicia faba* plants. (a) Membrane potential response of a guard cell exposed to $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ blue light (white area in the bar below the graph), given in addition to $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ red light background. Blue light induced a hyperpolarization of the plasma membrane, interrupted by fluctuations towards more depolarized values. After termination of blue light illumination, the membrane potential returned a stable depolarized state. (b & c) Voltage-dependent K^+ channels in Nf-treated albino guard cells. Time-dependent K^+ currents were elicited with voltage pulses (2 s) applied from a holding potential of -100 mV with 20 mV increments to 0 mV (b) or to -180 mV (c). (d) Steady-state current-voltage relation averaged for eight guard cells of Nf-treated plants (○) and seven cells from green plants (●). The steady-state currents were sampled during the last 100 ms of test pulses. Error bars indicate SE. E_m , free running membrane potential; I_m , membrane current; V_m , clamped membrane potential.

Hedrich 2005). The properties of these channels in guard cells of intact plants were studied using a voltage-clamp approach with double-barrelled microelectrodes (Roelfsema *et al.* 2001). Starting from a holding potential of -100 mV , test voltages were applied stepwise to more

positive or negative values to resolve the time-dependent activation of outward and inward K^+ channels, respectively. The properties of both K^+ channel types (Fig. 6b & c) were similar to those of control plants (Roelfsema *et al.* 2001). On average, the conductance of K^+ channels in Nf-treated guard cells was not significantly altered (Fig. 6d). These results indicate that both blue light-stimulated H^+ ATPases and inward- and outward-rectifying K^+ channels function in a similar manner in guard cells of Nf-treated and green control leaves.

Nf does not cause a loss in ABA sensitivity

Because ABA is mainly derived from carotenoids, synthesized in plastids, we expected the Nf-generated albino plants to contain less ABA than the green controls. Indeed, albino leaves of *V. faba* contained only 3 pmol gFW^{-1} (SD = 0.85 , $n = 3$) which represents 4% of the ABA content measured in green *V. faba* leaves (79 pmol gFW^{-1} , SD = 34 , $n = 3$). In water-stressed leaves (50% rest water content) the ABA content of albino plants increased only 2.5 times (10 pmol gFW^{-1}), while that of green plants increased 67 times ($5300 \text{ pmol gFW}^{-1}$). This shows that Nf-treated plants are not able to synthesize ABA in response to dehydration.

The stomata of Nf-treated plants, grown at these low endogenous ABA levels, still close in response to ABA that was fed via the petiole, just as control leaves (Fig. 5a & b). Previous studies documented that the activation of anion channels in guard cells represents a key step in ABA-induced stomatal closure (Pei *et al.* 1997; Roelfsema, Levchenko & Hedrich 2004). ABA activates both rapid (R-type)- and slow (S-type) anion channels, two channel populations that are characterized by different voltage-dependence and activation kinetics (Keller, Hedrich & Raschke 1989; Hedrich, Busch & Raschke 1990; Schroeder & Keller 1992). To study whether the low ABA content of albino plants changes the ABA-dependence of anion channel activation in guard cells, the patch clamp technique was applied. After gaining whole-cell access, $10 \mu\text{M}$ ABA diffusing from the pipette into the cytoplasm activated anion channels in a transient manner (Fig. 7a) (Levchenko *et al.* 2005). A peak activity was found for guard cells of Nf-treated plants after 220 s (SE = 18 , $n = 14$), while the anion channel activity peaked 142 s after whole-cell access was achieved in control cells (SE = 32 , $n = 10$). In the majority of albino (Fig. 7b) and control guard cells, S-type anion channels were activated by ABA. The weak voltage dependence of the S-type channel is reflected by its almost linear current-voltage relationship (Schroeder & Hagiwara 1989; Schroeder & Keller 1992). Under the same experimental conditions, activation of R-type anion channels (Keller *et al.* 1989; Hedrich *et al.* 1990) was observed in Nf-treated (8 of 68 cells) and green guard cells (7 of 52 cells) as well. The depolarization-activated R-type anion channels were identified by their typical current-voltage curve with a peak current at approximately -40 mV (Fig. 5c) (Kolb, Marten & Hedrich 1995; Schulz-Lessdorf, Lohse & Hedrich 1996).

1602 M. R. G. Roelfsema et al.

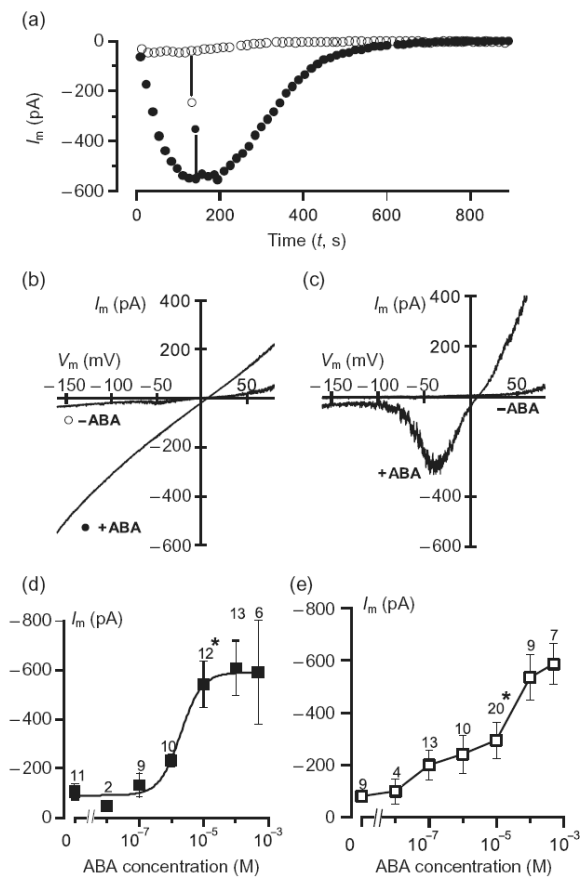


Figure 7. Abscisic acid (ABA) activation of anion currents in guard cell protoplasts. (a) Time courses of anion channel activation in guard cell protoplasts of Nf-treated plants, in the absence (○) or presence (●) of $10\ \mu\text{M}$ ABA in the patch pipette. Measurements were started ($t = 0$) after obtaining the whole-cell configuration. The activity of slow (S-type) anion channels is given as the current measured at $-160\ \text{mV}$. Data are from the same cell as in (b), with corresponding symbols. (b & c) Current–voltage relation of guard cell protoplasts of Nf plants in the whole-cell configuration. Cells were patched in the absence and presence of $10\ \mu\text{M}$ ABA in the pipette. The voltage ramps (1500 ms) were applied from a holding potential of -160 to $+80\ \text{mV}$. In the cell presented in (b), ABA activated S-type anion channels (60 of 68 cells), while ABA activated rapid (R-type) anion channels (8 of 68 cells) in the cell shown in (c). (d & e) Dose–response curves of ABA-dependent anion channel activation in guard cells of control (d) and Nf-treated (e) plants. The maximum currents during ABA transients were plotted as a function of the ABA concentration (error bars represent n , the number of experiments). The asterisks indicate a significant difference in the degree of anion channel activation ($P < 0.05$). E_m , free running membrane potential; I_m , membrane current; V_m , clamped membrane potential.

With $0\ \mu\text{M}$ ABA in the patch pipette, only a background anion channel activity was observed. With the increase in ABA concentration above $0.1\ \mu\text{M}$, however, anion channel activity rose in a dose-dependent manner (Fig. 7d & e). Dependence of anion channel activation on ABA was fitted with a sigmoidal curve in control guard cells, revealing

half-saturation constants of $2\ \mu\text{M} \pm$ cis, trans ABA and a Hill coefficient of 1.2 (Fig. 7d). For most concentrations of ABA, the difference in anion channel activation was not significant between Nf-treated and control cells. However, at a concentration of $10\ \mu\text{M}$, the activation of anion channels in Nf-treated cells was significantly smaller ($P < 0.05$) than in the controls (Fig. 7e). Apparently, Nf treatment decreased the ABA sensitivity, while the same maximum values of anion channel activation were found at high ABA concentration. Note that the maximum amplitude of anion currents was similar, although the albino guard cell protoplasts had a $\sim 34\%$ larger membrane surface than green guard cells (Fig. 1d & e).

DISCUSSION

Light-induced stomatal opening

The stimulation of stomatal opening by light was recognized by botanists as early as 1812 (Moldenhauer 1812). A role for the intercellular CO_2 concentration in this response was postulated about 100 years later (Stahl 1920). CO_2 may represent a feedback signal that couples the degree of stomatal opening to the photosynthetic activity in the leaf (Raschke 1975b; Roelfsema & Hedrich 2005). In the light, photosynthesis will lower the intercellular CO_2 concentration (Hanstein *et al.* 2001), which will in turn cause the stomata to open and enhance the uptake of CO_2 (Roelfsema *et al.* 2002). With this theory, stomata in non-photosynthesizing leaves should not open in response to PAR. Indeed, we found no stimulation of stomatal opening by red light with NF-treated leaves of *V. faba* nor with the white sectors of *C. comosum* leaves.

The albino leaf areas of the two plants differ because guard cells in *V. faba* displayed no chlorophyll fluorescence (Fig. 1), but guard cells in the white area of *C. comosum* had normal chloroplasts (Fig. 3). These chloroplasts most likely are capable of CO_2 fixation, because the NPQ was characteristically altered in response to changes in the atmospheric CO_2 concentration. Guard cells thus seem to have a functional Calvin cycle (Outlaw 1989), but can also provide ATP for stomatal movement (Mawson 1993; Tominaga, Kinoshita & Shimazaki 2001). This would be in agreement with the relatively low F_v/F_m and associated low F_m/F_0 values, which could be due to a large PSI/PSII ratio. The excess of PSI could provide ATP required for stomatal movement via cyclic electron transport. Despite the role of guard cell chloroplasts in providing energy for stomatal movement, the stomata of *C. comosum* do not open if red light is only given to the white areas of the variegated leaves. This result contradicts the observation that guard cells in isolated epidermal strips, bathed in experimental solutions, open in response to red light (Olsen *et al.* 2002). The difference can be explained by the low rate of diffusion for CO_2 in solution. While isolated guard cells bathed in experimental solutions may alter their own CO_2 concentration, the CO_2 concentration of guard cells in intact leaves probably equilibrates rapidly with the

intercellular gas space. In intact leaves, guard cells therefore likely monitor the intercellular CO₂ level (Mott 1988), which depends predominantly on the photosynthetic capacity of the mesophyll.

In addition to the response of stomata involving photosynthesis, double-beam (red plus blue) experiments revealed a specific response of stomata to blue light (Iino, Ogawa & Zeiger 1985). On the basis of data obtained with epidermal strips of *npq1*, a mutant with a defect in violaxanthin deoxidase, a role of carotenoids in this blue light response was suggested (Frechilla *et al.* 1999). However, Nf-treated leaves of *V. faba* can still respond to blue light, indicating that guard cells have at least an additional blue light receptor that does not depend on carotenoids. Two additional blue light receptors have been suggested to mediate the blue light-specific opening of stomata. Phototropins represent good candidates, because stomata of the *phot1/phot2* double mutant of *Arabidopsis thaliana* do not display a blue light-specific response, but still are responsive to red light (Kinoshita *et al.* 2001). Alternatively, cryptochromes may be involved, because blue light does not provoke an increase in stomatal opening in the *cry1/cry2* double mutant (Mao *et al.* 2005). However, it is not known if the stomata of the latter mutant are still responsive to other stimuli, such as PAR. The blue light responsiveness of stomata may be variable, because the stomata in the white area of *C. comosum* leaves opened in response to blue light in only half of the experiments.

The CO₂ sensor is active in albino guard cells

Although stomata of Nf-treated plants do not respond to red light, they still respond to CO₂ in darkness. CO₂-induced stomatal closure occurs, however, with a lower velocity in Nf plants compared with green controls (Fig. 5a & b). This difference is not due to a general failure of stomata closure in Nf-treated plants, because ABA still induces fast stomatal closure. Furthermore, low concentrations of ABA enhance the CO₂ response of Nf-treated stomata (Fig. 5c), which shows that both signals act synergistically on stomatal movement. The lowered CO₂ response may be linked to altered transcription rates of genes that function in this signalling pathway. Potential candidates for CO₂ sensors are phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylases and carbonic anhydrases. The transcription levels of the four PEP carboxylase genes (*AtPPC1-4*) in *Arabidopsis* were not much altered by Nf, but genes encoding cytoplasmic (CA 2) and chloroplastic (CA 1) carbonic anhydrases were down-regulated by Nf (McCormac & Terry 2004b). This suggests a role for carbonic anhydrases in the guard cell response to CO₂.

ABA-responses of guard cells are Nf resistant

Albino leaves obtained with Nf contained only 4% of the ABA content found for green control leaves. Some of the residual ABA could originate from seed stores or it may be formed from a precursor pool existing of E,E- and E,Z-

farnesol (Cowan 2001). The *Arabidopsis aba1* mutant lacks zeaxanthin epoxidase activity and also is unable to synthesize ABA (Cutler & Krochko 1999). The ABA content of *aba1* rosette leaves is reduced from 6 ng gFW⁻¹ (~23 pmol gFW⁻¹) in wild type to 1 ng gFW⁻¹ (~4 pmol gFW⁻¹) in *aba1* leaves (Koornneef *et al.* 1982). Mature *aba1* plants display a retarded growth and tend to wilt, a defect that was restorable by exogenous ABA supply. Wilting was not obvious with Nf-treated *V. faba* plants, presumably because the stomata of these plants also lack the response to PAR, and their stomata therefore do not open as wide as those of the ABA-synthesis mutants.

Guard cells of ABA-depleted plants were expected to have an altered ABA sensitivity, because ABA affects the transcription rate of several genes that encode protein phosphatases 2C and are involved in ABA signalling (Rodríguez, Leube & Grill 1998; Leonhardt *et al.* 2004; Sanchez, Duque & Chua 2004). These protein phosphatases are probably negative regulators of ABA responses in plant cells, because overexpression of HAB1 resulted in reduced ABA sensitivity (Saez *et al.* 2004), while an *abi2* protein with low phosphatase activity (Merlot *et al.* 2001) or loss of function of *AtP2C-HA* (Leonhardt *et al.* 2004) increased ABA sensitivity. It is tempting to speculate that these protein phosphatases create a negative feedback loop, acting on ABA-activated protein kinases encoded by AAPK (Li *et al.* 2000) in *V. faba* and OST1 (Mustilli *et al.* 2002) in *Arabidopsis*. As expected from their ABA-dependent gene activity, ABI1, 2 and *AtP2C-HA* were down-regulated in Nf-treated *Arabidopsis* plants, while HAB1 and 2 transcripts were virtually unchanged (McCormac & Terry 2004b). With these data, guard cells of Nf plants were thus expected to have a higher ABA sensitivity than the control cells. The situation appeared different because guard cells of Nf-treated plants were less responsive to 10 μM ABA in the patch pipette. Apparently, Nf induced a small shift of the dose-response curve, with anion channels requiring higher concentrations of ABA for activation (Fig. 7d & e). However, the maximum activity of anion channels was not affected by Nf. Future experiments should be directed to identify proteins that influence the ABA responsiveness of anion channels through direct manipulation of genes involved in ABA signalling.

In summary, the herbicide Nf has dramatic effects on the phenotype of *V. faba* plants, resulting in albino plants retarded in growth and with strongly reduced ABA content. The stomata of Nf-treated *V. faba* plants do not respond to red light, just as the stomata in the white leaf sectors of *C. comosum*. The absence of a response to PAR is in line with a role for the intercellular CO₂ concentration as an intermediate signal between red light and stomatal opening. Treatment with Nf did not disable stomatal responses to blue light, CO₂ and ABA. The stomata of Nf-treated plants still close in response to ABA, although the dose-response curve of anion channel activation in guard cells was significantly modified. The responsiveness of guard cells to ABA thus seems to be affected by the stress hormone itself. Guard cells thus seem to possess robust

signalling pathways coupling CO₂, blue light and ABA sensors to stomatal movement, which remain active even after depleting plants of carotenoids, chlorophyll and ABA.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank K. Neuwinger, E. Reisberger and S. Neimanis (University of Würzburg) for technical assistance concerning the gas exchange recordings, B. Röger (University of Würzburg) for the ABA measurements, U. Schreiber (University of Würzburg) for assistance with the chlorophyll fluorescence measurements, and E. Van Volkenburgh (University of Washington) for English-language proofing. Nf (Zorial Rapid 80) was a gift from Syngenta. This work was supported by a grant of the A. von Humboldt foundation to G. Psaras and grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to R. Hedrich.

REFERENCES

- Aphalo P.J. & Sanchez R.A. (1986) Stomatal responses to light and drought stress in variegated leaves of *Hedera helix*. *Plant Physiology* **81**, 768–773.
- Asomaning E.J.A. & Galston A.W. (1961) Comparative study of phototropic response & pigment content in oat & barley coleoptiles. *Plant Physiology* **36**, 453–464.
- Assmann S.M. & Shimazaki K.I. (1999) The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiology* **119**, 809–815.
- Assmann S.M., Simoncini L. & Schroeder J.I. (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **318**, 285–287.
- Bandurski R.S. & Galston A.W. (1951) Phototropic sensitivity of coleoptile of albino corn. *Maize Genetic Cooperative Newsletter* **25**, 5.
- Bavrina T.V., Lozhnikova V.N., Culafic L. & Zhivanovich B. (2002) Flowering of cultivated green and SAN 9789-treated *Chenopodium rubrum* plants exposed to white, blue, and red light. *Russian Journal of Plant Physiology* **49**, 460–464.
- Breitenbach J., Zhu C.F. & Sandmann G. (2001) Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5270–5272.
- Cowan A.K. (2001) Abscisic acid biosynthesis in vascular plants is a constitutive process. *South African Journal of Botany* **67**, 497–505.
- Cutler A.J. & Krochko J.E. (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* **4**, 472–478.
- Franks P.J. & Farquhar G.D. (2001) The effect of exogenous abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics, and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana*. *Plant Physiology* **125**, 935–942.
- Frechilla S., Zhu J., Talbott L.D. & Zeiger E. (1999) Stomata from npq1, a zeaxanthin-less *Arabidopsis* mutant, lack a specific response to blue light. *Plant and Cell Physiology* **40**, 949–954.
- Goh C.H., Schreiber U. & Hedrich R. (1999) New approach of monitoring changes in chlorophyll a fluorescence of single guard cells and protoplasts in response to physiological stimuli. *Plant, Cell & Environment* **22**, 1057–1070.
- Hanstein S., De Beer D. & Felle H.H. (2001) Miniaturised carbon dioxide sensor designed for measurements within plant leaves. *Sensors and Actuators B-Chemical* **81**, 107–114.
- Hedrich R., Busch H. & Raschke K. (1990) Calcium ion and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO Journal* **9**, 3889–3892.
- Henson I.E. (1984) Inhibition of abscisic-acid accumulation in seedling shoots of Pearl-Millet (*Pennisetum-Americanum* [L] Leeke) following induction of chlorosis by norflurazon. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* **114**, 35–43.
- Hetherington A.M. (2001) Guard cell signaling. *Cell* **107**, 711–714.
- Iino M., Ogawa T. & Zeiger E. (1985) Kinetic properties of the blue-light response of stomata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**, 8019–8023.
- Jabben M. & Deitzer G.F. (1979) Effects of the herbicide San-9789 on photomorphogenic responses. *Plant Physiology* **63**, 481–485.
- Karlsson P.E. (1986) Blue light regulation of stomata in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. I. Influence of red background illumination and initial conductance level. *Physiologia Plantarum* **66**, 202–206.
- Karlsson P.E., Höglund H.-O. & Klockare R. (1983) Blue light induces stomatal transpiration in wheat seedlings with chlorophyll deficiency caused by SAN 9789. *Physiologia Plantarum* **57**, 417–421.
- Keller B.U., Hedrich R. & Raschke K. (1989) Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature* **341**, 450–453.
- Kinoshita T. & Shimazaki K.I. (1999) Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO Journal* **18**, 5548–5558.
- 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**, 656–660.
- Kolb H.A., 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**, 273–282.
- Koornneef M., Jorna M.L., Brinkhorst-van der Swan D.L.C. & Karsen C.M. (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics* **61**, 385–393.
- Krause G.H. & Weis E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis – the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 313–349.
- 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. *Plant Cell* **16**, 596–615.
- 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 USA* **102**, 4203–4208.
- 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**, 300–303.
- Mao J., Zhang Y.C., Sang Y., Li Q.H. & Yang H.Q. (2005) A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**, 12270–12275.
- McCormac A.C. & Terry M.J. (2004a) The nuclear genes Lhcb and HEMA1 are differentially sensitive to plastid signals and suggest distinct roles for the GUN1 and GUN5 plastid-signalling pathways during de-etiolation. *Plant Journal* **40**, 672–685.
- McCormac A.C. & Terry M.J. (2004b) *NASCArrays, Experiment no. 51* [WWW document]. URL <http://affymetrix.arabidopsis.info>
- Mawson B.T. (1993) Regulation of blue-light-induced proton-pumping by *Vicia faba* L. guard-cell protoplasts – energetic

- contributions by chloroplastic and mitochondrial activities. *Planta* **191**, 293–301.
- 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. *Plant Journal* **25**, 295–303.
- Messinger S.M., Buckley T.N. & Mott K.A. (2006) Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO₂. *Plant Physiology* **140**, 771–778.
- Moldenhauer J.J.P. (1812) *Beitraege zur Anatomie der Pflanzen* pp. 95–107. Wäser, Kiel, Germany.
- Mott K.A. (1988) Do stomata respond to CO₂ concentrations other than intracellular? *Plant Physiology* **86**, 200–203.
- 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. *Plant Cell* **14**, 3089–3099.
- Oelmüller R. & Mohr H. (1986) Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta* **167**, 106–113.
- Olsen R.L., Pratt R.B., Gump P., Kemper A. & Tallman G. (2002) Red light activates a chloroplast-dependent ion uptake mechanism for stomatal opening under reduced CO₂ concentrations in *Vicia* spp. *New Phytologist* **153**, 497–508.
- Outlaw W.H. (1989) Critical examination of the quantitative evidence for and against photosynthetic CO₂ fixation by guard cells. *Physiologia Plantarum* **77**, 275–281.
- 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. *Plant Cell* **9**, 409–423.
- Raschke K. (1975a) Simultaneous requirement of carbon dioxide and abscisic acid for stomatal closure in *Xanthium strumarium*. *Planta* **125**, 243–259.
- Raschke K. (1975b) Stomatal action. *Annual Review of Plant Physiology* **26**, 309–340.
- Raschke K. & Hedrich R. (1989) Patch clamp measurements on isolated guard-cell protoplasts and vacuoles. *Methods in Enzymology* **174**, 312–330.
- Rodríguez P.L., Leube M.P. & Grill E. (1998) Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Molecular Biology* **38**, 879–883.
- Roelfsema M.R.G. & Hedrich R. (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist* **167**, 665–691.
- Roelfsema M.R.G., Steinmeyer R., Staal M. & Hedrich R. (2001) Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant Journal* **26**, 1–13.
- 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. *Plant Journal* **32**, 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. *Plant Journal* **37**, 578–588.
- 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. *Plant Journal* **37**, 354–369.
- Sanchez J.P., Duque P. & Chua N.H. (2004) ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **38**, 381–395.
- Sandmann G., Linden H. & Boger P. (1989) Enzyme-kinetic studies on the interaction of Norflurazon with phytoene desaturase. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **44**, 787–790.
- Schreiber U. (2004) Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (eds G.C. Papageorgiou & Govindjee) pp. 279–319. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- Schroeder J.I. & Hagiwara S. (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**, 427–430.
- Schroeder J.I. & Keller B.U. (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**, 5025–5029.
- Schulz-Lessdorf B., Lohse G. & Hedrich R. (1996) GCAC1 recognizes the pH gradient across the plasma membrane: a pH-sensitive and ATP-dependent anion channel links guard cell membrane potential to acid and energy metabolism. *Plant Journal* **10**, 993–1004.
- Schwartz A. & Zeiger E. (1984) Metabolic energy for stomatal opening. Roles of photophosphorylation and oxidative phosphorylation. *Planta* **161**, 129–136.
- Serrano E.E., Zeiger E. & Hagiwara S. (1988) Red light stimulates an electrogenic proton pump in *Vicia* guard cell protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 436–440.
- Sharkey T.D. & Raschke K. (1981) Effect of light quality on stomatal opening in leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiology* **68**, 1170–1174.
- Stahl E. (1920) Zur Physiologie und Biologie der Exkrete. *Flora* **13**, 1–132.
- Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J.R. & Chory J. (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* **421**, 79–83.
- Taylor A.R. & Assmann S.M. (2001) Apparent absence of a redox requirement for blue light activation of pump current in broad bean guard cells. *Plant Physiology* **125**, 329–338.
- Tian L., DellaPenna D. & Zeevaart J.A.D. (2004) Effect of hydroxylated carotenoid deficiency on ABA accumulation in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* **122**, 314–320.
- Tominaga M., Kinoshita T. & Shimazaki K. (2001) Guard-cell chloroplasts provide ATP required for H⁺ pumping in the plasma membrane and stomatal opening. *Plant and Cell Physiology* **42**, 795–802.
- Vierstra R.D. & Poff K.L. (1981) Role of carotenoids in the phototropic response of corn seedlings. *Plant Physiology* **68**, 798–801.

Received 8 February 2006; received in revised form 18 March 2006; accepted for publication 31 March 2006

3. Diskussion

Stomata sind die Pforten für den Gaswechsel der Pflanze mit ihrer Umwelt. Sie regulieren CO₂ Aufnahme und Wasserabgabe und ihr Öffnungsverhalten wird umgekehrt von der interzellulären CO₂ Konzentration und dem Wasserhaushalt der Pflanze kontrolliert. Die Bewegungen der Stomata und somit der Turgor der Schließzellen wird zu einem bedeutenden Teil durch Aufnahme und Abgabe von Ionen gesteuert. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Kalium sowie organische und anorganische Anionen, deren Fließrichtung über die Plasmamembran neben dem von der H⁺-ATPase aufgebauten H⁺-Gradienten maßgeblich durch die elektrische Potentialdifferenz zwischen Zytosol und Apoplast beeinflusst wird. Auch diese Potentialdifferenz wird hauptsächlich durch die H⁺-ATPase selbst bestimmt, aber auch durch die Aktivität von Anionenkanälen. Eine Aktivierung der Anionenkanäle kann zusammen mit einer Deaktivierung der H⁺-ATPase für eine Depolarisation sorgen, während andersherum eine Deaktivierung der Anionenkanäle und/oder eine Aktivierung der H⁺-ATPase zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran führen kann (Roelfsema & Hedrich, 2005; Pandey *et al.*, 2007). Die spannungsabhängigen Kaliuminflux- sowie effluxkanäle aktivieren dann gemäß des vorgegebenen Potentials und Kalium fließt entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zelle hinein oder heraus. Dieser Kaliumflux hat zwar keinen Einfluss darauf, ob die Zelle hyper- oder depolarisiert ist, er engt jedoch den Spielraum der Membranpolarisierung auf einen Bereich ein, der nur wenig größer ist als die Spanne zwischen Aktivierungspotential der einwärts- und der auswärtsgerichtenden Kaliumkanäle (Blatt, 1991; Roelfsema & Prins, 1998).

Eine Aktivierung der Anionenkanäle und eventuell eine Deaktivierung der H⁺-ATPase sorgen so bei der Antwort auf hohe CO₂ Konzentrationen und bei der ABA vermittelten Antwort auf Wasserstress für eine Depolarisation der Plasmamembran, was letztlich zu einem Kaliumefflux und Stomaschluss führt. Dem Botenstoff Calcium wird dabei eine wichtige Rolle zugeordnet, da dessen Konzentration im Zytosol während der Stomaschlussreaktion ansteigen kann. Zudem ist bekannt, dass Ca²⁺ die Anionenkanäle aktivieren (Schroeder & Hagiwara, 1989; Hedrich *et al.*, 1990) und scheinbar die H⁺-ATPase deaktivieren kann (Kinoshita *et al.*, 1995; Fuglsang *et al.*, 2007). Neben Ca²⁺ als Botenstoff bei

der ABA Antwort sind bei dem ABA-Signaltransduktionsweg in den letzten Jahren viele einzelne Komponenten postuliert worden und auch deren Interaktionen untereinander wurden intensiv erforscht. Bei der CO₂ Signaltransduktion weiß man hingegen lediglich von der Kinase HT1, dass sie bei der CO₂ Antwort in *A. thaliana* eine Rolle spielt (Hashimoto *et al.*, 2006). Im Unterschied zu den beiden Antworten auf ABA und CO₂ ist bei der Blaulichtreaktion der Stomata mit den Phototropinen wahrscheinlich der Rezeptor entdeckt worden (Kinoshita *et al.*, 2001). Hier weiß man bisher im Zusammenhang mit der Stomaöffnung, dass die H⁺-ATPase transient aktiviert wird und es wurde angenommen, dass diese Aktivität alleine für eine Hyperpolarisation der Plasmamembran ausreichen könnte (Assmann *et al.*, 1985).

Bisher ist bei der Untersuchung der Stomabewegung allerdings eine Betrachtung der Gesamtvorgänge in der intakten Pflanze zu kurz gekommen. Ein Zusammenhang zwischen Ca²⁺ und der Aktivierung von Anionenkanälen konnte ebenso wenig gezeigt werden, wie ein Beweis für eine ausschließlich durch die H⁺-ATPase induzierte Stomaöffnung im Blaulicht. Auch von der Rezeption und Signaltransduktion photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) und CO₂ ist wenig bekannt. Es wird vermutet, dass PAR über Änderungen der interzellulären CO₂ Konzentration wahrgenommen wird (Raschke *et al.*, 1975 und Referenzen darin; Roelfsema *et al.*, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit der DEVC Technik in der intakten Pflanze gearbeitet. Dabei wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung der Regulationsmechanismen der Stomabewegung als Antwort auf verschiedene Stimuli hauptsächlich folgenden Fragen nachgegangen:

- Welche Rolle haben Anionenkanäle und ggf. die Plasmamembran H⁺-ATPase bei den Schließzellreaktionen auf CO₂/PAR, Blaulicht und ABA in der intakten Pflanze;
- Wie werden die Anionenkanäle reguliert bzw. wie sieht die Signaltransduktion zu den Anionenkanälen in Antwort auf CO₂/PAR, Blaulicht und ABA aus;
- Welche Rolle spielt CO₂ bei der PAR Reaktion und wie werden Blaulicht und ABA wahrgenommen.

3.1 Rolle der Anionenkanäle und der Plasmamembran H⁺-ATPase bei der Stomabewegung

3.1.1 Einfluss von Licht, CO₂ und ABA auf Anionenkanäle und H⁺-ATPase

Die möglichen Funktionen der Anionenkanäle und der H⁺-ATPase bei Stomabewegungen und ihre Rolle bei den Antworten auf PAR, Blaulicht, CO₂ und ABA werden bereits intensiv untersucht. So weiß man von verschiedenen Stimuli, welche Stomaschlussreaktionen hervorrufen, so wie CO₂, ABA und Dunkelheit, dass diese in intakten Pflanzen von *Vicia faba* zu einer Aktivierung von Anionenkanälen führen (Roelfsema *et al.*, 2002; 2004). In *Vicia faba* hat sich bei der Untersuchung der Reaktion auf PAR auch gezeigt, dass dieser Stimulus vermutlich über eine Verringerung der interzellulären CO₂ Konzentration wahrgenommen wird (Roelfsema *et al.*, 2002; 2004). Wegen der schlechten genetischen Charakterisierung von *V. faba* werden weiterführende molekularbiologische Arbeiten allerdings erschwert, zudem gibt es noch keine Studien in intakten Pflanzen von anderen Spezies.

Von einer Deaktivierung der H⁺-ATPase bei den Stomaschlussreaktionen ist nur wenig bekannt. Rotlicht (PAR), und somit theoretisch auch niedrige CO₂ Konzentrationen, scheint in Schließzell-Protoplasten einen Pumpstrom zu induzieren und folglich müsste dieser bei Dunkelheit wieder deaktiviert werden (Serrano *et al.*, 1988; Tominaga *et al.*, 2001). Allerdings gibt es auch Studien, in denen ein Rotlichteffekt auf einzelne Schließzellen nicht gesehen wurde, weswegen ein Einfluss von Rotlicht auf einzelne Schließzellen nicht sicher ist (Roelfsema *et al.*, 2001; Taylor & Assmann, 2001). Von ABA ist bisher bekannt, dass es die durch Blaulicht induzierte Aktivierung der H⁺-ATPase hemmt (Goh *et al.*, 1996). Eine H⁺-ATPase Aktivierung durch Blaulicht konnte sowohl in Protoplasten, Epidermispräparaten als auch in intakten Pflanzen elektrophysiologisch gemessen werden (Shimazaki *et al.*, 1986; Assmann *et al.*, 1985; Roelfsema *et al.*, 1998; 2001). Die H⁺-ATPase wird also während der Stomaöffnung aktiviert und vermutlich bei Stomaschluss inaktiviert bzw. deren Aktivierung inhibiert.

3. Diskussion

Eine Regulierung der H⁺-ATPase konnte im Rahmen dieser Arbeit bei durch ABA, CO₂ und Dunkelheit induzierten Stomaschlussreaktionen nicht genau gemessen werden, da die von Anionenkanälen ausgelösten Ströme eine mögliche Deaktivierung der Protonenpumpe überdecken. Die bekannte Aktivierung der H⁺-ATPase bei der durch Blaulicht induzierten Stomaöffnung konnte hingegen in intakten *Vicia faba* Pflanzen unter CO₂ freien Bedingungen und in sättigendem Rotlicht gesehen werden. Blaulicht führt unter diesen Umständen zu einem Auswärtsstrom, der durch eine parallele Verschiebung der Strom-Spannungskurven gekennzeichnet ist, was typisch für die weitgehend spannungsunabhängige H⁺-ATPase ist (Assmann *et al.*, 1985; Lohse & Hedrich; 1992; Taylor & Assmann, 2002).

Während der Einfluss der Blaulicht spezifischen Antwort auf die H⁺-ATPase bekannt ist, wurde die Beeinflussung der Anionenkanäle bisher noch nicht erforscht. Eine Deaktivierung der Anionenkanäle durch Blaulicht konnte hier in intakten Pflanzen von *Vicia faba* und *Arabidopsis thaliana* gemessen werden, wenn durch erhöhte CO₂ Konzentration in dem Luftstrom über dem Blatt die Anionenkanäle im sättigenden Rotlicht noch aktiv waren. Dabei wurden hauptsächlich S-Typ, gelegentlich allerdings auch R-Typ Anionenkanäle deaktiviert. Die Deaktivierung der Anionenkanäle im Blaulicht ermöglicht eine Hyperpolarisation der Plasmamembran unabhängig von PAR und somit eine Stomaöffnung durch Blaulicht, die nicht von Synergieeffekten abhängig ist. Eine quantitative Aussage über die beteiligten Ionentransportaktivitäten war leider nicht möglich, da weder die Identität der Anionen, noch die Ionenkonzentrationen in der Zelle bekannt waren. Da in 0ppm CO₂ der Pumpstrom bei -100mV in *V. faba* 17pA betrug und in 700ppm CO₂ der Auswärtsstrom 56pA groß war, kann nur vermutet werden, dass der Anionenstrom maximal 39pA beiträgt. Jedoch könnte in 700ppm CO₂ der induzierte Protonenstrom von 17pA abweichen, da CO₂ eventuell auch die H⁺-ATPase deaktiviert (Serrano *et al.*, 1988; Tominaga *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 2002).

Die Antwort auf Blaulicht führt zu einer Deaktivierung von Anionenkanälen und zur Stomaöffnung, hingegen kommt es bei den Stomaschlussreaktionen als Antwort auf ABA und Dunkelheit/CO₂ zu einer Aktivierung von Anionenkanälen. In Schließzellen intakter Pflanzen von *Nicotiana tabacum* führen diese Stimuli im Gegensatz zu der bereits untersuchten *V. faba* ausschließlich zu einer Aktivierung von S-Typ Anionenkanälen,

während in *V. faba* durch ABA auch R-Typ Anionenkanäle aktiviert werden können (Roelfsema *et al.*, 2004; Levchenko *et al.*, 2005). R-Typ Anionenkanäle wurden in der intakten Pflanze von *N. tabacum* nicht beobachtet und scheinen in dieser Spezies unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht aufzutreten, bzw. in dieser Spezies zu fehlen. Der S-Typ von *N. tabacum* zeigt eine typische Depolarisationsaktivierung und ein Aktivierungspotential negativer als -200mV, ähnlich wie der S-Typ in *V. faba* und *Xanthium strumarium* (Linder & Raschke, 1992). Die Aktivierungskinetiken wurden nicht explizit bestimmt, sind jedoch länger als 2 Sekunden und gleichen somit eher den 5-60 Sekunden des S-Typs, als den 10-50msec des R-Typs von *V. faba* (Linder & Raschke, 1992; Keller *et al.*, 1989).

3.1.2 Zeitliche Regulierung der Anionenkanäle und der H⁺-ATPase bei der Stomabewegung

Der zeitliche Ablauf der Regulation der Anionenkanäle und der H⁺-ATPase bei den Schließzellbewegungen besteht nicht nur aus einem dauerhaften An- und Ausschalten. Bei der ABA Antwort in intakten *V. faba* Pflanzen kommt es zu einer transienten starken Aktivierung von Anionenkanälen und danach zu einer Plateau Bildung mit schwacher Anionenkanalaktivität (Roelfsema *et al.*, 2004; Levchenko *et al.*, 2005; Roelfsema & Hedrich, 2005). Die Antwort auf hohe CO₂ Konzentrationen scheint in *V. faba* hingegen langsamer zu sein und eine maximale Aktivität der Anionenkanäle erst spät einzusetzen. Das könnte daran liegen, dass sich Anionenkanalaktivität und CO₂ Konzentration linear zueinander verhalten und die Anionenkanalaktivität die mit der Zeit ansteigende CO₂ Konzentration in den Interzellularen widerspiegelt (Roelfsema & Hedrich, 2005). Von der Aktivierung der H⁺-ATPase bei Blaulichtbestrahlung ist wiederum bekannt, dass diese transient stattfindet und nach ca. 3 min maximal ist (Assmann *et al.*, 1985; Kinoshita & Shimazaki, 1999; Roelfsema *et al.*, 2001).

Die Antworten auf ABA, Dunkelheit und CO₂ sehen in *N. tabacum*, bezogen auf das Muster der zeitlichen Aktivierung der Anionenkanäle, sehr ähnlich aus. In allen Fällen kann es zu einer transienten Aktivierung der Anionenkanäle und nachfolgend zu einem Rückgang der Kanalaktivität kommen, die jedoch das Ausgangsniveau nicht vor Beendigung des

Schließreiz erreicht (Abb. 3.1 und Kapitel II, Fig. 2A, Kapitel III, Figs. 3A und 4A). Dies spiegelt die von Roelfsema & Hedrich (2005) beschriebene Zweiphasigkeit der ABA-Antwort in *Vicia faba* wieder, bei der auf die den Stomaschluss induzierende transiente Anionenkanalaktivierung eine Phase mit niedriger Aktivität folgt, die vermutlich eine Wiederöffnung der Stomata verhindert. Ein Unterschied bei den Antworten auf die verschiedenen Stimuli besteht in der Zeit bis die Aktivierung der Anionenkanäle einsetzt. So setzt die Antwort auf Dunkelheit oftmals sofort nach Ausschalten des Lichts ein, während die ABA Reaktion im Schnitt erst 90 Sekunden nach Einspülen von ABA startet. Das könnte daran liegen, dass ABA erst in ausreichend hoher Konzentration zu den Schließzellen gelangen muss, bzw. in diesen bis zu einem bestimmten Schwellenwert akkumulieren muss. Dasselbe gilt in geringerem Maße für CO₂. Hier dauert es im Schnitt 60 Sekunden bis zum Start der Reaktion, vermutlich weil CO₂ abhängig von der Öffnungsweite der Stomata eine gewisse Zeit braucht, um in den Interzellularen eine ausreichend hohe Konzentration zu erreichen.

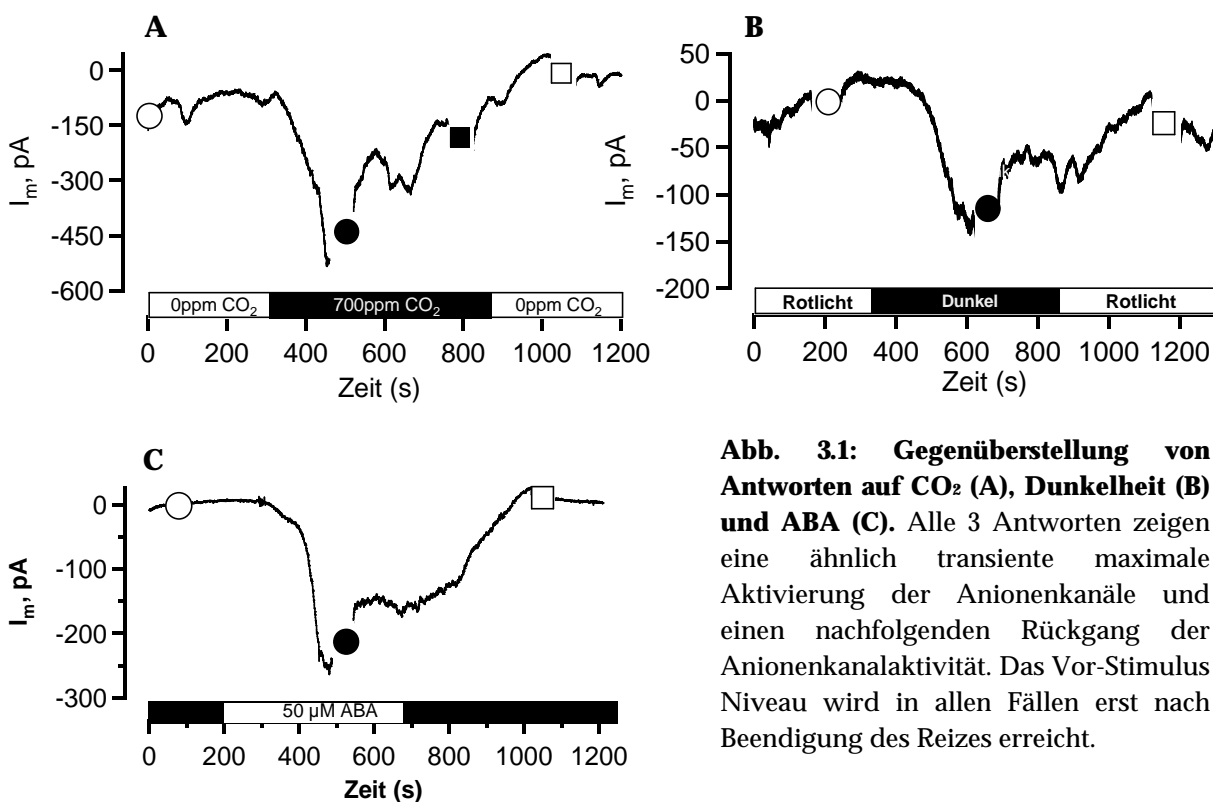


Abb. 3.1: Gegenüberstellung von Antworten auf CO₂ (A), Dunkelheit (B) und ABA (C). Alle 3 Antworten zeigen eine ähnlich transiente maximale Aktivierung der Anionenkanäle und einen nachfolgenden Rückgang der Anionenkanalaktivität. Das Vor-Stimulus Niveau wird in allen Fällen erst nach Beendigung des Reizes erreicht.

Das transiente Aktivierungsmuster der Anionenkanäle lässt nach der Rezeption der Stimuli eine zumindest teilweise Übereinstimmung im Ablauf der Signaltransduktion hin zu der

Anionenkanalaktivierung vermuten. Allerdings ist die Antwort auf Dunkelheit/CO₂ ziemlich variabel. So können mehrere Maxima in der Anionenkanalaktivität auftreten bis hin zu einer andauernden Oszillation der Anionenkanalaktivität. Ebenso kommen bei Dunkelheit/CO₂ nicht transiente Antworten vor, die jedoch eine viel geringere maximale Aktivierung der Anionenkanäle aufweisen als die Antworten mit transientem Maximum (vgl. Kapitel III, Fig. 7A und B). Diese Varianz könnte das Resultat der Mischung einer sich linear zu der sich verändernden interzellulären CO₂ Konzentration verhaltenden Anionenkanalaktivität und einer eventuell wie bei der ABA-Antwort auftretenden „alles-oder-nichts“ Reaktion sein, die nach ihrer Induktion ein bestimmtes Muster aufweist (vgl. Kapitel II, auch Roelfsema *et al.*, 2004; Levchenko *et al.*, 2005). So könnte die Anionenkanalaktivität bei der Dunkelheit/CO₂ Reaktion teilweise die CO₂ Konzentration im Blatt widerspiegeln, die sich abhängig von der Stomaöffnungsweite verändert (die ihrerseits von der CO₂ Konzentration abhängt) und zudem oftmals eine transiente Komponente besitzen, die relativ unabhängig von Länge und Intensität des Stimulus auftritt und zu schnellem Stomaschluss führt.

Ein Unterschied in der langfristigen Regulation der Anionenkanäle bei den ABA und Dunkelheit/CO₂ Antworten könnte auch erklären, warum Schließzellen in Epidermispräparaten von *Arabidopsis thaliana* mit konstitutiv aktiver H⁺-ATPase AHA1 in der Arbeit von Merlot *et al.* (2007) noch auf Dunkelheit schließen, nicht jedoch auf ABA. Wären die Antworten auf ABA und Dunkelheit gleich, so würde eine konstitutiv aktivierte H⁺-ATPase in beiden Fällen einen Stomaschluss verhindern. Die Inhibition des Stomaschlusses bei der ABA Antwort durch eine konstitutiv aktive H⁺-ATPase könnte auch bedeuten, dass eine zusätzliche Deaktivierung der H⁺-ATPase bei der ABA Reaktion möglicherweise notwendig ist. Das könnte primär für Phase 2 gelten, in der der erhöhte Einwärtsstrom zwar durch die Aktivität von Anionenkanälen erklärt werden kann, in der eine aktive H⁺-ATPase allerdings diesen Einwärtsstrom eventuell kompensieren könnte. Eine Deaktivierung der H⁺-ATPase würde zu einer Ersparnis von ATP führen. Denn die von den H⁺-ATPasen transportierten positiven Ladungen und die dadurch aufgebaute Polarisierung der Membran würden sich sonst aufgrund des Efflux von negativen Ladungen durch die Anionenkanäle dauernd gegenseitig kurzschließen.

3. Diskussion

Die zeitabhängige Regulation der Anionenkanäle zusammen mit der H⁺-ATPase konnte bei der Schließzellantwort auf Blaulicht am besten aufgelöst werden. Hier zeigte sich eine transiente Aktivierung der H⁺-ATPase, zusammen mit einer langfristigen und nicht transienten Deaktivierung der Anionenkanäle, die bis zur Beendigung der Blaulichtbestrahlung anhält (Abb. 3.2 und Kapitel I, Fig. 1b, c und 2b). Zudem scheint die Deaktivierung der Anionenkanäle später einzusetzen als die Aktivierung der H⁺-ATPase, bzw. die Deaktivierung scheint noch fortzuschreiten, wenn die Aktivität der H⁺-ATPase maximal ist. Dafür spricht, dass der Auswärtsstrom, der nur durch eine Aktivierung der H⁺-ATPase getragen wird, nach durchschnittlich 84 Sekunden maximal ist, deaktivieren allerdings zusätzlich Anionenkanäle, ist der Auswärtsstrom erst nach 217 Sekunden maximal. Die beobachtete andauernde Deaktivierung der Anionenkanäle könnte dabei den Vorteil bringen, dass nach anfänglicher Hyperpolarisation der Plasmamembran durch die H⁺-ATPase, das negative Potential auch bei geringerer Aktivität der ATPase aufrechterhalten werden kann. Die Aufrechterhaltung der Hyperpolarisation ist auch notwendig, um längerfristige Kaliumaufnahme in die Schließzellen zu ermöglichen.

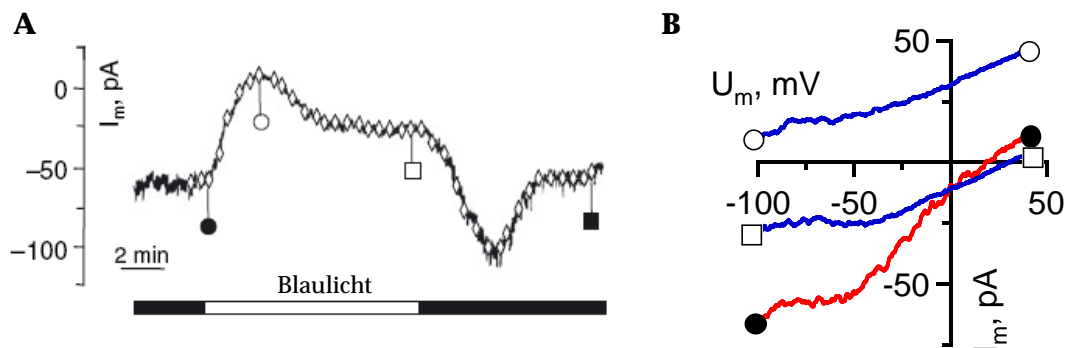


Abb. 3.2: Blaulicht führt zu kontinuierlicher Deaktivierung der Anionenkanäle.

(A) Dargestellt ist der Zellstrom einer Schließzelle von *V. faba* bei einer Haltespannung von -100mV in Luft mit 700ppm CO₂. An den mit \diamond gekennzeichneten Zeitpunkten wurden Spannungsrampen von -100mV bis 40mV gefahren. Bei Blaulichtbestrahlung kommt es zu einem transienten Maximum im Auswärtsstrom, dem ein andauernder geringerer Auswärtsstrom folgt. (B) Dargestellt sind die Ströme zu ausgewählten Spannungsrampen aus A, die Symbole entsprechen denen in A. Anschalten von Blau- zusätzlich zu Rotlicht aktiviert die H⁺-ATPase und deaktiviert Anionenkanäle (von ● nach ○). Die Aktivierung der H⁺-ATPase ist transient und geht während der Blaulichtbestrahlung wieder zurück, während die Anionenkanäle deaktiviert bleiben (von ○ nach □).

Die hauptsächlich transienten Änderungen der Transportaktivitäten scheinen ein charakteristisches Merkmal bei der Regulation der Stomabewegungen darzustellen. Beim

3. Diskussion

Stomaschluss kann eine transiente Anionenkanalaktivierung schnell zum Schluss führen und eine kontinuierliche H⁺-ATPasen Deaktivierung diesen Zustand aufrechterhalten. Bei der Öffnung der Stomata scheint eine transiente H⁺-ATPase Aktivierung eine Hyperpolarisation der Plasmamembran zu induzieren. Eine langfristige Stomaöffnung kann dann von einer spannungsunabhängigen Deaktivierung der Anionenkanäle aufrechterhalten werden.

3.2 Die Funktion von Ca²⁺ bei den Stomabewegungen

3.2.1 Ca²⁺ als Botenstoff bei der Stomaöffnung

Ca²⁺-Ionen werden bei der Regulation der Stomabewegungen allgemein eine wichtige Rolle zugesprochen. Die Rolle von Ca²⁺ bei der Stomaöffnung ist jedoch schlecht charakterisiert im Vergleich zum Stomaschluss. Ca²⁺ scheint allerdings möglicherweise als Botenstoff bei der Antwort auf Blaulichtbestrahlung aufzutreten. Eine Ca²⁺ Freisetzung aus internen Speichern und ein damit verbundener zytosolischer Ca²⁺ Anstieg könnte bei der Blaulichtreaktion eine Funktion bei der Induktion der H⁺-ATPase haben (Shimazaki *et al.*, 1999). Dementsprechend inhibieren Ca²⁺/Calmodulin Antagonisten und der Ca²⁺ Kanal Blocker Verapamil die Blaulichtreaktion der Stomata (Shimazaki *et al.*, 1992, 1997; Roelfsema *et al.*, 1998) und in Blättern und Cotyledonen von *A. thaliana* kann nach Blaulichtbestrahlung ein Ca²⁺ Influx beobachtet werden (Babourina *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2003; Stoelzle *et al.*, 2003).

Ein Anstieg der zytosolischen Ca²⁺ Konzentration bei der Blaulichtreaktion konnte mit dem hier verwendeten methodischen Ansatz nicht gezeigt werden, da der Ca²⁺ Indikatorfarbstoff FURA2 im UV-Licht Bereich angeregt wird und dieses die Blaulichtreaktion inhibiert (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Inhibition könnte daher kommen, dass UV-Licht von der physiologisch aktiven als auch der inaktiven Form der LOV-Domänen von Phototropinen absorbiert wird, der Übergang von der aktiven in die inaktive Form durch UV-Licht jedoch schneller katalysiert wird (Kennis *et al.*, 2004).

Allerdings gibt es Hinweise, dass Ca²⁺ indirekt bei der Deaktivierung der Anionenkanäle im Blaulicht beteiligt sein könnte. Möglich wäre eine Verringerung oder ein Verlust der Ca²⁺ Abhängigkeit dieser Kanäle nach Blaulicht Bestrahlung. Denn bei Messungen in hohen CO₂ Konzentrationen fällt auf, dass die Strom-Spannungskurven von 10 sec Testpulsen positiv von -50mV mit und ohne Blaulicht weitgehend parallel verlaufen, was typisch für eine Änderung der H⁺-ATPase Aktivität ist, während negativ davon die Steigung ohne Blaulicht durch aktive S-Typ Anionenkanäle immer weiter zunimmt (Abb. 3.3 und Kapitel I, Figs. 3D und 6D). Da S-Typ Anionenkanäle aber eigentlich bei positiven Potentialen spannungsabhängig aktivieren (Linder & Raschke, 1992), kann diese „invertierte“

3. Diskussion

Aktivierung eigentlich nur von einem Ca^{2+} Influx durch hyperpolarisations-aktivierte Ca^{2+} Kanäle herrühren (HACCs). Das könnte theoretisch auch bedeuten, dass nicht die Anionenkanäle durch Blaulicht deaktiviert werden, sondern die HACCs. Allerdings sprechen die publizierten verstärkenden Effekte von Ca^{2+} auf die Blaulichtantwort gegen letztere These. Ob die Ca^{2+} Abhängigkeit der Anionenkanäle tatsächlich für deren Deaktivierung im Blaulicht ausschlaggebend ist oder nicht, auf jeden Fall würde eine geringere Ca^{2+} Sensitivität eine stabile Hyperpolarisation der Plasmamembran unterstützen. Denn durch Hyperpolarisation der Plasmamembran während der Blaulichtantwort werden die HACCs theoretisch verstärkt aktiviert und Ca^{2+} Influx findet statt, was wiederum Anionenkanäle aktivieren kann.

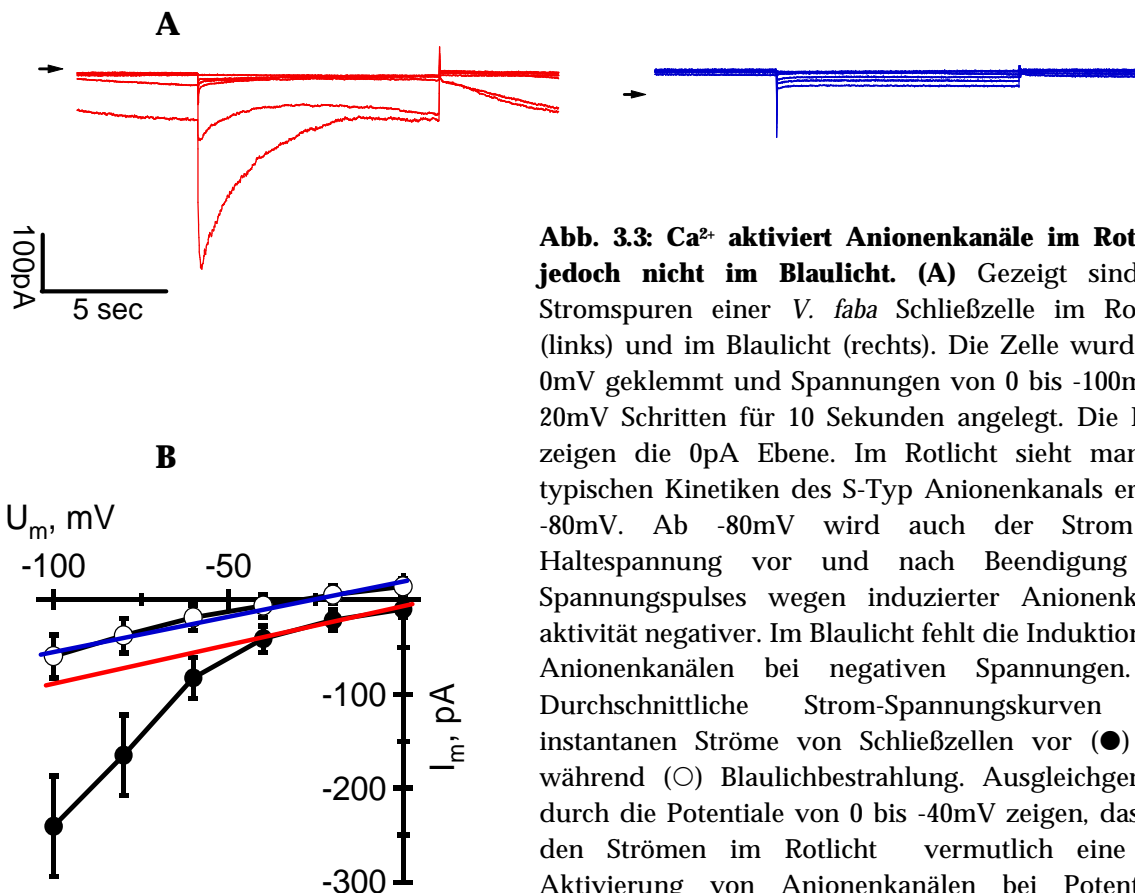


Abb. 3.3: Ca^{2+} aktiviert Anionenkanäle im Rotlicht, jedoch nicht im Blaulicht. (A) Gezeigt sind die Stromspuren einer *V. faba* Schließzelle im Rotlicht (links) und im Blaulicht (rechts). Die Zelle wurde auf 0mV geklemmt und Spannungen von 0 bis -100mV in 20mV Schritten für 10 Sekunden angelegt. Die Pfeile zeigen die 0pA Ebene. Im Rotlicht sieht man die typischen Kinetiken des S-Typ Anionenkanals erst ab -80mV. Ab -80mV wird auch der Strom bei Haltespannung vor und nach Beendigung des Spannungspulses wegen induzierter Anionenkanalaktivität negativer. Im Blaulicht fehlt die Induktion von Anionenkanälen bei negativen Spannungen. (B) Durchschnittliche Strom-Spannungskurven der instantanen Ströme von Schließzellen vor (●) und während (○) Blaulichtbestrahlung. Ausgleichgeraden durch die Potentiale von 0 bis -40mV zeigen, dass bei den Strömen im Rotlicht vermutlich eine Ca^{2+} Aktivierung von Anionenkanälen bei Potentialen negativer -40mV auftritt. Diese Induktion fehlt im Blaulicht. (N=8, SE)

3.2.2 Ca²⁺ als Botenstoff bei dem Stomaschluss

Das Auftreten von Ca²⁺ als Botenstoff bei Stimuli, die Stomaschlussreaktionen bewirken, ist schon intensiv untersucht und durch viele Studien belegt worden. So ist in Schließzellprotoplasten und Epidermispräparationen verschiedener Spezies während einer ABA Applikation ein zytosolischer Ca²⁺ Anstieg beobachtet worden (McAinsh *et al.*, 1990, 1992; Gilroy *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1994) und in Schließzellen von *Commelina communis* führt neben ABA auch CO₂ zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Webb *et al.*, 1996). Außerdem hat extrazellulär vorliegendes Ca²⁺ einen verstärkenden Effekt auf die ABA und CO₂ Antwort der Schließzellen und extrazellulär gepuffertes Ca²⁺ einen inhibierenden (DeSilva *et al.*, 1985a, 1985b; Schwartz *et al.*, 1988; Webb *et al.*, 2001). Ein zytosolischer Ca²⁺ Anstieg kann transient, dauerhaft oder als eine Oszillation auftreten. Solche Ca²⁺ Oszillationen haben eine spezifische Oszillationsfrequenz und Dauer, denen ebenfalls eine Bedeutung beim Stomaschluss beigemessen wird. So haben künstlich erzeugte Ca²⁺ Oszillationen gezeigt, dass transiente Ca²⁺ Erhöhungen zwar zu einem Stomaschluss führen, jedoch eine bestimmte Oszillationsfrequenz bzw. eine bestimmte Anzahl an Oszillationsspitzen nötig ist, um Schließzellen langfristig auf „Schließen“ zu programmieren und ein Wiederöffnen zu unterbinden (Allen *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004).

Wegen der Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺ Konzentration bei den Reaktionen auf ABA und CO₂ wurde davon ausgegangen, dass eine dabei auftretende Anionenkanalaktivierung auf die Ca²⁺ Abhängigkeit der Anionenkanäle zurückzuführen ist, denn es wurde bereits gezeigt, dass R- und S-Typ Anionenkanäle durch Ca²⁺ aktiviert werden können (Schroeder & Hagiwara, 1989; Hedrich *et al.*, 1990). Übereinstimmend damit zeigen patch-clamp Messungen im Zuge dieser Arbeit, dass zytosolisches Ca²⁺ in *Nicotiana tabacum* Schließzellen zu einer Steigerung der Anionenkanalaktivität führt. Dies äußert sich in einer Erhöhung der Anionenströme nach Erreichen der Whole-cell-Konfiguration und einer Verhinderung des ohne Ca²⁺ eintretenden kompletten run-downs dieser Kanäle mit der Zeit (siehe Kapitel II).

3. Diskussion

Obwohl dem Ca^{2+} eine Bedeutung beim Stomaschluss beigemessen wird, haben aber sowohl bei ABA Applikation als auch bei CO_2 Gabe zwischen 20 bis hin zu 75% der Schließzellen in den in der Vergangenheit durchgeführten Studien ohne eine messbare Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration reagiert (Webb *et al.*, 1996; McAinsh *et al.*, 1990, 1992; Gilroy *et al.*, 1991). Dennoch konnte auch in diesen Fällen eine Abnahme der Öffnungsweite der Stomata bei beiden Stimuli beobachtet werden (McAinsh *et al.*, 1990; Gilroy *et al.*, 1991; Webb *et al.*, 1996). Daher wurde neben einem Ca^{2+} abhängigem auch ein Ca^{2+} unabhängiger Signaltransduktionsweg zum Stomaschluss postuliert. In der intakten Pflanze von *Vicia faba* wurde bei der ABA Stimulierung der Anionenkanäle auch nur der Ca^{2+} unabhängige Weg gefunden (Levchenko *et al.*, 2005).

In intakten Pflanzen von *Nicotiana tabacum* konnten wir in Antwort auf ABA und Dunkelheit nach PAR sowohl Antworten mit als auch ohne Ca^{2+} Anstieg beobachten. Im Fall von Dunkelheit nach PAR hat sich hier nahezu eine 50-50 Aufteilung von Antworten mit und ohne Ca^{2+} gezeigt. Die Zahl der Antworten mit Ca^{2+} Signal bei der ABA Antwort lag bei ca. 75%. Das Auftreten von Antworten ohne messbare zytosolische Ca^{2+} Erhöhung zeigt hier schon, dass bei beiden Stimuli in dieser Spezies ein Ca^{2+} Anstieg für eine Aktivierung der Anionenkanäle nicht erforderlich ist. Bei der Hälfte der ABA Antworten mit Ca^{2+} Anstieg spricht auch gegen eine Ca^{2+} induzierte Aktivierung von Anionenkanälen, dass die Ca^{2+} Antworten im Vergleich zur Anionenkanalantwort um mehrere Minuten verzögert sind. Das führt zu einer Asynchronität der Antworten, was in diesem Fall eine mögliche Aktivierung der Anionenkanäle durch Ca^{2+} ausschließt.

Ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration tritt jedoch auch gleichzeitig mit einer Erhöhung der Anionenkanalaktivität auf. Dies könnte auf eine von Ca^{2+} ausgelöste Aktivierung der Anionenkanäle hinweisen, wobei die Anionenkanalaktivität sich nicht linear zu der Größe des gleichzeitig auftretenden Ca^{2+} Anstiegs verändert (Fig. 3.4 und Kapitel III, Fig. 5A). Das lässt vermuten, dass auch bei zytosolischem Ca^{2+} Anstieg und gleichzeitiger Anionenkanalaktivierung noch eine Ca^{2+} unabhängige Aktivierung durch andere Mechanismen erfolgt. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die Ca^{2+} Abhängigkeit einzelner Komponenten des Signaltransduktionsweges oder der Anionenkanäle selbst während der Antworten auf ABA und Dunkelheit reguliert werden kann.

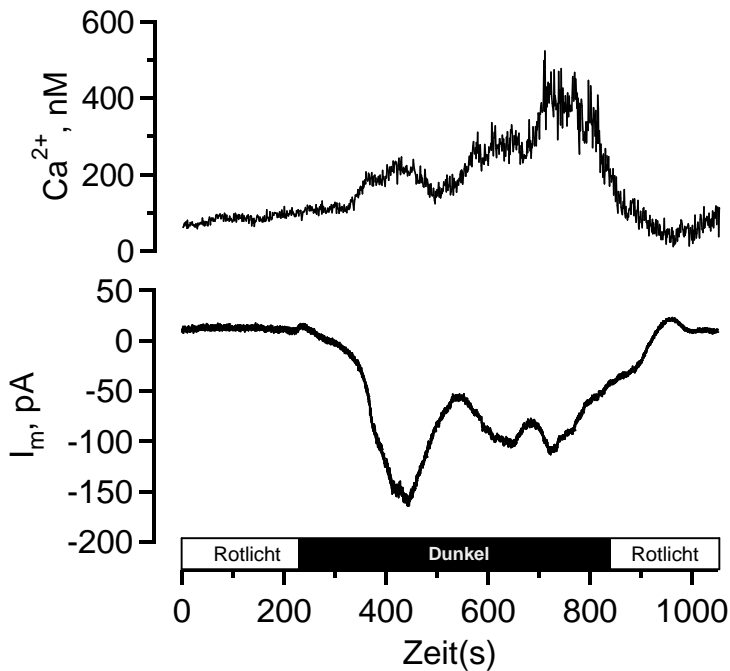


Abb. 3.4: Ca^{2+} Influx und Anionenstrom stehen in keinem linearen Zusammenhang. Dargestellt ist die Dunkelantwort einer *N. tabacum* Schließzelle, geklemmt auf -100mV . Die untere Spur zeigt den Ganzzellstrom, die obere Spur die zytosolische Ca^{2+} Konzentration. Der zytosolische Ca^{2+} Anstieg ist um den Zeitpunkt 750s am größten, der Ganzzellstrom und somit die Anionenkanalaktivität, ist jedoch im ersten Maximum um 450s am größten.

Die von ABA und Dunkelheit ausgelösten Antworten unterscheiden sich darin, dass kein signifikanter Unterschied im induzierten Anionenstrom in den Zellpopulationen mit und ohne Ca^{2+} Anstieg bei der ABA Antwort gesehen wurde, wohl aber bei der Dunkel Antwort. Nach dem Ausschalten von PAR scheint ein zytoplasmatischer Ca^{2+} Anstieg mit einer größeren Anionenkanalaktivität zu korrelieren. Dass das Ca^{2+} tatsächlich einen Einfluss auf die Anionenkanäle hat, suggeriert auch das Erscheinungsbild der Anionenkanal-Aktivierung. Während bei Antworten mit Ca^{2+} ein bis mehrere Maxima auftreten, kommt es bei Antworten ohne Ca^{2+} grundsätzlich zu einem einzelnen Anstieg der Anionenkanalaktivität mit Bildung eines ziemlich gleichmäßigen Plateaustroms ohne deutliches Maximum.

Im Fall von ABA spricht im Unterschied zu Dunkelheit nach PAR vieles für eine weitgehend Ca^{2+} unabhängige Antwort in *N. tabacum*, obwohl die zytosolische Ca^{2+} Konzentration ansteigen kann. Unterstützt wird das auch von patch-clamp Daten an Schließzell-Protoplasten, die auch in Abwesenheit von Ca^{2+} und Anwesenheit von ABA gesteigerte Anionenkanalaktivität zeigen (Kapitel II, Fig. 7). Eine aktivierende Wirkung von ABA zeigt sich hier darin, dass der zeitlich bedingte „run-down“ der S-Typ Anionenkanäle sehr stark verzögert ist. Der Maximal-Strom direkt nach Erreichen der Whole-cell-Konfiguration ist hingegen unbeeinflusst. Das lässt vermuten, dass ABA in Protoplasten scheinbar nicht die

Anionenkanäle aktiviert, sondern deren Deaktivierung inhibiert. Hohe zytoplasmatische Ca^{2+} Konzentrationen führen hingegen zu einer transienten Zunahme der Anionenkanalaktivität. Dass hier die Aktivierung größtenteils transient ist könnte daher kommen, dass Ca^{2+} abhängige Proteine, welche die Anionenkanäle aktivieren, mit der Zeit zusehends aus dem Zytosol ausgespült werden. Diese Ca^{2+} Abhängigkeit könnte in der intakten Pflanze eine Rolle spielen. In *Vicia faba* wurde nämlich gezeigt, dass eine starke Pufferung des zytosolischen Ca^{2+} mit BAPTA letztendlich eine ABA Aktivierung der Anionenkanäle inhibiert und somit eine gewisse Basiskonzentration erforderlich ist (Levchenko *et al.*, 2005).

Allgemein muss auch bedacht werden, dass die räumliche Verteilung der Anionenkanäle in der Plasmamembran nicht bekannt ist und sehr lokale Ca^{2+} Erhöhungen nicht aufgelöst werden. Dadurch könnte sich die gemessene zytosolische Ca^{2+} -Konzentration von der membrannahen Ca^{2+} -Konzentration unterscheiden. Andersherum muss dann aber gefragt werden, warum starke Konzentrationsänderungen im gesamten Zytosol bei der ABA-Reaktion die Anionenkanäle nicht aktivieren, obwohl Ca^{2+} definitiv ein positiver Regulator der Anionenkanäle in *N. tabacum* ist.

3.2.3 Mögliche Aufgaben von Ca^{2+} bei dem Stomaschluss

Die Antwort von Schließzellen auf ABA scheint in *N. tabacum* oftmals zu einem zytosolischen Ca^{2+} Anstieg zu führen, die Aktivierung der Anionenkanäle jedoch, wie schon angesprochen, weitgehend Ca^{2+} unabhängig zu sein. Im Falle des gleichzeitigen Anstiegs könnte die Funktion des Ca^{2+} jedoch zumindest zum Teil eine Aktivierung der Anionenkanäle sein.

Ob Änderungen in der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration alternative Funktionen beim Stomaschluss haben, konnte im Zuge dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die bei *N. tabacum* und bei anderen Studien auch in anderen Spezies wie *C. communis* und vor allem *V. faba* beobachteten Ca^{2+} unabhängigen ABA Antworten sprechen jedoch gegen eine essentielle Funktion eines zytosolischen Ca^{2+} Anstiegs. Eventuell hat Ca^{2+} bei der ABA Antwort einen

3. Diskussion

Effekt auf eine Plasmamembran lokalisierte H⁺-ATPase. So wird in *Arabidopsis thaliana* die H⁺-ATPase AHA2 vermutlich Ca²⁺ abhängig durch CIPKs (CBL Interacting Protein Kinase) inhibiert (Fuglsang *et al.*, 2007), was eine Depolarisation der Schließzell-Plasmamembran während der ABA Antwort verstärken könnte. Unterstützt wird diese These dadurch, dass eine hyperaktive AHA1 ein langfristiges Schließen der Stomata in Antwort auf ABA verhindern kann (Merlot *et al.*, 2007). Von AHA1 wie auch von AHA2 ist bekannt, dass sie in Schließzellen stark exprimiert werden (Ueno *et al.*, 2005). Daher könnte deren Deaktivierung eine wichtige regulatorische Funktion des Ca²⁺ sein. Eine andere Möglichkeit ist ein durch erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen induzierter transienter Efflux von Ionen aus der Vakuole (MacRobbie, 2000). Dieser Effekt ist vor allem von Kalium bzw. von dem in Tracer-Flux Studien als Kalium Ersatz verwendeten Rubidium (Rb⁺) bekannt (MacRobbie, 2000). Denkbare weitere Aufgaben des Calciums könnten auch Prozesse sein, die mit dem Stomaschluss selbst direkt nichts zu tun haben, wie z.B. Ca²⁺ induzierte und ABA abhängige Genexpression (Choi *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2007).

Bei der Antwort auf Dunkelheit nach PAR Bestrahlung wird die Anionenkanalaktivität durch Ca²⁺ anscheinend gesteigert. Die Plasmamembran von Schließzellen kann jedoch auch depolarisieren, ohne dass Ca²⁺ ansteigt und ein Ca²⁺ Anstieg kann dann noch im depolarisierten Zustand erfolgen. In diesem Fall könnte Ca²⁺ eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Depolarisation zukommen. Das ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Young *et al.* (2006), die bei Pufferung des intrazellulären Ca²⁺ nur einen transienten, jedoch keinen langfristigen Stomaschluss in Antwort auf CO₂ gesehen haben. So sind hier scheinbar Ca²⁺ unabhängiger und abhängiger Weg nicht strikt voneinander getrennt und können bei derselben Antwort zusammen arbeiten.

Im Prinzip erfolgt bei beiden Reaktionen, ABA und Dunkelheit (CO₂), nach der Rezeption eine Gabelung in zwei parallele Signalwege, ein Ca²⁺ unabhängiger zu den Anionenkanälen und einer, dessen primäres Ziel Ca²⁺-Kanäle sind. Dabei könnte der Weg zu den Anionenkanälen vor allem im Fall von ABA direkter sein, um die häufig verzögerten Ca²⁺-Antworten zu erklären. Alternativ ist auch denkbar, dass die Verzögerung des zytosolischen Ca²⁺ Anstiegs etwas damit zu tun hat, ob das Ca²⁺ von extern oder aus internen Speichern kommt. Die Herkunft des Ca²⁺ war mit dem hier verwendeten methodischen Ansatz nicht

auflösbar. Aufgrund des bei der ABA Antwort geringeren Ca^{2+} Anstiegs beim freilaufenden Membranpotential (-55mV) im Vergleich zur Haltespannung von -100mV, scheint hier zumindest ein Teil durch hyperpolarisationsaktivierte Ca^{2+} Kanäle von extern in die Zelle zu gelangen (vgl. Kapitel II).

3.2.4 Ca^{2+} abhängige und unabhängige Komponenten des ABA Signaltransduktionsweges

Da für die ABA Antwort im Gegensatz zur CO_2 /PAR Reaktion schon viele Komponenten der Signaltransduktion bekannt sind, kann man hier über deren Ablauf Vermutungen aufstellen. Ca^{2+} unabhängige Aktivierung der Anionenkanäle könnte in *N. tabacum* über Homologe der OST1 Kinase aus *A. thaliana* erfolgen, deren Aktivierung während der ABA-Antwort nicht von Ca^{2+} abhängt. Ein negativer Regulator dieser Kinase ist die ebenfalls Ca^{2+} unabhängige Proteinphosphatase 2C ABI1, welche in Abwesenheit von ABA an OST1 bindet (Yoshida *et al.*, 2006). Nach ABA Applikation wird OST1 phosphoryliert und aktiviert, wonach sie wahrscheinlich weitere Interaktionspartner phosphoryliert (Belin *et al.*, 2006).

Die Ca^{2+} unabhängige Signaltransduktion könnte zum Teil folgendermaßen funktionieren: ABA aktiviert vielleicht über den putativen G-Protein gekoppelten ABA-Rezeptor GCR2 die G-Protein α Untereinheit GPA1 (Wang *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007). Das aktivierte GPA1 setzt die assoziierte Phospholipase D frei (Zhao & Wang, 2004), die über Lipidspaltung Phosphatidat produziert, welches wiederum an ABI1 bindet und dessen inhibitorische Assoziation mit OST1 verhindert (Mishra *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004). OST1 könnte daraufhin phosphoryliert und aktiviert werden. Von dem *Vicia faba* Homolog zu OST1, AAPK, wurde gezeigt, dass es nach Aktivierung die Anionenkanäle sowie Ca^{2+} unabhängig regulatorische 14-3-3 Proteine aktivieren kann, woraufhin diese wiederum an weitere Proteine binden können (Li *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2007). Weder die Aktivierung, noch die Aktivität von OST1 sind von Ca^{2+} abhängig, es muss aber bedacht werden, dass OST1 scheinbar auch zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) führen kann, welche wiederum Ca^{2+} Kanäle und der Ca^{2+} Influx dann theoretisch Anionenkanäle aktivieren

3. Diskussion

können (McAinsh *et al.*, 1996; Mustilli *et al.*, 2002). Somit stellt OST1 möglicherweise auch ein Bindeglied zwischen Ca^{2+} unabhängigen und Ca^{2+} abhängigen Signalwegen dar.

Allgemein könnte aber eine Beteiligung von ABI1 an der Stomaschlussreaktion überbewertet werden. Denn Pflanzen mit durch Norfluorazon bewirkter schwacher Expression ABA induzierter Proteinphosphatasen (wie ABI1) weisen keinerlei gesteigerte Reaktivität auf ABA auf (siehe Kapitel IV). Hier kommt vielleicht aber auch eine redundante Funktion anderer PP2Cs wie ABI2 zu tragen, deren Expression nicht durch Norfluorazon geändert wird.

Ist ein Ca^{2+} Influx in die Zelle erfolgt, eventuell auch induziert durch OST1, so stehen für die weitere Ca^{2+} abhängige ABA Signaltransduktion vor allem 2 Möglichkeiten an involvierten Kinasen und Ca^{2+} abhängiger Proteine zur Auswahl. Kandidaten wären hier die SnRK3 Kinasen (CIPK/PKS) welche mit verschiedenen Ca^{2+} bindenden Proteinen (CBLs) assoziiert sind (Guo *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; D'Angelo *et al.*, 2006), bzw. die direkt Ca^{2+} bindenden CDPKs (Cheng *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2006). In *Arabidopsis thaliana* ist z.B. die CIPK3 Expression stark durch ABA induziert (Kim *et al.*, 2003) und CIPK1 knockout sowie CIPK3 antisense Pflanzen zeigen einen ABA hypersensitiven Phänotyp (Guo *et al.*, 2002; D'Angelo *et al.*, 2006). Im Zusammenhang mit CIPK1 und deren intrazellulärer Lokalisation ist auch bekannt, dass dieses zusammen mit den assoziierten CBLs an der Plasmamembran vorkommt und somit zumindest potentiell auch Kanäle kontrollieren könnte (D'Angelo *et al.*, 2006). Von CIPK3 wiederum weiß man, dass sich der hypersensitive Phänotyp auch auf die Stomata-Regulation erstreckt (Guo *et al.*, 2002). Ein hypersensitiver Phänotyp bei CIPK3 knockout würde in Bezug auf die Anionenkanalregulation allerdings bedeuten, dass ein Ca^{2+} abhängiger Signalweg über CIPK3 zu einer Inhibition der Anionenkanäle führt. Zudem interagiert CIPK3 stark mit den die ABA Antwort negativ regulierenden ABI2 und schwach mit ABI1 (Guo *et al.*, 2002).

Bei den CDPKs ist zumindest von zweien bekannt, dass sie einen Einfluss auf die Stomata-Regulation haben, nämlich CPK3 und CPK6. Diese beiden können ABA abhängig in *Arabidopsis thaliana* Schließzellen eine Aktivierung der Plasmamembran Ca^{2+} Kanäle und S-Typ Anionenkanäle bewirken (Mori *et al.*, 2006). Somit scheinen CPK3 und 6 eine Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} Freisetzung zu bewirken und letztlich zu Stomaschluss führen zu können.

3.3 Wahrnehmung der Stimuli für die Stomabewegung

3.3.1 Die ABA-Rezeption

Obwohl schon viele einzelne Komponenten des Signaltransduktionswegs in Antwort auf ABA bekannt sind, sind deren Zusammenspiel und Aufgaben, auch durch die Große Komplexität des Signalweges, nur lückenhaft bekannt. Das zeigt sich nicht erst bei der Aufgabelung in einen Ca^{2+} abhängigen und Ca^{2+} unabhängigen Weg, sondern schon vorher, bei der Rezeption von ABA. In jüngster Zeit sind einige ABA-Rezeptoren, im Endeffekt Proteine mit einer Affinität für ABA, charakterisiert worden. Darunter befinden sich das flowering-time control protein FCA (Razem *et al.*, 2006), welches jedoch mit der Stomaschlussreaktion erwiesenermaßen nichts zu tun hat. Ein weiterer Rezeptor ist die plastidäre Mg-Chelatase H Untereinheit (Shen *et al.*, 2006), deren Überexpression einen ABA hypersensitiven Stomata-Phänotyp bewirkt und deren Unterdrückung in Pflanzen mit antisense-RNA diese weniger sensitiv für ABA macht (Shen *et al.*, 2006). Und zuletzt der putative G-Protein gekoppelte Rezeptor GCR2, der bei knockout zu weniger ABA sensitiven Pflanzen führt (Liu *et al.*, 2007). Bei GCR2 besteht allerdings die Möglichkeit, dass es sich dabei eher um ein Homolog zu einer bakteriellen Lanthation Synthetase handelt und gar nicht um ein Membran lokalisiertes Protein (Johnston *et al.*, 2007).

Im Rahmen der in Kapitel II durchgeführten patch-clamp Messungen wird ein zytosolischer Rezeptor favorisiert, was nicht zu den bisher publizierten ABA Rezeptoren passt. Denn ABA aktiviert in *Nicotiana tabacum* die Anionenkanäle in Protoplasten von der Innenseite der Zelle aus. Gleiches gilt für *Vicia faba*. Zudem kommt es in letzterer Spezies quasi zu einer instantanen Aktivierung der Anionenkanäle, wenn ABA in der intakten Pflanze in einzelne Schließzellen injiziert wird (Levchenko *et al.*, 2005). Externe Applikation hingegen verzögert in *Vicia faba* wie auch in *Nicotiana tabacum* die Reaktion um 1 bis 2 Minuten. Das spricht für einen zytosolischen ABA Rezeptor mit schneller Signaltransduktion zu den Anionenkanälen. Ein plastidäres Protein und ein eventueller G-Protein gekoppelter Rezeptor, mit wahrscheinlich extrazellulärer Bindestelle für ABA, erfüllen diese Anforderungen nicht. Falls

GCR2 eine zytosolisch lokalisierte ABA bindende Lanthation Synthase ist, erfüllt das noch am ehesten die Bedingungen. Andererseits ist dann die publizierte Interaktion mit der an der ABA Signaltransduktion beteiligten G-Protein α Untereinheit GPA1 fraglich. Es bleibt also abzuwarten, welche ABA bindenden Proteine noch in Zukunft gefunden werden.

3.3.2 Die Rolle von CO₂ bei der PAR Reaktion

Stomata öffnen bei Bestrahlung mit photosynthetisch aktivem Licht (PAR) und bei geringen CO₂ Konzentrationen. Andersherum schließen sie in Dunkelheit sowie in Antwort auf hohe CO₂ Konzentrationen. Schon früh im 20. Jahrhundert wurde von Stahl (1920) die Hypothese aufgestellt, dass beide Reaktionen verknüpft sind und die stomatäre Antwort auf Licht mit der interzellulären CO₂ Konzentration zusammenhängt. CO₂ würde somit ein Rückkopplungs-System darstellen das dem Blatt sagt, ob genügend Kohlenstoff für die Photosynthese bei der gegebenen Belichtung vorhanden ist. Hohe PAR Bestrahlung führt demnach zu erniedrigter interzellulärer CO₂ Konzentration und einer Öffnung der Stomata, während es bei schwacher Bestrahlung und Dunkelheit zu erhöhten CO₂ Konzentrationen im Blatt und Stomaschluss kommt (Hanstein *et al.*, 2001; Roelfsema *et al.*, 2002).

Übereinstimmend mit einer Rolle von CO₂ bei der PAR Wahrnehmung haben mit dem Herbizid und Phytoendesaturaseinhibitor Norfluorazon (NF) gebleichte Pflanzen der Saubohne *Vicia faba* sowie weiße Blattareale der Pflanze *Chlorophytum comosum* nicht mehr auf PAR reagiert, aber durchaus noch auf Blaulicht. NF Behandelte *V. faba* konnten außerdem noch auf CO₂ und ABA reagieren. Das spricht dafür, dass die Stomaphysiologie in diesen Pflanzen nicht wesentlich durch NF beeinträchtigt wurde und fehlende PAR Reaktivität nicht an einer veränderten Physiologie liegt.

Die Hypothese, dass Schließzellen der Sensor der interzellulären CO₂ Konzentration sind, setzt voraus, dass diese nur die intrazelluläre CO₂ Konzentration wahrnehmen und dass diese von der Photosynthese der Schließzellen im Wesentlichen unbeeinflusst ist. Schließzellen in Epidermispräparaten können jedoch auf PAR Bestrahlung mit einer

Stomaöffnung reagieren (Raschke, 1975 und Referenzen darin; Olsen *et al.*, 2002). Daher ist noch nicht ganz klar, ob die Schließzelleigene Photosynthese nicht auch für eine intrazelluläre Reduktion der CO₂ Konzentration ausreicht, bzw. PAR eventuell nicht nur durch CO₂ wahrgenommen wird.

Die Experimente mit *C. comosum* sprechen dafür, dass einzelne Stomata keinen Einfluss auf ihre eigene Öffnungsweite bei PAR Bestrahlung haben. Die Stomata von *C. comosum* in weißen Blattarealen öffneten nämlich nicht bei PAR Bestrahlung, obwohl sie wahrscheinlich Chloroplasten mit einem funktionellen Calvin-Zyklus besitzen. Dadurch sollten sie fähig sein, CO₂ zu fixieren und somit die intrazelluläre CO₂ Konzentration zu erniedrigen. Da eine Öffnung der Stomata nicht stattgefunden hat, ist die Schließzelleigene Photosynthese anscheinend nicht ausreichend für eine Reduktion der von den Schließzellen wahrgenommenen CO₂ Konzentration. Ein funktioneller Calvin-Zyklus sollte den Schließzellen auch ermöglichen, ähnlich wie bei den Beobachtungen von Shimazaki *et al.* (1989) und Tominaga *et al.* (2001), ATP aus der Photophosphorylierung, vermutlich über ein Phosphoglycerat-Dihydroxyacetonphosphat Shuttle, in das Zytosol zu exportieren. Eine höhere ATP Konzentration im Zytosol bzw. eine höhere ATP/ADP Ratio könnte dann eventuell die H⁺-ATPase stimulieren. Eine Injektion von hoch energetischen Phosphatverbindungen wie Phosphoenolpyruvat oder ATP in die Zelle kann auch zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran führen (eigene unveröffentlichte Daten). Zusätzlich senkt eine hohe ATP Konzentration die Aktivierbarkeit der S-Typ Anionenkanäle durch Ca²⁺ (vgl. Kapitel II), dessen zytosolische Konzentration bei Dunkelheit/hoch CO₂ bzw. hyperpolarisierten Potentialen ansteigen kann. Die fehlende Stomaöffnung in der intakten Pflanze spricht allerdings gegen eine Funktion energiereicher Phosphatverbindungen bei der Antwort auf PAR.

Eine Erklärung dafür, dass Stomata in Epidermispräparaten bei PAR Bestrahlung öffnen, nicht jedoch die Stomata in intakten Pflanzen, wäre die schnelle Diffusion von CO₂ *in planta*. In intakten Pflanzen ist die Photosynthese der Schließzellen vermutlich nicht ausreichend, um die intrazelluläre CO₂ Konzentration maßgeblich zu verändern, weil sich diese schnell der interzellulären CO₂ Konzentration angleicht. Hingegen ist die Diffusion von CO₂ in Lösung 1000fach langsamer und ermöglicht somit vielleicht den Schließzellen von

3. Diskussion

Epidermispräparaten bei PAR Bestrahlung eine ausreichende intrazelluläre Erniedrigung der CO₂ Konzentration. Eine schnelle CO₂ Diffusion *in planta* würde noch einen weiteren Effekt haben. Sollte eine Aktivierung der Plasmamembran H⁺-ATPase ein direkter Effekt der Schließzelleigenen Photosynthese durch ein Phosphat-Shuttle sein, so findet das unabhängig von der intrazellulären CO₂ Konzentration statt. Möglicherweise können unter diesen Umständen gleichzeitig Anionenkanäle CO₂ abhängig in den Schließzellen aktivieren. Die Aktivität der Anionenkanäle könnte nun den H⁺-Pumpstrom der H⁺-ATPase kurzschließen und eine Stomaöffnung verhindern.

Während die Beobachtungen in *C. comosum* und in Norfluorazon gebleichter *V. faba* die Theorie unterstützen, dass PAR über Veränderungen der interzellulären CO₂ Konzentration durch die Photosynthese funktioniert, haben Messungen an *Nicotiana tabacum* *NtMPK4* antisense Pflanzen diese Theorie nur zum Teil bestätigt. *NtMPK4* ist eine MAP-Kinase, die an der systemischen erworbenen Resistenz und an Reaktionen auf Verletzungen beteiligt ist (Gomi *et al.*, 2005). *NtMPK4* Antisense Pflanzen zeigen eine erhöhte Sensibilität auf Ozon in Form nekrotischer Flecken, was eventuell von deren erhöhter stomatärer Leitfähigkeit und der dadurch verstärkten Diffusion von Ozon in die Blätter herrührt (Gomi *et al.*, 2005).

In Gaswechselexperimenten hat sich bestätigt, dass die Stomata der *NtMPK4* antisense Pflanzen in der Regel weit geöffnet sind. Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass eine Änderung der atmosphärischen CO₂-Konzentration keinerlei Änderung der Transpiration hervorruft und die Stomata somit in Luft mit hoher CO₂ Konzentration nicht schließen. In Übereinstimmung mit der Rolle von CO₂ bei der PAR Antwort konnte bei einer PAR Bestrahlung teilweise ebenfalls keine Antwort der Stomata registriert werden. Jedoch kam es oftmals zu einer stark reduzierten Restantwort bei PAR Bestrahlung oder Dunkelheit nach PAR, die bei Änderungen der CO₂ Konzentration nicht gesehen werden konnte.

Übereinstimmend mit den Gaswechselexperimenten zeigte sich keine Aktivierung von Anionenkanälen in Schließzellen in Antwort auf hohe CO₂ Konzentrationen. In Antwort auf Dunkelheit nach PAR kam es nur in wenigen Schließzellen zu einer Aktivierung der Anionenkanäle.

3. Diskussion

Dadurch, dass in Antwort auf CO₂ praktisch keine Reaktion gesehen wurde, ist dieser Unterschied nicht auf noch vorhandenes *NtMPK4* Restprotein durch unvollständiges „gene silencing“ zurückzuführen. Das lässt zum einen vermuten, dass *NtMPK4* eine wichtige Funktion in der CO₂ Signaltransduktion hat. Aber zum anderen zeigt es, dass das PAR Signal in *N. tabacum* nicht nur über die Veränderung der interzellulären CO₂ Konzentration weitergeleitet werden kann. Eine kleine Restantwort bei PAR Bestrahlung und die Abwesenheit einer CO₂ Antwort sprechen dafür, dass PAR zwar im Wesentlichen über Veränderungen der CO₂ Konzentrationen arbeiten könnte, aber weitere Signalwege zusätzlich zu dem CO₂ abhängigen vorhanden sind.

Ein mögliches Signal zusätzlich zu CO₂ wäre die bekannte Licht induzierte apoplastische Änderung der Konzentration verschiedener Ionen wie Kalium, Calcium und Chlorid (Felle *et al.* 2000; Roelfsema & Hedrich 2002). Allerdings ist dabei zu bedenken, dass CO₂ die apoplastische Ionenkonzentration vermutlich ebenfalls verändert (Roelfsema *et al.*, 2002). Eine weitere Möglichkeit wäre neben CO₂ ein (Zwischen-) Produkt der Photosynthese, oder ein Effekt des aus der Schließzelleigenen Photosynthese über ein Shuttle-System in das Zytosol exportierten ATPs (Shimazaki *et al.*, 1989; Tominaga *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu *C. comosum* könnte ATP einen Effekt auf die Stomaöffnung haben, da durch den „offene Stomata“ Phänotyp von *NtMPK4* antisense Pflanzen die Anionenkanäle in diesen Pflanzen im Normalfall eventuell deaktiviert vorliegen und ein H⁺-Pumpstrom somit nicht durch Anionenefflux kurzgeschlossen wird. Allerdings ist es bei den Wildtyp-artigen Antworten auf Dunkelheit in *NtMPK4* antisense Pflanzen zu einer Aktivierung von Anionenkanälen gekommen, was gegen einen alleinigen Effekt der H⁺-ATPase spricht (siehe Kapitel III, Fig. 6B).

Die Funktion von *NtMPK4* bei der Antwort auf CO₂/PAR könnte eine direkte Involvierung in den Signaltransduktionsweg dieser beiden Stimuli sein. *NtMPK4* erzeugt einen „offene Stomata“ Phänotyp, was für eine Aufgabe als positiver Regulator bei der CO₂ Antwort sprechen würde. Denkbar wäre eine Aktivierung von *NtMPK4* durch das während der CO₂ Antwort gebildete H₂O₂ (Kolla *et al.*, 2006), denn das *A. thaliana* Homolog zu *NtMPK4*, *AtMPK4*, befindet sich in einem Signaltransduktionsweg unterhalb der H₂O₂ abhängigen

MAP-Kinase-Kinase-Kinase MEKK1 (Nakagami *et al.*, 2006). Eine aktive *NtMPK4* könnte dann zu einer Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle führen.

Alternativ dazu ist eine Beeinflussung der stomatären Entwicklung durch *NtMPK4* denkbar. Antisense Pflanzen könnten deshalb aufgrund eines veränderten Expressionsmusters anderer Gene und Veränderungen in der Stomaphysiologie nicht mehr reaktiv sein. So sorgt in *Arabidopsis* eine Signaltransduktionskaskade über die MAPKKK YODA zu den auch durch biotischen und abiotischen Stress aktivierten MAP-Kinasen *AtMPK3* und *AtMPK6* für eine starke Anhäufung von Stomata in der Epidermis (Bergmann *et al.* 2004; Wang *et al.* 2007; Asai *et al.* 2002; Droillard *et al.* 2002; Kovtun *et al.* 2000; Menke *et al.* 2004). Ein Hinweis auf Entwicklungsveränderungen in *NtMPK4* antisense Pflanzen könnte die vergrößerte durchschnittliche Schließzelllänge sein, wie sie in diesen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp gefunden wurde (siehe Kapitel III, Fig. 1). Andererseits ist das vielleicht nur auf einen, durch den offenen Stomata Phänotyp bedingten, dauerhaft erhöhten Turgor und dadurch verstärktes Längenwachstum zurückzuführen.

3.3.3 Phototropin-Blaulichtrezeptoren regulieren die H⁺-ATPase und die Anionenkanäle

Die Aktivierung der Plasmamembran H⁺-ATPase als Antwort auf Blaulicht wird vermutlich von Plasmamembran lokalisierten Blaulichtrezeptorkinasen, den so genannten Phototropinen (PHOTS), bewirkt. Von diesen sind in *Arabidopsis thaliana* und *Vicia faba* 2 identifiziert worden und wenn beide Rezeptoren ausgeschaltet sind, fehlt die Blaulicht abhängige Aktivierung der H⁺-ATPase (Kinoshita *et al.*, 2001; 2003). Diese Phototropine zeigen nach Blaulichtanregung eine Autophosphorylierung und binden ein regulatorisches 14-3-3 Protein, was in *Vicia faba* vor einer regulatorischen Phosphorylierung der H⁺-ATPase stattfindet (Kinoshita *et al.*, 2003).

Trotz dieser Hinweise auf eine Beteiligung der Phototropine an der durch Blaulicht induzierten Stomaöffnung, wird noch immer das Carotinoid Zeaxanthin als möglicher

3. Diskussion

Blaulichtrezeptor diskutiert. In verschiedenen Studien wurde nämlich eine Korrelation zwischen der Reaktivität auf Blaulicht und dem Gehalt bzw. dem Vorhandensein von Zeaxanthin gefunden (Zeiger & Zhu, 1998; Talbott *et al.*, 2003; Talbott *et al.*, 2006).

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Öffnung der Stomata von Norfluorazon (NF) gebleichten *Vicia faba* in Antwort auf Blaulicht spricht jedoch gegen eine Beteiligung dieses oder anderer Carotinoide (siehe Kapitel IV, Fig. 2B). Denn NF hemmt die Phytoendesaturasen und verhindert somit die Carotinoidbiosynthese, was eine Reduktion des Gesamt-Carotinoidgehalts um das 50fache bewirkt (Eigene unveröffentlichte Daten). Neben einer langfristigen Blaulicht induzierten Öffnung der Stomata im Gaswechsel ist auch eine transiente Aktivierung der H⁺-ATPase und Hyperpolarisation der Plasmamembran elektrophysiologisch in gebleichten *Vicia faba* beobachtet worden. Eine essentielle Rolle des Zeaxanthins bei der Blaulichtantwort kann also ausgeschlossen werden.

Zum einen schließen die Messungen an gebleichten *V. faba* Zeaxanthin als Rezeptor im Prinzip aus, zum anderen deuten elektrophysiologische Messungen in *A. thaliana* auf Phototropine als Blaulichtrezeptoren hin. In Schließzellen von intakten *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Pflanzen konnte ein durch Blaulicht induzierter Auswärtsstrom beobachtet werden, der sich wie in *V. faba* aus einer Aktivierung der H⁺-ATPase und einer Deaktivierung der Anionenkanäle zusammensetzt. In *phot1/phot2* Doppelmutanten konnte dagegen keine Aktivierung der H⁺-ATPase oder eine Deaktivierung von S-Typ Anionenkanälen gefunden werden. Die Blaulicht spezifische Regulation der Anionenkanäle wie auch der H⁺-ATPase erfolgt demnach durch Phototropine.

3.4 Modelle für die Signalwege von ABA, PAR/CO₂ und Blaulicht

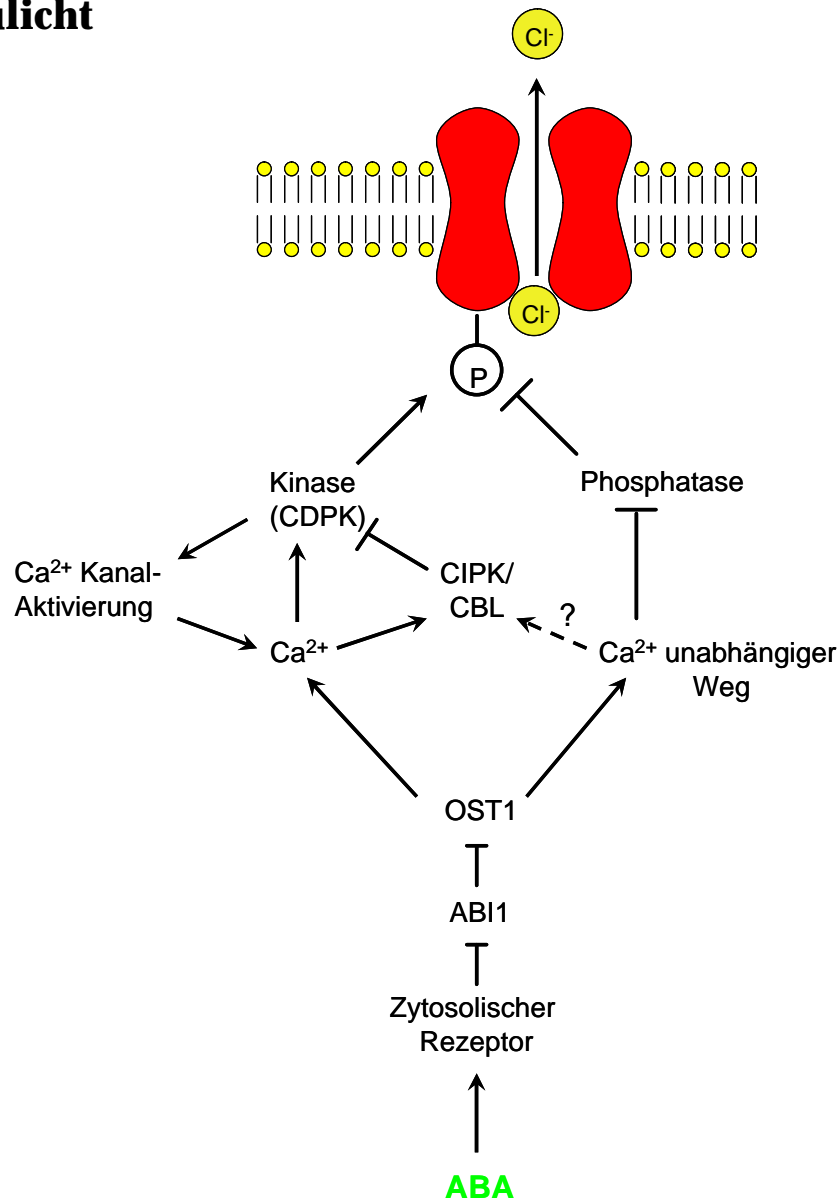


Abb. 3.5: Model für ABA induzierte Stimulierung der Anionenkanäle. ABA wird vermutlich über einen zytosolischen Rezeptor wahrgenommen und wirkt über Ca²⁺ abhängige und Ca²⁺ unabhängige Phosphorylierungsmechanismen. Nach der ABA Bindung an den Rezeptor wird eventuell ABI1 inhibiert und dadurch OST1 aktiviert (Yoshida *et al.*, 2006). OST1 aktiviert vermutlich über ROS den Ca²⁺ abhängigen Signalweg (McAinsh *et al.*, 1996; Mustilli *et al.*, 2002), könnte aber auch den Ca²⁺ unabhängigen einleiten. Ca²⁺ wirkt eventuell über eine CDPK. Diese könnte wie CPK3 und 6 aus *A. thaliana* zu einer Aktivierung und Phosphorylierung von Anionenkanälen als auch Ca²⁺ Kanälen und somit positiver Rückkopplung führen (Mori *et al.*, 2006). Zudem könnte Ca²⁺ CIPKs wie CIPK3 aktivieren, die eine Inhibition der Anionenkanalaktivität und somit negative Rückkopplung bewirken (Guo *et al.*, 2002). Der Ca²⁺ unabhängige Weg könnte eine Dephosphorylierung der Anionenkanäle verhindern. Das würde erklären, warum in patch clamp Experimenten ABA unter Ca²⁺ freien (vgl. Kapitel II, Fig. 7A) und Ca²⁺/ATP freien Bedingungen (Schwarz & Schroeder, 1998) den run-down der Anionenkanäle stark verzögert oder verhindert, diese aber nicht aktiviert. Der Ca²⁺ unabhängige müsste auch den Ca²⁺ abhängigen Weg inhibieren um zu erklären, dass ein Ca²⁺ Anstieg nach der transienten Anionenkanalantwort die Anionenkanäle nicht wieder aktiviert. Geschehen könnte dies durch eine Steigerung der Aktivität der CIPK bzw. deren Affinität für Ca²⁺ oder eine anderweitige Inhibition der Phosphorylierung der Anionenkanäle.

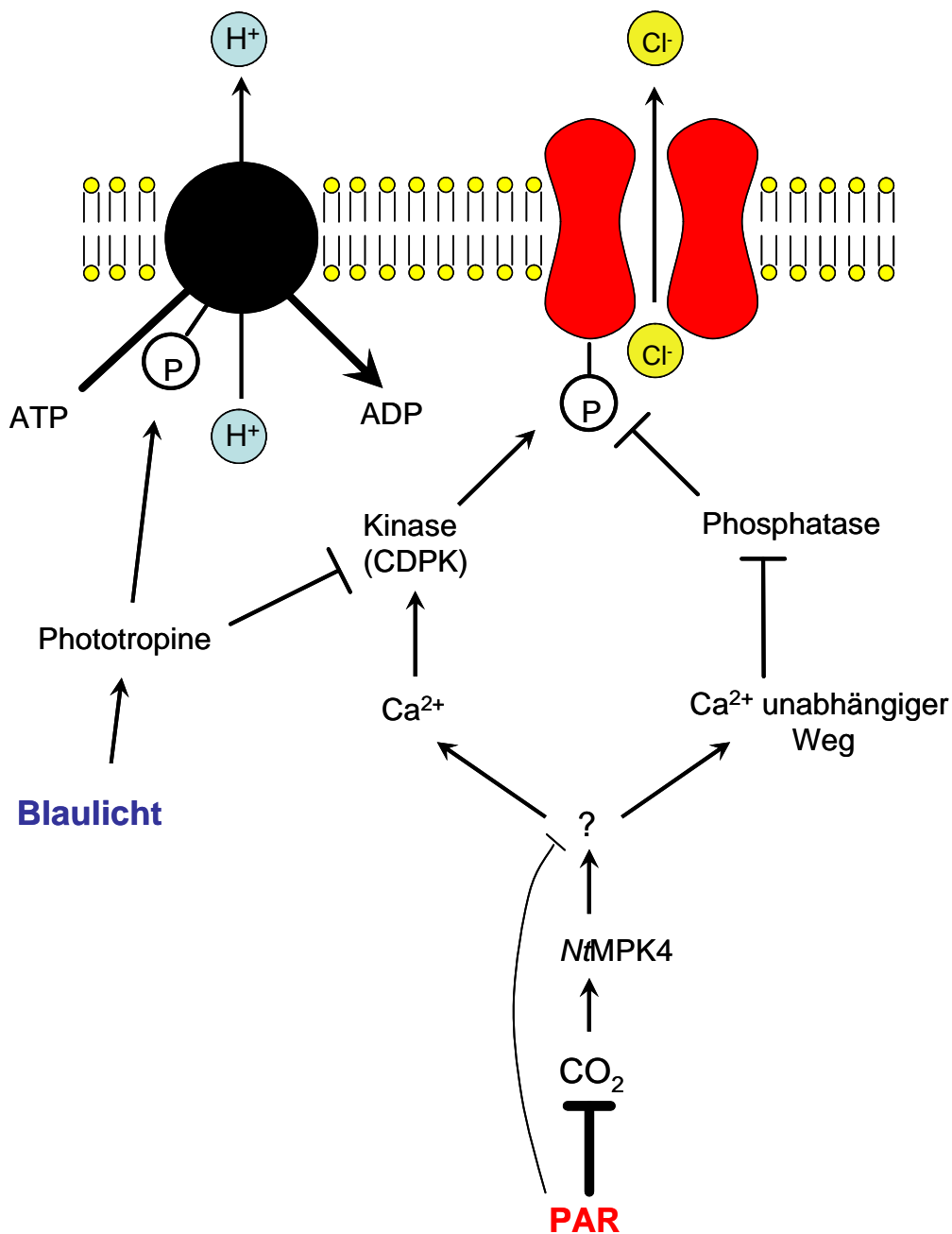


Abb. 3.6: Model für den Signalweg der Antworten auf PAR und Blaulicht. PAR reduziert die interzelluläre CO₂ Konzentration (Roelfsema *et al.*, 2002). Hohe CO₂ Konzentrationen in Abwesenheit von PAR aktivieren eventuell NtMPK4. Nach NtMPK4 könnte eine weitere Komponente im Signaltransduktionsweg kommen, die auch CO₂ unabhängig in Abwesenheit von PAR aktiviert werden kann und die zu einem Ca²⁺ abhängigen und einem Ca²⁺ unabhängigen Weg führt. Ca²⁺ könnte wie bei dem ABA Signalweg eine CDPK aktivieren, die ihrerseits die Anionenkanäle aktiviert. Diese Aktivierung wird eventuell von Blaulicht Phototropin abhängig gehemmt, wodurch die Anionenkanäle im Blaulicht ihre Ca²⁺ abhängige Stimulierung verlieren. Phototropine induzieren zusätzlich eine Aktivierung der H⁺-ATPase im Blaulicht (Assmann *et al.*, 1985). Der Ca²⁺ unabhängige Weg der PAR Signaltransduktion könnte, in Anlehnung an die ABA Reaktion, zu einer Deaktivierung einer Phosphatase führen, die die Anionenkanäle negativ reguliert. Eventuell ist die Deaktivierung dieser Phosphatase geringer bei der Dunkelheit/CO₂ als bei der ABA Reaktion und/oder der Ca²⁺ unabhängige Weg inhibiert nicht den Ca²⁺ abhängigen Weg. Das würde eine stärkere Abhängigkeit der durch Dunkelheit/CO₂ induzierten Antwort der Anionenkanäle von Ca²⁺ erklären.

3.5 Interaktionen von Licht, CO₂ und ABA bei der Stomabewegung

Licht in Form von Blaulicht und PAR führt zu einer Stomaöffnung, während CO₂ und ABA zum Stomaschluss führen. Blaulicht und eventuell PAR aktivieren dazu die H⁺-ATPase und beide deaktivieren die Anionenkanäle. CO₂ und ABA aktivieren andersherum die Anionenkanäle und deaktivieren eventuell die H⁺-ATPase. Dabei arbeiten die einzelnen Reaktionen, die zum Öffnen und Schließen der Stomata führen, unabhängig, synergistisch oder gegeneinander.

Der PAR Signalweg unterliegt zu einem großen Teil einer ständigen Rückkopplung durch die interzelluläre CO₂ Konzentration und passt so die Stomaweite der photosynthetischen Aktivität an (Roelfsema *et al.*, 2002; Roelfsema & Hedrich, 2005). Die Blaulichtantwort arbeitet hingegen direkter. Sie ist weitaus Lichtsensitiver als die PAR Antwort und unterliegt keiner vergleichbaren Rückkopplung, ist aber ohne PAR für sich alleine weniger wirkungsvoll (Shimazaki *et al.*, 2007 und Referenzen darin). Ein Vorteil wäre dies unter Bedingungen, bei denen von einem bald eintretenden höheren Bedarf an CO₂ für die Photosynthese ausgegangen werden kann. Eine Möglichkeit wäre in diesem Zusammenhang z.B. morgendliche schwache Sonneneinstrahlung. Eventuell unterstützt es auch die Stomaöffnung unter sich schnell verändernden Lichtverhältnissen, bei denen der PAR Effekt alleine zu langsam ist. Das könnte bei auftretender Bewölkung und damit verbundener wechselnder Helligkeit der Fall sein (Zeiger & Field, 1982). Die durch Blaulicht induzierte Stomaöffnung ist also neben der direkt photosynthetisch beeinflussten PAR Antwort eine weitere Möglichkeit, die Stomaweite anzupassen und den pflanzlichen Gaswechsel für die Photosynthese zu optimieren.

Während Blaulicht und PAR bei der Stomaöffnung miteinander Wechselwirken, findet dies zwischen ABA und CO₂ (Dunkelheit) beim Stomaschluss statt. ABA kann Anionenkanäle in der intakten Pflanze, und somit Stomaschluss, im Dunkeln wie im Licht, also unter hohen als auch niedrigen interzellulären CO₂ Konzentrationen, induzieren (vgl. Kapitel II, Roelfsema *et al.*, 2004). Wasserstress und somit einem akuten Bedrohungsstatus der Pflanze, könnte

3. Diskussion

dadurch immer direkt entgegengewirkt werden. Andersherum hängt möglicherweise die Antwort auf hohe CO₂ Konzentrationen in der intakten Pflanze stark von der ABA Konzentration im Blatt ab. So ist in Norfluorazon (NF) gebleichten *Vicia faba* der Stomaschluss durch hohe CO₂ Konzentrationen langsamer erfolgt als in unbehandelten Pflanzen. Hier konnte die Reaktion auf CO₂ maßgeblich durch geringe ABA Konzentrationen beschleunigt werden. Möglicherweise hat somit der mit nur 4% der normalen Konzentration sehr geringe Gehalt an ABA die verminderte Reaktivität auf CO₂ zur Folge. Da eine weite Öffnung der Stomata unter Wasser gesättigten Bedingungen nicht gefährlich für die Pflanze ist, besteht hier keine unbedingte Notwendigkeit die Stomata zu schließen. So könnte Transpiration und Xylemtransport aufrechterhalten werden und die Pflanze muss bei einem plötzlichen Anstieg der photosynthetischen Aktivität nicht erst die Stomata öffnen.

3.6 Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit wurden neue Kenntnisse gewonnen über die Beteiligung der Anionenkanäle an der Stomabewegung in der intakten Pflanze, sowie über die Signaltransduktion, die zu einer Veränderung der Anionenkanalaktivität führt. Ebenso wurde das Verständnis der CO₂/PAR Wahrnehmung erweitert und bei der Signaltransduktion dieser Stimuli die MAP-Kinase *NtMPK4* als beteiligte Komponente identifiziert. Je komplexer allerdings das Gesamtbild der Stomaregulation wird und je umfangreicher das Wissen um die daran beteiligten Prozesse, desto mehr neue Fragen kommen auf. Generell wäre eine genetische Identifizierung der S- und R-Typ Anionenkanäle sehr von Vorteil, um deren Regulation und Interaktion mit Liganden und anderen Proteinen molekularbiologisch studieren zu können. Ein Anfang wurde hier mit dem jüngst identifizierten Protein SLAC1 gemacht, welches einen Bestandteil oder ein Regulator des S-Typ Anionenkanals sein könnte (Vahisalu *et al.*, 2008; Negi *et al.*, 2008). Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ergeben sich jedoch erstmal auch konkretere Fragen. So scheint zwar Ca²⁺ bei der Reaktion auf Dunkelheit nach PAR Bestrahlung Anionenkanäle aktivieren zu können, aber bei der Antwort auf ABA scheint dessen Rolle unwichtig zu sein. Denn selbst bei Anstieg des Ca²⁺ kann ein Zusammenhang mit der Aktivität der Anionenkanäle nicht hergestellt werden. Hier muss die Zukunft noch zeigen, ob man mit dem Ca²⁺ unabhängigen und dem Ca²⁺ abhängigen ABA Signaltransduktionsweg 2 redundante Wege vorliegen hat, oder 2 Wege mit unterschiedlicher Funktion. Ca²⁺ könnte genauso gut andere Prozesse wie Genexpression, Ionenfreisetzung aus der Vakuole oder eine Deaktivierung der H⁺-ATPase regulieren und nicht die Anionenkanäle. Gleiches gilt womöglich zusätzlich für die Dunkelantwort, denn depolarisieren können Schließzellen bei dieser Antwort auch Ca²⁺ unabhängig.

Unklar ist nun auch, ob der PAR Effekt tatsächlich nur durch verringerte CO₂ Konzentrationen ausgelöst wird, oder ob es sich dabei eventuell nur um einen Teil des Signals handelt. Denn die *NtMPK4* antisense Pflanzen streuen Zweifel, sie reagieren nicht mehr auf niedrig/hoch CO₂, aber trotzdem noch geringfügig auf PAR. Die Restantwort bei PAR Bestrahlung könnte von veränderten apoplastischen Ionenkonzentrationen oder einer

Photosynthese bedingten Erhöhung der ATP/ADP Rate des Zytosols und Induktion der H⁺-ATPase bedingt sein. Elektrophysiologisch ergibt sich hier eine Schwierigkeit, denn die Auflösung der H⁺-ATPase gestaltet sich aufgrund der begleitenden Anionenkanalaktivität und fraglicher Selektivität und Effizienz von Anionenkanalblockern (*in planta*) als schwierig. Von Vorteil wäre auf jeden Fall die Charakterisierung des CO₂ Rezeptors und der darauf folgenden Signaltransduktion, um die CO₂/PAR Antwort besser zu verstehen.

Bei der durch Blaulicht ausgelösten Deaktivierung der Anionenkanäle stellt sich nun die Frage nach der auf die Phototropin Aktivierung folgenden Signaltransduktion. Denn die Aktivierung der H⁺-ATPase erfolgt scheinbar früher und deutlich transienter als die Deaktivierung der Anionenkanäle. Es wäre auch interessant zu erfahren, ob die Deaktivierung der Anionenkanäle mit deren Ca²⁺ Sensitivität zusammenhängt, oder ob sogar die hyperpolarisations-aktivierten Ca²⁺ Kanäle in Schließzellen durch Blaulicht reguliert werden. Eventuell könnte man das *in proto* untersuchen, *in planta* ist man durch die unzureichende Auflösung der Ca²⁺-Kanäle und mangelnde Kontrolle über die zytosolische Ionenzusammensetzung limitiert. Zudem kann man keine Messungen mit FURA2 oder anderen durch UV-Licht anzuregenden Farbstoffen bei der Blaulichtantwort der Stomata durchführen, da UV diese Antwort inhibiert (eigene unveröffentlichte Daten).

Neben neuen Erkenntnissen in der Stomaregulation hat sich somit aus dieser Arbeit eine Reihe von möglichen Ansatzpunkten für weiterführende Forschungsarbeit ergeben. Um die Stomabewegung in Antwort auf verschiedene Signale zu verstehen, müssen zudem noch verschiedene weitere wichtige Wissenslücken geschlossen werden. So ist die Identifizierung der Rezeptoren für ABA und CO₂ ebenso grundlegend, wie die kürzlich von einem Teilerfolg gekrönte Suche nach den Genen für die Anionenkanäle.

Zusammenfassung

Die Stomata in der Epidermis von Pflanzen sind Poren, die den Gasaustausch mit der Atmosphäre regulieren. Die Öffnungsweite der Stomata kann verändert werden, was eine Optimierung der CO₂ Aufnahme für die Photosynthese ermöglicht und gleichzeitig den Wasserverlust durch Transpiration minimiert. Um diese Funktion zu erfüllen, können Stomata verschiedene Stimuli wie Wasserstress (durch Abscisinsäure), Licht und CO₂ wahrnehmen. Die oben genannten Reize führen dann zu einer Aufnahme oder Abgabe von osmotisch aktiven Substanzen in zwei Schließzellen, welche die Stomaöffnung kontrollieren.

Die Rezeptoren zur Wahrnehmung dieser Stimuli, die intrazellulären Signalwege und die beteiligten Iontentransportproteine in den Schließzellen sind nur lückenhaft bekannt. In dieser Arbeit lag ein Hauptaugenmerk auf der Rolle von Anionenkanälen der Plasmamembran bei Stomabewegungen, sowie auf den Signalwegen welche diese Kanäle steuern. Die Aktivität der Anionenkanäle wurde mit der DEVC (Double Electrode Voltage Clamp) Einstich-Methode in Schließzellen in der intakten Pflanze gemessen, kombiniert mit Calcium Imaging durch den Ca²⁺ Indikator Farbstoff FURA2.

Stomaschlussreaktionen werden durch Abscisinsäure (ABA), CO₂ und Dunkelheit induziert und bei allen drei Stimuli konnten wir in *Nicotiana tabacum* eine Aktivierung von Anionenkanälen beobachten. Das führt zu Anionenefflux aus den Schließzellen und einer Depolarisation der Plasmamembran, was wiederum Kalium-Efflux-Kanäle spannungsabhängig aktiviert. Der resultierende Verlust osmotisch aktiver Teilchen führt dann zu Turgorabnahme der Schließzellen und Stomaschluss. Das zeitliche Muster der Anionenkanalaktivität bei dem Stomaschluss, ausgelöst durch CO₂, Dunkelheit und ABA war bei allen Reizen ähnlich. Es zeigte sich eine charakteristische transiente starke und darauf folgende schwächere Anionenkanalaktivität. Dieses konservierte Muster lässt Überschneidungen bei der Signaltransduktion der verschiedenen Stimuli vermuten. Die gesteigerte Aktivität der Anionenkanäle während der Reaktion auf ABA und Dunkelheit wurde in ungefähr der Hälfte der Antworten von einem Anstieg der zytosolischen Ca²⁺

4. Zusammenfassung

Konzentration begleitet. Bei beiden Stimuli scheinen somit Ca^{2+} abhängig und unabhängig Signale intrazellulär weitergeleitet zu werden. Allerdings war der Effekt der Ca^{2+} Signale auf die Aktivität der Anionenkanäle bei den beiden Stimuli unterschiedlich. Eine zytosolisch erhöhte Ca^{2+} Konzentration konnte bei Antworten auf ABA nicht mit einer erhöhten Anionenkanalaktivität in Verbindung gebracht werden, bei Dunkelheit hingegen wurde die Aktivität der Anionenkanäle in Anwesenheit von Ca^{2+} gesteigert.

Die wichtige Rolle von Anionenkanälen beim Stomaschluss lässt vermuten, dass ihre Deaktivierung eine Voraussetzung für eine Stomaöffnung ist. Blaulicht führt bei niedrigen Photonen-Fluss Raten zu Stomaöffnung und sollte daher Anionenkanäle inhibieren. Übereinstimmend damit konnten wir tatsächlich zeigen, dass Blaulicht in Schließzellen von *Vicia faba* und *Arabidopsis thaliana* Anionenkanäle deaktiviert. Diese Deaktivierung ist von den Phototropin-Blaulichtrezeptoren abhängig, da die Deaktivierung der Anionenkanäle in *Arabidopsis thaliana phot1/phot2* Doppelmутanten nicht beobachtet werden konnte.

Neben einer Blaulicht spezifischen Antwort öffnen Stomata auch in Antwort auf photosynthetisch aktive Strahlung (PAR). Die PAR Wahrnehmung scheint zu einem wesentlichen Teil über Veränderungen der interzellulären CO_2 Konzentration, ausgelöst durch die Photosyntheseaktivität des Mesophylls, stattzufinden (Roelfsema *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten wir in Schließzellen in Albino Blattarealen von *Chlorophytum comosum* und gebleichten *Vicia faba* keine Reaktion auf PAR beobachten, obwohl Schließzellen von *Chlorophytum comosum* in Albino Bereichen funktionierende Chloroplasten besitzen. Die Rolle von CO_2 bei der PAR Antwort haben wir des Weiteren in *NtMPK4* antisense Pflanzen untersucht. Stomata von *NtMPK4* antisense Pflanzen haben nicht auf Änderungen in der atmosphärischen CO_2 Konzentration reagiert und zeigten eine stark reduzierte Antwort auf PAR. Diese Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle der intrazellulären CO_2 Konzentration bei der PAR Antwort, sie zeigen aber auch, dass es anscheinend zusätzlich zu CO_2 noch ein weiteres PAR abhängiges Signal für Stomaöffnung gibt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Anionenkanäle bei den Stomabewegungen eine essentielle Rolle spielen. Verschiedene Stomaschluss-Stimuli lösen eine transiente

4. Zusammenfassung

Anionenkanalaktivierung aus, welche von einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration begleitet werden kann. Ein zytosolischer Ca^{2+} Anstieg bei Stomaschlussreaktionen scheint aber nicht generell zu einer Aktivierung der Anionenkanäle zu führen, sondern die Ca^{2+} Induzierbarkeit der Anionenkanäle von der Art des Stimulus abzuhängen. An der Anionenkanalaktivierung sind im Fall von Dunkelheit und CO_2 MAP-Kinasen beteiligt, welche somit eine wichtige Komponente oberhalb der Ca^{2+} unabhängigen als auch abhängigen Signaltransduktionswege sein könnten.

In zukünftigen Arbeiten könnte untersucht werden, welche genaue Rolle Ca^{2+} Signale während ABA und Dunkelreaktionen bei der Anionenkanalaktivierung haben und wie diese Kanäle anderweitig reguliert werden. Im Hinblick auf Licht-induzierte Stomaöffnung bleiben auch einige Fragen offen, wie z.B. welche Faktoren sorgen für eine PAR Antwort zusätzlich zu CO_2 , die Rolle von *NtMPK4* bei der Signaltransduktion in Antwort auf Dunkelheit/ CO_2 und generell ob MAP-Kinasen an der Stomaregulation beteiligt sind.

Summary

Stomata in the epidermis of plants are pores, which regulate the gas exchange with the atmosphere. The aperture of these stomata can be altered and thus enable the plant to optimize the uptake of CO₂ for photosynthesis, while minimizing loss of water via transpiration. To fulfil this function, stomata are able to sense several stimuli like water stress (through abscisic acid), light and CO₂. The mentioned stimuli can induce accumulation in or release of osmotically active substances from two guard cells that control the stomatal aperture.

The receptors for perception of these stimuli, the intracellular signal transduction pathways and the involved ion transporters of the guard cells are only partially resolved. This work focuses on the role of plasma membrane anion channels during stomatal movements and the signal transduction pathways that controls these channels. The activity of the anion channels was studied with the DEVC (double electrode voltage clamp) impalement method, in combination with FURA2 based calcium imaging in guard cells located in intact plants.

Closure of stomata is induced by abscisic acid (ABA), CO₂ and darkness and all these stimuli were found to activate anion channels in *Nicotiana tabacum*. This response not only leads to an anion efflux from the guard cells, but also causes depolarization of the plasma membrane, which in turn activates voltage dependent potassium efflux channels. As a result, osmotically active particles are lost, causing a decrease of the guard cell turgor and stomatal closure. The timing of anion channel activation in response to CO₂, darkness and ABA displayed a similar pattern for all three stimuli. It was characterized by a transient strong-, followed by a steady low activity of anion channels. This conserved pattern suggests conserved steps in the signal transduction pathways of these stimuli. The activation of anion channels in response to ABA and darkness was in approximately half of the responses accompanied by an increase in the cytosolic Ca²⁺ concentration. This suggests that ABA and darkness are transmitted through Ca²⁺-dependent as well as Ca²⁺-independent signalling pathways. However, the effect of Ca²⁺ signals on the degree on anion channel activity

5. Summary

differed for both stimuli. During ABA responses, an increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration could not be linked to enhanced anion channel activity, but Ca^{2+} signals were related to large anion currents in responses to darkness.

The important role of anion channels for inducing stomatal closure suggests that their deactivation is a prerequisite for stomatal opening. Blue light provokes stomatal opening, at low photon flux densities, and thus should inhibit anion channels in guard cells. We were able to show that blue light indeed deactivates anion channels in *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana*. This response depends on phototropin blue light receptors, because it was not observed in *Arabidopsis thaliana phot1/phot2* double mutants.

In addition to a blue light-specific response, stomata open in response to photosynthetically active radiation (PAR). The perception of PAR seems to depend mainly on a decrease of the intercellular CO_2 concentration, which is caused by photosynthetic activity of the mesophyll (Roelfsema *et al.*, 2002). In agree with this proposed mechanism, we observed no response to PAR in guard cells located in albino leaf areas of *Chlorophytum comosum* and bleached *Vicia faba*, even though guard cells of *Chlorophytum comosum* in albino areas contain functional chloroplasts. We further studied the role of CO_2 in the PAR response with *NtMPK4* antisense plants. Stomata of *NtMPK4* silenced plants did not respond to changes in the atmospheric CO_2 concentration and showed a strongly reduced response to PAR. These data thus confirms the important role of intracellular CO_2 in the PAR response, but also point to an additional PAR dependent signal for stomatal opening.

The results of this work show, that anion channels seem to play a pivotal role in the regulation of stomatal movements. Different stimuli, inducing stomatal closure, cause a transient activation of anion channels, which can be accompanied by an increase of the cytosolic Ca^{2+} concentration. However, an increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration does not generally lead to an increase in anion channel activity, thus the Ca^{2+} sensitivity seems to be stimulus specific. In case of darkness and CO_2 , MAP-Kinases are involved in anion channel activation and therefore seem to be an important component upstream of Ca^{2+} -dependent as well as Ca^{2+} -independent signal transduction pathways.

5. Summary

Future studies may elucidate the exact role of cytoplasmic Ca^{2+} signals during ABA and CO_2 induced anion channel activation or reveal alternative functions for activation of these channels. With respect to light induced stomatal opening many open questions remain, such as the factors that cause the PAR response in addition to CO_2 , the role of *NtMPK4* in the darkness/ CO_2 signal transduction and more general if MAP-Kinases are generally involved in regulation of stomatal movement.

6. Referenzen

- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., and Hedrich, R.** (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Letters* **486**, 93-98.
- Alexandre, J., and Lassalles, J.P.** (1990). Effect of D-Myo-Inositol 1,4,5-Trisphosphate on the Electrical-Properties of the Red Beet Vacuole Membrane. *Plant Physiology* **93**, 837-840.
- Allan, A.C., Fricker, M.D., Ward, J.L., Beale, M.H., and Trewavas, A.J.** (1994). Two Transduction Pathways Mediate Rapid Effects of Abscisic Acid in *Commelina* Guard Cells. *Plant Cell* **6**, 1319-1328.
- Allaway, W.G., and Mansfield, T.A.** (1967). Stomatal responses to changes in carbon dioxide concentration in leaves treated with 3-(4-chlorophenyl)-l,l-dimethylurea. *New Phytologist* **66**, 57-63.
- Allaway, W.G.** (1973). Accumulation of Malate in Guard Cells of *Vicia faba* During Stomatal Opening. *Planta* **110**, 63-70.
- Allen, G.J., and Sanders, D.** (1994). Two Voltage-Gated, Calcium Release Channels Coreside in the Vacuolar Membrane of Broad Bean Guard Cells. *Plant Cell* **6**, 685-694.
- Allen, G.J., Muir, S.R., and Sanders, D.** (1995). Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**, 735-737.
- Allen, G.J., and Sanders, D.** (1996). Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *The Plant Journal* **10**, 1055-1069.
- Allen, G.J., Kuchitsu, K., Chu, S.P., Murata, Y., and Schroeder, J.I.** (1999). *Arabidopsis abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *Plant Cell* **11**, 1785-1798.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**, 1053-1057.
- Armstrong, F., Leung, J., Grabov, A., Brearley, J., Giraudat, J., and Blatt, M.R.** (1995). Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K⁺ channels is suppressed by *abi1-1*, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9520-9524.
- Asai, N., Nakajima, N., Tamaoki, M., Kamada, H., and Kondo, N.** (2000). Role of malate synthesis mediated by phosphoenolpyruvate carboxylase in guard cells in the regulation of stomatal movement. *Plant and Cell Physiology* **41**, 10-15.

6. Referenzen

- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Assmann, S.M., Simoncini, L., and Schroeder, J.I.** (1985). Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **318**, 285-287.
- Assmann, S.M.** (1988). Enhancement of the Stomatal Response to Blue-Light by Red-Light, Reduced Intercellular Concentrations of CO₂, and Low Vapor-Pressure Differences. *Plant Physiology* **87**, 226-231.
- Assmann, S.M., and Shimazaki, K.** (1999). The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiology* **119**, 809-816.
- Assmann, S.M., Snyder, J.A., and Lee, Y.R.** (2000). ABA-deficient (*aba1*) and ABA-insensitive (*abi1-1*, *abi2-1*) mutants of *Arabidopsis* have a wild-type stomatal response to humidity. *Plant, Cell & Environment* **23**, 387-395.
- Babourina, O., Newman, I., and Shabala, S.** (2002). Blue light-induced kinetics of H⁺ and Ca²⁺ fluxes in etiolated wild-type and phototropin-mutant *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2433-2438.
- Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikhine, G., Frachisse, J., and Maurel, C.** (2000). Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 199-218.
- Baukrowitz, T., and Yellen, G.** (1995). Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* **15**, 951-960.
- Becker, D., Zeilinger, C., Lohse, G., Depta, H., and Hedrich, R.** (1993). Identification and biochemical characterization of the plasma-membrane H⁺-ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **190**, 44-50.
- Belin, C., de Franco, P.O., Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J.M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S.** (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiology* **141**, 1316-1327.
- Bergmann, D.C., Lukowitz, W., and Somerville, C.R.** (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* **304**, 1494-1497.

6. Referenzen

- Bethke, P.C., and Jones, R.L.** (1994). Ca²⁺-Calmodulin Modulates Ion Channel Activity in Storage Protein Vacuoles of Barley Aleurone Cells. *Plant Cell* **6**, 277-285.
- Bihler, H., Eing, C., Hebeisen, S., Roller, A., Czempinski, K., and Bertl, A.** (2005). TPK1 is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar cation channel. *Plant Physiology* **139**, 417-424.
- Blatt, M.R.** (1987). Electrical Characteristics of Stomatal Guard Cells: The Contribution of ATP-Dependent, "Electrogenic" Transport Revealed by Current-Voltage and Difference-Current-Voltage Analysis. *Journal of Membrane Biology* **98**, 257-274.
- Blatt, M.R.** (1988). Potassium-dependent, bipolar gating in K⁺ channels of guard cells. *Journal of Membrane Biology* **102**, 235-246.
- Blatt, M.R.** (1992). K⁺ channels of stomatal guard cells. Characteristics of the inward rectifier and its control by pH. *Journal of General Physiology* **99**, 615-644.
- Blatt, M.R., and Armstrong, F.** (1993). K⁺ Channels of Stomatal Guard-Cells - Abscisic-Acid-Evoked Control of the Outward Rectifier Mediated by Cytoplasmic pH. *Planta* **191**, 330-341.
- Boller, T., and Wiemken, A.** (1986). Dynamics of Vacuolar Compartmentation. *Annual Review of Plant Physiology* **37**, 137-164.
- Brearley, J., Venis, M.A., and Blatt, M.R.** (1997). The effect of elevated CO₂ concentrations on K⁺ and anion channels of *Vicia faba* L. guard cells. *Planta* **203**, 145-154.
- Briggs, W.R., and Christie, J.M.** (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**, 204-210.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., and Neill, S.J.** (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal* **45**, 113-122.
- Briskin, D.P., Basu, S., and Assmann, S.M.** (1995). Characterization of the Red Beet Plasma Membrane H⁺-ATPase Reconstituted in a Planar Bilayer System. *Plant Physiology* **108**, 393-398.
- Brüggemann L, Dietrich P, Becker D, Dreyer I, Palme K, and R, H.** (1999). Channel-mediated high-affinity K⁺ uptake into guard cells from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3298-3302.

6. Referenzen

- Camoni, L., Iori, V., Marra, M., and Aducci, P.** (2000). Phosphorylation-dependent interaction between plant plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 proteins. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9919-9923.
- Carpaneto, A., Cantu, A.M., and Gambale, F.** (2001). Effects of cytoplasmic Mg²⁺ on slowly activating channels in isolated vacuoles of *Beta vulgaris*. *Planta* **213**, 457-468.
- Cellier, F., Conejero, G., Ricaud, L., Luu, D.T., Lepetit, M., Gosti, F., and Casse, F.** (2004). Characterization of *AtCHX17*, a member of the cation/H⁺ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis. *The Plant Journal* **39**, 834-846.
- Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C., and Sheen, J.** (2002). Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiology* **129**, 469-485.
- Cheng, N.H., and Hirschi, K.D.** (2003). Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing *Arabidopsis* protein that associates with CAX1. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 6503-6509.
- Cheng, N.H., Liu, J.Z., Nelson, R.S., and Hirschi, K.D.** (2004). Characterization of CXIP4, a novel *Arabidopsis* protein that activates the H⁺/Ca²⁺ antiporter, CAX1. *FEBS Letters* **559**, 99-106.
- Cho, H.Y., Tseng, T.S., Kaiserli, E., Sullivan, S., Christie, J.M., and Briggs, W.R.** (2007). Physiological roles of the light, oxygen, or voltage domains of phototropin 1 and phototropin 2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**, 517-529.
- Choi, H.I., Park, H.J., Park, J.H., Kim, S., Im, M.Y., Seo, H.H., Kim, Y.W., Hwang, I., and Kim, S.Y.** (2005). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase *AtCPK32* interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiology* **139**, 1750-1761.
- Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E., and Briggs, W.R.** (1998). *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698-1701.
- Christie, J.M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., and Briggs, W.R.** (1999). LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8779-8783.
- Christie, J.M., Swartz, T.E., Bogomolni, R.A., and Briggs, W.R.** (2002). Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *The Plant Journal* **32**, 205-219.

6. Referenzen

- Christodoulakis, N.S., Menti, J., and Galatis, B.** (2002). Structure and development of stomata on the primary root of *Ceratonia siliqua* L. *Annals of Botany (Lond)* **89**, 23-29.
- Clapham, D.E.** (1995). Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-268.
- Cosgrove, D.J., and Hedrich, R.** (1991). Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **186**, 143-153.
- Cotelle, V., Pierre, J.-N., and Vavasseur, A.** (1999). Potential strong regulation of guard cell phosphoenolpyruvate carboxylase through phosphorylation. *Journal of Experimental Botany* **50**, 777-783.
- Cousson, A.** (2000). Analysis of the sensing and transducing processes implicated in the stomatal responses to carbon dioxide in *Commelia communis* L. *Plant, Cell and Environment* **23**, 487-495.
- D'Angelo, C., Weinl, S., Batistic, O., Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Schultke, S., Albrecht, V., Ehlert, B., Schulz, B., Harter, K., Luan, S., Bock, R., and Kudla, J.** (2006). Alternative complex formation of the Ca²⁺-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **48**, 857-872.
- Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H., and Cherel, I.** (1997). Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *Embo Journal* **16**, 3455-3463.
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.M., Thomine, S., Gambale, F., and Barbier-Brygoo, H.** (2006). The nitrate/proton antiporter *AtCLCa* mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**, 939-942.
- DeMichele, D.W., and Sharpe, P.J.** (1973). An analysis of the mechanics of guard cell motion. *Journal of Theoretical Biology* **41**, 77-96.
- DeSilva, D.L.R., Hetherington, A.M., and Mansfield, T.A.** (1985). Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. *New Phytologist* **100**, 473-482.
- DeSilva, D.L.R., Cox, R.C., Hetherington, A.M., and Mansfield, T.A.** (1985). Suggested involvement of calcium and calmodulin in the response of stomata to abscisic acid. *New Phytologist* **101**, 555-563.

6. Referenzen

- Dietrich, P., and Hedrich, R.** (1994). Interconversion of fast and slow gating modes of GCAC1 a Guard Cell Anion Channel. *Planta* **195**, 301-304.
- Dietrich, P., and Hedrich, R.** (1998). Anions permeate and gate GCAC1, a voltage-dependent guard cell anion channel. *The Plant Journal* **15**, 479-487.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Muller-Rober, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B., and Hedrich, R.** (1997). Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophysical Journal* **72**, 2143-2150.
- Droillard, M.J., Boudsocq, M., Barbler-Brygoo, H., and Lauriere, C.** (2002). Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions - Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Letters* **527**, 43-50.
- Drozdowicz, Y.M., and Rea, P.A.** (2001). Vacuolar H⁺ pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends in Plant Science* **6**, 206-211.
- Eckert, M., and Kaldenhoff, R.** (2000). Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1435-1442.
- Ehrhardt, T., Zimmermann, S., and Muller-Rober, B.** (1997). Association of plant K⁺(in) channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Letters* **409**, 166-170.
- Emi, T., Kinoshita, T., Sakamoto, K., Mineyuki, Y., and Shimazaki, K.** (2005). Isolation of a protein interacting with *Vfphot1a* in guard cells of *Vicia faba*. *Plant Physiology* **138**, 1615-1626.
- Emmerlich, V., Linka, N., Reinhold, T., Hurth, M.A., Traub, M., Martinoia, E., and Neuhaus, H.E.** (2003). The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11122-11126.
- Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peters, S.W., Keller, F., Baginsky, S., Martinoia, E., and Schmidt, U.G.** (2006). Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**, 196-207.
- Felle, H.** (1988). Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: Interaction of Ca²⁺ and pH? *Planta* **176**, 248-255.
- Felle, H.H., Hanstein, S., Steinmeyer, R., and Hedrich, R.** (2000). Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness. *The Plant Journal* **24**, 297-304.

6. Referenzen

- Fischer, R.A.** (1968). Stomatal opening: role of potassium uptake by guard cells. *Science* **160**, 784-785.
- Frachisse, J.M., Colcombet, J., Guern, J., and Barbier-Brygoo, H.** (2000). Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **21**, 361-371.
- Franks, P.J., Cowan, I.R., and Farquhar, G.D.** (1998). A study of stomatal mechanics using the cell pressure probe. *Plant, Cell & Environment* **21**, 94-100.
- Franks, P.J., Buckley, T.N., Shope, J.C., and Mott, K.A.** (2001). Guard Cell Volume and Pressure Measured Concurrently by Confocal Microscopy and the Cell Pressure Probe. *Plant Physiology*. **125**, 1577-1584.
- Franks, P.J., and Farquhar, G.D.** (2007). The Mechanical Diversity of Stomata and Its Significance in Gas-Exchange Control. *Plant Physiology*. **143**, 78-87.
- Frayse, L.C., Wells, B., McCann, M.C., and Kjellbom, P.** (2005). Specific plasma membrane aquaporins of the PIP1 subfamily are expressed in sieve elements and guard cells. *Biology of the Cell* **97**, 519-534.
- Frechilla, S., Talbott, L.D., Bogomolni, R.A., and Zeiger, E.** (2000). Reversal of blue light-stimulated stomatal opening by green light. *Plant and Cell Physiology* **41**, 171-176.
- Fuglsang, A.T., Tulinius, G., Cui, N., and Palmgren, M.G.** (2006). Protein phosphatase 2A scaffolding subunit A interacts with plasma membrane H⁺-ATPase C-terminus in the same region as 14-3-3 protein. *Physiologia Plantarum* **128**, 334-340.
- Fuglsang, A.T., Guo, Y., Cuin, T.A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K.A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K.S., Palmgren, M.G., and Zhu, J.K.** (2007). *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* **19**, 1617-1634.
- Garcia-Mata, C., and Lamattina, L.** (2002). Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiology* **128**, 790-792.
- Geelen, D., Lurin, C., Bouchez, D., Frachisse, J.M., Lelievre, F., Courtial, B., Barbier-Brygoo, H., and Maurel, C.** (2000). Disruption of putative anion channel gene *AtCLC-a* in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content. *The Plant Journal* **21**, 259-267.

6. Referenzen

- Gilroy, S., Read, N.D., and Trewavas, A.J.** (1990). Elevation of Cytoplasmic Calcium by Caged Calcium or Caged Inositol Trisphosphate Initiates Stomatal Closure. *Nature* **346**, 769-771.
- Gilroy, S., Fricker, M.D., Read, N.D., and Trewavas, A.J.** (1991). Role of Calcium in Signal Transduction of Commelina Guard Cells. *Plant Cell* **3**, 333-344.
- Goh, C.H., Kinoshita, T., Oku, T., and Shimazaki, K.I.** (1996). Inhibition of blue light-dependent H⁺ pumping by abscisic acid in *Vicia* guard-cell protoplasts. *Plant Physiology* **111**, 433-440.
- Gomi, K., Seo, S., Ogawa, D., Kamada, H., Nakajima, N., Saji, H., and Ohashi, Y.** (2005). Activation of a mitogen-activated protein kinase *NtMPK4* is involved in ozone tolerance mediated JA signaling pathway in tobacco. *Plant and Cell Physiology* **46**, S128-S128.
- Grabov, A., and Blatt, M.R.** (1997). Parallel control of the inward-rectifier K⁺ channel by cytosolic free Ca²⁺ and pH in *Vicia* guard cells. *Planta* **201**, 84-95.
- Grabov, A., Leung, J., Giraudat, J., and Blatt, M.R.** (1997). Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *The Plant Journal* **12**, 203-213.
- Grabov, A., and Blatt, M.R.** (1998). Membrane voltage initiates Ca²⁺ waves and potentiates Ca²⁺ increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4778-4783.
- Grabov, A., and Blatt, M.R.** (1999). A steep dependence of inward-rectifying potassium channels on cytosolic free calcium concentration increase evoked by hyperpolarization in guard cells. *Plant Physiology* **119**, 277-288.
- Gudesblat, G.E., Iusem, N.D., and Morris, P.C.** (2007). Guard cell-specific inhibition of Arabidopsis MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytologist* **173**, 713-721.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C.P., Gong, D., Halfter, U., and Zhu, J.K.** (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **3**, 233-244.
- Guo, F.Q., Young, J., and Crawford, N.M.** (2003). The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 107-117.

6. Referenzen

- Hamilton, D.W., Hills, A., Kohler, B., and Blatt, M.R.** (2000). Ca^{2+} channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4967-4972.
- Hamilton, D.W., Hills, A., and Blatt, M.R.** (2001). Extracellular Ba^{2+} and voltage interact to gate Ca^{2+} channels at the plasma membrane of stomatal guard cells. *FEBS Letters* **491**, 99-103.
- Han, S., Tang, R., Anderson, L.K., Woerner, T.E., and Pei, Z.M.** (2003). A cell surface receptor mediates extracellular Ca^{2+} sensing in guard cells. *Nature* **425**, 196-200.
- Hanstein, S.M., and Felle, H.H.** (2002). CO_2 -triggered chloride release from guard cells in intact *fava* bean leaves. Kinetics of the onset of stomatal closure. *Plant Physiology* **130**, 940-950.
- Harada, A., Sakai, T., and Okada, K.** (2003). Phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca^{2+} differently in *Arabidopsis* leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8583-8588.
- Harper, J.F., Hong, B., Hwang, I., Guo, H.Q., Stoddard, R., Huang, J.F., Palmgren, M.G., and Sze, H.** (1998). A novel calmodulin-regulated Ca^{2+} -ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal autoinhibitory domain. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 1099-1106.
- Hartung, W., Sauter, A., and Hose, E.** (2002). Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany* **53**, 27-32.
- Hashimoto, M., Negi, J., Young, J., Israelsson, M., Schroeder, J.I., and Iba, K.** (2006). *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO_2 . *Nature* **8**, 391-397.
- Hedrich, R., Flügge, U.I., and Fernandez, J.M.** (1986). Patch-clamp studies of ion-transport in isolated plant vacuoles. *FEBS Letters* **204**, 228-232.
- Hedrich, R., and Neher, E.** (1987). Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature* **329**, 833-836.
- Hedrich, R., Kurkdjian, A., Guern, J., and Flugge, U.I.** (1989). Comparative studies on the electrical properties of the H^+ translocating ATPase and pyrophosphatase of the vacuolar-lysosomal compartment. *Embo Journal* **8**, 2835-2841.
- Hedrich, R., Busch, H., and Raschke, K.** (1990). Ca^{2+} and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Embo Journal* **9**, 3889-3892.

6. Referenzen

- Hedrich, R., and Marten, I.** (1993). Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells. *Embo Journal* **12**, 897-901.
- Hentzen, A.E., Smart, L.B., Wimmers, L.E., Fang, H.H., Schroeder, J.I., and Bennett, A.B.** (1996). Two plasma membrane H⁺-ATPase genes expressed in guard cells of *Vicia faba* are also expressed throughout the plant. *Plant and Cell Physiology* **37**, 650-659.
- Hertel, B., Horvath, F., Wodala, B., Hurst, A., Moroni, A., and Thiel, G.** (2005). KAT1 inactivates at sub-millimolar concentrations of external potassium. *Journal of Experimental Botany* **56**, 3103-3110.
- Hetherington, A.M., and Brownlee, C.** (2004). The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 401-427.
- Hirayama, T., and 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**, 343-351.
- Hirschi, K.D., Zhen, R.G., Cunningham, K.W., Rea, P.A., and Fink, G.R.** (1996). CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8782-8786.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., Simonneau, T., Thibaud, J.B., and Sentenac, H.** (2003). The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5549-5554.
- Humble, G.D., and Hsiao, T.C.** (1969). Specific Requirement of Potassium for Light-Activated Opening of Stomata in Epidermal Strips. *Plant Physiology* **44**, 230-234.
- Humble, G.D., and Raschke, K.** (1971). Stomatal Opening Quantitatively Related to Potassium Transport: Evidence from Electron Probe Analysis. *Plant Physiology* **48**, 447-453.
- Hurth, M.A., Suh, S.J., Kretschmar, T., Geis, T., Bregante, M., Gambale, F., Martinoia, E., and Neuhaus, H.E.** (2005). Impaired pH homeostasis in *Arabidopsis* lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiology* **137**, 901-910.
- Hwang, I., Sze, H., and Harper, J.F.** (2000). A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6224-6229.

6. Referenzen

- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S.Q., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y., Walker, J.C., Grp, M., and Walker, J.C.** (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. Trends in Plant Science **7**, 301-308.
- Iino, M., Ogawa, T., and Zeiger, E.** (1985). Kinetic properties of the blue-light response of stomata. Proc Natl Acad Sci U S A **82**, 8019-8023.
- Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M., and Yokoyama, K.** (2003). Evidence for rotation of V1-ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 2312-2315.
- Inada, S., Ohgishi, M., Mayama, T., Okada, K., and Sakai, T.** (2004). RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell **16**, 887-896.
- Ivashikina, N., Deeken, R., Ache, P., Kranz, E., Pommerrenig, B., Sauer, N., and Hedrich, R.** (2003). Isolation of *AtSUC2* promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. The Plant Journal **36**, 931-945.
- Jarvis, R.G., and Mansfield, T.A.** (1980). Reduced stomatal responses to light, carbon dioxide and abscisic acid in the presence of sodium ions. Plant, Cell & Environment **3**, 279-283.
- Jiang, J., Wang, P., An, G., Wang, P., and Song, C.-P.** The involvement of a P38-like MAP kinase in ABA-induced and H₂O₂-mediated stomatal closure in *Vicia faba* L. Plant Cell Reports.
- Johnston, C.A., Temple, B.R., Chen, J.-G., Gao, Y., Moriyama, E.N., Jones, A.M., Siderovski, D.P., and Willard, F.S.** (2007). Comment on "A G Protein-Coupled Receptor Is a Plasma Membrane Receptor for the Plant Hormone Abscisic Acid". Science **318**.
- Karlsson, P., Höglund, H.-O., and Klockare, R.** (1983). Blue light induces stomatal transpiration in wheat seedlings with chlorophyll deficiency caused by SAN 9789. Physiologia Plantarum **57**, 417-421.
- Kasahara, M., Swartz, T.E., Olney, M.A., Onodera, A., Mochizuki, N., Fukuzawa, H., Asamizu, E., Tabata, S., Kanegae, H., Takano, M., Christie, J.M., Nagatani, A., and Briggs, W.R.** (2002). Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from Arabidopsis, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology **129**, 762-773.
-

6. Referenzen

- Kasai, M., and Muto, S.** (1990). Ca^{2+} pump and $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter in plasma membrane vesicles isolated by aqueous two-phase partitioning from corn leaves. *Journal of Membrane Biology* **114**, 133-142.
- Kennis, J.T.M., van Stokkum, I.H.M., Crosson, S., Gauden, M., Moffat, K., and van Grondelle, R.** (2004). The LOV2 Domain of Phototropin: A Reversible Photochromic Switch. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 4512-4513.
- Keller, B.U., Hedrich, R., and Raschke, K.** (1989). Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature* **341**, 450-452.
- Kim, K.N., Cheong, Y.H., Grant, J.J., Pandey, G.K., and Luan, S.** (2003). CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 411-423.
- Kinoshita, T., Nishimura, M., and Shimazaki, K.** (1995). Cytosolic Concentration of Ca^{2+} Regulates the Plasma Membrane H^{+} -ATPase in Guard Cells of *Fava* Bean. *Plant Cell* **7**, 1333-1342.
- Kinoshita, T., and Shimazaki, K.** (1999). Blue light activates the plasma membrane H^{+} -ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *Embo Journal* **18**, 5548-5558.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., and Shimazaki, K.** (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656-660.
- Kinoshita, T., Emi, T., Tominaga, M., Sakamoto, K., Shigenaga, A., Doi, M., and Shimazaki, K.** (2003). Blue-light- and phosphorylation-dependent binding of a 14-3-3 protein to phototropins in stomatal guard cells of broad bean. *Plant Physiology* **133**, 1453-1463.
- Klein, M., Cheng, G., Chung, M., and Tallman, G.** (1996). Effects of turgor potentials of epidermal cells neighbouring guard cells on stomatal opening in detached leaf epidermis and intact leaflets of *Vicia faba* L. (faba bean). *Plant, Cell & Environment* **19**, 1399-1407.
- Kluge, C., Lahr, J., Hanitzsch, M., Bolte, S., Gollack, D., and Dietz, K.J.** (2003). New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H^{+} -ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **35**, 377-388.
- Klüsener, B., Young, J.J., Murata, Y., Allen, G.J., Mori, I.C., Hugouvieux, V., and Schroeder, J.I.** (2002). Convergence of Calcium Signaling Pathways of Pathogenic Elicitors and Abscisic Acid in *Arabidopsis* Guard Cells. *Plant Physiology* **130**, 2152-2163.

6. Referenzen

- Kohler, B., and Blatt, M.R.** (2002). Protein phosphorylation activates the guard cell Ca²⁺ channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. *The Plant Journal* **32**, 185-194.
- Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T., and Koshiba, T.** (2004). Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**, 1697-1707.
- Kolla, V.A., Vavasseur, A., and Raghavendra, A.S.** (2007). Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*. *Planta* **225**, 1421-1429.
- Kong, S.G., Kinoshita, T., Shimazaki, K., Mochizuki, N., Suzuki, T., and Nagatani, A.** (2007). The C-terminal kinase fragment of *Arabidopsis* phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses. *The Plant Journal* **51**, 862-873.
- Koornneef, M., Reuling, G., and Karsen, C.M.** (1984). The isolation of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **61**, 377-383.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., and Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2940-2945.
- Krinke, O., Novotna, Z., Valentova, O., and Martinec, J.** (2007). Inositol trisphosphate receptor in higher plants: is it real? *Journal of Experimental Botany* **58**, 361-376.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G., and Schroeder, J.I.** (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **22** 2623-2633.
- Lasceve, G., Leymarie, J., and Vavasseur, A.** (1997). Alterations in light-induced stomatal opening in a starch-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* L. deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant, Cell & Environment* **20**, 350-358.
- Latorre, R., Olcese, R., Basso, C., Gonzalez, C., Munoz, F., Cosmelli, D., and Alvarez, O.** (2003). Molecular coupling between voltage sensor and pore opening in the *Arabidopsis* inward rectifier K⁺ channel KAT1. *Journal of General Physiology* **122**, 459-469.
- Leckie, C.P., McAinsh, M.R., Allen, G.J., Sanders, D., and Hetherington, A.M.** (1998). Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15837-15842.

6. Referenzen

- Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H.-Y., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J.M., Lee, I.-J., and Hwang, I.** (2006). Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. *Cell* **126**, 1109–1120.
- Lemtiri-Chlieh, F., MacRobbie, E.A., Webb, A.A., Manison, N.F., Brownlee, C., Skepper, J.N., Chen, J., Prestwich, G.D., and Brearley, C.A.** (2003). Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10091-10095.
- Levchenko, V., Konrad, K.R., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., and Hedrich, R.** (2005). Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4203-4208.
- Lew, R.R.** (2004). Osmotic effects on the electrical properties of *Arabidopsis* root hair vacuoles in situ. *Plant Physiology* **134**, 352-360.
- Leymarie, J., Vavasseur, A., and Lascève, G.** (1998). CO₂ sensing in stomata of *abi1-1* and *abi2-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 539-543.
- Leymarie, J., Lascève, G., and Vavasseur, A.** (1998). Interaction of stomatal responses to ABA and CO₂ in *Arabidopsis thaliana*. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**, 785-791.
- Leymarie, J., Lascève, G., and Vavasseur, A.** (1999). Elevated CO₂ enhances stomatal responses to osmotic stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* **22**, 301-308.
- Li, J., and Assmann, S.M.** (1996). An Abscisic Acid-Activated and Calcium-Independent Protein Kinase from Guard Cells of *Fava* Bean. *Plant Cell* **8**, 2359-2368.
- Li, J., Lee, Y.R., and Assmann, S.M.** (1998). Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiology* **116**, 785-795.
- Li, J., Wang, X.Q., Watson, M.B., and Assmann, S.M.** (2000). Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* **287**, 300-303.
- Li, Y., Wang, G.-X., Xin, M., Yang, H.-M., Wu, X.-J., and Li, T.** (2004). The parameters of guard cell calcium oscillation encodes stomatal oscillation and closure in *Vicia faba*. *Plant Science* **166**, 415–421.
- Linder, B., and Raschke, K.** (1992). A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Letters* **313**, 27-30.

6. Referenzen

- Lino, B., Baizabal-Aguirre, V.M., and Vara, L.E.G.d.I.** (1998). The plasma-membrane H⁺-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta* **204**, 352-359.
- Liu, X.G., Yue, Y.L., Li, B., Nie, Y.L., Li, W., Wu, W.H., and Ma, L.G.** (2007). A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* **315**, 1712-1716.
- Lohse, G., and Hedrich, R.** (1992). Characterization of the plasma-membrane H⁺-ATPase from *Vicia faba* guard cells. *Planta* **188**, 206-214.
- Lohse, G., and Hedrich, R.** (1995). Anions modify the response of guard-cell anion channels to auxin. *Planta* **197**, 546-552.
- Luan, S., Li, W., Rusnak, F., Assmann, S.M., and Schreiber, S.L.** (1993). Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2202-2206.
- Luoni, L., Bonza, M.C., and Michelis, M.I.D.** (2000). H⁺/Ca²⁺ exchange driven by the plasma membrane Ca²⁺-ATPase of *Arabidopsis thaliana* reconstituted in proteoliposomes after calmodulin-affinity purification. *FEBS Letters* **482**, 225-230.
- Lurin, C., Guclu, J., Cheniclet, C., Carde, J.P., Barbier-Brygoo, H., and Maurel, C.** (2000). CLC-Nt1, a putative chloride channel protein of tobacco, co-localizes with mitochondrial membrane markers. *Biochemical Journal* **348**, 291-295.
- Macallum, A.G.** (1905). On the distribution of potassium in animal and vegetable cells. *Journal of Physiology (London)* **52**, 95-128.
- MacRobbie, E.A.C.** (1984). Effects of Light/Dark on Anion Fluxes in Isolated Guard Cells of *Commelina communis* L. *Journal of Experimental Botany* **35**, 707-726.
- MacRobbie, E.A.C.** (1995). ABA-induced ion efflux in stomatal guard cells: multiple actions of ABA inside and outside the cell. *The Plant Journal* **7**, 565-576.
- MacRobbie, E.A.C.** (2000). ABA activates multiple Ca²⁺ fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K⁺(Rb⁺) release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12361-12368.
- MacRobbie, E.A.C.** (2006). Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1135-1140.

6. Referenzen

- Mao, J., Zhang, Y.C., Sang, Y., Li, Q.H., and Yang, H.Q.** (2005). A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12270-12275.
- Marra, M., Fullone, M.R., Fogliano, V., Pen, J., Mattei, M., Masi, S., and Aducci, P.** (1994). The 30-kilodalton protein present in purified fusicoccin receptor preparations is a 14-3-3-like protein. *Plant Physiology* **106**, 1497-1501.
- Marten, I., and Hoshi, T.** (1998). The N-terminus of the K channel KAT1 controls its voltage-dependent gating by altering the membrane electric field. *Biophysical Journal* **74**, 2953-2962.
- Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K.A., Hoshi, T., and Hedrich, R.** (1999). AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked by protons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7581-7586.
- Martinoia, E., Massonneau, A., and Frangne, N.** (2000). Transport Processes of Solutes across the Vacuolar Membrane of Higher Plants. *Plant and Cell Physiology*. **41**, 1175-1186.
- Martinoia, E., Maeshima, M., and Neuhaus, H.E.** (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**, 83-102.
- Matsuoka, D., and Tokutomi, S.** (2005). Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13337-13342.
- McAinsh, M.R., Brownlee, C., and Hetherington, A.M.** (1990). Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca²⁺ precedes stomatal closure. *Nature* **343**, 186-188.
- McAinsh, M.R., Brownlee, C., and Hetherington, A.M.** (1992). Visualizing Changes in Cytosolic-Free Ca²⁺ during the Response of Stomatal Guard Cells to Abscisic Acid. *Plant Cell* **4**, 1113-1122.
- McAinsh, M.R., Webb, A., Taylor, J.E., and Hetherington, A.M.** (1995). Stimulus-Induced Oscillations in Guard Cell Cytosolic Free Calcium. *Plant Cell* **7**, 1207-1219.
- McAinsh, M.R., Clayton, H., Mansfield, T.A., and Hetherington, A.M.** (1996). Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiology* **111**, 1031-1042.
- McCormac, A.C., and Terry, M.J.** (2004). The nuclear genes Lhcb and HEMA1 are differentially sensitive to plastid signals and suggest distinct roles for the GUN1 and GUN5 plastid-signalling pathways during de-etiolation. *The Plant Journal* **40**, 672-685.

6. Referenzen

- Meckel, T., Hurst, A.C., Thiel, G., and Homann, U.** (2004). Endocytosis against high turgor: intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged K⁺-channel KAT1. *The Plant Journal* **39**, 182-193.
- Menke, F.L.H., van Pelt, J.A., Pieterse, C.M.J., and Klessig, D.F.** (2004). Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 897-907.
- Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., Vavasseur, A., Genty, B., Boivin, K., Muller, A., Giraudat, M., and Leung, J.** (2007). Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *Embo Journal* **26**, 3216-3226.
- Miedema, H., and Assmann, S.M.** (1996). A membrane-delimited effect of internal pH on the K⁺ outward rectifier of *Vicia faba* guard cells. *Journal of Membrane Biology* **154**, 227-237.
- Mishra, G., Zhang, W., Deng, F., Zhao, J., and Wang, X.** (2006). A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* **312**, 264-266.
- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriach, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M., and Schroeder, J.I.** (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biology* **4**, e327.
- Mott, K.A.** (1988). Do Stomata Respond to CO₂ Concentrations Other Than Intercellular. *Plant Physiology* **86**, 200-203.
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., and Giraudat, J.** (2002). *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**, 3089-3099.
- Nakamura, A., Fukuda, A., Sakai, S., and Tanaka, Y.** (2006). Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* **47**, 32-42.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., and Iba, K.** (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 2008, published online before print
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., and Hancock, J.T.** (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1237-1247.

6. Referenzen

- Neuhaus, H.E.** (2007). Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Letters* **581**, 2223-2226.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., and Zhu, J.-K.** (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11771-11776.
- Olsen, R.L., Pratt, R.B., Gump, P., Kemper, A., and Tallman, G.** (2002). Red light activates a chloroplast-dependent ion uptake mechanism for stomatal opening under reduced CO₂ concentrations in *Vicia spp.* *New Phytologist* **153**, 497-508.
- Ortiz-Masia, D., Perez-Amador, M.A., Carbonell, J., and Marcote, M.J.** (2007). Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581**, 1834-1840.
- Outlaw, W.H., and Manchester, J.** (1979). Guard Cell Starch Concentration Quantitatively Related to Stomatal Aperture. *Plant Physiology* **64**, 79-82.
- Outlaw, W.H.J.** (1980). A descriptive evaluation of quantitative histochemical methods based on pyridine nucleotides. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 299-311.
- Overlach, S., Diekmann, W., and Raschke, K.** (1993). Phosphate Translocator of Isolated Guard-Cell Chloroplasts from *Pisum sativum* L. Transports Glucose-6-Phosphate. *Plant Physiology* **101**, 1201-1207.
- Palmgren, M.G., Sommarin, M., Serrano, R., and Larsson, C.** (1991). Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 20470-20475.
- Pandey, S., Zhang, W., and Assmann, S.M.** (2007). Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters* **581**, 2325-2336.
- Pardo, L.A., Heinemann, S.H., Terlau, H., Ludewig, U., Lorra, C., Pongs, O., and Stuhmer, W.** (1992). Extracellular K⁺ specifically modulates a rat brain K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2466-2470.
- Park, K.Y., Jung, J.Y., Park, J., Hwang, J.U., Kim, Y.W., Hwang, I., and Lee, Y.** (2003). A role for phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells. *Plant Physiology* **132**, 92-98.

6. Referenzen

- Pei, Z.M., Ward, J.M., Harper, J.F., and Schroeder, J.I.** (1996). A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *Embo Journal* **15**, 6564-6574.
- Pei, Z.M., Kuchitsu, K., Ward, J.M., Schwarz, M., and Schroeder, J.I.** (1997). Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell* **9**, 409-423.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.
- Penny, M.G., Kelday, L.S., and Bowling, D.J.F.** (1976). Active Chloride Transport in the Leaf Epidermis of *Commelina communis* in Relation to Stomatal Activity. *Planta* **130**, 291-294.
- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Cherel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.B., and Sentenac, H.** (2001). Guard cell inward K⁺ channel activity in *Arabidopsis* involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 3215-3221.
- Pittman, J.K., and Hirschi, K.D.** (2003). Don't shoot the (second) messenger: endomembrane transporters and binding proteins modulate cytosolic Ca²⁺ levels. *Current Opinions in Plant Biology* **6**, 257-262.
- Raschke, K., and Dickerson, M.** (1972). Changes in shape and volume of guard cells during stomatal movement. *Plant Research* **1972**, 153-154.
- Raschke, K.** (1975). Stomatal Action. *Annual Review of Plant Physiology* **26**, 309-340.
- Raschke, K., and Schnabl, H.** (1978). Availability of Chloride Affects the Balance between Potassium Chloride and Potassium Malate in Guard Cells of *Vicia faba* L. *Plant Physiology* **62**, 84-87.
- Raschke, K., Hanebuth, W.F., and Farquhar, G.D.** (1978). Relationship Between Stomatal Conductance and Light Intensity in Leaves of *Zea mays* L., Derived From Experiments Using the Mesophyll as Shade. *Planta* **139**, 73-77.
- Raschke, K.** (2003). Alternation of the slow with the quick anion conductance in whole guard cells effected by external malate. *Planta* **217**, 651-657.
- Raschke, K., Shabahang, M., and Wolf, R.** (2003). The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. *Planta* **217**, 639-650.

6. Referenzen

- Rasi-Caldogno, F., Pugliarello, M.C., and De Michelis, M.I.** (1987). The Ca²⁺-Transport ATPase of Plant Plasma Membrane Catalyzes an H⁺/Ca²⁺ Exchange. *Plant Physiology* **83**, 994-1000.
- Razem, F.A., El-Kereamy, A., Abrams, S.R., and Hill, R.D.** (2006). The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**, 290-294.
- Reckmann, U., Scheibe, R., and Raschke, K.** (1990). Rubisco Activity in Guard Cells Compared with the Solute Requirement for Stomatal Opening. *Plant Physiology* **92**, 246-253.
- Reddy, A.R., and Das, V.S.R.** (1986). Stomatal Movement and Sucrose Uptake by Guard Cell Protoplasts of *Commelina benghalensis* L. *Plant and Cell Physiology*. **27**, 1565-1570.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K., and Hedrich, R.** (2002). AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel alpha -subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4079-4084.
- Ritte, G., Rosenfeld, J., Rohrig, K., and Raschke, K.** (1999). Rates of sugar uptake by guard cell protoplasts of *Pisum sativum* L. Related To the solute requirement for stomatal opening. *Plant Physiology* **121**, 647-656.
- Roelfsema, M.R.G., and Prins, H.B.A.** (1995). Effect of abscisic acid on stomatal opening in isolated epidermal strips of abi mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **95**, 373-378.
- Roelfsema, M.R., and Prins, H.B.** (1998). The membrane potential of *Arabidopsis thaliana* guard cells; depolarizations induced by apoplastic acidification. *Planta* **205**, 100-112.
- Roelfsema, M.R., Steinmeyer, R., Staal, M., and Hedrich, R.** (2001). Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *The Plant Journal* **26**, 1-13.
- Roelfsema, M.R., Hanstein, S., Felle, H.H., and Hedrich, R.** (2002). CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *The Plant Journal* **32**, 65-75.
- Roelfsema, M.R.G., and Hedrich, R.** (2002). Studying guard cells in the intact plant: modulation of stomatal movement by apoplastic factors. *New Phytologist* **153**, 425-431.
- Roelfsema, M.R., Levchenko, V., and Hedrich, R.** (2004). ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *The Plant Journal* **37**, 578-588.
- Roelfsema, M.R., and Hedrich, R.** (2005). In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist* **167**, 665-691.
-

6. Referenzen

- Romano, L.A., Jacob, T., Gilroy, S., and Assmann, S.M.** (2000). Increases in cytosolic Ca²⁺ are not required for abscisic acid-inhibition of inward K⁺ currents in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **211**, 209-217.
- Rutschmann, F., Stalder, U., Piotrowski, M., Oecking, C., and Schaller, A.** (2002). LeCPK1, a Calcium-Dependent Protein Kinase from Tomato. Plasma Membrane Targeting and Biochemical Characterization. *Plant Physiology* **129**, 156-168.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., and Okada, K.** (2001). Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6969-6974.
- Sakamoto, K., and Briggs, W.R.** (2002). Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* **14**, 1723-1735.
- Salomon, M., Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U., and Briggs, W.R.** (2000). Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., and Harper, J.F.** (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**, S401-417.
- Sarda, X., Tusch, D., Ferrare, K., Legrand, E., Dupuis, J.M., Casse-Delbart, F., and Lamaze, T.** (1997). Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *The Plant Journal* **12**, 1103-1111.
- Sauter, A., Dietz, K.J., and Hartung, W.** (2002). A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant, Cell & Environment* **25**, 223-228.
- Schmidt, C., and Schroeder, J.I.** (1994). Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma Membrane of Guard Cells (Large Nitrate Permeability). *Plant Physiology* **106**, 383-391.
- Schmidt, C., Schelle, I., Liao, Y.J., and Schroeder, J.I.** (1995). Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9535-9539.
- Schroeder, J.I.** (1988). K⁺ transport properties of K⁺ channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Journal of General Physiology* **92**, 667-683.
- Schroeder, J.I., and Hagiwara, S.** (1989). Cytosolic Calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**, 427-430.

6. Referenzen

- Schroeder, J.I., and Hagiwara, S.** (1990). Repetitive increases in cytosolic Ca²⁺ of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca²⁺ permeable channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9305-9309.
- Schulz-Lessdorf, B., Dietrich, P., Marten, I., Lohse, G., Busch, H., and Hedrich, R.** (1994). Coordination of plasma membrane and vacuolar membrane ion channels during stomatal movement. *Symp Soc Exp Biol* **48**, 99-112.
- Schulz-Lessdorf, B., and Hedrich, R.** (1995). Protons and calcium modulate SV-type channels in the vacuolar-lysosomal compartment - channel interaction with calmodulin inhibitors. *Planta* **197**, 655-671.
- Schulz-Lessdorf, B., Lohse, G., and Hedrich, R.** (1996). GCAC1 recognizes the pH gradient across the plasma membrane: a pH-sensitive and ATP-dependent anion channel links guard cell membrane potential to acid and energy metabolism. *The Plant Journal* **10**, 993-1004.
- Schwartz, A., and Zeiger, E.** (1984). Metabolic energy for stomatal opening. Roles of photophosphorylation and oxydative phosphorylation. *Planta* **161**, 129-136.
- Schwartz, A., Ilan, N., and 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**, 583-587.
- Schwartz, A., Wu, W.H., Tucker, E.B., and Assmann, S.M.** (1994). Inhibition of Inward K⁺ Channels and Stomatal Response by Abscisic-Acid - an Intracellular Locus of Phytohormone Action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4019-4023.
- Schwarz, M., and Schroeder, J.I.** (1998). Abscisic Acid maintains S-type anion channel activity in ATP-depleted *Vicia faba* guard cells. *FEBS Letters* **428**, 177-182.
- Serrano, E.E., Zeiger, E., and Hagiwara, S.** (1988). Red light stimulates an electrogenic proton pump in *Vicia* guard cell protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 436-440.
- Shen, Y.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Du, S.Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.L., Peng, C.C., Yu, X.C., Zhu, S.Y., Fan, R.C., Xu, Y.H., and Zhang, D.P.** (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**, 823-826.
- Shigaki, T., and Hirschi, K.D.** (2006). Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H⁺ exchangers in plants. *Plant Biology (Stuttg)* **8**, 419-429.

6. Referenzen

- Shimazaki, K., Iino, M., and Zeiger, E.** (1986). Blue light-dependent proton extrusion of guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **319**, 324-326.
- Shimazaki, K., Terada, J., Tanaka, K., and Kondo, N.** (1989). Calvin-Benson Cycle Enzymes in Guard-Cell Protoplasts from *Vicia-Faba* L - Implications for the Greater Utilization of Phosphoglycerate Dihydroxyacetone Phosphate Shuttle between Chloroplasts and the Cytosol. *Plant Physiology* **90**, 1057-1064.
- Shimazaki, K.I., Kinoshita, T., and Nishimura, M.** (1992). Involvement of Calmodulin and Calmodulin-Dependent Myosin Light Chain Kinase in Blue Light-Dependent H Pumping by Guard Cell Protoplasts from *Vicia faba* L. *Plant Physiology* **99**, 1416-1421.
- Shimazaki, K., Tominaga, M., and Shigenaga, A.** (1997). Inhibition of the stomatal blue light response by verapamil at high concentration. *Plant and Cell Physiology* **38**, 747-750.
- Shimazaki, K., Goh, C.H., and Kinoshita, T.** (1999). Involvement of intracellular Ca²⁺ in blue light-dependent proton pumping in guard cell protoplasts from *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum* **105**, 554-561.
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S.M., and Kinoshita, T.** (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 219-247.
- Shoemaker, E.M., and Srivastava, L.M.** (1973). The Mechanics of Stomatal Opening in Corn (*Zea mays* L.) Leaves. *Journal of Theoretical Biology* **42**, 219-225.
- Shope, J.C., DeWald, D.B., and Mott, K.A.** (2003). Changes in Surface Area of Intact Guard Cells Are Correlated with Membrane Internalization. *Plant Physiology*. **133**, 1314-1321.
- Shope, J.C., and Mott, K.A.** (2006). Membrane trafficking and osmotically induced volume changes in guard cells. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4123-4131.
- Stadler, R., Buttner, M., Ache, P., Hedrich, R., Ivashikina, N., Melzer, M., Shearson, S.M., Smith, S.M., and Sauer, N.** (2003). Diurnal and light-regulated expression of *AtSTP1* in guard cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**, 528-537.
- Stahl, E.** (1920). Zur Physiologie und Biologie der Exkrete. *Flora* **13**, 1-132.
- Staxen, I.I., Pical, C., Montgomery, L.T., Gray, J.E., Hetherington, A.M., and McAinsh, M.R.** (1999). Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1779-1784.
-

6. Referenzen

- Stoelzle, S., Kagawa, T., Wada, M., Hedrich, R., and Dietrich, P.** (2003). Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1456-1461.
- Strucker, S., and Weber, F.** (1926). Zur Physiologie der Stomata-Nebenzellen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **44**, 272-278.
- Suh, S.J., Wang, Y.F., Frelet, A., Leonhardt, N., Klein, M., Forestier, C., Mueller-Roeber, B., Cho, M.H., Martinoia, E., and Schroeder, J.I.** (2007). The ATP binding cassette transporter AtMRP5 modulates anion and calcium channel activities in *Arabidopsis* guard cells. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 1916-1924.
- Sussman, M.R., and Harper, J.F.** (1989). Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. *Plant Cell* **1**, 953-960.
- Svennelid, F., Olsson, A., Piotrowski, M., Rosenquist, M., Ottman, C., Larsson, C., Oecking, C., and Sommarin, M.** (1999). Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H⁺-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* **11**, 2379-2391.
- Swartz, T.E., Corchnoy, S.B., Christie, J.M., Lewis, J.W., Szundi, I., Briggs, W.R., and Bogomolni, R.A.** (2001). The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 36493-36500.
- Sze, H., Li, X., and Palmgren, M.G.** (1999). Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* **11**, 677-690.
- Sze, H., Liang, F., Hwang, I., Curran, A.C., and Harper, J.F.** (2000). Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 433-462.
- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., Palme, K., and Hedrich, R.** (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2917-2921.
- Taiz, L., and Zeiger, E.** (2000). *Physiologie der Pflanzen*. (Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl.).
- Takahashi, Y., Kinoshita, T., and Shimazaki, K.I.** (2007). ABA induces a 14-3-3 protein binding to a 61 kDa protein in phosphorylation-dependent manner in *Vicia* guard cells. *Plant and Cell Physiology* **48**, S159-S159.

6. Referenzen

- Takemiya, A., Kinoshita, T., Asanuma, M., and Shimazaki, K.** (2006). Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13549-13554.
- Talbott, L.D., and Zeiger, E.** (1993). Sugar and Organic Acid Accumulation in Guard Cells of *Vicia faba* in Response to Red and Blue Light. *Plant Physiology* **102**, 1163-1169.
- Talbott, L.D., and Zeiger, E.** (1996). Central Roles for Potassium and Sucrose in Guard-Cell Osmoregulation. *Plant Physiology* **111**, 1051-1057.
- Talbott, L.D., Shmayevich, I.J., Chung, Y., Hammad, J.W., and Zeiger, E.** (2003). Blue light and phytochrome-mediated stomatal opening in the *npq1* and *phot1 phot2* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**, 1522-1529.
- Talbott, L.D., Hammad, J.W., Harn, L.C., Nguyen, V.H., Patel, J., and Zeiger, E.** (2006). Reversal by green light of blue light-stimulated stomatal opening in intact, attached leaves of *Arabidopsis* operates only in the potassium-dependent, morning phase of movement. *Plant and Cell Physiology* **47**, 332-339.
- Tanaka, Y., Kutsuna, N., Kanazawa, Y., Kondo, N., Hasezawa, S., and Sano, T.** (2007). Intravacuolar reserves of membranes during stomatal closure: the possible role of guard cell vacuoles estimated by 3-D reconstruction. *Plant and Cell Physiology* **48**, 1159-1169.
- Thiel, G., MacRobbie, E.A.C., and Blatt, M.R.** (1992). Membrane-Transport in Stomatal Guard-Cells - the Importance of Voltage Control. *Journal of Membrane Biology* **126**, 1-18.
- Tokutomi, S., Matsuoka, D., and Zikihara, K.** (2007). Molecular structure and regulation of phototropin kinase by blue light. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Tominaga, M., Kinoshita, T., and Shimazaki, K.** (2001). Guard-cell chloroplasts provide ATP required for H⁺ pumping in the plasma membrane and stomatal opening. *Plant and Cell Physiology* **42**, 795-802.
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F., and Kaldenhoff, R.** (2003). The tobacco aquaporin *NtAQP1* is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* **425**, 734-737.
- Ueno, K., Kinoshita, T., Inoue, S., Emi, T., and Shimazaki, K.** (2005). Biochemical characterization of plasma membrane H⁺-ATPase activation in guard cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana* in response to blue light. *Plant and Cell Physiology* **46**, 955-963.
- Uozumi, N., Gassmann, W., Cao, Y., and Schroeder, J.I.** (1995). Identification of strong modifications in cation selectivity in an *Arabidopsis* inward rectifying potassium channel by mutant selection in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 24276-24281.

6. Referenzen

- Uozumi, N., Nakamura, T., Schroeder, J.I., and Muto, S.** (1998). Determination of transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* based on functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9773-9778.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J.I., and Kangasjärvi, J.** (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 2008, published online before print
- Van Kirk, C.A., and Raschke, K.** (1978). Presence of Chloride Reduces Malate Production in Epidermis during Stomatal Opening. *Plant Physiology* **61**, 361-364.
- Venema, K., Belver, A., Marin-Manzano, M.C., Rodriguez-Rosales, M.P., and Donaire, J.P.** (2003). A novel intracellular K⁺/H⁺ antiporter related to Na⁺/H⁺ antiporters is important for K⁺ ion homeostasis in plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 22453-22459.
- Walker, D.J., Leigh, R.A., and Miller, A.J.** (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10510-10514.
- Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M., and Assmann, S.M.** (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* **292**, 2070-2072.
- Wang, H.C., Ngwenyama, N., Liu, Y.D., Walker, J.C., and Zhang, S.Q.** (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 63-73.
- Ward, J.M., and 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. *Plant Cell* **6**, 669-683.
- Webb, A.A., McAinsh, M.R., Mansfield, T.A., and Hetherington, A.M.** (1996). Carbon dioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium. *The Plant Journal* **9**, 297-304.
- Webb, A.A., Larman, M.G., Montgomery, L.T., Taylor, J.E., and Hetherington, A.M.** (2001). The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. *The Plant Journal* **26**, 351-362.
- Wilkinson, S., and Davies, W.J.** (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell & Environment* **25**, 195-210.
- Wille, A.C., and Lucas, W.J.** (1984). Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. *Planta* **160**, 129-142.
-

6. Referenzen

- Willmer, C.M., and Fricker, M.** (1996). *Stomata*. (London; New York: Chapman & Hall).
- Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Lee, H.C., Foster, R., and Chua, N.H.** (1997). Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* **278**, 2126-2130.
- Xiao, Z., Miao, Y.C., An, G.Y., Zhou, Y., Shangguan, Z.P., Gao, J.F., and Song, C.P.** (2001). K⁺ channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in *Vicia* guard cells. *Cell Research* **11**, 195-202.
- Xie, X., Wang, Y., Williamson, L., Holroyd, G.H., Tagliavia, C., Murchie, E., Theobald, J., Knight, M.R., Davies, W.J., Leyser, H.M., and Hetherington, A.M.** (2006). The identification of genes involved in the stomatal response to reduced atmospheric relative humidity. *Current Biology* **16**, 882-887.
- Yamaguchi, M., and Kasamo, K.** (2001). Modulation in the activity of purified tonoplast H⁺-ATPase by tonoplast glycolipids prepared from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Boro) cells. *Plant and Cell Physiology* **42**, 516-523.
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R., and Shinozaki, K.** (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **43**, 1473-1483.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K.** (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 5310-5318.
- Young, J.J., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2006). CO₂ signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7506-7511.
- Zeiger, E., and Field, C.** (1982). Photocontrol of the Functional Coupling between Photosynthesis and Stomatal Conductance in the Intact Leaf - Blue-Light and Par-Dependent Photosystems in Guard-Cells. *Plant Physiology* **70**, 370-375.
- Zeiger, E., and Zhu, J.K.** (1998). Role of zeaxanthin in blue light photoreception and the modulation of light-CO₂ interactions in guard cells. *Journal of Experimental Botany* **49**, 433-442.

6. Referenzen

- Zhang, S.Q., Outlaw, W.H., Jr., and Chollet, R.** (1994). Lessened malate inhibition of guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase velocity during stomatal opening. *FEBS Letters* **352**, 45-48.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., and Wang, X.** (2004). Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9508-9513.
- Zhao, J., and Wang, X.** (2004). Arabidopsis Phospholipase Dalpha1 Interacts with the Heterotrimeric G-protein alpha-Subunit through a Motif Analogous to the DRY Motif in G-protein-coupled Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 1794-1800.
- Zhu, S.Y., Yu, X.C., Wang, X.J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.C., Shang, Y., Du, S.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Xu, Y.H., Zhang, X.Y., and Zhang, D.P.** (2007). Two Calcium-Dependent Protein Kinases, CPK4 and CPK11, Regulate Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 3019-3036.

7. Anhang

Veröffentlichungsverzeichnis

1. Holger Marten, Rainer Hedrich and M. Rob G. Roelfsema

Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner.

The Plant Journal **50**, 29-39, 2007

2. Holger Marten, Kai R. Konrad, Petra Dietrich, M. Rob G. Roelfsema and Rainer Hedrich

Ca²⁺-Dependent and -Independent Abscisic Acid Activation of Plasma Membrane Anion Channels in Guard Cells of *Nicotiana tabacum*.

Plant Physiology **143**, 28-37, 2007

3. M. Rob G. Roelfsema, Kai R. Konrad, **Holger Marten**, George K. Psaras, Wolfram Hartung and Rainer Hedrich

Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO₂ and abscisic acid.

Plant, Cell and Environment **29**, 1595-1605, 2006

4. Holger Marten, Taekyung Hyun, Shigemi Seo, Rainer Hedrich and M. Rob G. Roelfsema

Silencing of *NtMPK4* impairs CO₂-induced stomatal closure, activation of anion channels and cytoplasmic Ca²⁺-signals in *Nicotiana tabacum* guard cells.

The Plant Journal accepted, 2008

Lebenslauf

Holger Marten

Rottendorfer Straße 29b

97074 Würzburg

Tel: 0931-8804801

Email: Holger.Marten@t-online.de

Persönliche Daten

Geboren am 27.05.1980 in Frankfurt am Main

Familienstand Ledig

Kinder keine

Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildungsweg an Schule und Universität

1986 – 1990 Besuch der Grundschule, Frankfurt am Main

1990 – 1999 Besuch einer Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe in Frankfurt am Main mit Abitur 1999

1999 – 2001 Grundstudium der Biologie (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

2001 – 2004 Hauptstudium der Biologie an der Universität Würzburg
Ausrichtung des Hauptstudiums:
Hauptfach: Mikrobiologie; Nebenfächer: Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik sowie Biochemie

2004 Anfertigung der Diplomarbeit
Thema der Diplomarbeit:
Kohlendioxid Wahrnehmung und Blaulichtreaktion in Schließzellen von *Vicia faba*

Angefertigt am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie und Biophysik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, unter der Anleitung von Prof. Dr. R. Hedrich

November 2004 Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe die Dissertation weder in der vorliegenden noch in einer ähnlichen Fassung in anderen Prüfungsverfahren oder an anderen Fakultäten vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg,

Holger Marten

Danksagung

Ich danke allen voran Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Ermöglichung dieser Arbeit, die interessante Fragestellung und dass er mir sehr viel Freiraum bei der Arbeit gelassen hat.

Ein besonderer Dank gilt Rob, der mich in die spannende Welt der Elektrophysiologie eingelernt hat, immer gute Ideen zu den einzelnen Projekten hatte und mich jederzeit tatkräftig unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Hedrich für die Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bei meiner Arbeit. Ein besonderer Dank gilt dabei Joachim für die ungezählten Pflanzen die er für mich angezogen hat, damit ich sie auseinander nehmen kann.

Ein Dank gilt vor allem auch meinem Kaffee-Intensiv-Konsum Kollegen Thomas, der die Stimmung immer hoch gehalten hat.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Freundin, die mich unterstützt hat und hilfreich zur Seite stand.

Ich danke auch meinen Freunden, die zwar keine Ahnung haben was ich mache, aber immer für Erholung von der Arbeit gesorgt haben.

Selbstverständlich danke ich meinen Eltern, die immer für mich da waren und diese Arbeit und mein Studium letztlich erst ermöglicht haben.