

**Biophysikalische Analyse und Rekonstitution
des schnellen ABA-
Signaltransduktionsweges aus
*Arabidopsis thaliana***



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

vorgelegt von
Sönke Scherzer
aus Stenden

Würzburg 2012

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Tina Romeis

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

**Biophysikalische Analyse und Rekonstitution
des schnellen ABA-
Signaltransduktionsweges aus
*Arabidopsis thaliana***



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

vorgelegt von
Sönke Scherzer
aus Stenden

Würzburg 2012

Zusammenfassung

Stomata sind mikroskopisch kleine Poren in der Epidermis von Blättern. Sie entstanden ursprünglich vor 400 Millionen Jahren bei der Besiedlung des Landes durch Pflanzen. Diese sind in der Atmosphäre jedoch vor das Problem gestellt, dass sie auf der einen Seite CO₂ für die Photosynthese benötigen und auf der anderen Seite, den damit verbundenen Verlust von Wasser, minimal halten müssen. Deshalb entwickelten Landpflanzen stomatäre Komplexe, die aus zwei benachbarten Schließzellen gebildet werden. Durch eine Veränderung im Turgor dieser Zellen kann das Stoma auf äußere oder innere Reize hin schließen bzw. öffnen. Ionenflüsse über die Membran der Schließzellen führen zu Änderungen im osmotischen Druck und damit zu einem Schrumpfen oder Anschwellen der Schließzellen. Dabei ist eine adäquate Regulation dieser Ionenflüsse essentiell für die Pflanze, da sie bestrebt ist den bestmöglichen Kompromiss zwischen Gasaustausch und transpirationsbedingtem Wasserverlust einzugehen. Wassermangel führt zur Synthese des Stresshormons ABA. Dieses bewirkt ein schnelles Schließen der Stomata durch die Aktivierung von Anionenkanälen. Der resultierende Anionenausstrom initiiert den Stomaschluss, da der Verlust von osmotisch aktiven Anionen das Wasserpotential der Schließzellen erhöht und zusätzlich das Membranpotential depolarisieren lässt. Anhand der elektrophysiologischen Charakteristiken konnte gezeigt werden, dass der Anionenausstrom von zwei unterschiedlichen Kanaltypen getragen wird, die in Anlehnung an ihre spannungsabhängigen Aktivierungs- und Deaktivierungs-Kinetiken als schneller (Rapid) R-Typ und langsamer (Slow) S-Typ Anionenkanal bezeichnet werden. Der R-Typ Anionenkanal stellt einen stark spannungsabhängigen Kanal dar, wohingegen der S-Typ Anionenkanal relativ spannungsunabhängig ist. Seit über 20 Jahren sind diese Anionenkanäle Gegenstand intensiver Forschung, aber ihre molekular-genetische Grundlage und Regulation durch ABA sind bis heute nicht völlig verstanden. Interessanter Weise konnte, während dieser Arbeit, von 2 unabhängigen Laboren ein Gen als Bestandteil oder als regulatorische Komponente des S-Typ Anionenkanals in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Analog zur Benennung der Anionenströme, die durch dieses Gen beeinflusst werden, nannte man das Genprodukt **SLAC1** (*Slow Anion Channel-Associated 1*). In seinen Verlustmutanten fehlen die S-Typ Anionenströme und die Stomata schließen nach ABA-Applikation stark zeitverzögert. Allerdings konnte die Funktion von SLAC1 als S-Typ Anionenkanal weder mittels direkter noch indirekter

Experimente gezeigt werden. Somit war die genaue Bedeutung von SLAC1 in der Schließzelle immer noch unklar.

In dieser Arbeit sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob es sich bei SLAC1 um den S-typ Anionenkanal handelt, oder ob SLAC1 nur ein essentieller Bestandteil des Anionenkanals ist. Zur funktionellen Charakterisierung des per se inaktiven SLAC1 Proteins, wurde mit der Suche nach SLAC1-aktivierenden Interaktionspartnern begonnen. Zu diesem Zweck bediente man sich der Methode der bimolekularen Fluoreszenz Komplementation (BiFC) im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten. Da bereits die Abhängigkeit der Anionenströme in Schließzellen von De- und Phosphorylierungsereignissen bekannt war, galt Ca^{2+} -abhängigen Kinasen der CPK Familie, ABA-aktivierten Kinasen der SnRK Familie und Phosphatasen des PP2C Typs eine besondere Aufmerksamkeit. Mitglieder dieser Familien wurden bereits mit der Regulation des Stomaschlusses in Verbindung gebracht. Bei diesen Experimenten zeigte sich, dass SnRK2.6 (OST1) und mehrere CPKs deutlich mit SLAC1 physikalisch interagierten.

Als Folge dieser Interaktion in Oozyten konnten schließlich nach Koexpression von SLAC1 zusammen mit den interagierenden Kinasen typische S-Typ Anionenströme detektiert werden, wie man sie aus Patch-Clamp Experimenten an isolierten Schließzellprotoplasten kannte. Hierbei bewirkten die Kinasen OST1 und CPK23 die größte Anionenkanalaktivierung. Dieses Ergebnis wird durch die BiFC-Experimente gestützt, da OST1 und CPK23 die stärkste Interaktion zu SLAC1 zeigten. Die elektrophysiologische Charakterisierung der SLAC1-Ströme im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten in Kombination mit *in vivo* Patch-Clamp Untersuchungen wies SLAC1 eindeutig als den lange gesuchten S-Typ Anionenkanal in Arabidopsis Schließzellen aus.

Somit ist die direkte S-Typ Anionenkanalaktivierung durch OST1 auf dem Kalzium-unabhängigen und durch CPKs auf dem Ca^{2+} -abhängigen ABA-Signaltransduktionsweg gelungen. Bei der Spezifizierung der einzelnen Kalzium-Abhängigkeiten dieser Kinasen in Oozyten und in *in vitro* Kinase Assays konnten weiterhin unterschiedliche Affinitäten der CPKs zu Kalzium festgestellt werden. So vermittelten die schwach Kalzium-abhängigen CPK6 und CPK23 bereits ohne einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration über das Ruhenniveau hinaus schon die Anionenkanalaktivierung. Die stark Kalzium-abhängigen CPK3 und CPK21 hingegen, werden erst aktiv wenn die ABA vermittelte Signaltransduktion zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration führt.

Da somit die Kinasen OST1, CPK6 und CPK23 ohne dieses Kalziumsignal aktiv sind, benötigen diese einen übergeordneten Regulationsmechanismus.

In den BIFC-Experimenten konnte eine deutliche Interaktion der Phosphatasen ABI1 und 2 zu den SLAC1 aktivierenden Kinasen beobachtet werden. Dass diese Interaktion zu einem Ausbleiben der Anionenkanalaktivierung führt, wurde in TEVC-Messungen gezeigt.

Mit diesen Erkenntnissen um die ABA-Signaltransduktionskette in Schließzellen konnten in *in vitro* Kinase Experimenten ihre einzelnen Glieder zusammengesetzt und der ABA-vermittelte Stomaschluss nachvollzogen werden. In dieser Arbeit zeigte sich, dass, das unter Wasserstress-Bedingungen synthetisierte Phytohormon, ABA von Rezeptoren der RCAR/PYR/PYL-Familie perzeptiert wird. Anschließend bindet die Phosphatase ABI1 an den ABA-RCAR1 Komplex. In ihrer freien Form inhibiert die Phosphatase ABI1 die Kinasen OST1, CPK3, 6, 21 und CPK23 durch Dephosphorylierung. Nach Bindung von ABI1 an RCAR1 sind diese Kinasen von dem inhibierenden ABI1 entlassen. Die Kinasen OST1, CPK6 und CPK23 stellen ihre Aktivität durch Autophosphorylierung wieder her. Die stark Ca^{2+} -abhängigen Kinasen CPK3 und 21 benötigt hierzu noch einen ABA induzierten Ca^{2+} -Anstieg im Zytoplasma. Diese Kinasen phosphorylieren anschließend SLAC1 am N-Terminus. Diese Phosphorylierung bewirkt die Aktivierung von SLAC1 woraufhin Anionen aus der Schließzelle entlassen werden. Das Fehlen dieser negativen Ladungen führt zur Depolarisation der Membran woraufhin der auswärtsgerichtete Kaliumkanal GORK aktiviert und K^+ aus der Schließzelle entlässt. Der Verlust an Osmolyten bewirkt einen osmotisch getriebenen Wasserausstrom und das Stoma schließt sich.

Summary

Stomata are microscopic pores in the epidermis of leaves. Early stomata emerged 400 million years ago when plants started to colonize the land. Stomatal complexes are formed by two adjacent guard cells which control the gas exchange of leaves with the atmosphere. In response to external or internal stimuli turgor changes within guard cells promote stomatal opening or closure. Thereby ion fluxes across the membrane of guard cells lead to changes in osmotic pressure and thus in guard cell movement. Since plants have to avoid massive transpirational water loss during CO₂-uptake for photosynthesis, a fine-tuned regulation of these ion fluxes across the guard cell plasma membrane is essential for the plant survivor in ever changing environments. Water deficiency for example leads to synthesis of the stress hormone ABA. This causes fast stomatal closure by activation of anion channels. The resulting anion efflux depolarizes guard cells and thereby initiates stomatal closure. Early patch-clamp measurements with guard cell protoplasts could identify two different anion channel types. The R-type (rapid-type) anion channel is characterized by a strong voltage-dependency whereas the S-type (slow-type) anion channel is relatively voltage independent. For more than 20 years these anion channels were in the focus of intense research but their molecular nature and regulation by ABA is still not fully understood. Interestingly during this PhD thesis two independent laboratories could identify an essential component or the S-type anion channel gene itself. Since S-type anion currents were affected by the disruption of this gene, it was called SLAC1 (slow associated anion channel 1). *slac1* knock out mutants lack S-type anion currents and are strongly impaired in ABA evoked stomatal closure. However the function of SLAC1 remained unknown because it remained electrically silent when expressed heterologously in *Xenopus* oocytes. Thus the function of SLAC1 in guard cells is still scant.

This work should clarify whether SLAC1 is the anion channel itself, or a regulatory component of S-type anion channels. To answer this question we searched for activating interaction partners of SLAC1. For this purpose the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) technique was used following heterologous expression in *Xenopus* oocytes. Since anion currents of guard cells have been shown to be associated with phosphorylation events we focused on calcium dependent kinases (CPKs), ABA-activated SnRK kinases and PP2C phosphatases. Members of these families were already

known to be involved in ABA-dependent stomatal closure. BIFC experiments revealed that SnRK2.6 (OST1) and several CPKs physically interact with SLAC1 in oocytes.

Upon coexpression of SLAC1 with these interacting kinases in *Xenopus* oocytes, SLAC1-related anion currents appeared similar to those observed in guard cells. Strongest anion channel activation was detected by coexpression of SLAC1 and OST1 or CPK23. These findings are supported by BIFC experiments detecting OST1 and CPK23 also as strongest interaction partners of SLAC1. The electrophysiological characterization of SLAC1 currents in *Xenopus* oocytes, in combination with *in vivo* patch clamp studies demonstrated that SLAC1 is the major component of S-type anion currents in Arabidopsis guard cells.

Furthermore we could show that OST1 mediates direct S-type anion channel activation in a calcium-independent manner whereas CPKs are positive regulators of SLAC1 in the calcium-dependent branch of the ABA signaling pathway. Moreover *in vitro* kinase assays and TEVC measurements in oocytes revealed that there are two groups of SLAC1 activating CPK kinases with distinct Ca^{2+} affinities: i) the weak calcium-dependent CPK6 and CPK23 mediate anion channel activation even at the low resting calcium concentrations while ii) the high affinity kinases CPK3 and CPK21 are only active in response to an increase in cytosolic calcium concentration. Since OST1, CPK6 and CPK23 are active even without a preceding calcium signal, a master regulator is necessary which keeps those kinases inactive in the absence of ABA.

BIFC experiments revealed a strong interaction of phosphatases ABI1 and 2 towards the SLAC1 activating kinases. Interestingly the integration of ABI1 into the SLAC1/kinase complex prevented SLAC1 activation in oocytes.

Taken together our findings allowed us to reconstitute the ABA signaling pathway from the perception of ABA to the activation of S-type anion channel SLAC1, in turn leading to stomatal closure. Under water stress conditions the phytohormone ABA is synthesized and sensed by its receptors (RCAR/PYR/PYL). This allows binding of ABI1 to the active ABA-RCAR1 complex. In its free form ABI1 by dephosphorylation inhibits the kinases OST1, CPK3, 6, 21 and CPK23. After binding of ABI1 to RCAR1, however, these kinases are released from the inhibitory effect of ABI1. The kinases OST1, CPK23 and CPK6 become active by autophosphorylation. The strong Ca^{2+} -dependent kinases CPK3 and CPK21 in addition need an ABA-induced rise in cytosolic calcium concentration to restore their activity. These active kinases phosphorylate SLAC1 at its N-terminus leading to the activation of SLAC1. The release of anions from guard cells depolarizes the guard

cell membrane potential whereupon the outward rectifying potassium channel GORK is gated open. Finally the loss of osmolytes causes an osmotic driven water loss, the guard cells shrink and thus the stoma closes.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	
Summary	
Inhaltsverzeichnis.....	0
1 Einleitung	4
1.1 Wasser und Kohlendioxid als limitierende Faktoren.....	4
1.2 Stomata	6
1.2.1 Physiologie der Stomata.....	7
1.2.2 Stoma-Bewegung	7
1.2.3 Steuerung der Stoma-Bewegung.....	10
1.3 Das Stresshormon ABA leitet den Stomaschluss ein	11
1.3.1 Synthese von ABA.....	12
1.3.2 Syntheseorte des ABA	13
1.3.3 ABA Perzeption	13
1.3.4 Funktion der PP2C Phosphatasen in der ABA Signalweiterleitung	14
1.3.5 Funktion der SnRK2.6 Kinase in der ABA Signalweiterleitung	16
1.4 Ca ²⁺ als „second Messenger“	17
1.4.1 Kalziumtransporter.....	18
1.4.1.1 Export von Ca ²⁺ aus dem Zytoplasma	18
1.4.1.2 Ca ²⁺ Einstrom in das Zytoplasma	19
1.4.2 Dekodierung des Kalziumsignals.....	21
1.4.2.1 CDPKs sind Kalzium abhängige Kinasen	21
1.4.2.2 CBL Proteine fungieren als Kalziumsensoren für CIPKs	24
1.4.2.4 CIPK Proteine sind CBL-aktivierte Kinasen	25
1.4.2.5 Bedeutung der CBL / CIPK Proteine.....	26
1.5 Kalzium unabhängige Signaltransduktion	27
1.6 Ionen transport über Membranen.....	29
1.6.1 Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten	30
1.6.1.1 Regulation der H ⁺ ATPasen.....	31
1.6.1.2 H ⁺ ATPasen in der Vakuolenmembran	33
1.6.1.3 Bedeutung der H ⁺ ATPasen bei der Stomabewegung	33

1.6.2 Die Rolle von Zuckertransport während der Stomabewegung.....	34
1.6.3 Kationentransport.....	35
1.6.3.1 Phylogenie der Kaliumkanäle.....	36
1.6.3.2 Spannungsabhängigkeit der Gleichrichter.....	37
1.6.3.3 Regulation der Kaliumverschiebung während der Stomabewegung.....	37
1.6.3.4 Vakuoläre Kaliumkanäle	39
1.6.3.5 Bedeutung der Kaliumkanäle bei der Stomabewegung.....	41
1.6.4 Anionentransport	41
1.6.4.1 Anionen sind Gegenionen zum Kalium	41
1.6.4.2 Anionenkanäle der Schließzelle	43
1.6.4.3 Identifikation des SLAC1 Gens.....	46
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	48
2 Material und Methoden.....	49
2.1 USER Klonierung.....	49
2.1.1 Präparation der Vektoren	50
2.1.2 Präparation der Inserts	50
2.1.3 Insertion von PCR Fragment in den USER Vektor	51
2.1.4 Generierung neuer Vektoren.....	51
2.1.5 Mutagenese	53
2.2 <i>In vitro</i> Transkription IVT.....	53
2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	55
2.4 Präparation von <i>Xenopus</i> Oozyten	56
2.5 Injektion der cRNA	56
2.6 Fluoreszenz-Mikroskopische Untersuchungen.....	57
2.6.1 Bi-molekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	57
2.6.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM).....	58
2.7 Elektrophysiologische Untersuchung der Oozyten	58
2.7.1 Konventionen.....	60
2.7.2 Meßaufbau	60
2.7.3 Elektroden.....	61
2.7.4 Messung der Ströme	61
2.7.5 Bestimmung der Umkehrspannungen und der relativen Permeabilitäten ..	63
2.8 Arbeiten mit Proteinen.....	66
2.8.1 GST-Tag	66

2.8.2 HIS-Tag.....	67
2.8.3 Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine	67
2.8.4 Generelle Durchführung der <i>in vitro</i> Kinase Assays	69
2.8.4.1 Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung.....	69
2.8.4.2 Spezifität der Kinasen zum SLAC1	70
2.8.4.3 Genauere Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen.....	70
2.8.4.4 Ca ²⁺ Abhängigkeit der Phosphorylierungsreaktion	71
2.8.4.5 Regulation der Kinasen.....	71
2.9 verwendete Lösungen	72
2.9.1 Lösungen für die Molekularbiologie.....	72
2.9.2 Lösungen für die Elektrophysiologie	73
2.9.2.1: Cl ⁻ basierte Standard-Badlösungen.....	73
2.9.2.2: Lösungen mit variierenden Anionen	73
2.9.2.3: Lösungen mit variierenden Kationen.....	74
2.9.2.4: Standard Patch-Clamp-Lösungen	74
2.9.3 Lösungen für die Proteinbiochemie	75
3 Ergebnisse	78
3.1 Transkriptions-Analysen.....	78
3.2 Aktivierung von SLAC1	80
3.2.1 Ca ²⁺ unabhängige Aktivierung von SLAC1 durch Kinasen der SnRK Familie	81
3.2.1.0 Die BIFC Methode.....	81
3.2.1.1 BIFC Experimente zwischen SLAC1 und den Kinasen der SnRK Familie	82
3.2.1.2 TEVC Experimente mit Kinasen der SnRK Familie	85
3.2.1.3 Patch-Clamp Experimente mit <i>ost1-2</i> knock out Pflanzen.....	88
3.2.1.4 Elektrophysiologische Charakterisierung der Anionenströme	90
3.2.1.5 SLAC1 N-terminus Phosphorylierung durch OST1	100
3.2.2 Ca ²⁺ abhängige Aktivierung von SLAC1 durch Kinasen der CPK Familie.....	103
3.2.2.1 BIFC Experimente zwischen SLAC1 und Kinasen der CPK Familie	104
3.2.2.2 TEVC Experimente mit Kinasen der CPK Familie	106
3.2.2.3 CPK23 Verlustmutanten zeigen reduzierte S-Typ Anionenströme....	109
3.2.2.4 CPK23 phosphoryliert SLAC1 in <i>in vitro</i> Kinase Experimenten.....	111

3.2.2.5 CPK23 und OST1 phosphorylieren unterschiedliche Aminosäurereste im N-terminus von SLAC1	115
3.2.2.6 Affinitätsbestimmung der CPK Proteinkinasen zu Ca ²⁺	117
3.3 Regulation der ABA-abhängigen Aktivierung von SLAC1	122
3.3.1 ABI interagiert sowohl mit OST1 als auch mit CPK23.....	122
3.3.2 ABI1 inhibiert die Aktivierung von SLAC1 durch OST1 und CPK23	125
3.3.3 Regulation von SLAC1 durch Kinase/Phosphatase Komplexe.....	127
4 Diskussion.....	134
4.1 ABA vermittelt den Stomaschluss.....	135
4.2 SLAC1 ist essentiell für den Stomaschluss	136
4.3 Identifizierung von SLAC1-Interaktionspartnern.....	137
4.4 SLAC1 ist der S-Typ Anionenkanal aus Schließzellen	138
4.5 SLAC1 wird durch OST1 und Kinasen der CPK-Familie phosphoryliert und somit aktiviert.....	141
4.6 SLAC1 Anionenkanalaktivität wird über PP2C-Phosphatasen reguliert	145
5 Referenzen	149
6 Anhang.....	184
6.1 Veröffentlichungsverzeichnis.....	184
6.2 Lebenslauf	185
6.3 Abkürzungsverzeichnis	186
6.4 Abbildungsverzeichnis	188
6.5 Eidesstattliche Erklärung.....	189
6.6 Danksagung	190

1 Einleitung

Vor etwa 700 Millionen Jahren verließen die ersten Pflanzen ihr marines Habitat und begannen mit der Besiedelung des Festlandes (Heckman et al. 2001). Seit dieser Zeit haben sie sich zu den am weitesten verbreiteten und erfolgreichsten Organismen der heutigen Erde mit rund 315.000 Arten entwickelt (Chapman 2009). Die Gesamtmasse der grünen Pflanzen auf dem Festland beträgt etwa 1000 Milliarden Tonnen. Die Masse der Menschheit beläuft sich hingegen auf nur 0,4 Milliarden Tonnen (<http://www.brefeld.homepage.t-online.de/leben-auf-der-erde.html>). Im Zuge dieser erfolgreichen Lebensraumumstellung mussten sich die Pflanzen allerdings auf fortlaufend verändernde Bedingungen einstellen.

1.1 Wasser und Kohlendioxid als limitierende Faktoren

Landpflanzen beziehen ihr Wasser in der Regel über die Wurzel und verlieren es durch Transpiration an den oberirdischen Organen. Gerade in Zeiten der Klimaerwärmung tritt dieses Problem besonders in den Vordergrund. Somit ist Wasser (H_2O) ein limitierender Faktor und es wurden Strategien entwickelt, um lebenswichtiges H_2O einzusparen und die verfügbaren Ressourcen effektiver für Photosynthese, Wachstum und Entwicklung der Pflanze zu nutzen. Wasser wird, neben seiner essentiellen Funktion als intra- und extrazelluläres Lösungsmittel, auch bei der Photosynthese als Elektronendonator zur Reduktion von Kohlendioxid CO_2 benötigt (Lüttge 2010).

Pflanzen sind phototrophe Organismen, die mittels Photosynthese unter Ausnutzung von Lichtenergie aus anorganischen Verbindungen den Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) und das Reduktionsäquivalent NADPH synthetisieren. Diese werden dann genutzt, um CO_2 aus der Luft zu reduzieren und anschließend Zucker zu synthetisieren, die der Pflanze als Kohlenstoffquelle dienen. Im Laufe der Zeit entstanden drei Gruppen von Photosynthespezialisten, die CAM-, C4- und C3-Pflanzen. CAM- und C4-Pflanzen sind in der Lage die Photosynthese räumlich und/oder zeitlich voneinander zu trennen. Im

Gegensatz zu den C3-Pflanzen, sind sie deshalb in der Lage, den Wasserverlust während des Gasaustausches an den Stomata zu minimieren. C3-Pflanzen verlieren durch Transpiration pro Gramm Kohlenstoff, das sie aus der Atmosphäre aufnehmen, etwa 450 – 950 Gramm Wasser. Bei C4-Pflanzen halbiert sich dieser Wasserverlust durch die räumliche Trennung von CO₂-Aufnahme und CO₂-Fixierung auf etwa 250 – 350 Gramm Wasser pro Gramm Kohlenstoff. CAM-Pflanzen hingegen, können CO₂ in der Nacht aufnehmen, was einen minimierten Wasserverlust von 18 – 100 Gramm pro aufgenommenes Gramm Kohlenstoff zur Folge hat (Lüttge 2010).

Um den Wasserverlust durch Transpiration in trockenen Klimata weiter zu verringern, haben Pflanzen spezielle morphologische Strukturen zum Schutz vor Austrocknung entwickelt. Zu diesen Strukturen gehören z.B. vaskuläre und epidermale Gewebe sowie eine nahezu Wasser undurchlässige Kutikula. Als Kutikula bezeichnet man die wachsartige Schicht auf der Epidermis, die von Landpflanzen während der Evolution zur Verringerung der Transpiration entwickelt wurde. Durch diese Schicht wird allerdings ein effektiver Gasaustausch zwischen den Intrazellulärräumen im Mesophyllgewebe und der Außenluft verhindert. Aufgrund des Verbrauchs von CO₂ durch die Photosynthese in den Blättern, benötigen Pflanzen allerdings einen ständigen Nachschub dieses Gases. Da die Konzentration von CO₂ in der Atmosphäre mit durchschnittlich ca. 375 Teilen pro Million (ppm) relativ gering ist, stellt es einen zweiten limitierenden Faktor für die Photosynthese dar (Herzschuh et al. 2011; Hetherington & Woodward 2003; Neumayer et al. 2005). Damit das für die Photosynthese benötigte CO₂ aufgenommen und der entstandene Sauerstoff (O₂) abgegeben werden kann, haben Pflanzen Stomata entwickelt. Sind diese mikroskopisch kleinen Poren in der Epidermis der Pflanzen geöffnet, kann das photosynthetisch aktive Gewebe mit ausreichend CO₂ versorgt werden. Jedoch erhöht sich hierdurch der Wasserverlust durch die stomatäre Transpiration. Obwohl die Stomaöffnungen nur etwa 5% der gesamten Blattoberfläche ausmachen, erfolgt bis zu 70% des Wasserverlustes durch diese Poren (Willmer & Fricker 1996). Bei vielen Pflanzen der gemäßigten Breiten führt schon ein Verlust von 20% ihres Wassers zu irreparablen Schäden. Die Anzahl und Öffnungsweite der Stomata muss daher exakt reguliert werden, um einen bestmöglichen Kompromiss zwischen Photosynthese- und Transpirationsrate zu erzielen. Bereits während der Entwicklung des Blattes wird durch Umwelteinflüsse, wie Lichtintensität, CO₂- Gehalt in der Atmosphäre und endogene Pflanzenhormone ,die Anzahl und Größe der stomatären Komplexe reguliert (Hetherington & Woodward 2003).

1.2 Stomata

Die ersten Stomata entstanden vor rund 400 Millionen Jahren (Edwards et al. 1998). Ihr Name leitet sich aus dem griechischen Wort für Mund (stóma) ab. Das Stoma wird aus zwei spezialisierten Epidermiszellen, den sogenannten Schließzellen, gebildet. Bei manchen Arten werden diese von Nebenzellen umgeben (Bergmann & Sack 2007). Schon Mitte des 17. Jahrhunderts begann die wissenschaftliche Untersuchung des stomatären Komplexes. Die erste wissenschaftliche Publikation über diese Poren in Blättern erschien 1675 (Malpighi). Damals nahm die Royal Society von London noch an, dass Stomata eine Verbindung mit Xylem-Gefäßen ausbilden und ein Röhrensystem aufbauen, über das die Pflanze atmen kann. Die intensive moderne Forschung des 20. und 21. Jahrhunderts hat das Wissen um die Funktion und die regulatorischen Mechanismen zur Stomabewegung jedoch stark erweitert. So ist bekannt, dass Stomata den Gasaustausch der Blätter mit der umgebenden Luft gewährleisten. Neben der geregelten CO₂ Aufnahme und H₂O Abgabe kann durch Öffnen der Stomata eine Absenkung der Blatt-Temperatur erreicht werden und so Schäden wie das Denaturieren von Proteinen durch Überhitzung vermieden werden (Nobel 1999). Zudem wird durch die kontrollierte Transpiration ein Transpirationssog generiert, der bis in die Wurzel reicht. Wasser, Makro- und Mikronährstoffe sowie Signalmoleküle, wie z.B. ABA (Abschnitt 1.3), werden so angetrieben vom Transpirationssog über das Xylem von der Wurzel in den Spross transportiert (Jiang & Hartung 2008). Dieser Transpirationssog stellt einen wichtigen Kommunikationsweg zwischen der Wurzel und dem Spross dar und ermöglicht die Steuerung der Transpiration in den Blättern z.B. als Antwort auf die Verfügbarkeit von Wasser im Wurzelraum (Felle et al. 2005).

1.2.1 Physiologie der Stomata

Stomata sind Poren in der Epidermis der Blätter, deren Öffnungsweite in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen kontrolliert wird. Die Stomata öffnen beispielsweise bei Lichteinstrahlung (Blaulicht), einem geringen CO₂ Partialdruck im photosynthetischen Gewebe oder Hitze (Lüttge 2010).

Diese Poren befinden sich an nahezu allen, der Luft ausgesetzten Pflanzenteilen (Willmer & Fricker 1996). Dabei unterscheidet man zwischen hypo-, hyper- und amphistomatischen Blättern. Bei hypostomatischen Blättern kommen Stomata nur auf der Blattunterseite (abaxial) vor, was dem am meisten verbreitetsten Stomatypen entspricht. Vermutlich dient diese Anordnung dem Transpirationsschutz, da sich die Blattunterseite bei Sonneneinstrahlung weniger stark erwärmt, als die Blattoberseite. Wasserpflanzen haben hingegen meist auf der Blattoberseite (adaxial) befindliche Stomata also hyperstomatische Blätter. Amphistomatische Blätter tragen Stomata auf beiden Seiten und sind z.B. bei Gräsern und Nadelblättern weit verbreitet.

Die Schließzellen können von nierenförmiger oder von hantelförmiger Gestalt sein, letztere kommen nur bei Gräsern vor und werden daher als „Gräser-Typ“ bezeichnet.

1.2.2 Stoma-Bewegung

Beide Schließzelltypen (hantelförmig und nierenförmig) besitzen ein spezifisches radiales Muster an Zellulosemikrofibrillen in der Zellwand. Diese speziellen Verstärkungen sorgen bei nierenförmigen Schließzellen dafür, dass sich diese beim Öffnen nach außen hin also voneinander weg biegen (Demichel & Sharpe 1973). Bei Schließzellen des Gräser-Typs schwellen die hantelförmigen Enden der Zellen so an, dass sich die Zellen parallel voneinander entfernen (Shoemaker & Srivasta 1973).

Beim Öffnen der Stomata kommt es zu einer Vervielfachung des Innendruckes (Turgor) in den Schließzellen. In der eingehend charakterisierten Pflanze *Vicia faba* kann der Turgor bei der Stomaöffnung von einem bis auf 4 MPa ansteigen (Franks et al. 2001;

Franks et al. 1998). Die Erhöhung des Turgors verläuft parallel zu einer Volumen- und Oberflächenzunahme der Schließzellen (Franks et al. 2001; Raschke & Dickerson 1972; Shope et al. 2003). Dieser Vorgang resultiert aus einer Ausdehnung der longitudinalen Achse der Schließzellen sowie aus deren dreieckigem Querschnitt, der während der Öffnung erst elliptisch und dann kreisförmig wird (Shope et al. 2003). Um ein Schwellen und Schrumpfen der Schließzellen zu ermöglichen, kommt es zu einer Internalisierung und Remobilisierung der Membran, d.h. beim Schließen der Stomata wird die Membranfläche durch Endozytose reduziert. Beim Öffnen hingegen wird die Membranfläche durch Vesikel-Exozytose vergrößert (Homann 1998; Homann & Thiel 2002; Hurst et al. 2004).

Die Öffnungsweite der Stomata wird reguliert durch die vergleichsweise großen Epidermiszellen, die an die Schließzellen grenzen und von außen auf diese drücken. Die Epidermiszellen besitzen durch ihre Größe einen mechanischen Vorteil („mechanical Advantage“) (Demichel & Sharpe 1973) und können den Druck der Stomata kompensieren und somit deren Öffnungsweite reduzieren (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). Ferner erhalten die Stomata beim Öffnen eine positive Rückkopplung. Durch die stomatäre Transpiration verlieren die viel größeren Epidermiszellen schneller Turgor als die Schließzellen und der Gegendruck der Epidermis lässt folglich nach (Klein et al. 1996).

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 unabhängige osmotische Steuerung des Schließzellenturgors wird durch das Fehlen von Plasmodesmen zu benachbarten Zellen ermöglicht. (Wille & Lucas 1984). Als Osmotika werden Zucker sowie organische und anorganische Ionen benutzt, die aufgrund ihrer Ladung oder polaren Eigenschaften in wässriger Umgebung gut löslich sind. Die Konzentration dieser Osmotika kann durch Transport- und/oder Biosyntheseprozesse reguliert werden. Der Transport über die Membran wird von integralen Membranproteinen vermittelt, die meist hochspezifisch Molekül- und Ionensorten entweder passiv entlang oder aktiv gegen einen elektrochemischen Gradienten befördern können. Um diese osmotisch aktiven Substanzen herum bildet sich aufgrund des ebenfalls polaren Charakters der Wassermoleküle eine Hydrathülle. 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 ansehen. 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 hingegen in den Apoplasten zurück. Im Gegensatz zu Ionen kann Wasser durch biologische Membranen diffundieren. Die reine Diffusion spielt in diesem Fall aber nur eine geringe Rolle, da der Wassertransport über so genannte Aquaporine beschleunigt stattfinden kann. Aquaporine sind Wasserpermeable Proteine, die in Schließzellen gefunden, bzw. deren Existenz indirekt nachgewiesen wurde (Frayse et al. 2005; Kaldenhoff & Fischer 2006; Sarda et al. 1997; Shope & Mott 2006). 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 Regulation ihrer Aktivität erfolgt über divalente Kationen (Ca²⁺/ Mg²⁺) und den pH-Wert (Chaumont et al. 2005; Gerbeau et al. 2002). Zudem wurden auch phosphorylierungsabhängige Modifikationen der Aktivität von Aquaporinen nachgewiesen (Johansson et al. 1998; Tornroth-Horsefield et al. 2006).

Da zu hohe Ionenkonzentrationen im Zytosol toxisch wirken können, werden die in den Schließzellen befindlichen osmotisch aktiven Substanzen nur zum Teil im Zytosol belassen, ein großer Teil wird in die Vakuole transportiert und dort gespeichert (Boller & Wiemken 1986; MacRobbie 2006; Martinoia et al. 2007). Deshalb ermöglicht die Kompartimentierung der Zelle, die Zusammensetzung des Zytosols bei Stomabewegungen konstant zu halten, während sich der Ionengehalt der Vakuole stark verändern kann (MacRobbie 2006).

1.2.3 Steuerung der Stoma-Bewegung

C3-Pflanzen veratmen das meiste Gas im Laufe des Tages während der Photosynthese. Daher öffnen Stomata unter Lichteinfall (Blaulicht), oder niedrigem inter- bzw. intrazellulärem CO_2 -Partialdruck (Roelfsema & Hedrich 2005). Blaulicht wird von den beiden Photorezeptoren PHOT1, PHOT2 wahrgenommen und führt zu einer Aktivierung der Plasmamembran-ständigen H^+ -ATPasen (Emi et al. 2001; Kinoshita et al. 2003; Kinoshita & Shimazaki 1999; Kinoshita & Shimazaki 2001; Shimazaki et al. 2007; Svanellid et al. 1999). Die H^+ -ATPasen pumpen dann unter ATP Verbrauch Protonen aus dem Zytoplasma in den Apoplasten. So entsteht ein elektrochemischer Protonengradient. Der apoplastische pH-Wert sinkt und die Zelle hyperpolarisiert (Lohse & Hedrich 1992). Dieser Gradient kann dann von kaliumeinwärtsgerichteten Kanälen genutzt werden, um K^+ in die Zelle aufzunehmen. Der Hauptaufnahmekanal in der Schließzelle ist KAT1 (Abschnitt 1.6.3), welcher bei hyperpolarisierten Spannungen öffnet und die Kaliumaufnahme vermittelt (Hoth et al. 1997; Roelfsema & Hedrich 2005; Schachtman et al. 1992; Very et al. 1995). Weiterhin führt die Ansäuerung des Apoplasten durch die H^+ -ATPasen zu einer veränderten Offenwahrscheinlichkeit des K^+ -Kanals und begünstigt damit den Kaliumstrom (Blatt 1992; Grabov et al. 1997; Schroeder & Hagiwara 1989). Als Gegenionen zu dem aufgenommenem K^+ dienen vor Allem Cl^- und NO_3^- . Diese beiden Anionen werden vermutlich im Symport mit apoplastischen Protonen aufgenommen (Guo et al. 2003; MacRobbie 1984; Penny et al. 1976; Van Kirk & Raschke 1978). Dies sind aber nicht die einzigen osmotisch aktiven Substanzen die bei der Stomabewegung wichtig sind. Sobald die Pflanze Photosynthese betreibt akkumuliert Zucker und, das Nebenprodukt des Calvin Zyklus, Malat in den Schließzellen (Allaway 1973; Asai et al. 2002). Diese Akkumulation der osmotisch aktiven Substanzen führt zu einem Nachstrom von Wasser, was in einer Vervielfachung des Innendruckes (Turgor) in den Schließzellen resultiert. Auf Grund ihrer speziellen Anatomie führt dieser Druckanstieg zum Öffnen der Stomata.

Der Stomaschluss kann hingegen durch eine Vielzahl von abiotischen Faktoren ausgelöst werden. Dazu zählen z.B. erhöhte Konzentration von CO_2 sowie O_3 , Dunkelheit, Trockenstress, hoher Salzgehalt, und Kälte. Trocken- und Salzstress sowie Kälte führen zu einem Anstieg der ABA-Konzentration in den Schließzellen (Abschnitt 1.3). Auch nach der Applikation von ABA auf Blätter verschiedener Pflanzenspezies kommt es

innerhalb weniger Minuten (5-10 min) zum Stomaschluss. Diese relativ schnelle mechanische Bewegung wird durch starke Ionenflüsse über die Plasmamembran der Schließzellen hinweg eingeleitet. Durch elektrophysiologische Untersuchungen ist bekannt, dass es in den ersten Minuten nach ABA-Applikation zu einer starken Depolarisation der Schließzellenmembran kommt (Ishikawa et al. 1983; Roelfsema et al. 2004; Thiel et al. 1992). Diese schnelle Depolarisation ist der initiale Schritt beim Stomaschluss und wird von Anionenkanälen in den Schließzellen ausgelöst. Diese werden vermutlich über einen Ca^{2+} abhängigen und einen Ca^{2+} unabhängigen Signaltransduktionsweg und einem Phosphorylierungsereignis aktiviert (Hetherington & Brownlee 2004; Levchenko et al. 2005; Marten et al. 2007; Schroeder & Hagiwara 1989). Der resultierende Anionenausstrom führt zu einer Depolarisation der Schließzellmembran. Anschließend aktiviert der spannungsabhängige Kaliumauswärtsgleichrichter GORK und entlässt Kaliumionen aus den Schließzellen. Ebenso spielen auch organische Osmotika eine Rolle bei dem Stomaschluss. So wurde beobachtet, dass Schließzellen von *C. communis* nach ABA-Behandlung 60 % ihres Malates abgeben (Van Kirk & Raschke 1978). Auch wird die osmotisch aktive Glukose durch Glykolyse und weiteren Einbau in Stärke aus dem Zytosol entfernt (Hedrich et al. 1985; Robinson & Preiss 1987; Schnabl & Kottmeier 1984). Am Ende dieser ABA-Signaltransduktionskette sinkt das osmotische Potential der Schließzelle, es kommt zu einem Wasserausstrom und das Stoma schließt sich.

1.3 Das Stresshormon ABA leitet den Stomaschluss ein

Das Phytohormon Abscisinsäure (**A**bscisic **A**cid/**ABA**) spielt eine entscheidende Rolle bei der Antwort von Pflanzen auf abiotischen Stress (Trockenheit, hoher Salzgehalt, Kälte, etc.) und ist maßgeblich an der Pflanzenentwicklung beteiligt (Becker et al. 2003; Felle et al. 2000; Roelfsema et al. 2004; Schroeder et al. 2001; Zeevaart & Creelman 1988). Bereits in den späten sechziger Jahren entdeckte man, dass ABA die Transpiration negativ beeinflusst (Little & Eidt 1968; Mittelhe & Vansteve 1969; Wright & Hiron 1969). Im Vergleich zu Pflanzen mit ausreichender Wasserversorgung, stieg die ABA-

Konzentration in Blättern von Pflanzen, die Trockenstress ausgesetzt waren, auf das 20-40-fache an (Harris et al. 1988). Dort bewirkt ABA, wie bereits erwähnt, den schnellen Stomaschluss durch den Ausstrom von Anionen und Kationen, was schließlich zu einer Verringerung des osmotischen Potentials führt und damit zum Verlust des Turgors in Schließzellen (MacRobbie 1998).

1.3.1 Synthese von ABA

ABA gehört zu den Isoprenoiden oder auch Terpenoiden, die alle vom C₅-Körper Isopentenyl (IDP) abstammen. IDP wird wiederum aus Mevalonsäure (MVA) oder 2-C-methyl-n-erythritol-4-phosphat (MEP) gebildet (Nambara & Marion-Poll 2005). Am Ende des MEP-Stoffwechselweges steht ein C-40 Körper, ein Carotenoid, das letztendlich über mehrere Schritte zu ABA synthetisiert/modifiziert wird (Hirai et al. 2000; Kasahara et al. 2004; Milborrow & Lee 1998; Nambara & Marion-Poll 2005). Mittlerweile konnten die meisten Enzyme dieses Stoffwechselweges mit Hilfe von auxotrophen Mutanten genetisch und biochemisch identifiziert werden (Nambara & Marion-Poll 2005; Zeevaert & Creelman 1988). Die schnelle Zunahme der ABA Konzentration als Antwort auf abiotischen Stress kann zum Teil durch die transkriptionelle Regulation der Synthesegene erklärt werden. Das Geschwindigkeits-bestimmende Enzym der ABA-Synthese ist **NCED3** (**n**ine-**c**is-**e**poxy**c**arotenoid-**d**ioxygenase **3**) (Tan et al. 2003). Weiterhin kann eine Erhöhung der ABA Menge auch durch den Stress-vermittelten Umbau von inaktiven ABA-Vorläufern stattfinden. ABA-Glucose stellt einen dieser Vorläufer dar. Durch die Trockenstress-induzierte Glucosidase **AtBG1** (**b**eta-1,3-**G**lucanase **1**) kann daraus in kurzer Zeit aktives ABA gebildet werden (Lee et al. 2006). Es bleibt allerdings fraglich, ob diese Mechanismen ausreichend sind, um die 30-fache Zunahme an aktivem ABA nach Stressinduktion zu erklären, oder ob noch andere regulatorische Funktionen oder Transportprozesse für die ABA-Anpassung an geänderte Umweltbedingungen nötig sind (Harris et al. 1988).

Die Schlüsselenzyme beim ABA-Abbau sind die ABA-8-Hydroxylasen (Nambara & Marion-Poll 2005). Sie werden durch Rehydratation bei Pflanzen unter Trockenstress

induziert (Kushiro et al. 2004). Schon hohe Luftfeuchtigkeit kann zur Transkription dieser Enzyme im Leitbündel oder in Schließzellen führen (Okamoto et al. 2009). Auch die Bildung von inaktiver ABA-Glucose aus seiner aktiven Form wird als Regulationsmechanismus vermutet (Priest et al. 2006).

1.3.2 Syntheseorte des ABA

Immunhistochemische Lokalisationsstudien der wichtigsten Syntheseenzyme von ABA **ABA2** (**ABA** deficient **2**), **NCED3**, und **AAO3** (**A**bsciscic **A**ldehyde **O**xidase **3**) haben gezeigt, dass das Leitbündelgewebe in der Wurzel der Hauptsyntheseort für ABA nach osmotischer Stressinduktion darstellt (Cheng et al. 2002; Endo et al. 2008; Koiwai et al. 2004; Tan et al. 2003). Eine Reporter-Luciferase-Expression unter dem Promotor des ABA-Syntheseenzym, **AtHD6** (**H**istone-**D**eacetylase **6**), zeigte dessen Transkription als Trockenstress-Antwort auch in Leitbündelgewebe und darüber hinaus in Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* (Christmann et al. 2007). Zudem konnten auch Transkripte von AtNCED2, AtNCED3 und AtAAO3 in Schließzellen gefunden werden (Koiwai et al. 2004; Tan et al. 2003). Da einer der vielen Wirkungsorte von ABA Schließzellen sind, unterstützt diese Erkenntnis die Theorie einer Gewebs-autonomen Synthese von ABA neben der geläufigen Hypothese, dass ABA durch Langstreckentransport aus der Wurzel in den Spross gelangt (Christmann et al. 2007; Sauter et al. 2001).

1.3.3 ABA Perzeption

Um auf das Trockenstresshormon ABA reagieren zu können, muss es zunächst mit Hilfe eines ABA-Rezeptors in der Schließzelle erkannt werden. Trotz intensiver Suche konnte lange Zeit kein entsprechendes Protein eindeutig als ABA-Rezeptor identifiziert werden. Publikationen, die von einer H-Untereinheit einer Magnesiumchelatasen (Shen et al. 2006)

oder einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (**GCR2**) als putativen ABA-Rezeptoren berichteten, stellten sich schließlich als nicht haltbar heraus (Gao et al. 2007; Liu et al. 2007; Muller & Hansson 2009; Risk et al. 2009; Wu et al. 2009). Kürzlich wurde allerdings von neuen vielversprechenden Kandidaten berichtet. Die beiden Plasmamembran assoziierten GPCR-Type G Proteine **GTG1** und **GTG2** binden ABA und Verlustmutanten dieser Gene wurden als ABA-insensitiv beschrieben (Chen et al. 2006; Pandey et al. 2006; Pandey et al. 2009). Allerdings sind die beiden knock out Mutanten nur teilweise ABA-insensitiv, was auf genetische Redundanz, oder alternative ABA-Rezeptoren zurückzuführen sein muss. Der Durchbruch bei der Suche nach ABA-Rezeptoren gelang erst während der Anfertigung dieser Dissertationsarbeit. Zwei unabhängige Arbeitsgruppen identifizierten die **PYR/PYL/RCAR** (pyrabactin resistance/**PYR1** like/regulatory component of ABA receptor) Familie eindeutig als ABA Rezeptoren (Ma 2009; Park et al. 2009). Diese Familie besteht aus 14 Mitgliedern. Die Mutante *pyr1* (pyrabactin resistance 1) hat sich in einem genetischen screen als insensitiv gegenüber dem ABA-Antagonisten Pyrabactin gezeigt. Auch in dieser Familie kommt es zu Redundanz, da erst eine Quatrupelmutante (*pyr1/pyl1/pyl2/pyl4*) einen deutlich ABA-insensitiveren Phänotyp im Keimungsverhalten und Wurzelwachstum aufwies, als die Einfachmutante *pyr1* (Nishimura et al. 2010; Park et al. 2009).

1.3.4 Funktion der PP2C Phosphatasen in der ABA Signalweiterleitung

In Interaktionsstudien konnte die Bindung von PP2C Phosphatasen an die Mitglieder der **PYR/PYL/RCAR** Familie in Abhängigkeit von ABA gezeigt werden. Diese Phosphatasen spielen eine entscheidende Rolle bei der ABA-Signaltransduktion und die entsprechenden Verlustmutanten in Arabidopsis zeigten einen ABA-hypersensitiven Phänotyp (Gao et al. 2007; Mishra et al. 2006). So wurden in „yeast two-hybrid“ Experimenten die beiden PP2C Phosphatasen **HAB1** (homology to **ABI1**) und **ABI1** (**ABA** insensitive 1) als Interaktionspartner von **PYR1** bestimmt. Weiterhin interagiert **HAB1** mit **PYL1** oder **PYL4** (Park et al. 2009). **ABI2** (**ABA** insensitive 2) bindet an **RCAR1/PYL9** (regulatory component of ABA receptor 1/**PYR1** like 9) und wird somit

inhibiert (Ma 2009; Park et al. 2009). ABI1 interagiert mit insgesamt neun Mitgliedern der PYR/PYL/RCAR Familie innerhalb kurzer Zeit nach ABA Zugabe (Nishimura et al. 2010).

Röntgen-kristallografische Studien zeigten schließlich, dass die ABA Bindung an PYR1, PYL1 und PYL2 zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führt, was wiederum die Bindung des Rezeptors an die aktive Domäne von PP2C Phosphatasen ermöglicht (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009; Yin et al. 2009).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Aktivität der PP2C-Phosphatasen in Anwesenheit von ABA von den ABA-Rezeptoren inhibiert wird. Diese PP2C Phosphatasen dienen daher als negative Regulatoren des ABA-Signaltransduktionsweges und verhindern den Stomaschluss in Abwesenheit von ABA (Leonhardt et al. 2004; Nishimura et al. 2010; Robert et al. 2006; Saez et al. 2004).

Erstmals beschrieben wurden die Gene der PP2C Phosphatasen (*abi1* und *abi2* / **ABA insensitive 1** und **2**) bei der Suche nach ABA-insensitiven *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die ungerichtet mutiert wurden. Die identifizierten Mutanten zeigten eine deutlich verminderte ABA-Inhibierung während der Keimung und des Wachstums (Leon-Kloosterziel et al. 1996). Die entsprechenden Gene konnten dann von Leung (1994; 1997) kloniert und durch Sequenzhomologien in die Klasse der PP2C Phosphatasen eingeordnet werden. Warum diese dominanten Mutanten (*abi1-1* und *abi2-1*) allerdings einen ABA-insensitiven Phänotyp zeigen, während ihre Verlustmutanten ABA-hypersensitiv sind, konnte erstmals 2009 (Ma ; Park et al.) eindeutig aufgeklärt werden. In ihren Interaktionsstudien stellte sich heraus, dass im Gegensatz zu den Wildtyp-Proteinen die Einzelmutanten *abi1-1* und *abi2-1* nicht an den ABA-Rezeptor RCAR1/PYL9 binden und somit auch nicht in Anwesenheit von ABA inhibiert werden. Ein weiterer Interaktionspartner von ABI1 konnte schon früher aufgedeckt werden. Mittels „in-Gel“ Kinase Experimenten konnten Mustilli et al (2002) zeigen, dass die ABA-vermittelte Aktivierung einer 42-kD großen Proteinkinase **OST1 (Open STomata 1)** in den dominanten *abi1-1* Mutanten unterbunden war. Weiterhin wurde die direkte Interaktion dieser beiden Proteine von Yoshida et al (2006) mittels Hefe-2-Hybrid Experimenten bestätigt. Letzte Veröffentlichungen hierzu haben aufgeklärt, dass OST1 von ABI1 durch Dephosphorylierung inhibiert wird (Nishimura et al. 2010; Umezawa et al. 2009; Vlad et al. 2009).

1.3.5 Funktion der SnRK2.6 Kinase in der ABA Signalweiterleitung

Schon deutlich bevor die ABA-Rezeptoren identifiziert wurden, konnte ein weiteres Glied in der ABA-Signaltransduktionskette beschrieben werden (Mustilli et al. 2002). Mittels thermographischer Bildgebung von ungerichtet mutierten und trockengestressten *Arabidopsis* Pflanzen gelang es hier ein neues Gen zu identifizieren, das am ABA-vermittelten Stomaschluss beteiligt ist. Es codiert für **OST1** (Open STomata 1 / SnRK2.6), eine Proteinkinase aus der 38 Mitglieder umfassenden Familie der SnRK's (Hrabak et al. 2003; Imamura et al. 2003). Die *ost1* Mutanten sind im schnellen, ABA induzierten Stomaschluss inhibiert und erscheinen deshalb in den thermographischen Aufnahmen kühler. Für 2 eng zu SnRK2.6 verwandte Kinasen (SnRK2.2/2.3) konnte später ebenso eine ABA-Aktivierung nachgewiesen werden, diese Kinasen werden allerdings hauptsächlich in der Wurzel exprimiert (Fujii et al. 2011; Fujii & Zhu 2009; Li et al. 2000; Umezawa et al. 2009). Die übergeordnete Regulation von OST1 durch ABI1 weist die Kinase als einen positiven Regulator im ABA-Signaltransduktionsweg aus (Nishimura et al. 2010; Umezawa et al. 2009; Vlad et al. 2009). Dabei wird OST1 durch ABA aktiviert, was *in vivo* zu einer Phosphorylierung verschiedener Serine in der Aktivierungsdomäne von OST1 führt (Vlad et al. 2009). Die Phosphatase ABI1 konnte hingegen in *in vitro* Kinase Experimenten diese Autophosphorylierung von OST1 dephosphorylieren und die Kinase damit in ihren inaktiven Zustand zurückversetzen (Umezawa et al. 2009; Vlad et al. 2009).

Die aktive Kinase OST1 führt über die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Verbindungen (ROS) und Anionenkanalaktivierung zum Stomaschluss (Mustilli et al. 2002; Suhita et al. 2004; Yoshida et al. 2002). In Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* Epidermispräparaten konnte innerhalb von 2-3 min nach ABA-Gabe, die verstärkte Produktion von H₂O₂ (ROS) und eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration nachgewiesen werden. Zudem blieb der Stomaschluss aus, wenn die Produktion von H₂O₂ chemisch geblockt wurde (Pei et al. 2000). ROS in seiner Eigenschaft als Signalmolekül wurde daraufhin von Cho (2009) als positiver Regulator in der ABA-Signaltransduktion beschrieben. Die beiden Schlüsselenzyme, verantwortlich für diese ABA vermittelte ROS Produktion in Schließzellen, konnten von Kwak (2003) als die NADPH Oxidasen **AtrbohD/F** (respiratory burst oxidase homologue **D** und **F**) identifiziert werden. Fehlen diese beiden Gene, so kommt es in Schließzellen von *A.*

thaliana zu einer verminderten ABA vermittelten ROS Produktion. Als Folge kommt es in diesen Schließzellen, ebenso wie in *ost1* Verlustmutanten (Mustilli et al. 2002), nach ABA Gabe zu einem verminderten Stomaschluss (Kwak et al. 2003). Die Verbindung dieser beiden Glieder in der ABA-Signaltransduktionskette wurde lange vermutet (Mustilli et al. 2002), konnte aber erst von Sirichandra (2009) geknüpft werden. OST1 ist AtrbohF vorgeschaltet und aktiviert die Oxidase durch Phosphorylierung. Entstehendes ROS führt daraufhin zu einer Aktivierung von Kalziumkanälen und einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration, die wiederum zu Anionenkanalaktivität führen kann (Cho et al. 2009; Hedrich et al. 1990; Linder & Raschke 1992; Schroeder & Hagiwara 1989; Schroeder & Keller 1992; Siegel et al. 2009). Diese Anionenkanalaktivierung stellt den initialen Schritt beim schnellen ABA-abhängigen Stomaschluss dar (Grabov et al. 1997; Roelfsema et al. 2004). Die Dekodierung des Ca^{2+} Signals und die Umsetzung in eine physiologische Reaktion der Zelle/Pflanze ist dabei eine große wissenschaftliche Herausforderung, weil sowohl biotische als auch abiotische Reize zunächst Ca^{2+} als „second messenger“ bei der Signalweiterleitung benutzen. Wie die Pflanzenzelle den Auslöser des Ca^{2+} Signals erkennt und spezifisch darauf reagiert ist noch weitgehend unverstanden.

1.4 Ca^{2+} als „second Messenger“

Wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben, führt eine Erhöhung der ABA Konzentration zum Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration. Die daraufhin folgende Aktivierung der Anionenkanäle initiiert schließlich den Stomaschluss (Hedrich et al. 1990; Linder & Raschke 1992; Schroeder & Hagiwara 1989; Schroeder & Keller 1992; Siegel et al. 2009). Hierbei drängen sich zwei Fragen auf: i) Wie kommt es zur Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration und ii) wie kann diese Ca^{2+} -Erhöhung im Zytosol in eine Anionenkanalaktivierung übersetzt werden?

1.4.1 Kalziumtransporter

Die Reizweiterleitung von ABA-Signalen zieht die Freisetzung vieler unterschiedlicher „second messenger“ nach sich (Hirayama & Shinozaki 2007; Israelsson et al. 2006; Kim et al. 2010; Roelfsema & Hedrich 2010; Schroeder et al. 2001). Dazu gehören z.B. reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), Stickstoffmonoxid (NO), und Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PIP3) (Kim et al. 2010). Einer der wichtigsten „second messenger“ stellt allerdings die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration dar (Case et al. 2007; Shemarova & Nesterov 2005). ABA ist aber nur ein Signal unter vielen, die zu einem Kalziumsignal führen (Gilroy et al. 1991; Marten et al. 2007; Mcainsh et al. 1990). Viele weitere Stressfaktoren, wie z.B. Wind, Kälte, mechanische Stimulation und hypoosmotische Bedingungen können ebenso zu einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration führen (Knight et al. 1991; Knight et al. 1992; Takahashi et al. 1997). Pflanzenzellen halten dazu einen hohen Ca^{2+} Gradienten zwischen Zytosol und der extrazellulären Matrix aufrecht. Die Aufrechterhaltung einer niedrigen zytosolischen Ca^{2+} Konzentration hat in der Evolution seine Funktion als „second messenger“ immer weiter gestärkt. Die freie Kalziumkonzentration in der Zellwand und der Vakuole beträgt etwa 10^{-4} M, während im Zytoplasma Ca^{2+} nur in einer Konzentration von etwa 10^{-7} M im Ruhezustand vorliegt (Bethmann et al. 1995; Felle 1988; Felle et al. 2000; Felle & Hepler 1997; Miller & Sanders 1987). Um diesen großen Gradienten aufbauen zu können, muss die Zelle über effiziente Mechanismen für den Transport von Ca^{2+} aus dem Zytoplasma in extra- oder intrazelluläre Kompartimente verfügen (Case et al. 2007).

1.4.1.1 Export von Ca^{2+} aus dem Zytoplasma

Der Transport von Kalzium aus dem Zytoplasma erfolgt meist gegen einen sehr großen elektrischen und chemischen Gradienten. Um diesen Gradienten zu überwinden wird Kalzium mittels P-Typ Ca^{2+} -ATPasen aus dem Zytosol gepumpt. Diese ACAs (autoinhibierten Ca^{2+} ATPasen) weisen hohe Homologien zu tierischen PMCA (plasma membrane Kalzium ATPasen) auf. Bislang konnten 10 ACAs in *A. thaliana* identifiziert werden (Baxter et al. 2003). Während tierische PMCA ausschließlich in Plasmamembranen lokalisieren, sind ihre pflanzlichen Vertreter, die ACAs, auch mit

Endomembranen assoziiert (Bolte et al. 2004; Geisler et al. 2000; Hong et al. 1999; Lee et al. 2007; Schiott et al. 2004). Bislang konnten 3 Vertreter der ACA Familie in Plasmamembranen lokalisiert werden. ACA7 und ACA9 sind an der Pollenentwicklung beteiligt (Lucca & Leon 2012; Schiott et al. 2004). Für ACA8 konnte eine Regulation der Pumpaktivität mittels Kinasen der CDPK Familie (Abschnitt 1.4.2.1) beschrieben werden (Bonza et al. 2000).

Weiterhin werden ACAs über eine Calmodulin-regulierte, autoinhibitorische Domäne an ihrem N-terminus reguliert. Dabei wird die Pumpaktivität nach Bindung von Ca^{2+} aktiviert (Bonza et al. 2000; Carafoli 1997; Harper et al. 1998; Schiott et al. 2004). Während dieses Pumpvorgangs sinkt die zytosolische Kalziumkonzentration und die Aktivität der ACAs wird eingestellt. Somit wird in den Zellen eine niedrige Ruhekonzentration an Kalzium gewährleistet (Baekgaard et al. 2005; Baekgaard et al. 2006). Zusätzlich zu diesen ATPasen wird Kalzium mit Hilfe von Kationen/ H^+ Antiportern (CAX) transportiert (Shigaki & Hirschi 2006). Die CAX-Familie in *Arabidopsis* besteht aus 6 Mitgliedern. Die bislang charakterisierten CAX-Transporter (CAX1-4) lokalisieren in der Vakuolenmembran und transportieren, energetisiert durch den Protonengradienten über dem Tonoplasten, Ca^{2+} in die Vakuole (Mei et al. 2009; Shigaki & Hirschi 2006; Zhao et al. 2009).

1.4.1.2 Ca^{2+} Einstrom in das Zytoplasma

Im Gegensatz zum Export aus dem Zytoplasma, kann der Einstrom von Ca^{2+} entlang des elektrochemischen Gradienten über Kanalproteine erfolgen. Da die Hauptquellen für Kalzium der Apoplast, das ER, der Zellkern und die Vakuole sind, müssen sich diese Ca^{2+} /Kationen selektiven Kanäle in den entsprechenden Membransystemen befinden.

Wie in Abschnitt 1.6.3.4 erwähnt, befinden sich in der Vakuolenmembran wenigstens drei Kationenkanaltypen: SV, VK und FV (Allen & Sanders 1996; Hedrich et al. 1986; Hedrich & Neher 1987; Martinoia et al. 2007; Schulzlessdorf et al. 1996; Ward & Schroeder 1994). Aufgrund seiner Selektivität kommt für einen effektiven Ca^{2+} Transport der SV-Kanal in Frage (Hedrich & Neher 1987; Ward & Schroeder 1994). Da der SV-Kanal zudem durch Ca^{2+} aktiviert ist, vermutet man durch diesen einen Ca^{2+} induzierten Ca^{2+} Ausstrom in das Zytoplasma (Bewell et al. 1999; Scholz-Starke et al. 2006; Ward & Schroeder 1994). Eine *Arabidopsis* knock out Mutante *tpc1-2* zeigte einen verringerten

Stomaschluss ausgelöst durch eine hohe extrazelluläre Kalziumgabe (Peiter et al. 2005), wobei andere Kalziumantworten unbeeinflusst blieben (Ranf et al. 2008). Im Folgenden wurde allerdings durch Messungen der Stomaöffnung, reaktiven Sauerstoffverbindungen (Abschnitt 1.3.5) und der Kalziumkonzentrationen gezeigt, dass TPC1 nicht direkt an dem ABA-vermittelten Stomaschluss beteiligt ist. Nach aktuellem Wissensstand ist es wahrscheinlicher, dass dieser Kanal auf eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration reagiert als diese selbst zu generieren. (Hedrich & Marten 2011; Islam et al. 2010; Ranf et al. 2008). Somit ist der verantwortliche Kanal für die Kalziumfreisetzung im Zytoplasma noch nicht identifiziert.

Neben der Vakuole stellt auch der Apoplast einen großen Kalziumspeicher dar. In der Plasmamembran befindet sich eine Vielzahl an Kationenkanälen, die permeabel für Ca^{2+} sind. Sie alle sind zusammengefasst unter der Klasse der nichtselektiven Kationenkanäle (NSCCs). Zu ihnen zählen 41 Mitglieder der zyklische Nukleotid-aktivierten Kanäle (CNGC) und der Glutamat-Rezeptor Familie (GLR). Allerdings besitzen die meisten von ihnen unter physiologischen Bedingungen höhere Selektivitäten für andere Kationen wie z.B. Kalium (Hetherington & Brownlee 2004). Zu diesen zählen auch die mechanosensitiven Kalziumkanäle der MSL-Familie in der Plasmamembran von *Arabidopsis* Schließzellen (Cosgrove & Hedrich 1991; Haswell et al. 2008).

Da das Ruhepotential der Schließzelle im offenen Zustand vor einem Ca^{2+} induzierten Stomaschluss stark hyperpolarisiert ist (Linder & Raschke 1992; Roelfsema et al. 2001), wurden Hyperpolarisations-aktivierte Ca^{2+} Kanäle postuliert (Lohse & Hedrich 1992). Später konnten diese Kanäle dann in *Arabidopsis*-Schließzellen gefunden werden (Hamilton et al. 2000; Pei et al. 2000). Dass diese Kanäle tatsächlich nach Aktivierung durch Hyperpolarisation einen Ca^{2+} Einstrom in *Arabidopsis*-Schließzellen vermitteln, konnte mit dem kalziumsensitiven Farbstoff FURA-2 bestätigt werden (Grabov & Blatt 1998; Levchenko et al. 2005; Stange et al. 2010). Neben der Regulation durch ihre Spannungsabhängigkeit, wird die Aktivität der Hyperpolarisations-aktivierten Ca^{2+} Kanäle noch durch ROS gesteigert (Pei et al. 2000). Obwohl die Existenz dieser Kanäle schon lange bekannt ist und sie auch elektrophysiologisch in pflanzlichen Zellen untersucht sind, ist es bislang nicht gelungen die betreffenden Gene zu identifizieren, die für diese Kanäle kodieren.

1.4.2 Dekodierung des Kalziumsignals

Wie bereits erwähnt, aktivieren die meisten spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanäle in Pflanzen nach Hyperpolarisation des Membranpotentials (Gelli & Blumwald 1997; Hamilton et al. 2000; Pei et al. 2000). Die erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration führt auf bislang unbekanntem Weg wiederum zur Aktivierung der Anionenkanäle in Schließzellen (Abschnitt 1.6.4.2) (Hedrich et al. 1990; Schroeder & Hagiwara 1989; Stange et al. 2010). Dies bewirkt eine Depolarisation der Plasmamembran und deaktiviert die Hyperpolarisation-aktivierten Ca^{2+} Kanäle. Die erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration aktiviert neben den Anionenkanälen auch die P-Typ Ca^{2+} -ATPasen, die das Kalziumsignal wieder aufheben.

Wie aber können Zellen auf geänderte Kalziumkonzentrationen reagieren und diese in spezifische Antworten (z.B. Aktivierung der Anionenkanäle in Schließzellen) übersetzen? Pflanzen besitzen zu diesem Zweck mehrere Familien von Kalziumsensoren. Es sind 3 Klassen von Kalzium-bindenden Proteinen bekannt, die Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentrationen wahrnehmen und in Protein-Phosphorylierungen übersetzen können. Dabei handelt es sich um Calmodulin, das unter anderem mit Calmodulin-abhängigen Kinasen interagiert und diese reguliert, calcineurin **B**-like (**CBL**) Proteine, die an **CBL** interagierende **Proteinkinasen (CIPK)** binden und diese aktivieren beziehungsweise deaktivieren, sowie **calcium dependent protein kinases (CDPKs)** oder in *Arabidopsis* **CPKs**), die Kinasen darstellen, die direkt Kalzium binden können und im gleichen Protein eine Kinase-Aktivität besitzen.

1.4.2.1 CDPKs sind Kalzium abhängige Kinasen

CDPKs, Serin / Threonin-Kinasen, kommen außer in einigen Prokaryoten nur in Pflanzen vor. In *Arabidopsis thaliana* bilden die CPKs eine Genfamilie mit 34 Mitgliedern. Sie besitzen eine hochkonservierte Struktur, die aus vier Domänen aufgebaut ist. Am N-Terminus befindet sich eine sehr variable Domäne, welche die größten Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen CDPKs aufweist und möglicherweise für die Substratspezifität verantwortlich ist. CDPKs können am N-Terminus myristoyliert oder palmitoyliert vorliegen. Dabei handelt es sich um posttranslationale Modifikationen,

die eine Membranassoziation ermöglichen. 24 der 34 CDPKs aus *Arabidopsis thaliana* weisen eine Myristoylierungsstelle auf (Bucher & Bairoch 1994). Die drei anderen Domänen sind in der CPK-Familie stark konserviert. An den variablen N-Terminus schließt sich die Kinase-Domäne an. Sie enthält das aktive Zentrum der Proteinkinaseaktivität, sowie die ATP-Bindestelle. Die Anzahl der Aminosäuren (AS) der Kinasedomäne variiert unter den CDPK-Isoformen zwischen 264 und 273 AS. Sie alle weisen die 11 hochkonservierten Subdomänen von eukaryotischen Ser/Thr-Kinasen auf. Dabei besitzt das aktive Zentrum die höchste Sequenzhomologie mit annähernd 100% zwischen allen 34 CPK-Proteinen (Cheng et al. 2002). Darauf folgt die 31 Aminosäuren lange Junction-Domäne (autoinhibitorische Domäne), deren C-terminaler Teil als Pseudosubstrat fungiert. Am C-terminalen Ende der CPK befindet sich die Calmodulin-ähnliche Domäne, welche ungefähr 40 % Sequenzhomologie mit Calmodulin aufweist (Chandran et al. 2006). Sie ist aus zwei strukturellen Einheiten, der C- und N-terminalen Schleife mit jeweils 2 kalziumbindenden EF-Händen aufgebaut. Jede EF-Hand weist eine „helix-loop-helix“ Struktur auf und bindet ein einzelnes Ca^{2+} -Ion. Insgesamt können somit 4 Ca^{2+} Ionen von der CPK gebunden werden, wobei man eine kooperative Kalziumbindung vermutet (Lee et al. 1998). Im Ruhezustand der CPK ohne gebundenes Kalzium befindet sich die Junction-Domäne als Pseudosubstrat im aktiven Zentrum der Kinase-Domäne und blockiert die Enzymaktivität. Nach Stress-induzierter Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration bindet Ca^{2+} an der Calmodulin-ähnlichen Domäne, was zu einer Konformationsänderung der CPK führt. Die autoinhibitorische Junctiondomäne wird aus dem aktiven Zentrum gezogen wodurch diese nun nicht mehr blockiert ist. Die Kinase autophosphoryliert sich selbst und ist in ihrem aktiven Zustand (Harmon et al. 1994; Harper et al. 1994; Huang et al. 1996; Vitart et al. 2000; Yoo & Harmon 1996). Für 3 CDPKs aus Soja wurde auf diesem Wege eine 22-50-fache Erhöhung der Enzymaktivität durch Kalziumbindung gezeigt (Lee et al. 1998). Die C- und N-terminalen EF-Hände sind jedoch nicht identisch in ihren Kalziumbindeeeigenschaften. Die Messung der Kalziumbindeaffinitäten der EF-Hände von AtCPK1 und LeCPK1 aus *Arabidopsis* und Tomate zeigte, dass sich die 4 Kalziumbindenden EF-Hand-Motive in zwei Klassen von hoher und niedriger Ca^{2+} -Affinität aufspalten, wobei die C-terminalen EF-Hände eine signifikant höhere Kalziumbindeaffinität aufwiesen, als die N-terminalen EF-Hände. Diese Daten deuteten darauf hin, dass C- und N-terminale EF-Hände unterschiedliche Funktionen bei der Aktivierung des Enzyms haben. Dabei scheint besonders die N-terminale Schleife als

Kalziumsensor zu fungieren, dessen Kalziumbeladung schließlich das Enzym aktiviert (Chandran et al. 2006).

Für viele CDPKs ist die biologische Funktion noch unbekannt. Jedoch weisen Transkriptionsdaten, *in vitro* Phosphorylierungsexperimente und phänotypische Untersuchungen von CDPK knock out Pflanzen auf eine Funktion von CDPKs im Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus, Ionen- und Wassertransport, in der Zytoskelettorganisation, Phospholipidsynthese, Pathogenabwehr und abiotischer Stressantwort hin (Berberich & Kusano 1997; Choi et al. 2005; Martin & Busconi 2001; Tahtiharju et al. 1997; Urao et al. 1994). Transkripte von AtCPK10 und AtCPK11 akkumulieren nach Salz- und Trockenstress, jedoch nicht nach Kälte- oder Hitzestress. Die Behandlung der Pflanzen mit ABA hatte keinerlei Effekt auf die Transkription der beiden Gene. Dies deutet darauf hin, dass beide Gene als Antwort auf eine Änderung des osmotischen Potentials aktiviert werden (Urao et al. 1994). Eine Funktion in der Antwort auf Trocken- und Salzstress wurde auch für die AtCPK23 von Ma und Wu (2007) beschrieben. CPK23 T-DNA Insertionspflanzen zeigten eine verstärkte Toleranz gegen Trocken-, osmotischen - und Salzstress. Des Weiteren wurde nach Salzstress ein höheres Kalium- zu Natriumverhältnis im oberirdischen Gewebe der knock out Pflanzen, verglichen zum Col-0 Wildtyp, festgestellt. Dies deutet auf eine veränderte Kaliumaufnahme hin (Ma & Wu 2007).

In Arabidopsis konnten bislang mit Hilfe von Verlustmutanten 4 CPKs, die einen Einfluss auf das ABA-abhängige Schließen des stomatären Komplexes haben, identifiziert werden (Mori et al. 2006; Zhu et al. 2007). Mutationen in den *CPK3* und *CPK6* Genen führten nach ABA-Stimulation zu verminderter S-Typ Anionen- und Kalzium-Kanalaktivierung (Mori et al. 2006). Daraus resultierend konnte bei Fehlen der Kinasen *cpk3/cpk6* nach Ca^{2+} Behandlung ein 64 – 81 % verminderter Stomaschluss beobachtet werden (Mori et al. 2006). CPK4 und CPK11 konnten ebenso als positive Regulatoren der ABA Signaltransduktion identifiziert werden, da sich ihre knock out Mutanten ABA-insensitiv und die Überexprimierer hypersensitiv verhielten (Zhu et al. 2007). Da diese beiden CPKs sowohl im Zytoplasma, als auch im Kern lokalisiert sind, vermutet man, dass das ABA Signal an mehreren Orten dekodiert wird. Tatsächlich sind beide Kinasen in der Lage ABA-responsive element binding factor 1 und 4 (Transkriptionfaktoren **ABF** 1/4) zu phosphorylieren (Zhu et al. 2007). Neben diesen beiden konnte schon zuvor gezeigt werden, dass eine Vielzahl der 34 CPKs in der Lage sind mit ABFs zu interagieren und

diese *in vitro* zu phosphorylieren (Choi et al. 2005). Eine direkte Interaktion und Phosphorylierung von Kanalproteinen durch CPKs wurde aber bislang noch nicht beobachtet.

1.4.2.2 CBL Proteine fungieren als Kalziumsensoren für CIPKs

Eine weitere Klasse von kalziumsensorischen Proteinen sind calcineurin **B**-like (**CBL**) Proteine. CBLs wurden bisher nur im Pflanzenreich nachgewiesen und ähneln strukturell Calcineurin **B** (**CNB**) sowie den neuronalen Kalziumsensoren (**NCS**) aus dem Tierreich (Batistic & Kudla 2004; Kolukisaoglu et al. 2004; Kudla et al. 1999). In *A. thaliana* wurden zehn CBL-Gene entdeckt. Sie kodieren für kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 23,5 kD und 31,7 kD (203-246 AS) (Kolukisaoglu et al. 2004). CBLs sind sowohl in ihrer AS-Sequenz als auch in ihrer Intron-Exon-Struktur stark konserviert. Das bedeutet jedoch nicht, dass diese auch zwangsläufig funktionelle Redundanz zeigen (Batistic & Kudla 2004). Die beiden ähnlichsten Paare sind CBL1 und 9 sowie CBL2 und 3 (Kolukisaoglu et al. 2004). Einige der CBLs besitzen ein Myristoylierungs- und Palmitoylierungsmotiv für eine mögliche Membranassoziation. AtCBL1, 4, 5 und 9 weisen solche Sequenzen auf (Batistic et al. 2008; Kolukisaoglu et al. 2004) und konnten *in vitro* bereits myristoyliert werden (Batistic & Kudla 2004). Obwohl sich die Membranlokalisation zwischen der myristoylierten und der unmyristoylierten (mutierten) Form von AtCBL4/SOS3 nicht geändert hat, konnte nur die myristoylierte Form in Abhängigkeit von Ca^{2+} mit dem Zielprotein AtCIPK24/SOS2 interagieren (Ishitani et al. 2000). Mittlerweile konnte anhand von GFP-Fusionsstudien gezeigt werden, dass CBL1 und 9 an der Plasmamembran lokalisiert sind (D'angelo et al. 2006). Diese Ergebnisse zeigen, dass Myristoylierung sowohl für eine Membranlokalisation als auch für weitere Funktionen wie die spezifische Interaktion mit anderen Proteinen erforderlich sein könnte (Batistic et al. 2008).

Alle CBL-Proteine besitzen vier EF-Hände, deren Abstand im Protein nicht variiert. Daher ist die unterschiedliche Größe der Proteine auf die N- und C-Termini zurückzuführen. Wahrscheinlich zeigen CBLs, je nach Struktur der EF-Hände, eine höhere oder niedrigere Affinität für Ca^{2+} (Kolukisaoglu et al. 2004). Einzelne CBLs tragen sogar EF-Hände, die kein Ca^{2+} mehr binden können. Vermutlich übernehmen diese

EF-Hände andere Funktionen wie z.B. die Bindung von Zielproteinen (Batistic & Kudla 2004; Kolukisaoglu et al. 2004).

1.4.2.4 CIPK Proteine sind CBL-aktivierte Kinasen

Es wird postuliert dass CBLs durch die Bindung von Ca^{2+} ihre Konformation ändern und somit vermutlich an ihre Interaktionspartner, den **CBL interacting Proteinkinase (CIPK)** binden und diese aktivieren (Burgoyne & Weiss 2001; Hedrich & Kudla 2006; Kudla et al. 1999; Luan 2009). Interessanterweise bewirkt eine Interaktion zwischen AtCBL4/SOS3 und AtCIPK24/SOS2, Komponenten des SOS-Signalwegs, der zur Aktivierung des Na^+/H^+ Antiporters SOS1 führt, eine Aktivierung und gleichzeitige Rekrutierung der Kinase an die Plasmamembran (Quintero et al. 2002). Die Kristallstruktur von SOS3 und der C-terminalen Domäne von SOS2 ermöglichte ein genaueres Verständnis dieser Ca^{2+} abhängigen Kinaseaktivierung (Akaboshi et al. 2008; Sanchez-Barrena et al. 2007). Möglicherweise beeinflussen CBLs durch Interaktion mit einer CIPK das subzelluläre „Trafficking“ der CIPKs an die Plasmamembran oder an Membranen anderer Zellkompartimente, sodass diese Kinasen mit unterschiedlichen Zielproteinen an unterschiedlichen Membransystemen interagieren können (Batistic & Kudla 2004; Batistic et al. 2008). Die CIPKs besitzen eine typische Zwei-Domänen-Struktur aus einer N-terminalen Kinasedomäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne. Eine Verbindungsregion („Junction domain“) sitzt zwischen diesen beiden Domänen.

Die C-terminale regulatorische Domäne ist innerhalb der CIPKs relativ ähnlich und ca. 150 AS lang (Shi et al. 1999). Sie besitzt eine 24 AS-lange Region, welche aufgrund ihrer auffallenden konservierten AS-Sequenz Asparagin(N)-Alanin(A)-Phenylalanin(F) **NAF**-Domäne genannt wird (oder auch FISL-Domäne) (Albrecht et al. 2001; Hrabak et al. 2003). Bis heute konnten ihr zwei Funktionen zugeschrieben werden. Zum einen übt sie einen autoinhibitorischen Effekt auf die katalytische Domäne aus, zum anderen dient sie für die Interaktion mit CBLs. Viele ihrer AS sind hydrophob, so dass eine Bindung von CBLs über hydrophobe Wechselwirkungen stattfindet (Akaboshi et al. 2008; Batistic & Kudla 2004; Quintero et al. 2002).

1.4.2.5 Bedeutung der CBL / CIPK Proteine

In der derzeitigen Literatur geht man davon aus, dass eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration vom Ca^{2+} Sensorprotein CBL durch eine Bindung der Kalziumionen an dessen EF-Hände wahrgenommen wird. Die Bindung von Ca^{2+} löst eine Konformationsänderung des CBL-Proteins aus, sodass es mit einer CIPK Kinase einen Komplex bilden kann. Die Komplexbildung führt nun auch in der CIPK zu einer Konformationsänderung, bei der die Kinasedomäne von der inhibierenden NAF-Domäne gelöst wird. Daraufhin kann die CIPK ihre Zielproteine phosphorylieren und somit regulieren (Batistic & Kudla 2004; Qiu et al. 2002; Quintero et al. 2002; Sanchez-Barrena et al. 2007).

Mindestens 2 der 10 in *Arabidopsis* exprimierten CBLs scheinen eine Rolle bei der ABA-Signaltransduktion in Schließzellen zu spielen. So zeigen z.B. CBL1 überexprimierende Pflanzen eine erhöhte Toleranz gegenüber Trockenstress. Allerdings weisen *cbll* knock out Pflanzen keine geänderte ABA-Antwort auf (Albrecht et al. 2003; Cheong et al. 2003). *cb19* Mutanten sind, im Gegensatz dazu, bei der Samenkeimung, beim Sämlingwachstum und bei der Genexpression ABA-hypersensitiv (Kim et al. 2009; Pandey et al. 2004; Pandey et al. 2008). Wenngleich keine der beiden Einfachmutanten einen veränderten ABA-Effekt in Schließzellen zeigte, ist die *cbll/cb19* Doppelmutante trockenresistenter als der Wildtyp und ihre Stomata reagieren hypersensitiv auf ABA (Cheong et al. 2007). Weitere Ergebnisse unterstützen die Erkenntnis, dass CIPK23 mit den beiden CBLs interagiert und ein negativer Regulator im ABA Signaltransduktionsweg ist. Die *cipk23* Verlustmutanten sind auch ABA-hypersensitiv in Bezug auf ihre Stomabewegung und zeigen eine verringerte Transpiration (Cheong et al. 2007). In Verbindung mit dem *cbll/cb19* Phänotyp ist es wahrscheinlich, dass beide CBLs nach Kalziumaktivierung synergetisch CIPK23 aktivieren und sie an die Plasmamembran geleiten (Cheong et al. 2007). Dort ist ihr Zielprotein der K^{+}_{in} Kanal AKT1, der durch Phosphorylierung aktiviert wird, wodurch Kalium in die Schließzelle strömen kann und sich das Stoma öffnet (Cheong et al. 2007; Geiger et al. 2009; Li et al. 2006; Luan 2009; Xu et al. 2006). Der Kalzium/ H^{+} Antiporter CAX1 wird durch die CIPK24/SOS2 (salt overly sensitive 2) aktiviert, was zu einer Terminierung des Kalziumsignals führen könnte (Cheng et al. 2004). Die Redundanz der einzelnen Ca^{2+} detektierenden Proteine (CBLs und CPKs) spricht für die Stabilität der schließzellspezifischen kalziumabhängigen Signaltransduktion (Cheong et al. 2007; Mori et al. 2006; Zhu et al. 2007). Dabei agieren

CPKs vermutlich als positive und CBLs/CIPKs als negative Regulatoren des kalziumabhängigen ABA-Signaltransduktionsweges (Cheong et al. 2007; Kim et al. 2003; Pandey et al. 2008).

1.5 Kalzium unabhängige Signaltransduktion

Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass dem ABA ausgelöstem Stomaschluss in *Commelina communis* eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration vorangeht (Mcainsh et al. 1990). Allerdings erfolgt der Kalziumanstieg nicht immer und der Prozentsatz variiert je nach Spezies. So tritt eine Kalziumerhöhung in 37 % aller Schließzellen von *Vicia faba* (Levchenko et al. 2005; Schroeder & Hagiwara 1990), 40 – 80 % bei *C. communis* (Gilroy et al. 1991), 70 % in *Paphiopedilum tonsum* (Irving et al. 1992), 85 % in *Arabidopsis thaliana* (Allen et al. 1999) und etwa 66 % bei *Nicotiana tabacum* (Marten et al. 2007) auf. Trotzdem schließen auch die Stomata die keine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration erfahren haben. Diese geringe Kopplung zwischen dem ABA induzierten Stomaschluss und der Ca^{2+} Erhöhung nach ABA-Gabe impliziert einen Kalzium-unabhängigen Signaltransduktionsweg in der ABA-Signalkaskade (Allan et al. 1994). Ein weiteres Indiz für 2 getrennte Wege der Signaltransduktion ist, dass bei den beiden ABA insensitiven Mutanten *abi1-1* und *ost1* Mutanten (Abschnitt 1.3.4 und 1.3.5) der Stomaschluss nicht mehr durch ABA, aber immer noch mittels Kalzium ausgelöst werden kann (Allen et al. 1999; Mustilli et al. 2002; Pei et al. 1997; Schmidt et al. 1995). Wenn allerdings die Kalziumerhöhung in *A. thaliana* durch den Celator BAPTA (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetic acid) verhindert wird, so reagieren die Stomata nur noch zu 30 % gegenüber unbehandelten Stomata auf ABA (Levchenko et al. 2005; Siegel et al. 2009). Diese verbliebenen 30 % ABA-Antwort benötigten aber dennoch die physiologische „Ruhe“-Konzentration von 100 – 150 nM Ca^{2+} (Siegel et al. 2009). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für den ABA-induzierten Stomaschluss die Kalziumerhöhung nicht zwingend nötig ist, solange zumindest die „Ruhe“-Konzentration an Ca^{2+} in der Zelle vorliegt

Mittels bildgebender Verfahren und Kalzium sensitiver Farbstoffe konnte gezeigt werden, dass auch in unstimulierten Schließzellen spontane Kalziumerhöhungen auftreten können (Allen et al. 1999; Grabov & Blatt 1998; Klusener et al. 2002; Konrad & Hedrich 2008; Staxen et al. 1999). So stellt sich die Frage, wie CO₂ und ABA einen Kalzium vermittelten Stomaschluss bewirken können, wenn die Kalziumkonzentration auch ohne ersichtliche Reize schwankt? Eine mögliche Antwort ist, dass ABA die Kalziumsensitivität der Schließzellen steigert. Siegel (2009) konnten die S-Typ Anionenströme durch extrazelluläre Kalziumapplikationen deutlich steigern, wenn die Zellen zuvor mit ABA vorbehandelt wurden.

So scheint es wahrscheinlich, dass sich die strikte Verbindung von Stomaschluss und Kalziumsignalen im Laufe der Evolution durch Entstehung von parallel verlaufenden Signalwegen gelockert hat. Möglicherweise ist so eine höhere Spezifität der einzelnen Signale erreicht worden. Dennoch ist die erheblichste ABA-Antwort bei den meisten Spezies immer noch bei einem gleichzeitigen Kalziumsignal zu verzeichnen. Die Abspaltung eines Ca²⁺ unabhängigen Signalweges vom ursprünglich Ca²⁺-abhängigen Signalweg erscheint möglich, da die kalziumabhängigen CPKs nahe verwandt zu den Ca²⁺-unabhängigen SnRK Protein Kinasen sind (Hrabak et al. 2003). Zu dieser Familie zählt die Kinase OST1, die als positiver Regulator in der ABA-Signaltransduktion beteiligt ist (Abschnitt 1.3.5)(Hrabak et al. 2003; Umezawa et al. 2004; Yoshida et al. 2006). Mit Hilfe von genetischen Screens konnten ABA-insensitive Mutanten gefunden werden, die einen beeinträchtigten Stomaschluss aufweisen (Leung et al. 1994; Li et al. 2000; Meyer et al. 1994; Mustilli et al. 2002). Besonders starke Phänotypen weisen dabei die Verlustmutanten der ABA-aktivierten Kinase SnRK2.6 (**OST1** / **open stomata 1**) auf. Diese Kinase ist an dem schnellen, ABA-vermittelten Stomaschluss beteiligt und wird von der Phosphatase ABI1 durch Dephosphorylierung inhibiert (Assmann 2003; Gosti et al. 1999; Leung et al. 1997; Merlot et al. 2001; Mustilli et al. 2002; Roelfsema & Prins 1995; Rubio et al. 2009; Umezawa et al. 2009; Vlad et al. 2009) (Abschnitt 1.3.5).

1.6 Ionentransport über Membranen

Die Stomabewegungen sind osmotisch reguliert, deshalb müssen beim Öffnen und Schließen viele osmotisch aktive Ionen/Moleküle über die Membransysteme der Schließzellen geschleust werden. Da alle biologischen Membranen aus einer zweilagigen Lipidschicht (6-10 nm Dicke) bestehen, die für die meisten Moleküle, ausgenommen H₂O und wenige niedermolekulare ungeladene Stoffe, sowie Gase undurchlässig ist, muss der Austausch von Stoffwechselmetaboliten und Mineralien über die Membran durch integrale Kanal- und Carrier-Proteine vermittelt werden. Im Laufe der Evolution entstanden hoch spezialisierte und fein regulierte Transportproteine. Schätzungen der Arabidopsis-Genom-Initiative gehen von etwa 600 Transportproteinen in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* aus (Arabidopsis Genome, 2001). Die Aktivität und Transportrate der integralen Transportproteine werden durch ein Zusammenspiel vieler Faktoren wie z.B. Expressionsrate, post-transkriptionelle/translationale Modifikation, Signalmoleküle (second messenger), sowie durch exo- und endozytotische Prozesse, den sog. Turnover gesteuert.

Transportproteine können in drei übergeordnete Gruppen zusammengefasst werden: i) Kanäle, ii) Carrier und iii) Pumpen. Beim Transport über die Membran unterscheidet man zwischen passiven-, sekundär aktiven- und aktiven Transportprozessen.

Kanäle vermitteln einen passiven Transport, dessen Richtung und Intensität lediglich vom elektrochemischen Gradienten des jeweiligen Ions über der Membran abhängt. Mit Kanalproteinen lassen sich sehr große Transportraten von ca. 10^8 Ionen s^{-1} bewerkstelligen. Diese Ionenkanäle können zudem eine sehr hohe Selektivität für bestimmte Ionen besitzen. Die Diskriminierung von unterschiedlichen Ionen wird durch die Struktur des jeweiligen Kanalproteins bzw. dessen Porenregion bedingt. Schnelle selektive Ionenverschiebungen über Membranen können zur elektrischen Reizweiterleitung und/oder zur Induktion mechanischer Bewegungen wie der Stomabewegung genutzt werden.

Sekundär aktive Transportvorgänge werden durch Carrier vermittelt. Sie weisen eine vergleichsweise niedrigere Transportrate von 10^3 bis 10^4 Ionen s^{-1} auf. Es wird angenommen, dass Carrier, im Unterschied zu Kanälen, ihr Substrat binden. Sie vermitteln dennoch eine 10^6 bis 10^8 -fach höhere Permeabilität im Vergleich zur Membran

(Schopfer & Brennicke 1999). Carrier, die sekundär aktive Transportprozesse vermitteln, werden in Pflanzen über die Protonen (H^+)-motorische Kraft angetrieben, die durch die Aktivität der H^+ -Pumpen (H^+ -ATPase und H^+ -PPase) über die Plasma- und vakuoläre Membran aufgebaut wird (Maeshima 2001; Palmgren 2001; Sze et al. 1999). Durch die Kopplung des Substratflusses an einen Protonen-Strom, der entlang seines elektrochemischen Gradienten verläuft, kann das Substrat auch gegen seinen eigenen (elektro-)chemischen Gradienten transportiert werden. Das zu transportierende Substrat wird beim Symport mit, beim Antiport entgegen den H^+ -Strom durch die Membran geschleust.

H^+ -ATPasen sind Pumpen, die zu den primär aktiven Transportern gezählt werden (Palmgren 2001). Die H^+ -ATPasen der Plasmamembran gehören zu der sog. P-Typ Familie, deren Bezeichnung von einem Aspartyl-Phosphat (P^i) Intermediat während ihres Reaktionszyklus herrührt. V-Typ H^+ -ATPasen sind Protonen-ATPasen, die in der Vakuolenmembran lokalisiert sind. Unter ATP-Hydrolyse erzeugen die P-Typ und die V-Typ H^+ -ATPasen einen H^+ -Gradienten über der Plasma- bzw. der vakuolären Membran. H^+ -ATPasen werden in *Arabidopsis* durch eine Multigenfamilie codiert, wobei alle 11 Gene dieser Familie interessanterweise in Schließzellen exprimiert werden (Ueno et al. 2005).

1.6.1 Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten

P-Typ H^+ -ATPasen hydrolysieren ihrem Namen entsprechend ATP und transportieren dabei Protonen aus dem Zytosol über die Plasmamembran in den Apoplasten. Durch Mutagenese-Experimente konnten in *Arabidopsis thaliana* 2 Mutanten (*ost2-1* und *ost2-2*) gefunden werden, die eine erhöhte Transpiration unter Trockenstress aufweisen (Merlot et al. 2007). Beide Mutationen betreffen das Gen *open stomata2*. Dieses Gen codiert für die H^+ -ATPase AHA1. Beide Mutanten *ost2-1* und *ost2-2* weisen eine erhöhte H^+ -ATPase Aktivität auf (Merlot et al. 2007), die die konstitutiv geöffneten Stomata erklären. Die treibende Kraft für Kanal- und Carrier-vermittelte Transportprozesse ist

dabei der elektrochemische Gradient, der primär von ATPasen aufgebaut wird. Da Schließzellen aufgrund ihrer hohen Transportaktivität auf einen stabilen elektrochemischen H^+ -Gradienten angewiesen sind, werden neben AHA1 auch alle anderen 10 H^+ -ATPasen dort besonders hoch exprimiert (Becker et al. 1993; Ueno et al. 2005). H^+ -ATPasen hydrolysieren ein ATP pro Proton (Briskin et al. 1995) und hyperpolarisieren so das Membranpotential pflanzlicher Zellen (elektrischer Gradient) bis zu -260 mV (Lohse & Hedrich 1992).

1.6.1.1 Regulation der H^+ ATPasen

Diese H^+ -ATPasen werden durch eine autoinhibitorische C-terminale Domäne (R-Domain) in einem inaktiven Zustand gehalten (Merlot et al. 2007; Palmgren et al. 1991). Wenn bei Tag die Stoma öffnen, um das für die Photosynthese benötigte CO_2 aufzunehmen, dient der Blaulichtanteil des Lichtes der Aktivierung der H^+ -ATPasen (Shimazaki et al. 2007). Dazu wird die autoinhibitorische Domäne an ihrem vorletzten Threoninrest durch eine bislang unbekannte Kinase phosphoryliert. Daraufhin bindet ein regulatorisches 14-3-3 Dimer an den phosphorylierten C-terminus der H^+ -ATPase. Diese Bindung der 14-3-3 Proteine versetzt die H^+ -ATPase in ihre aktive Form (Emi et al. 2001; Kinoshita & Shimazaki 1999; Svanellid et al. 1999).

Im Gegensatz dazu scheint die photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) keinerlei direkten Einfluss auf die Stomaöffnung zu haben (Roelfsema et al. 2006). Blaulicht wird im Gegensatz zu PAR von den Schließzellen selbst wahrgenommen (Assmann et al. 1985). 2001 wurde dann ein viel versprechender Blaulicht-Rezeptor in *A. thaliana* mit der Blaulicht-induzierten Stomaöffnung in Verbindung gebracht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit der Blaulicht-absorbierenden Serin/Threonin Kinasen Phototropin 1 und 2 in der *phot1/phot2* Doppelmutante zu einem Blaulicht insensitiven Stomata-Phänotyp führt, da beide für die H^+ -ATPase-Aktivierung nötig sind (Christie et al. 1998; Kinoshita et al. 2001). Die Phototropine werden durch Blaulicht aktiviert und als Folge dessen autophosphoryliert. Ob sie im Folgenden die H^+ -ATPase durch direkte Phosphorylierung aktivieren, oder weitere Interaktionspartner beteiligt sind konnte noch nicht geklärt werden (Hayashi et al. 2011; Takemiya et al. 2012).

Die Deaktivierung der H^+ -ATPase bei Dunkelheit wird mit der Phosphataseaktivität einer Protein-Phosphatase 2A in Verbindung gebracht (Camoni et al. 2000; Fuglsang et al.

2006; Takemiya et al. 2012). Weitere Regulatoren der H⁺-ATPase-Aktivität sind der zytosolische pH-Wert und Kalzium-Ionen. So ist die H⁺-ATPase bei pH-Werten von 7.5 bis 7.8 nur moderat aktiv, wohingegen sich ihre Aktivität durch eine zytosolische Ansäuerung erhöht und bei pH 6.8 ein Maximum erreicht (Becker et al. 1993). Erhöhte zytosolische Kalzium-Konzentrationen führen eventuell zu einer Deaktivierung der Protonenpumpe, wie es in Mikrosomen beobachtet werden konnte (Kinoshita et al. 1995). Für die Ca²⁺ Wahrnehmung und -Vermittlung des Signals in Form einer Phosphorylierung könnten zum einen Kinasen der **CIPK/PKS-Familie** (**CBL interacting Protein Kinase**) verantwortlich sein, die durch Ca²⁺ bindende Proteine (CBLs) reguliert werden oder zum anderen Ca²⁺ abhängige Kinasen der **CPK Familie** (**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 bereits beschrieben (Lino et al. 1998; Rutschmann et al. 2002), allerdings ist die Bedeutung dieser Beobachtung für die Schließzellphysiologie noch nicht bekannt.

Des Weiteren wird die H⁺-ATPase durch das Phytohormon Abscisinsäure (**abscisic acid/ABA**) inhibiert (Kinoshita et al. 1995; Merlot et al. 2007; Shimazaki et al. 1986). Der genaue Regulationsmechanismus ist zwar noch unbekannt, aber die Gabe von 10 µM ABA führt zu einer Abnahme der durch Blaulicht induzierten H⁺-ATPase Aktivität auf 60 – 65 % der Ausgangsaktivität und somit zu einem Anstieg des zytosolischen pH-Wertes um bis zu 0.3 Einheiten (Blatt & Armstrong 1993; Irving et al. 1992; Roelfsema et al. 1998; Zhang et al. 2004).

Protonen werden nicht nur in den Apoplasten gepumpt, sondern auch in die Vakuole, wodurch diese auf pH-Werte zwischen 3 und 6 ansäuern (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 aber Schätzungen gehen von ca. -30mV aus (Martinoia et al. 2007).

1.6.1.2 H⁺ ATPasen in der Vakuolenmembran

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

1.6.1.3 Bedeutung der H⁺ ATPasen bei der Stomabewegung

Da die H⁺-ATPase bei Blaulicht in ihrer aktiven Form einen starken elektrochemischen Protonengradienten über der Plasmamembran aufbaut, was auch eine starke Hyperpolarisation der Membran mit sich bringt, profitieren sowohl Kanäle als auch Carrier von dieser gespeicherten Energie. Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle werden z.B. durch die Hyperpolarisation der Schließzellmembran aktiviert und lassen Kaliumionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten in die Zelle fließen. Ebenso wichtig ist das Membranpotential beim Stomaschluss für das Entlassen von Anionen über Anionen-selektive Kanäle. Carrier, die ihr Substrat im Symport oder Antiport transportieren, nutzen sowohl den Protonengradienten als auch das hyperpolarisierte Membranpotential zur Akkumulation ihres Substrats (Assmann & Shimazaki 1999; Roelfsema & Hedrich 2005). Diese Akkumulation der unterschiedlichen Osmotika führt dann zum Anschwellen und Öffnen der Schließzellen.

Durch die Aktivierung der H⁺-ATPase mittels des Pilztoxins Fusicoccin konnte eine gesteigerte Zuckeraufnahme in Schließzell-Protoplasten gezeigt werden (Reddy & Das 1986; Ritte et al. 1999). Diese Entdeckung bestätigt die Kopplung der H⁺-ATPase Aktivität und der Zuckertransportrate in Schließzellen.

1.6.2 Die Rolle von Zuckertransport während der Stomabewegung

Am Anfang des 20. Jahrhunderts wurde davon ausgegangen, dass bei Licht Stärke aus den Schließzell-Chloroplasten in Zucker konvertiert wird und so den Turgor steigert (Strugger & Weber 1926). Glukose, die aus dem Makromolekül Stärke gebildet wird, ist im Gegensatz zur Stärke osmotisch aktiv. Später wurde tatsächlich gezeigt, dass sich der Stärkegehalt der Chloroplasten in Schließzellen der Saubohne *Vicia faba* invers zur Öffnungsweite verhält. Der Saccharosegehalt nimmt jedoch mit der Öffnungsweite bzw. anhaltender Öffnungsdauer zu (Malpighi 1675; Olsen et al. 2002; Talbott & Zeiger 1993; Talbott & Zeiger 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 wurde im Dunkeln und schwachem Blaulicht eine reduzierte Öffnung festgestellt (Lasceve et al. 1997). Dieser Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass während der Photosynthese organische Osmotika (Glucose und Fruktose) direkt aus Saccharose synthetisiert werden, ohne den Umweg über den Stärkeaufbau zu nehmen. Andererseits wurde beobachtet, dass *A. thaliana* Schließzellen Stärke bei der Stomaöffnung im Licht auf-, und beim Schließen im Dunkeln abbauen können, wie es auch in Mesophyllzellen beschrieben wurde (Stadler et al. 2003). Das steht im Gegensatz zu der von Strugger & Weber (1926) aufgestellten Theorie. Zusätzlich scheint es unwahrscheinlich, dass die für die Stomaöffnung benötigte Menge an Stärke von den Schließzellen selbst synthetisiert wird, da deren Chloroplastengehalt nur etwa 2% im Vergleich zu einer Mesophyllzelle ausmacht (Gotow et al. 1988; Outlaw & Manchester 1979). Trotzdem scheinen Schließzellen in der Lage zu sein, Saccharose durch eine Aufnahme aus dem Apoplasten zu akkumulieren (Reckmann et al. 1990). 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). Als Aufnahmesysteme für Zucker kommen die beiden sekundär aktiven Carrier AtSUC3 und AtSTP1 in Frage (Meyer et al. 2004; Stadler et al. 2003). Zuckerabgabesysteme sind aber bisher in Schließzellen nicht beschrieben. Saccharose- und Glukoseexporter des SWEET-typs, die zuletzt in Mesophyllzellen gefunden wurde, könnten aber auch in Schließzellen

exprimiert sein und den Export vermitteln (Chen et al. 2010; Chen et al. 2012). Allerdings wurde bei *SWEET*-Verlustmutanten keine Beeinträchtigung der Stomabewegung beschrieben. Stomaschlussbewegungen können innerhalb weniger Minuten stattfinden und die hierfür benötigten osmotischen Änderungen können kaum durch die Synthese von großen Mengen an osmotisch nur schwach aktiver Stärke, noch durch einen aktiven Transport der Zucker ausreichend bewerkstelligt werden (Roelfsema & Hedrich 2005). Somit scheint Saccharose allenfalls als unterstützendes Osmotikum bei langsamen Stomabewegungen in Frage zu kommen.

1.6.3 Kationentransport

Vom Kation Kalium (K^+) war schon früh bekannt, dass es in Schließzellen akkumulieren kann. So hat Macallum (1905) von der Tatsache profitiert, dass Kalium zusammen mit einem Kobalt-Natrium-Nitratsalz in orangefarbenen Kristallen ausfällt. Er konnte so zeigen, dass in Schließzellen wesentlich mehr Kalium vorhanden ist, als in anderen pflanzlichen Geweben. Daher stand Kalium frühzeitig unter Verdacht zu einem großen Anteil an der osmotischen Regulation der Stomabewegung beizutragen. Heute ist bekannt, dass Kaliumionen von Schließzellen als einziges Kation in solchen Mengen aufgenommen werden kann, dass eine zunehmende Stomata-Öffnungsweite möglich erscheint (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 (Humble & Hsiao 1969; Jarvis & Mansfield 1980). Somit ist die Schließzelle auf ein perfekt aufeinander abgestimmtes und regulierbares Magazin an Kalium-selektiven Kanälen angewiesen, die die K^+ Aufnahme oder -Abgabe über die Membran gewährleisten.

Die treibende Kraft für diesen Transport stellt der elektrochemische Kaliumgradient dar. Wie bereits erwähnt hyperpolarisieren H^+ -ATPasen die Schließzellplasmamembran bei der Stomaöffnung (Abschnitt 1.6.1). Die positiv geladenen K^+ -Ionen können unter diesen Bedingungen durch Kalium-selektive Kanäle aufgenommen werden, bis sich ein

elektrochemisches Kaliumgleichgewicht eingestellt (Pandey et al. 2007; Roelfsema & Hedrich 2005).

Die einwärts- (K^+_{in}) und auswärtsgerichtenden (K^+_{out}) Kaliumkanäle der Schließzell-Plasmamembran gehören der Shaker-ähnlichen Kaliumkanalfamilie an. Die am stärksten exprimierten Shaker-Kanäle in *Arabidopsis*-Schließzellen sind KAT1 (K^+ -channel in *Arabidopsis thaliana* 1) und GORK (Guard cell outward rectifying K^+ channel) (Ache et al. 2000).

1.6.3.1 Phylogenie der Kaliumkanäle

Genomanalysen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zufolge codieren 15 Gene für K^+ -selektive Kanäle (Mäser et al. 2001). Diese Kanäle können aufgrund ihrer Struktur in drei Gruppen untergliedert werden: i) Shaker-Typ Kanäle, ii) Tandem-Poren-Kanäle (TPKs) und iii) der Ein-Poren-Kanal (KCO3) (Mäser et al. 2001; Very & Sentenac 2003). Die einwärts- (K^+_{in}) und auswärtsgerichtenden (K^+_{out}) 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; Uozumi et al. 1998). Die vierte Transmembran-Domäne besitzt positiv geladene Aminosäuren und fungiert als Spannungssensor (Gonzalez et al. 2012; Latorre et al. 2003; Marten & Hoshi 1998). Diese Domäne ist für die Regulation dieser Kaliumkanäle durch die Membranspannung verantwortlich. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* befinden sich neun Mitglieder der Shaker-Familie, von denen sechs in der Schließzell-Plasmamembran lokalisiert sind: KAT1, KAT2 (K^+ -channel in *Arabidopsis thaliana* 1.2), AKT1 (*Arabidopsis thaliana* K^+ -transporter 1), AKT2/3, AtKC1 (*Arabidopsis thaliana* K^+ -rectifying channel 1) und GORK (Guard cell outward rectifying K^+ channel) (Ache et al. 2000; Pilot et al. 2001; Szyroki et al. 2001).

1.6.3.2 Spannungsabhängigkeit der Gleichrichter

Die am stärksten exprimierten Shaker-Kanäle in *Arabidopsis*-Schließzellen sind KAT1 und GORK (Ache et al. 2000). Bei beiden K^+ -Kanälen handelt es sich um spannungsabhängige Gleichrichter. Der K^+ _{in} Kanal KAT1 vermittelt einen K^+ -Einstrom und aktiviert bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen (Hoth et al. 1997; Roelfsema & Hedrich 2005; Schachtman et al. 1992; Very et al. 1995). KAT1 vermittelt somit die K^+ -Aufnahme in die Schließzellen, die für eine Erhöhung des Turgors beim Öffnen der Stomata verantwortlich ist.

Der einzige K^+ _{out} Kanal in Schließzellen, GORK, aktiviert bei Membrandepolarisationen, die positiv vom K^+ -Umkehrpotential liegen (Ache et al. 2000). Mittels knock out Pflanzen (T-DNA Insertion im *GORK* Gen) und elektrophysiologischer Untersuchungen konnte GORK als K^+ _{out} Kanal identifiziert werden, der während des Stomaschlusses den Kaliumausstrom vermittelt (Ache et al. 2000; Hosy et al. 2003).

1.6.3.3 Regulation der Kaliumverschiebung während der Stomabewegung

Die einwärts- und auswärtsgerichteten Kaliumkanäle zeigen nach spannungsabhängiger Aktivierung keine oder kaum Inaktivierung und können daher für langfristigen K^+ In- oder Efflux sorgen (Blatt 1992; Schroeder 1988). Neben ihrer Spannungsabhängigkeit gibt es jedoch weitere Möglichkeiten für die Regulation ihrer Aktivität und ihrer spannungsabhängigen Aktivierung.

In erster Linie kann die Schließzelle die Anzahl an aktivierbaren Kaliumkanälen aktiv steuern. Wie bereits erwähnt, kann sich die Membran-Oberfläche einer Schließzelle bei variierenden Porenweiten um bis zu 40% ändern (Raschke & Dickerson 1972). In *Vicia faba* konnte gezeigt werden, dass der, durch Exozytose bewirkte, Oberflächenzuwachs mit dem Integrieren von Kaliumkanälen einhergeht (Homann & Thiel 2002). Hierzu steht im Zytoplasma ein Reservoir an Vesikeln mit dem bereits integrierten K^+ _{in} Kanal KAT1 zur Verfügung (Sutter et al. 2006).

Aber auch bereits in die Membran eingebaute Kanäle werden reguliert. Eine besondere Eigenschaft von Kaliumeffluxkanälen besteht darin, dass sich ihre spannungsabhängige Aktivierung an die extrazelluläre K^+ Konzentration anpasst, indem sich ihr Aktivierungspotential bei steigenden extrazellulären K^+ -Konzentrationen ins positive verschiebt. Dadurch wird gewährleistet, dass die Auswärtsgleichrichter nur positiv vom

Nernst-Potential für K^+ aktivieren und somit ihre Auswärtsgleichrichtung bei sich verändernden externen Kaliumkonzentrationen beibehalten (Ache et al. 2000; Blatt 1988; Roelfsema & Prins 1997).

Die Abhängigkeit der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle von der extrazellulären K^+ -Konzentration ist hingegen noch nicht vollständig geklärt. Eine Inaktivierung des Einwärtsgleichrichters wäre nur bei extrem niedrigen apoplastischen K^+ -Konzentrationen sinnvoll, da es sonst bei Membranpotentialen positiv des Nernst-Potentials für Kalium zu einem Efflux durch die geöffnete Pore der Kaliumkanäle kommen könnte. Ein solches Verhalten bei Kaliumkonzentrationen im μM Bereich wurde für AKT1 und KAT1 beschrieben (Abenavoli et al. 2009; Geiger et al. 2009; Hertel et al. 2005).

Neben der extrazellulären K^+ -Konzentration und der Membranspannung werden Kaliumkanäle auch durch den pH-Wert reguliert. ABA verhindert die Öffnung der Stomata durch Inaktivierung der H^+ -ATPasen (Kinoshita et al. 1995; Merlot et al. 2007; Schroeder & Hagiwara 1989)(Abschnitt 1.6.1.1). Nach ABA-Gabe konnte daher in Schließzell-Protoplasten ein Anstieg von 0,1 – 0,3 pH-Einheiten beobachtet werden. Beim K^+ -Aufnahmekanal KAT1 bewirkt diese Alkalisierung des zytosolischen pH-Wertes eine spannungsunabhängige Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit und eine Abnahme der Leitfähigkeit (Blatt 1992; Grabov et al. 1997; Hoshi 1995; Schroeder & Hagiwara 1989). Dazu entgegengesetzt verhält sich der auswärtsgleichrichtende Kaliumkanal GORK. Dieser wird durch eine Alkalisierung des Zytoplasmas aktiviert (Blatt & Armstrong 1993). Somit begünstigt ABA indirekt über den zytosolischen pH-Wert das Entlassen von K^+ Ionen aus der Schließzelle und somit den Stomaschluss.

Entgegengesetzt hierzu müssen die Schließzellen Kalium aufnehmen, um zu öffnen. Wird bei Licht Photosynthese betrieben, so sind die H^+ -ATPasen besonders aktiv. Die Aktivität dieser Protonenpumpen führt, wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.6.1.1), zu einer Ansäuerung des Apoplasten. Die Ansäuerung des Apoplasten bewirkt ihrerseits eine Aktivierung des KAT1 Kanals. Die Erhöhung des Kaliumstroms ist auf eine Verschiebung der spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeit zu positiveren Membranpotentialen und somit zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit bei einem gegebenen Membranpotential zurückzuführen (Blatt 1992; Gonzalez et al. 2012; Grabov et al. 1997; Schroeder & Hagiwara 1989). Bei GORK führt sowohl eine intra- als auch extrazelluläre Ansäuerung zu einer Reduktion der GORK-vermittelten Kaliumströme in *Xenopus Oozyten*, was vermutlich durch eine Abnahme der Anzahl an aktivierbaren Kanälen zu erklären ist (Ache et al. 2000; Blatt 1990). Somit ist gewährleistet, dass im

Licht Kalium in die Schließzellen aufgenommen und nicht abgegeben werden kann. Als Folge öffnen die Stomata und Photosynthese kann betrieben werden.

ABA (Abschnitt 1.3) führt neben dem Anstieg des zytoplasmatischen pH-Wertes auch zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die ebenso zu einer Verschiebung des Aktivierungspotentials der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle zu negativeren Potentialen führt. Diese Ca^{2+} -Abhängigkeit wurde in *Vicia faba* durch Proteinphosphatase-2B Inhibitoren mit einer Ca^{2+} abhängigen Protein-Phosphatase in Verbindung gebracht (Luan et al. 1993). In *Arabidopsis thaliana* kann hingegen eine Ca^{2+} abhängige Protein Kinase (CDPK) den Kaliumkanal KAT1 phosphorylieren (Li et al. 1998) und dessen Aktivität regulieren (Berkowitz et al. 2000). Parallel zu dieser kalziumabhängigen Kinase wird KAT1 auch von der ABA aktivierten Kinase OST1 (Abschnitt 1.3.4) phosphoryliert und dadurch inhibiert (Sato et al. 2009). Im C-Terminus von KAT1 und anderen pflanzlichen Shaker-ähnlichen Kaliumkanälen finden sich neben dem Oligomerisierungsmotiv auch eine Reihe weiterer regulatorischer Domänen. So führt die Regulation von KAT1 mittels 14-3-3 Proteinen auf 2 Wegen zu einem gesteigerten Kaliumstrom in die Schließzellen. i) Der Transport und Einbau des Kanals in die Plasmamembran wird gesteigert (Sottocornola et al. 2008) und ii) die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit nimmt zu (Sottocornola et al. 2008; Van Den Wijngaard et al. 2005). Desweiteren konnten regulatorische Sequenzmotive für die Bindung zyklischer Nukleotide (Gaymard et al. 1996; Hoshi 1995) oder für Häm- (Tang et al. 2003), sowie Ankyrin-ähnliche Strukturbereiche identifiziert werden, die zur Regulation von diesen Kanälen beitragen könnten.

1.6.3.4 Vakuoläre Kaliumkanäle

Zwischen der Aufnahme von K^+ durch einwärtsgerichtende Kaliumkanäle bei der Stomaöffnung und der Abgabe durch auswärtsgerichtende Kaliumkanäle beim Schließen der Stomata wird ein Großteil dieses Kations in der Vakuole zwischengespeichert. Über die Regulation der Kanäle die dem K^+ -Aufnahme System der Vakuole zu Grunde liegen ist im Vergleich zu den Transportsystemen der Plasmamembran nur wenig bekannt. Sicher ist, dass der koordinierte Ionentransport über den Tonoplast eine wichtige Rolle bei der Stomaregulation spielt (Macrobbie & Kurup 2007; Macrobbie 2006). In den meisten pflanzlichen Zellen nimmt die Vakuole einen

Großteil des Volumens der Zelle (~80-90%) ein. Untersuchungen zu zytoplasmatischen Ionenkonzentrationen in diversen Geweben zeigten eine relativ konstante K^+ -Aktivität im Bereich von 100 mM bei variierenden extrazellulären K^+ -Konzentrationen (Leigh 2001). Dies legt den Schluss nahe, dass die Vakuole der eigentliche Speicher für aufgenommene Ionen ist und die zytoplasmatische K^+ -Konzentration über diesen Speicher konstant gehalten wird (Leigh 2001; Walker et al. 1996). Patch-Clamp-Messungen an *Vicia faba* Schließzellprotoplasten zufolge gibt es mindestens drei mögliche Kandidaten für einen K^+ -Transport aus dem Tonoplasten:

- slow vacuolar channel (SV-Kanal),
- fast vacuolar channel (FV-Kanal)
- vacuolar K^+ -selective channel (VK-Kanal)

(Allen & Sanders 1996; Hedrich et al. 1986; Hedrich & Marten 2011; Hedrich & Neher 1987; Martinoia et al. 2007; Roelfsema & Hedrich 2005; Schulzlessdorf et al. 1996; Ward & Schroeder 1994).

Zwei der drei K^+ -leitenden vakuolären Kanäle wurden bereits auf molekulargenetischer Ebene identifiziert. Der schon lange elektrophysiologisch charakterisierte SV-Kanal, einer der ersten untersuchten pflanzlichen Ionenkanäle überhaupt (Hedrich & Neher 1987), wird durch das *tpc1*-Gen codiert (Peiter et al. 2005)(Abschnitt 1.4.1.2). Ebenfalls elektrophysiologisch gut beschrieben ist der vakuoläre K^+ -Kanal (VK) (Ward & Schroeder 1994), der als das Produkt des *TPK1*-Gens identifiziert werden konnte (Gobert et al. 2007).

SV und FV Kanäle aktivieren bei Depolarisation des Tonoplasten, während VK Kanäle nicht spannungsabhängig sind. SV- und FV-Kanäle repräsentieren die dominanten Leitfähigkeiten der Vakuole und können auf Grund ihres Schaltverhaltens gut voneinander unterschieden werden. Beide zeigen eine spannungsabhängige Aktivierung bei Depolarisation, und können daraufhin einen K^+ -Efflux aus der Vakuole vermitteln.

Elektrophysiologische Nachweise für K^+ -Aufnahme-Transportmechanismen der Vakuole liegen hingegen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vor. Wahrscheinlich spielen NHX (sodium-hydrogen-exchanger)-Transporter, deren Familie im *Arabidopsis thaliana*-Genom 6 Mitglieder umfasst, beim K^+ -Transport in die Vakuole eine wichtige Rolle (Apse et al. 1999). NHX1 und NHX2 sind vakuoläre K^+/H^+ Antiporter und somit nicht elektrophysiologisch zu charakterisieren. Verlustmutanten dieser beiden redundanten Gene *nhx1* und *nhx2* weisen einen geringeren Kaliumgehalt in den Vakuolen auf und sind

daher in ihrer Turgorregulation eingeschränkt (Barragan et al. 2012; Bassil et al. 2011). Der Verlust dieser beiden Gene in Schließzellen führt desweiteren zu einer gestörten Stomabewegung (Barragan et al. 2012).

1.6.3.5 Bedeutung der Kaliumkanäle bei der Stomabewegung

Kalium stellt das Hauptosmotikum für die Stomabewegung dar. Unter photosynthetisch aktiven Bedingungen sind Plasmamembran-ständige H^+ -ATPasen besonders aktiv was einen sauren apoplastischen pH-Wert und eine hyperpolarisierte Membranspannung zur Folge hat (Abschnitt 1.6.1) (Assmann et al. 1985; Shimazaki et al. 2007). Somit kann Kalium über K^+ _{in} Kanäle (KAT1) in die Schließzelle aufgenommen werden und das Stoma öffnet sich (Abschnitt 1.6.3.2) (Hoth et al. 1997; Roelfsema & Hedrich 2005). ABA führt zum Stomaschluss, da es die H^+ -ATPasen deaktiviert, Anionenkanäle aktiviert und somit zu einer Depolarisation führt, die den auswärtsgerichtenden Kanal GORK aktiviert (Abschnitt 1.6.1. und 1.6.3.2) (Ache et al. 2000; Blatt 1990; Kinoshita et al. 1995; Merlot et al. 2007; Shimazaki et al. 1986). Zudem inhibiert eine, durch ABA ausgelöste, erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration die einwärtsgerichtenden Kanäle (Abschnitt 1.6.3.3) (Berkowitz et al. 2000; Li et al. 1998). Des Weiteren wurden ABA- und/oder Ca^{2+} -abhängige posttranslationale Modifikationen für die Regulation vakuolärer und plasmamembran-ständiger Kaliumkanäle dokumentiert, die Stimulus-abhängig den Kaliumtransport steuern (Abschnitt 1.6.3.3) (Homann & Thiel 2002; Sutter et al. 2006).

1.6.4 Anionentransport

1.6.4.1 Anionen sind Gegenionen zum Kalium

Die Erkenntnis, dass bei der Stomabewegung große Mengen an Kaliumionen als Osmotikum transportiert werden, wirft eine neue Frage auf: Wie werden die positiven Ladungen des Kaliums elektrisch im Zytosol der Schließzellen kompensiert? Als einfache Lösung bietet sich dabei eine gleichzeitige Akkumulation von negativen Ladungen, also

Anionen, an. Humble & Raschke (1971) zeigten, dass die Chlorid (Cl^-) Konzentration ähnlich wie die Kaliumkonzentration in sich öffnenden Stomata ansteigt. Unter den von ihnen gewählten Bedingungen war das aber nicht ausreichend, um die K^+ Aufnahme elektrisch zu kompensieren und so wurde zusätzlich die Synthese von organischen Anionen als Ausgleich für K^+ postuliert. Zwei Jahre später wurde in *Vicia faba* beobachtet, dass die Malatkonzentration bei sich öffnenden Schließzellen von durchschnittlich 38 auf 75 mM ansteigt (Allaway 1973). Malat als Gegenion zu Kalium zu nutzen, erscheint ausgesprochen effektiv: Um Photosynthese zu betreiben, öffnen Pflanzen ihre Stomata und Malat wird ohnehin als Nebenprodukt der Photosynthese hergestellt. Es wird in den Schließzellen durch Reduktion des bei der Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat synthetisierten Oxalacetats gebildet (Asai et al. 2002). Diese Synthesereaktion wird durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) initiiert, von der die Schließzellen eine 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 mittels negativer Rückkopplung durch steigende Malat-Konzentrationen inhibiert. In Schließzellen jedoch wird die PEPC beim Öffnen der Stomata durch Phosphorylierung aktiviert und hierdurch der negative Malat-Effekt abgeschwächt. Somit kann die Schließzelle Malat in höheren Konzentrationen akkumulieren als z.B. Mesophyllzellen (Cotelle et al. 1999; Zhang et al. 1994). Malat scheint aber nicht nur von den Schließzellen selbst gebildet zu werden, da auch seine apoplastische Anwesenheit für eine effektive Stomaöffnung nötig ist (Lee et al. 2008). Allerdings fand man nachfolgend, dass auch ein anderes Anion, das Chlorid, einen starken Einfluss auf die Synthese von Malat hat. So kann sich die Malatkonzentration in offenen Stomata bis auf 145 mM verdoppeln, wenn im Apoplasten kein Cl^- verfügbar ist (Raschke & Schnabl 1978). Daher ist es unwahrscheinlich, dass Malat das einzige Gegenion zu Kalium darstellt. Mittlerweile wurde der Einfluss eines weiteren Anions, Nitrat (NO_3^-), auf die Öffnung der Stomata gezeigt. Fehlt in *Arabidopsis* der Nitrat/ H^+ -Symporter CHL1, so zeigen die Schließzellen eine gehemmte Öffnung (Guo et al. 2003). Da abhängig von der Cl^- -Verfügbarkeit auch die Cl^- -Konzentration in Schließzellen während der Öffnung ansteigt, wird neben einem Transport von Nitrat über CHL1, auch ein Symport von Cl^- im Symport mit Protonen über einen weiteren Transporter vermutet (Macrobbie 1984; Penny et al. 1976; Van Kirk & Raschke 1978). Die Aufnahme dieser Anionen ist allerdings auf Grund des

auswärtsgerichteten Anionengradienten und des negativen Membranpotentials nur durch sekundär aktive Transportvorgänge über Carrier möglich.

1.6.4.2 Anionenkanäle der Schließzelle

Für den Stomaschluss wird ein Teil des Malates in osmotisch schwach aktive Stärke umgewandelt. Anionen, wie z.B. NO_3^- und Cl^- , werden beim Stomaschluss auf Grund ihres elektrochemischen Gradienten über selektive Kanäle aus dem Zytosol in den Apoplasten abgegeben (Roelfsema & Hedrich 2005; Van Kirk & Raschke 1978). Der Transport dieser Anionen ist auf Grund des negativen Membranpotentials und des auswärtsgerichteten Gradienten durch die Aktivität von Anionenkanälen möglich. Diese Anionenkanäle konnten mittels der Patch-Clamp-Technik schon früh elektrophysiologisch an Schließzellprotoplasten charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass der Anionen-Efflux von zwei unterschiedlichen Kanälen ermöglicht wird, die in Anlehnung an ihre Aktivierungs- und Deaktivierungs-Kinetiken als schneller (**Rapid R-Typ**) (Hedrich et al. 1990; Keller et al. 1989; Linder & Raschke 1992) und langsamer (**Slow S-Typ** oder **SLAC** (slow anion channel) Anionenkanal (Linder & Raschke 1992; Schroeder & Hagiwara 1989; Schroeder & Keller 1992) bezeichnet werden. Ihre Namensgebenden Kinetiken unterscheiden sich um etwa den Faktor 1000, abhängig von der Spezies und den externen Bedingungen (Barbier-Brygoo et al. 2000). Der R-Typ Anionenkanal stellt einen stark spannungsabhängigen Kanal dar. Er zeigt Aktivierungs-, Deaktivierungs- und Inaktivierungskinetiken im Millisekundenbereich (Hedrich 1994; Hedrich et al. 1990; Keller et al. 1989). Dieser Kanal weist eine maximale Aktivität bei ca. -50 mV auf und deaktiviert schnell bei Hyperpolarisation der Plasmamembran. Die Stromantwort des R-Typ Anionenkanals kann mit Hilfe der Hodgkin-Huxley-Gleichung beschrieben werden (Kolb et al. 1995; Schulzlessdorf et al. 1996) und weist relative Permeabilitäten der Reihenfolge $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{J}^- > \text{Cl}^-$ auf (Hedrich & Marten 1993; Hedrich et al. 1994). Dabei zeigt er einen „feed-forward“ stimulierten Anionenefflux aus der Zelle. In Anwesenheit von apoplastischem Malat, das selbst als Substrat dient, erhöht sich die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit der R-Typ Anionenkanäle bei hyperpolarisierten Membranpotentialen (Dietrich & Hedrich 1998; Hedrich & Marten 1993; Konrad & Hedrich 2008; Lohse & Hedrich 1995; Raschke et al. 2003).

Die Steuerung der R-Typ-Anionenkanal-Aktivität durch Malat spielt möglicherweise eine wichtige Rolle zur Regulation der Stomaweite (Lohse & Hedrich 1995; Marten et al. 1991). Das von Mesophyll- und Schließzellen synthetisierte Malat wird bei einer hohen Photosyntheserate in den Apoplasten transportiert. Malat könnte somit als Signalmolekül fungieren, um die Stomaweite der Photosyntheseleistung anzupassen und gleichzeitig die Transpirationsrate auf ein Minimum zu senken (Hedrich & Marten 1993).

Eine bekannte Klasse von Malat-permeablen Kanälen stellen die **Aluminium-aktivierten Malat Transporter (ALMTs)** dar. Diese Familie besteht aus 12 Mitgliedern. ALMT1 wurde erstmals durch Expression in *Xenopus* Oozyten als Aluminium-aktivierter Malattransporter beschrieben (Sasaki et al. 2004). Andere Mitglieder dieser Familie, darunter ALMT12 zeigten gegensätzlich zu ALMT1 keine Aluminiumabhängigkeit (Meyer et al. 2010; Pineros et al. 2008; Sasaki et al. 2010; Sasaki et al. 2004). Wird dieser Kanal in Oozyten exprimiert, so waren in Malat- und Sulfat-basierenden Lösungen die typischen schnell deaktivierenden Kinetiken zu beobachten (Meyer et al. 2010), wie sie von QUAC1 in Protoplasten beschrieben wurden (Hedrich 1994; Hedrich et al. 1990; Keller et al. 1989). Des Weiteren ist dieser Kanal in *Arabidopsis* Schließzellen exprimiert (Meyer et al. 2010; Sasaki et al. 2010). Die Verlustmutanten von ALMT12 weisen in Patch-Clamp-Studien immer noch S-Typ Anionenströme auf (Meyer et al. 2010; Sasaki et al. 2010), aber die Malat-induzierten R-Typ Anionenströme sind deutlich reduziert (Meyer et al. 2010). Zudem ist der ABA-, Kalzium-, CO₂- und Dunkelheit-induzierte Stomaschluss in diesen Verlustmutanten beeinträchtigt (Meyer et al. 2010; Sasaki et al. 2010). Daher wurde ALMT12, in Anlehnung an SLAC auch **QUAC (quick anion channel)** genannt und ist ein essentieller Bestandteil der R-Typ Anionenströme in Schließzellen (Meyer et al. 2010; Sasaki et al. 2010).

Der S-Typ-Anionenkanal hingegen zeigt Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken im Sekunden-Bereich (Forestier et al. 1998; Schroeder & Keller 1992). So deaktiviert er bei Hyperpolarisation der Plasmamembran nur langsam und schwach (Schulz-Lessdorf et al. 1994). Wird mittels der Patch-Clamp-Technik bei Schließzellprotoplasten eine relativ schnelle (1500 ms) Spannungsrampe von -160 bis +80 mV appliziert, kann der schwach spannungsabhängige S-Typ-Anionenkanal gut durch sein nahezu lineares Strom (I)-Spannungs (V)-Verhalten erkannt werden, da er in dieser kurzen Zeit kaum spannungsabhängig deaktiviert. Dieser Unterschied in den spannungsabhängigen Aktivierungs-, Deaktivierungs- und Inaktivierungs-Kinetiken von SLAC und QUAC ist

entscheidend für die Vorgänge beim ABA-induzierten Stomaschluss. Das Ruhepotential von geöffneten Schließzellen ist stark hyperpolarisiert (Linder & Raschke 1992; Roelfsema et al. 2001). Damit das Stoma schließen kann, muss Kalium durch den Auswärtsgleichrichter GORK aus der Zelle entlassen werden. Dieser K^+ _{out}-Kanal öffnet allerdings erst positiv vom Kaliumumkehrpotential (Abschnitt 1.6.3.2). Daher muss die Schließzelle bis zu diesem Wert depolarisieren, damit Kalium entlassen wird und sich das Stoma schließen kann. Diese Depolarisation wird durch einen Anionenausstrom initiiert (Roelfsema et al. 2004). Allerdings ist QUAC, zumindest in Abwesenheit von apoplastischem Malat, bei solch negativen Membranspannungen geschlossen. Somit ist es fraglich, ob der R-Typ-Anionenkanal bei stark hyperpolarisierten Schließzellen für die Depolarisation ausreichend ist. Vielmehr besitzt der schwach spannungsabhängige S-Typ-Anionenkanal unter diesen Bedingungen eine höhere Aktivität und scheint damit vielmehr für die Depolarisation der Schließzellen verantwortlich zu sein.

S-typ Anionenkanäle vermitteln NO_3^- - und Cl^- -Ströme und haben dabei eine etwa 20 fach höhere Permeabilität für NO_3^- relativ zu Cl^- (Frachisse et al. 2000; Schmidt & Schroeder 1994). Die Aktivierung des Kanals erfordert die Anwesenheit von zytosolischem ATP und kann durch den Proteinkinaseinhibitor Staurosporin gehemmt werden, was eine Regulation durch Phosphorylierung vermuten lässt (Frachisse et al. 2000; Schmidt et al. 1995). Dazu steht im Einklang, dass der ABA-ausgelöste Stomaschluss durch den Kinaseinhibitor K-252a inhibiert und durch den Phosphataseinhibitor ocataic acid verstärkt wird (Schmidt et al. 1995). So scheint ABA SLAC-Kanäle über eine Kinase zu aktivieren und über eine Phosphatase zu deaktivieren (Schmidt et al. 1995). Weiterhin ließen elektrophysiologische Untersuchungen vermuten, dass ABA den Stomaschluss über einen Ca^{2+} -abhängigen und einen Ca^{2+} -unabhängigen Signaltransduktionsweg initiiert (Allan et al. 1994; Hetherington & Brownlee 2004; Levchenko et al. 2005; Schroeder & Hagiwara 1989). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass Ca^{2+} -abhängige Kinasen das ABA-Signal in eine Aktivierung der Anionenkanäle umsetzt. Später konnten 2 dieser calcium-dependent protein kinasen (CDPK) identifiziert werden, die einen Einfluss auf den ABA-vermittelten Stomaschluss haben. CPK3 und CPK6 werden in Schließzellen exprimiert. Beim Fehlen dieser Kinasen in einer Doppelmutante zeigten sich verminderte Anionenströme in Patch-Clamp-Experimenten an Schließzellprotoplasten nach zytosolischer Ca^{2+} - und ABA-Zugabe (Mori et al. 2006). Allerdings konnte bislang keine direkte Interaktion gezeigt werden, da das Gen, das für S-Typ Anionenkanäle kodiert, noch unbekannt war.

1.6.4.3 Identifikation des SLAC1 Gens

S-Typ Anionenströme in *Arabidopsis* Schließzellen sind bereits seit den achtziger Jahren dokumentiert (Linder & Raschke 1992; Schroeder & Hagiwara 1989; Schroeder & Keller 1992). Das Gen, das für diesen Anionenkanal kodiert, konnte allerdings über Jahrzehnte nicht identifiziert werden. Als vielversprechende Kandidaten wurden anfangs „ATP-binding cassette“ (ABC)-Transporter gehandelt (Leonhardt et al. 1999). Genomanalysen weisen auf 120 ABC Transporter in *Arabidopsis thaliana* hin (Sanchez-Fernandez et al. 2001). Darunter befindet sich eine Unterfamilie mit 16 Mitgliedern, die so genannten „multidrug resistance“ Proteine (MRPs). Erst 5 Transporter dieser MRP-Familie wurden molekulargenetisch untersucht (Rea 2007). AtMRP4 und AtMRP5 sind Plasmamembranständige Transporter für organische Anionen, die in Schließzellen exprimiert werden (Gaedeke et al. 2001; Klein et al. 2004). Aus dem Tierreich ist bekannt, dass ABC-Transporter (wie z.B. CFTR) Ionenkanalaktivitäten aufweisen können (Randak & Welsh 2003). Eine ähnliche Funktion der MRPs wurde in Pflanzen postuliert (Gaedeke et al. 2001; Leonhardt et al. 1999). Bei der Mutante AtMRP5 fand man eine verminderte Ca^{2+} - und ABA-Abhängigkeit der Schließzellanionenströme (Suh et al. 2007). Interessanterweise führt der Verlust des *mrp4*-Gens zu einer Inhibition der Stomaöffnung (Klein et al. 2004). Dies wirft die Frage auf, ob MRPs Ionenkanaleigenschaften besitzen können oder indirekt regulatorische Mechanismen zur Steuerung der Ionenflüsse besitzen. Studien deuten darauf hin, dass der ABC-Transporter MRP5 die Aktivität von NSCCs (non-selective cation channels)(Abschnitt 1.4.1.2) und S-Typ-Anionenkanälen in *Arabidopsis thaliana* beim ABA-induzierten Stomaschluss beeinflusst (Klein et al. 2003; Suh et al. 2007; Wanke & Kolukisaoglu 2010).

Neben den ABC-Transportern hoffte man den SLAC Anionenkanal in der Familie der CLC Proteine zu finden. Das *Arabidopsis*-Genom codiert für 7 Mitglieder der CLC-Familie (Geelen et al. 2000). Einige Mitglieder dieser Familie fungieren im Tierreich als Cl^- -Kanäle, wie z.B. CLC0 im Zitterrochen (*Torpedo marmorata*) (Lisal & Maduke 2008), oder der humane CLC1 (Chen et al. 1997). Andere hingegen sind Anionen/ H^+ Antiporter, wie der bakterielle CLCec1 (Accardi et al. 2004) und die humanen CLC4 und CLC5 (Picollo & Pusch 2005). Mitglieder der CLC-Familie in *Arabidopsis thaliana* finden sich in verschiedenen Organellen. So ist CLCd im Golgi-Apparat oder CLCe in Chloroplasten lokalisiert (De Angeli et al. 2009). CLCa wurde erst kürzlich als vakuolärer NO_3^-/H^+ Antiporter charakterisiert (Zifarelli & Pusch 2010). Dieser Antiporter besitzt nur

eine sehr geringe Affinität zu Cl^- , was neben seiner Lokalisation in der Vakuole dessen Bedeutung für den Cl^- -Transport bei der Stomabewegung ausschließt. Ein Plasmamembran-lokalisierter CLC Transporter wurde bisher nicht identifiziert.

Interessanterweise konnte während dieser Arbeit von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen das Gen At1g12480 als Bestandteil oder als regulatorische Komponente des S-Typ Anionenkanals in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Analog zur Benennung der Anionenströme, die bisher in Schließzellen aufgezeichnet wurden, nannte man das Genprodukt von At1g12480 **SLAC1** (*Slow Anion Channel-associated 1*). Er ist Gründer einer kleinen Genfamilie mit 5 Mitgliedern. Eine SLAC1-Verlustmutante zeigte einen stark verzögerten Stomaschluss in der intakten Pflanze. In Epidermispräparaten kam das Schließen der Stomata völlig zum Erliegen (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Die Aktivität der R-Typ Anionenkanäle war hingegen unbeeinflusst von einer Mutation im SLAC1-Lokus (Vahisalu et al. 2008). Promoter-GUS Analysen und SLAC1-GFP Fusionskonstrukte zeigten, dass SLAC1 spezifisch in Schließzellen exprimiert wird und an der Plasmamembran lokalisiert ist. Seine schwache Homologie zu bakteriellen und pilzlichen Dicarboxylat/Malat Transportern ließ die Autoren vermuten, dass SLAC1 tatsächlich für den S-Typ Anionenkanal codiert oder zumindest mit dem S-Typ Anionenkanal assoziiert sein muss (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Allerdings konnte die Funktion von SLAC1 nicht direkt gezeigt werden, da sowohl, die Bemühungen einen Malattransport-defizienten Hefestamm (*mae1*) als auch einen *E. coli* Stamm durch die Transformation mit dem SLAC1 Gen zu komplementieren, fehl schlugen. Ebenso blieb SLAC1 nach heterologer Expression und elektrophysiologischer Untersuchung in *Xenopus Oozyten* elektrisch still. Die Funktion von SLAC1 als S-Typ Anionenkanal konnte also weder durch indirekte noch durch direkte Experimente gezeigt werden (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Mit der Identifizierung des SLAC1-Gens konnte nach jahrzehntelanger Suche schließlich ein essentieller Bestandteil des S-Typ Anionenkanals in *Arabidopsis* Schließzellen gefunden werden. SLAC1 Verlustmutanten zeigten wie erwartet einen ABA-, CO₂-, und O₃-insensitiven Phänotyp. Im Vergleich zu Wildtyp Schließzellen wiesen die *slac1* Mutanten deutlich verringerte Anionenströme auf und der Stomaschluss verlief verlangsamt. Allerdings konnte die Funktion von SLAC1 bisher durch Komplementationsversuche in Hefe und *E. coli*, sowie durch die heterologe Expression in *Xenopus* Oozyten, nicht aufgeklärt werden. Da die Funktion von SLAC1 als S-Typ Anionenkanal weder mittels direkter noch indirekter Experimente gezeigt werden konnte (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008), ist die genaue Bedeutung von SLAC1 in der Schließzelle immer noch unklar.

Dieser Arbeit lagen somit folgende Fragen zu Grunde:

- Was ist die Funktion von SLAC1? Ist SLAC1 der S-Typ Anionenkanal, oder nur ein regulatorischer Bestandteil, der für die Aktivierung der Anionenströme essentiell ist?

Sollte SLAC1 tatsächlich der Anionenkanal sein, so ergeben sich die weiteren Fragen:

- Durch welche Interaktionspartner wird das per se inaktive SLAC1 Protein aktiviert?
- Was sind die genauen elektrophysiologischen Charakteristika dieses Anionenkanals?
- Wie ist der übergeordnete Regulationsmechanismus beschaffen, dem die S-Typ Anionenströme in Schließzellen untergeordnet sind?

Um diese Fragen anzugehen, wurden Methoden der modernen Biologie angewandt. Darunter befanden sich die heterologe Expression im System der *Xenopus* Oozyten, die **Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)**, **Two Electrode Voltage Clamp (TEVC)** Messungen und *in vitro* Kinase Experimente mit rekombinanten Proteinen.

Mit diesen Methoden sollte schließlich die ABA-Signaltransduktionskette, die zum schnellen Stomaschluss führt, rekonstituiert werden.

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten, gängigen Methoden zum Umgang mit Bakterien, DNA, RNA und Proteinen sind, soweit nicht anders erwähnt, entsprechend Current Protocols in Molecular Biology (Wiley) und Molecular Cloning (Sambrook/Russel) durchgeführt worden.

2.1 USER Klonierung

Für die erforderlichen Klonierungsarbeiten wurde die USERTM Methode (New England Biolabs) (Nour-Eldin et al. 2006) angewandt. Diese Technik beruht darauf, dass komplementäre 8 Nukleotid (nt) lange Überhänge von Vektor und Insert miteinander stabil hybridisieren und ohne einen gesonderten Ligationsschritt transformiert werden können.

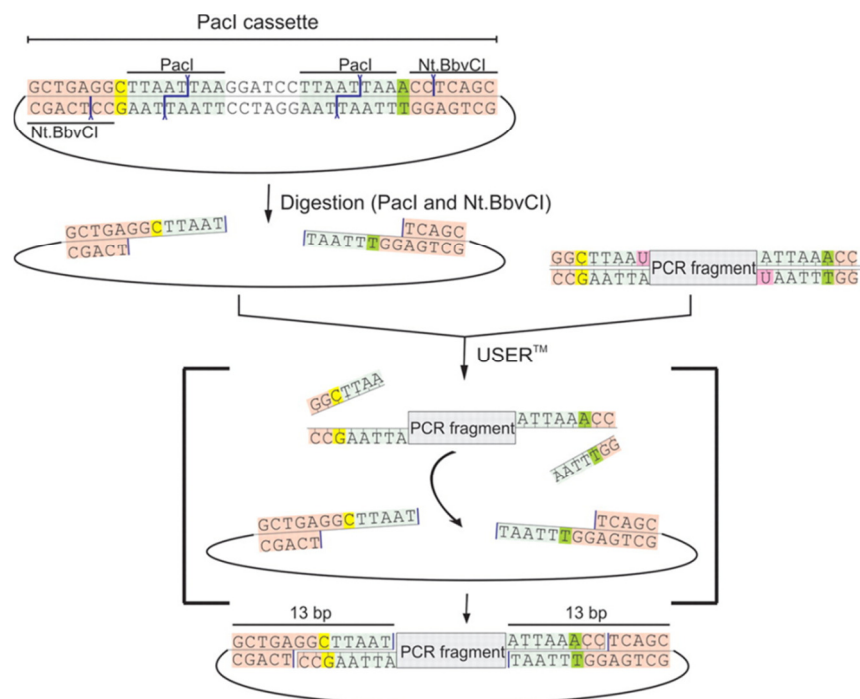


Abbildung 2.1: Übersicht der USERTM Technik

Der USER Vektor mit inserierter 38 bp langen Pacl Kassetten (oben links) wird mit Pacl und NtBbvCI verdaut, um 3' 8 bp lange Überhänge zu erzeugen. Das mit Uracil (pink) haltigen Primern amplifizierte PCR Fragment wird zu dem linearisierten Vektor und dem USER Enzym Mix gegeben. In der anschließenden Reaktion (25 min bei 37 °C) werden die Uracile und die 5' Enden des PCR Fragmentes entfernt. In den darauf folgenden 25 Minuten (25 °C) hybridisieren Vektor und Fragment und können daraufhin transformiert werden. In gelb und grün sind einzeln Basenpaar-Unterschiede markiert, die eine falsch orientierte Insertion verhindern. Diese Abbildung wurde Nour-Eldin et al (2006) entnommen.

2.1.1 Präparation der Vektoren

Als Ausgangsvektoren dienten der Oozytenexpressionvektor pGEM KN und der induzierbare Protein Expressionsvektor pGEX-6P-1 (GE Healthcare). Für die transiente Expression in *Arabidopsis* Protoplasten wurden Vektoren auf Basis des pCAMBIA geschaffen. In die multiple cloning site (MCS) dieser 3 Vektoren wurde eine 38 Basenpaare (bp) lange PacI-Userkassette eingebracht (Abbildung 2.1)(Nour-Eldin et al. 2006). Die im Hause sequenzierten und somit verifizierten USER Vektoren wurden mit insgesamt 60 U DNA Restriktionsenzym PacI (Fermentas) / 5 µg Plasmid linearisiert und durch anschließende Behandlung mit 20 U NtBbvCI (New England Biolabs) konnten die 8 nt langen (nicht komplementären; Abbildung 2.1) 3' Überhänge erzeugt werden. Nach einer Phenol-Chloroform Aufreinigung wurden die linearisierten Vektoren aliquotiert mit 50% Glycerol versehen und bei -20 °C gelagert.

2.1.2 Präparation der Inserts

Damit die zu klonierenden DNA-Fragmente in die vorbereiteten Vektoren eingebracht werden konnten, war es nötig an ihren 5' Enden, zur aufgeschnittenen USER-Kassette komplementäre, 8 nt lange Überhänge zu erzeugen. Dazu wurde eine Polymerase Ketten Reaktion (PCR) mit Insert-spezifischen Primern, die zusätzlich 5' die Sequenz (5' GGCTTAAU + Insert) am forward Primer und am reverse Primer 5' die Sequenz (komplementär/revers zum Insert + UAATTTGG 5') enthielten, durchgeführt. Für die PCR wurden die DNA Polymerasen PfuTurbo[®] C_x Hotstart (PfuCx Stratagene)(Norholm 2010) oder Phusion[™] DNA Polymerase (Finnzymes) gemäß der Herstelleranweisungen benutzt. Beide haben Proofreading Eigenschaft, aber überlesen die Uracile in den Primern. Anschließend erfolgte ein DpnI (Fermentas) Verdau mit anschließender Inaktivierung, da ein stabiles Template mit gleicher Antibiotika-Resistenz zu falsch positiven Klonen nach der Transformation führen kann.

2.1.3 Insertion von PCR Fragment in den USER Vektor

Für die Insertion wurde ein 10 µl Reaktionsgemisch bestehend aus den beiden DNAs, 1 Unit (U) USERTM Enzym Mix (Uracil-DNA-Glykosylase und DNAGlykosylase-Lyase Endo VIII; New England Biolabs) und gegebenenfalls TE-Puffer (Abschnitt 2.9.1) angesetzt. Das PCR-Fragment und der geschnittene USER Vektor wurden in einem 10:1 Verhältnis eingesetzt. Üblicherweise lag die Insertmenge bei etwa 400 ng pro Reaktion. Dieser Ansatz wurde 25 Minuten bei 37 °C (wobei die Überhänge am PCR Fragment erzeugt werden) und anschließend 25 Minuten bei 25 °C (wobei Vektor und Insert hybridisieren) inkubiert. Mit der gesamten Reaktion transformierte man dann chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen, wobei die Stämme MRF' (Stratagene) / TOP 10 F' (Invitrogen) für Plasmid Amplifikation und der Stamm RosettaTM (Merck) für anschließende Proteinexpression benutzt wurden.

2.1.4 Generierung neuer Vektoren

Die Ausgangsvektoren wurden freundlicher Weise von Hussam H. Nour-Eldin (Plant Biochemistry Laboratory, Frederiksberg C, Denmark) zur Verfügung gestellt und konnten nach Nour-Eldin et al (2006) um verschiedene Fluorophore oder Tags erweitert werden. Dazu verlängerte man die Insert-spezifischen Primer um 25 bp entweder am forward-, oder am reverse-Primer. Somit wurde nach Insertion des gewünschten Segments (2.1.3) wieder eine neue PacI Kasette entweder upstream (im Falle des forward-Primers) oder downstream (im Falle des reverse-Primers) geschaffen. Nach Transformation, DNA-Präparation und abschließender Präparation der Vektoren (Abschnitt 2.1.1) konnte ein weiteres PCR-Fragment in den neu entstandenen Vektor inseriert werden. So wurde in diesem Labor der Vektor #23 (Tabelle 2.2) generiert. Das Fluorophor **YFP** (Yellow Fluorescent Protein / Venus) wurde über Invitrogen bezogen und der HIS Tag wurde als Oligonukleotid von Metabion synthetisiert.

Tabelle 2.2











Vector Nr.	Name	Beschreibung	schematische Darstellung
16	pNB1u	USER kompatibeler Oozytenexpressionvektor	
17	pNB1u N-term YC	C-terminale Hälfte eines YFP upstream der USER Kasette	
18	pNB1u C-term YC	C-terminale Hälfte eines YFP downstream der USER Kasette	
19	pNB1u N-term YN	N-terminale Hälfte eines YFP upstream der USER Kasette	
20	pNB1u C-term YN	N-terminale Hälfte eines YFP downstream der USER Kasette	
21	pNB1u N-term YFP	ganzes YFP upstream der USER Kasette	
22	pNB1u C-term YFP	ganzes YFP downstream der USER Kasette	
23	pGEX 6p1 V5 HIS	GST Tag upstream der USER Kasette und HIS Tag downstream der USER Kasette	
p 01	pCAMBIA 01	C-terminale Hälfte eines YFP upstream der USER Kasette	
p 02	pCAMBIA 02	N-terminale Hälfte eines YFP upstream der USER Kasette	

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten USER™ Vektoren

Nomenklatur und Beschreibung der verwendeten Oozyten- Protein- und Pflanzen Expressionsvektoren. Bei den Split YFP Vektoren für BIFC Experimente (Nummer 17 – 21, p01 und p02) wurde das Fluorophor in die Hälften YFP NT (Aminosäure 1-155) und YFP CT (Aminosäure 156- 239) gespalten.

Die Beschreibung der folgenden (Standard-) Methoden und Techniken wurden zum Teil aus Arbeiten von Uta Anschütz, Marcel Dunkel, Dietmar Geiger und Kai Konrad übernommen und an meine experimentellen Gegebenheiten angepasst.

2.1.5 Mutagenese

Durch Nutzung geeigneter *sense*- und *antisense*- Primer, welche jeweils in der Mitte ihrer Sequenz die gewünschte Mutation trugen, war es möglich mit Hilfe einer der oben erwähnten Proofreading-Polymerasen (Abschnitt 2.1.2) in einer PCR DNA-Doppelstränge zu generieren, welche ebenfalls die gewünschte Mutation trugen. Durch anschließenden Verdau der PCR Reaktion mit DpnI wurde die Matrizen-DNA zerschnitten, nicht aber das PCR-Produkt, welches anschließend in kompetente Zellen transformiert werden konnte.

2.2 *In vitro* Transkription IVT

Für die Expression eines Proteins in den Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* wurde (**copy**) cRNA in die Eizelle injizieren. Die Herstellung dieser cRNA kann in großen Mengen durch *in vitro* Transkription der cDNA auf Grundlage geeigneter Vektoren wie den pNB1u-Vektoren stattfinden. Für das Umschreiben der cDNA in cRNA wurden RNA-Polymerasen verwendet, die von bestimmten bakteriellen Viren wie dem T7-Virus abgeleitet sind. Für dieses Umschreiben der DNA in RNA muss die zu transkribierende DNA-Matrize über einen Promotor (z.B. den T7-Promotor) für die virale RNA-Polymerase verfügen. Beim Umgang mit cRNA, wurden sterile Gefäße und Gerätschaften, sowie RNase-freie Chemikalien verwendet und es wurde wenn möglich auf Eis gearbeitet.

Von den, mit der USER Methode erzeugten, Klonen der einzelnen CPKs, PP2Cs, SnRKs und SLAC1 wurden Plasmid Minipräparationen angefertigt. Diese stellten die Template für die so genannte IVT-PCR. Dabei wurde mit Vektor-spezifischen Primern, die auf jedem erzeugten Vektor 5' der 5' untranslatierten Region (UTR) und 3' der 3' UTR aufsetzen eine PCR durchgeführt. Die so gewonnene lineare DNA diente nach Aufreinigung (Quiagen PCR purification kit) als Template für die „homemade“ *in vitro* Transkription. Basis für Transkription ist ein Mastermix bestehend aus:

T7 Transkriptions Puffer 5x (Fermentas)	500 µl
DTT 0,1 M (Fermentas)	250 µl
BSA 1,25 mg/ml	25 µl
ATP 100 mM (Fermentas)	25 µl
UTP 100 mM (Fermentas)	25 µl
CTP 100 mM (Fermentas)	25 µl
GTP 100 mM (Fermentas)	1,25 µl
BPC H ₂ O (nuclease freies H ₂ O (AppliChem))	925 µl

Dieser Mastermix kann auf -20 °C gelagert werden. Der eigentliche Reaktionsansatz für die IVT setzt sich dann wie folgt zusammen:

Mastermix	40 µl
PPase (Fermentas)	0,01 U (0,1 µl)
RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas)	20 U (0,5 µl)
Cap (10 mM NEB)	0,3 µl
T7 RNA Polymerase (Fermentas)	20 U
PCR Template	8 µl (≥ 500 ng)

Dieser Ansatz inkubierte 35 min bei 37 °C bevor 0,5 µl GTP (100mM) zugegeben wurden. Nach weiteren 3,5 Stunden stoppte man dann die Reaktion durch Zugabe von 30 µl LiCl (7.5 M + 50 mM EDTA). Die cRNA fällte über Nacht bei -20 °C aus und wurde anschließend bei 2 °C mit 15.000 g für 1 h abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70 %igem EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min; 15.000 g; 2 °C) und Verwerfen des Überstandes, wurde die RNA

bei 37 °C getrocknet, in BPC Wasser (~20 µl) aufgenommen und bei -20 °C eingefroren, was auch dem Lösen des cRNA Pellets diene.

Die Qualität der cRNA wurde auf einem Agarosegel überprüft. 1 µl der Ribonukleinsäureproben wurden dazu mit 3 µl RNA-Ladungspuffer (2.9.1) versetzt, bei 65 °C für 5 min denaturiert und in einem 1 %igen MEN-Agarosegel (2.9.1) in 1 x MEN-Puffer (2.9.1) mit 7 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Die entstandenen Bandenmuster wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid zum RNA-Ladungspuffer und anschließender Fluoreszenzanregung (255 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert (Intas UV Imager, Intas UV-Systeme).

Die Konzentration der synthetisierten cRNA wurde photometrisch bestimmt, mit BPC H₂O auf 0,5µg/µl eingestellt und bis zur Injektion bei -20 °C aufbewahrt.

2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte nach dem Prinzip der UV-Photospektrometrie (GeneQuant, Amersham Biosciences) über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich hierbei aus der OD bei 260 nm. Mit dem Verhältnis der OD₂₆₀ nm und der OD₂₈₀ nm erhält man eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Probe. Die Proben wurden hierzu 1:7 mit BPC H₂O verdünnt, in eine Quarzküvette überführt und die Extinktion bei den oben genannten Wellenlängen spektralphotometrisch gemessen.

2.4 Präparation von *Xenopus* Oozyten

Die Oozyten wurden *Xenopus laevis* (südafrikanischer Krallenfrosch) durch eine einfache Operation am betäubten Tier (Tricaine 0,75 g / l) entnommen. Das Ovargewebe wächst nach und der Frosch steht nach einer halbjährigen Ruhepause für weitere Eingriffe zur Verfügung. Unter einem Binokular wurde das gewonnene Ovargewebe mit den enthaltenen Oozyten vorsichtig vereinzelt und nach mehrmaligem Waschen in Ca^{2+} -freier ND96-Lösung (Absatz 2.9.1) für 2 h einem Kollagenaseverdau (~6 mg / ml) bei Raumtemperatur unterzogen. Dieser Schritt diente dazu, die Oozyten von Follikelzellen und Ovargewebe zu befreien. Anschließend folgte gründliches Waschen in Ca^{2+} -freier ND96-Lösung, um die Kollagenase und die Follikelzellen von den Oozyten zu trennen. Aufbewahrt wurden die Oozyten bei 17 °C in einer mit Gentamycin (100 µg / ml) versetzten ND96-Lösung.

2.5 Injektion der cRNA

Um die gewonnenen Oozyten mit cRNA zu injizieren, wurden Injektionskapillaren (Drumond #3-00-203-G/X, Drumond Scientific Company) mit einem Laserziehgerät (Sutter Instruments; Model p-2000) zu Mikropipetten gezogen. Damit an diesen eine scharfkantige Spitze entstand, wurde die Pipette gezielt an einer Microforge abgebrochen. Ihre Öffnung betrug ca. 2 µm im Durchmesser. Somit wurden die Oozyten bei der Injektion nur wenig verletzt. Die Injektion erfolgte spätestens 24 h nach der Präparation der Oozyten. Mittels eines Nanoject II Auto Nanoliter Injector (Drummond) wurden 8,5 ng jedes Konstruktes cDNA / Oocyte injiziert. Die injizierten Oozyten wurden bei 17 °C aufbewahrt und nach 2-3 Tagen elektrophysiologisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.6 Fluoreszenz-Mikroskopische Untersuchungen

2.6.1 Bi-molekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation ist es möglich die Interaktion und die Kollokalisierung von zwei Proteinen *in vivo* zu studieren. Diese Methode basiert auf einem in zwei Hälften geteilten YFP. Keine der beiden Hälften kann für sich alleine fluoreszieren, wohl aber wenn beide Hälften zusammenlagern und ihre Fluoreszenz so komplementieren. Wenn man jede der beiden Hälften mit zwei anderen Proteinen kovalent verknüpft, kann eine Interaktion anhand der Fluoreszenzkomplementation erkannt werden, da sich beide YFP Hälften erst so zusammenlagern. Gegenüber der **Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)**-Analyse, bei der die Proteininteraktion als Weitergabe der Fluoreszenz von einem intakten Fluoreszenzprotein zu nächsten messbar ist, hat sie den Vorteil, dass es nur einen Zustand des YFP gibt, fluoreszierend und nicht fluoreszierend. Die BiFC-Methode ermöglicht also einen technisch einfachen und vermeintlich sicheren Nachweis der Proteininteraktion. Nachteilig bei dieser Technik ist allerdings die Tatsache, dass die YFP-Komplementation irreversibel ist und gleichzeitig die getrennten YFP-Hälften die Tendenz zur Selbstkomplementation haben, was zum Anzeigen von falsch positiven Interaktionen führen kann (Walter et al. 2004).

Für die Interaktionsstudien der einzelnen CPKs, SnRKs, PP2Cs, und SLAC1 in Oozyten wurden mittels der USERTM Technik (Abschnitt 2.1) geeignete Vektoren erzeugt. So kann eine YFP-Komplementation stattfinden, wenn eines der zu untersuchenden Proteine in die Vektoren Nr. 17 oder 18 und das andere Protein in die Vektoren Nr. 19 oder 20 eingebracht ist (Tabelle 2.1). Bei der Expression in Mesophyllprotoplasten kamen die Vektoren Nr. p01 und p02 zum Einsatz.

2.6.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die, in dieser Arbeit verwendeten, Aufnahmen von Pflanzenzellen und Oozyten wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) LSM 5 Pascal von Zeiss angefertigt. Zur Anregung der Fluorophore ist das LSM5 Pascal mit einem 25mW Argon-Laser (Lasos RMC 7812Z) ausgestattet, der Photonen definierter Wellenlängen (458nm, 488nm, 514nm) erzeugen kann. Für die Anregung der YFPs wurde die Wellenlänge 514 nm genutzt. Die hohe Intensität und das parallele Licht des Lasers ermöglichten es, dass die Probe Punkt für Punkt untersucht werden konnte (konfokale Laser Scanning Mikroskopie). Das Fluoreszenzlicht aus diesem Punkt oder besser dieser Linie durch das Präparat wurde in der Bildebene durch eine Lochblende gefiltert, so dass hauptsächlich Licht aus der Fokusebene den Detektor erreichte. Durch die Öffnungsweite der frei verstellbaren Lochblende konnte dabei die Dicke des optischen Schnitts bestimmt werden. Um möglichst hohe Auflösungen zu erzielen wurde die Öffnungsweite der Lochblende so gewählt, dass die Fokusebene eine Dicke von 34 μm nicht überstieg. Für Oozytenaufnahmen verwendete man ein Zeiss Plan-Neofluar 10x/0.5 Objektiv und für Mesophyllprotoplasten ein Zeiss Plan-Neofluar 63x/1.25 Öl-Immersionsobjektiv. Als Emission des YFPs wurde Licht mit größeren Wellenlängen als 560 nm gesammelt und in den entstandenen Bildern als gelber Kanal dargestellt.

2.7 Elektrophysiologische Untersuchung der Oozyten

Mittels der etablierten zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (TEVC-Methode) (Finkel & Redman 1985) konnten Stromableitungen der injizierten *Xenopus* Oozyten durchgeführt werden, um die Funktionalität und Regulation der eingebrachten Kanäle zu untersuchen. Gemessen wurden die Ströme in Abhängigkeit auf variierende Anionen in der Badlösung. Entwickelt wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik Ende der 40er und Anfang der 50er Jahre im letzten Jahrhundert von Marmont, Cole, Hodgkin, Huxley und Katz an Tintenfisch-Axonon (Cole 1949; Hodgkin et al. 1949; Hodgkin et al. 1952; Marmont 1949). Anfang der 70er Jahre wurde diese Technik mit dem heterologen

Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten kombiniert und entwickelte sich daraufhin zu einem der beliebtesten System zur funktionellen Charakterisierung und Struktur-Funktionsuntersuchung von Membrantransportproteinen (Finkel & Gage 1985; Gurdon et al. 1971; Hille 1992).

Die TEVC-Technik ermöglicht die Ableitung von Ionenströmen unter der Kontrolle des Membranpotentials. Sie ist somit eine Voraussetzung für die elektrophysiologische Charakterisierung von Zellen und deren elektrogenen Transportern. Das technische Prinzip dieser Methode basiert auf der Messung des Membranpotentials mittels der Potential-Mikroelektrode (PE). Ein Differentialverstärker (Dv) vergleicht diese Spannung mit einer vorgegebenen Soll-Spannung (U_{com}), um durch Stromapplikation durch die Strom-Mikroelektrode (CE) so viele Ladungen in die Oozyte zu injizieren, bis das Membranpotential auf U_{com} eingestellt ist (Abb. 2.3). Die Trennung von Spannungsmessung und Stromapplikation durch zwei getrennte Mikro-Elektroden ist bei großen Zellen und Strömen im nA- und μ A Bereich nötig. Bei kleineren Zellen und geringeren Strömen kann eine einzige Elektrode verwendet werden („discontinuous single electrode voltage clamp“ (Neher et al. 1978; Park et al. 1981), „Patch-Clamp“ (Neher et al. 1978)).

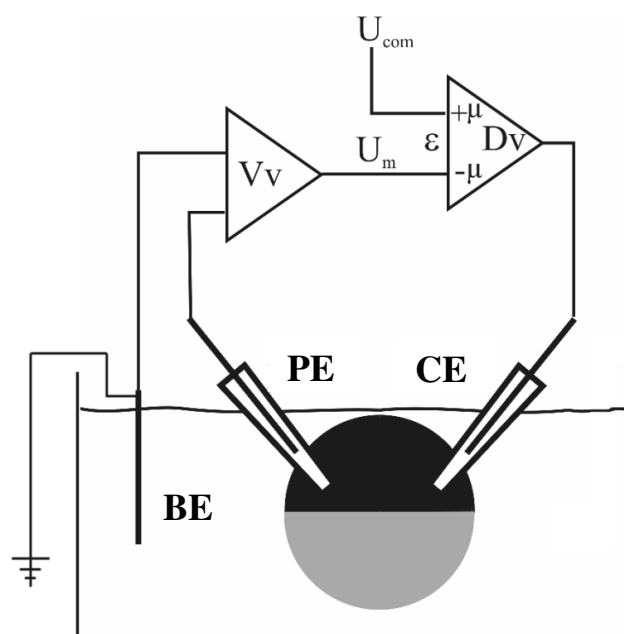


Abbildung 2.3: Ersatzschaltbild der TEVC-Technik

Das Membranpotential (U_m) wird über die Potentialelektrode (PE) und den Vorverstärker (Vv) gemessen. Über den Hochverstärkungsdifferentialverstärker (Dv) wird das Membranpotential (U_m) mit der vorgegebenen Soll-Spannung (U_{com}) verglichen. Dieser Dv bewirkt einen Ausgleichsstrom über die Stromelektrode (CE) in die Zelle, bis (U_m) und (U_{com}) den selben Wert angenommen haben. Als Referenz für PE und CE sowie als Erdung dient die Badelektrode (BE) (modifiziert nach „The Axon Guide“, 1993).

Die verwendeten Badlösungen enthielten immer weniger Chlorid als die Elektrodenlösungen. Dadurch entstanden an der Grenze von Elektroden und Badlösung Diffusionspotentialgradienten, die aber nach Eintauchen in die Badlösung, vor dem Einstechen in die Oozyte elektronisch subtrahiert werden konnten.

2.7.1 Konventionen

Die Differenz zwischen dem Potential auf der zytosolischen Membranseite und dem Potential der umgebenden Flüssigkeit bestimmt die Membranspannung. Das extrazelluläre Potential wird konventionsgemäß auf Null gesetzt (geerdet). Ein Einstrom von Kationen in die Zelle und ein Ausstrom von Anionen in den extrazellulären Raum, entsprechen einem negativen elektrischen Strom. Somit steht ein positiver Strom für einen Einstrom von Anionen in die Oozyte.

2.7.2 Meßaufbau

Die Messapparatur befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch durch einen Faraday'schen Käfig elektromagnetisch abgeschirmt. Als Perfusionsystem dienten 50 ml Spritzen als Reservoir für die Messlösungen und eine Vakuumpumpe für das Absaugen der Flüssigkeit aus einem kleinen, der Badkammer nachgeschaltetem Reservoir. Gleichmäßig, von der Schwerkraft getrieben, flossen die Messlösungen mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,5 ml / min durch die Badkammer. Die Oozyten wurden mittels Polyamidfäden stabil in der Badkammer gehalten, die an dieser Stelle ~3 mm breit war. Die Strom- und Spannungs Elektroden wurden an Mikromanipulatoren (Mikromanipulator, Märzhäuser MM33; Drummond) befestigt. Alle leitenden Bestandteile der Messeinheit wurden unter Vermeidung von Schleifenbildung geerdet. An die Erde des Vorverstärkers der Spannungselektrode war die Referenzelektrode (BE)

angeschlossen und wurde möglichst nahe der Zelle in der Badlösung platziert. Die, nach Anlegen einer bestimmten Haltespannung an die Oozyte, von der Membran abgeleitete Stromantwort wurde über den Vorverstärker in den eigentlichen Messverstärker (Turbo TEC 10X, NPI electronic, Tamm) geleitet. Die analogen Signale des Messverstärkers wurden dann mit einem 16 Bit AD/DA-Wandler (ITC16 ST, Instrutech Corporation, New York, USA) digitalisiert und somit für den Messrechner lesbar gemacht. Die Spannungspuls-Protokolle wurden mit der Software „PatchMaster“ (HEKA, Lambrecht/Pfalz) erstellt und mit IGOR (WaveMetrics) ausgewertet.

2.7.3 Elektroden

Zur Messung wurden Silber / Silberchlorid-Elektroden verwendet, die durch elektrolytische Chlorierung mit (ALC-01; npi electronic) regelmäßig regeneriert wurden. Die Messelektroden wurden in, mit 3 M KCl-Lösung gefüllten, Messpipetten getaucht, welche zuvor aus Borsilikatglaskapillaren (KWIK-FILTM, World Precision Instruments Inc.) gezogen wurden. Die Referenzelektrode war in einem Polyvinylschlauch platziert, der ebenfalls eine 3 M KCl-Lösung enthielt. Ein Agarpfropfen in der Schlauchöffnung, bestehend aus 3 M KCl und 2 % Agar, verhinderte ein Auslaufen der hochkonzentrierten Elektrolytlösung in die niedermolare Badlösung ohne dabei einen zu hohen elektrischen Widerstand darzustellen. Die Pipettenwiderstände, bedingt durch ihre Öffnungsweite, lagen etwa bei 0,3-1.2 M Ω .

2.7.4 Messung der Ströme

Zur Messung der Ganzzellströme wurde die Membranspannung der angestochenen Oozyte nach einem bestimmten Pulsprotokoll hin variiert (Abbildung. 2.4). Dieses

Pulsprotokoll bestand aus 24 Durchläufen. Im ersten und im letzten Segment lag eine Haltespannung von 0 mV an. Die Oozyte wurde in dem zweiten Segment auf +50 mV geklemmt, wobei sich diese Spannung in jedem der 24 Durchläufe um 10 mV erniedrigte, bis nach 24 Wiederholungen eine minimale Spannung von -180 mV erreicht war. Im vorletzten Segment wurde dann wieder eine konstante Spannung von -120 mV angelegt, bevor die Spannung im letzten Segment wieder das Haltepotential von 0 mV erreichte.

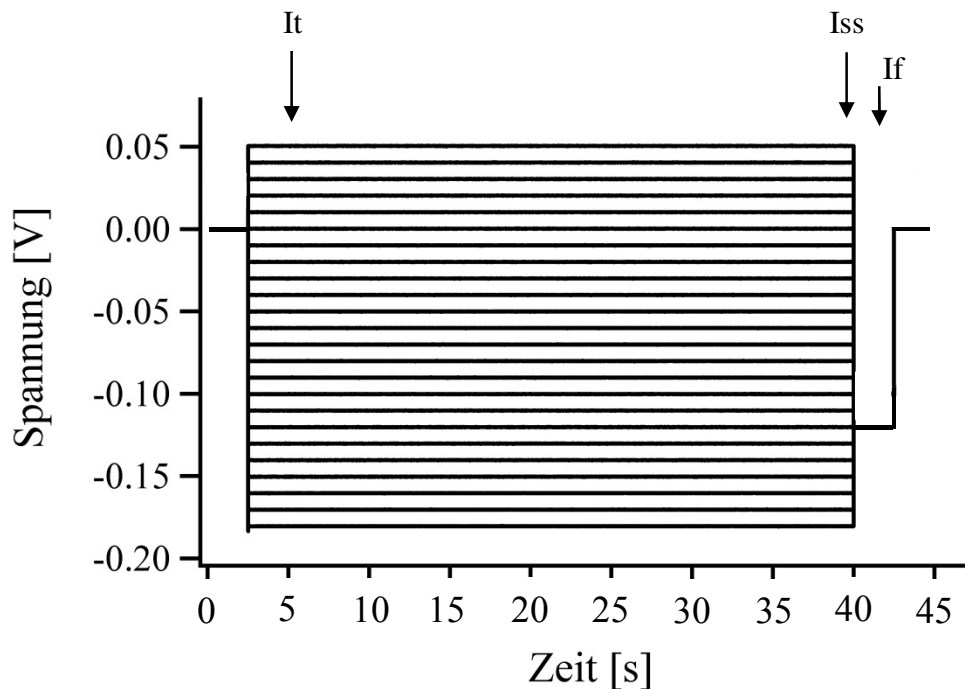


Abbildung 2.4: Standard Spannungspulsprotokoll

In dem ersten Segment dieses Protokolls wird die Zelle für 2,5 s auf eine Haltespannung von 0 mV geklemmt. Danach schließt sich das mittlere Segment an, in dem die Spannung in jedem der 24 Durchläufe von 50 mV ausgehend um 10 mV erniedrigt wird. In diesem 37,5 s langen Segment werden zu Beginn die instantanen Ströme (I_t) und im Endbereich die Gleichgewichtsströme (I_{ss}) generiert. In dem anschließenden Folgepuls auf -120 mV können die Folgeströme (I_f) gewonnen werden. Im letzten Segment wird wieder für 2,5 s die Haltespannung von 0 mV an die Oozyte angelegt.

Zur weiteren Auswertung, der aus dem Spannungsprotokoll (Abbildung 2.4) gewonnenen Stromantworten, wurden der Gleichgewichtsstrom I_{ss} („steady-state“-Strom), der Folgepulsstrom I_f und der instantane Strom durch die offene Kanalpore I_t bei variierenden Badlösungen (Abschnitt 2.9.2) ermittelt. Diese drei Kenngrößen (I_{ss} ; I_t und I_f) erlauben bereits eine sehr weitreichende Charakterisierung und Vergleichbarkeit von Kanälen.

Nach Voraktivierung im ersten Segment, wurden zu Beginn des zweiten Segments (40 – 50 ms nach Anlegen der neuen Spannung) die instantanen Ströme („Tailströme“ I_t)

gewonnen. Am Ende dieses Segments erreichte der Strom durch die Kanäle einen stabilen Wert den sogenannten Gleichgewichtsstrom I_{ss} .

Im vorletzten Segment wurde dann wieder eine konstante Spannung von -120 mV angelegt. Durch die schnellen Spannungssprünge zu diesem festen Wert konnte die relative Offenwahrscheinlichkeit P_o bestimmt werden. Hierzu wurden die Folgepulsströme zu Beginn des dritten Segments nach einer Boltzmann Funktion gefittet, anhand des Maximalwertes normalisiert und gegen die entsprechenden Spannungen aufgetragen.

Da die hier untersuchten Anionenkanäle nur in den beiden Zuständen offen, oder geschlossen vorliegen, wird der Strom durch den Kanal von 3 Variablen bestimmt. Entscheidend sind die Anzahl (N) der Kanäle in der Membran, der Einzelkanalstrom (i) bei gegebener Spannung und die Offenwahrscheinlichkeit (P_o). Die Folgepulsströme (IF) im dritten Segment sind ein direktes Maß für die relative spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit P_o , weil der Folgepuls immer zur gleichen Spannung springt, so dass $N * i(U) = \text{konstant}$ gilt.

$$I_{ss}(U, t) = \underbrace{N}_{\text{Anzahl der Kanäle}} * \underbrace{i(U)}_{\text{spannungsabhängiger Einzelkanalstrom}} * \underbrace{p_o(U, t)}_{\text{Offenwahrscheinlichkeit}} \quad (1)$$

2.7.5 Bestimmung der Umkehrspannungen und der relativen Permeabilitäten

Die Umkehrspannung (U_{rev}) ist definiert als die Membranspannung, bei der der Nettostromfluss über die Membran null ist. Als Stromfluss gelten Ionen, die meist durch Kanäle die Membran passieren. Diese Ionen bewegen sich immer entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Da in der Regel eine Membran oder ein Ionenkanal für

verschiedene Ionen durchlässig ist, muss zur Berechnung des Umkehrpotentials die Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) Spannungsgleichung benutzt werden (Goldman 1943; Hodgkin & Katz 1949). In den folgenden Berechnungen werden nur Anionen (x^- , y^- , usw) als permeierende Ionen betrachtet.

$$U_{\text{rev}} = \frac{R T}{F} * \ln \frac{p_x [x^-]_{\text{innen}} + p_y [y^-]_{\text{innen}} + \text{usw}}{p_x [x^-]_{\text{außen}} + p_y [y^-]_{\text{außen}} + \text{usw}} \quad (2)$$

Wobei R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur in °Kelvin, F die Faradaykonstante, p die Permeabilitatskoeffizienten der einzelnen Ionen und [x, y, usw] die Konzentrationen der einzelnen Ionen außen und innen sind.

Gibt es in einer Membran Kanäle mit nur einer Leitfähigkeit, so wird das Umkehrpotential (U_{rev}) durch das elektrochemische Gleichgewicht dieses einzig permeierenden Ions (x^-) bestimmt. Das Umkehrpotential in diesem Fall kann nach Nernst berechnet werden:

$$U_{\text{rev}} = \frac{R T}{z_x F} * \ln \frac{p_x [x^-]_{\text{innen}}}{p_x [x^-]_{\text{außen}}} \quad (3)$$

Dabei haben R, T, p und F ihre schon erwähnte Bedeutung, während z_x (1 bei einwertigen Ionen) die Ladung des Ions (x^-) ist.

Bei einer absoluten Temperatur von 298,15 K lässt sich die Nernst-Gleichung umstellen zu:

$$U_{\text{rev}} = 59,1 \text{ mV} * \lg \frac{p_x [x^-]_{\text{innen}}}{p_x [x^-]_{\text{außen}}} \quad (4)$$

Nach dieser Gleichung verschiebt sich das Umkehrpotential bei einer zehnfachen Erniedrigung der extrazellulären Anionenkonzentration $[x^-]_{\text{außen}}$ um 59,1 mV wenn das permeierende Ion einfach geladen ist. Bei Messungen an Oozyten mit der zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik ist die intrazelluläre Anionenkonzentration nicht bekannt. Daher wurden die relativen Permeabilitäten im Vergleich zu einer definierten Badlösung (Abschnitt 2.9.2) mit 50 mM $\text{Cl}^-_{\text{außen}}$ bestimmt:

$$\frac{p_x}{p_{\text{Cl}^-}} = 10^{\frac{\Delta U_{\text{rev}}}{59,1 \text{ mV}}} * \frac{[\text{Cl}^-]_{\text{innen}}}{[x^-]_{\text{außen}}} \quad (5)$$

Hierbei bezeichnet ΔU_{rev} die Differenz der in Cl^- und x^- gemessenen Umkehrspannungen.

2.8 Arbeiten mit Proteinen

Um die rekombinanten Proteine SLAC1, CPK3, 6, 21, 23, 31, OST1, ABI1 und 2 in *in vitro* Kinase Assays einzusetzen, mussten ihre Gene zunächst unter Verwendung der USERTM Methode in den Expressionsvektor Nr. 23 eingebracht (Abschnitt 2.1) und in *E. coli* Zellen (Rosetta; Merck) exprimiert werden. Da sich die regulatorischen Domänen des Anionenkanals SLAC1 vermutlich an seinen beiden zytosolischen Enden befinden, wurden diese ebenso wie das Vollängenkonstrukt hergestellt. Dabei bestand der SLAC1 N-terminus (SLAC1 NT) aus den Aminosäuren (AS) 1 – 186 und der C-terminus (SLAC1 CT) aus den AS 496 – 556. Der verwendete Vektor Nr. 23 ist abgeleitet von dem Expressionsvektor pGEX 6P1 und ermöglichte eine Doppelaufreinigung über einen **Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag / N-terminal)** und einen **poly-Histidin-Tag (His-Tag / C-terminal)**.

2.8.1 GST-Tag

Glutathion-S-Transferase (GST) wurde erstmals 1988 genutzt, um Proteine aufzureinigen (Smith & Johnson 1988). Das exprimierte Fusionskonstrukt aus GST und Zielprotein konnte bei einer Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion gebunden und durch Zugabe von 10 mM reduziertem Glutathion wieder eluiert werden. Dabei spielt es keine Rolle, ob der Tag N- oder C-terminal am Zielprotein hängt. Der GST-Tag gehört mit einer Größe von 26 kDa zu den größeren Tags. Sein Einsatzgebiet umfasst Bakterien (Smith & Johnson 1988), Hefe (Lu et al. 1997), Säugetierzellen (Rudert et al. 1996) und Insektenzellen (Beekman et al. 1994). GST Fusionsproteine haben sich seit dem zu einem Grundbaustein der Molekularbiologie entwickelt. Sie eignen sich sowohl für Interaktionsstudien zwischen Protein - DNA (Beekman et al. 1994; Lassar et al. 1989), als auch zwischen Protein - Protein (Mayer et al. 1991; Ron & Dressler 1992). Weiterhin dient der GST-Tag als Antigen in der Immunologie (McTigue et al. 1995).

Soweit nicht anders gekennzeichnet, besaßen alle in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteinen einen GST-Tag.

2.8.2 HIS-Tag

Ebenso wie der GST-Tag wird auch der Polyhistidin-Tag (HIS-Tag) genutzt, um seine Fusionsproteine aufzureinigen oder zu markieren. Als Tag dienen dabei 5 – 10 aufeinander folgende Histidine, wobei sich die Affinität proportional zur Anzahl der Histidine verhält (Terpe 2003). Histidin bindet besonders stark an zweiwertige Metallionen (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), da sein Imidazolring als Elektronendonator für die immobilisierten Kationen in der „immobilized metal-affinity chromatography“ (IMAC) dient (Porath et al. 1975). Diese Bindung kann durch pH-Änderung oder Zugabe von freiem Imidazol gelöst werden. Erstmals konnte diese Methode 1987 mit „nitrilotriacetic acid“ (NTA) als Trägermaterial für Ni^{2+} erfolgreich angewandt werden (Hochuli et al. 1987). Mittlerweile konnte diese Methode zu dem so genannten HAT-Tag weiterentwickelt werden (Chaga et al. 1999; Chaga et al. 1999). Dennoch ist die Aufreinigung von Proteinen aus einer Vielzahl von Expressionssystemen über den HIS-Tag die weithin gängigste Methode (Terpe 2003).

2.8.3 Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Nachdem die Konstrukte von SLAC1, SLAC1 NT, SLAC1 CT, CPK3, 6, 21, 23, 31, OST1, ABI1, 2 und die beiden Totmutanten OST1 D140A, CPK23 D193A (Hanks & Hunter 1995) in die entsprechenden Vektoren kloniert und in die die Expressionszellen RosettaTM transformiert wurden (Abschnitt 2.1), konnte mit der Proteinexpression begonnen werden. Dazu wurde mit einer frischen 5 ml Übernachtskultur 100 ml TB-Medium (Abschnitt 2.9.3) angeimpft. Nach mindestens 16 h Schütteln bei 37 °C konnte diese Vorkultur dann in 2x 1 Liter frisches TB-Medium in zwei 2,5 Liter Schikanekolben überführt werden. Der Expressionsansatz wurde dann, unter regelmäßiger Kontrolle der optischen Dichte (OD 600 / GeneQuant; Amersham Biosciences) bei 37 °C und 130 Umdrehungen / min (multitron standard / Infors HT, Einsbach), inkubiert. Sobald die Bakterien eine optische Dichte von 0,5 – 0,8 (meist nach etwa 3 h) aufwiesen, wurden sie mit 0,4 mM IPTG (Isopropylthio- β -galatoside) induziert und schüttelten für weitere ~18 h bei 18 °C. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien bei 6000g 15 Minuten

abzentrifugiert und in 40 ml kaltem PBS / 2 Liter Kultur aufgenommen. Das Pellet wurde durch einen Rührfisch auf einem Magnetrührer (Hartenstein; Würzburg) im Kühlraum (4 °C) resuspendiert. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 5 mg Lysozym (Sigma) und Sonifikation (4x 20 sec Puls 100 W / Sonopuls HD 3100 VS 70 T; Bandelin) auf Eis. Das Lysat wurde in 50 ml Falkons überführt und 10 min bei 12.000 g 2 °C zentrifugiert (Eppendorf 5810R).

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte nach Herstelleranweisung (Glutathione Sepharose 4B; Amersham). Der Überstand des Bakterienlysats wurde zu 1,4 ml (/ 2 l Ausgangskultur) Glutathione Sepharose Beads gegeben und für die Bindung mindestens 3 h auf 4 °C invertiert. Anschließend wurden die Sepharose Beads bei 600 g für 5 min (2 °C) abzentrifugiert und 3 – 5 mal in 15 ml PBS gewaschen, wobei sie in ein 15 ml Falcon überführt wurden.

Bei der einfachen Aufreinigung, wie sie für die CPKs (3, 6, 21, 23, 23 D193A, 31), OST1, OST1 D140A, ABI1 und 2 angewendet wurde, eluierte man die Proteine von den gewaschenen Beads durch Zugabe von 600 µl Elutionspuffer. Darin wurden die Beads 10 min bei Raumtemperatur invertiert und erneut bei 600 g für 5 min (2 °C) abzentrifugiert. Diese erste Elution wurde durch erneute Zentrifugation (14.000 g, 1 min) von verbliebenen Beads befreit und gegen 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,4 über Nacht bei 4 °C dialysiert. Der Elutionsvorgang wurde weitere 2 – 3 mal wiederholt.

Bei der doppelten Aufreinigung, wie sie bei dem Proteinen SLAC1 NT- und CT durchgeführt wurde, eluierte man 2 mal mit je 2 ml Elutionspuffer nach obigem Protokoll. Dieses Eluat wurde allerdings mit 1,4 ml Ni-NTA Superflow (Qiagen) und 8 ml His-Puffer versetzt. Die Bindung des Proteins erfolgte durch Invertieren für 40 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Beads 3 mal mit His-Puffer gewaschen (600 g / 5 min) und 4 mal in 600 µl (His-Puffer + 500 mM Imidazol) nach obigem Protokoll eluiert. Danach wurden, wie bei der GST Aufreinigung, verbliebene Beads abzentrifugiert und das Eluat dialysiert.

Die Proteine wurden auf einem 12 %igen SDS Gel kontrolliert und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Dabei wurden die Proteine der CPKs, OST1, ABI1 und 2 in 50 % Glycerin und 1x Proteaseinhibitor (EGTA frei, Roche) aufgenommen, um ein Einfrieren zu vermeiden. Hierbei war darauf zu achten, dass in dem späteren Reaktionsansatz weniger als 5 % Glycerin enthalten waren.

2.8.4 Generelle Durchführung der *in vitro* Kinase Assays

In den durchgeführten *in vitro* Kinase Assays wurde die Phosphorylierungsreaktion am SLAC1 durch unterschiedliche Kinasen untersucht. Dabei galt es den Einfluss von Phosphatasen und variierenden Ca^{2+} Konzentrationen auf die Kinasen zu testen. Generell wurden etwa 1 – 3 μg jedes Proteins und 5 mCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP (100 μM ATP; 3,000 Ci/mmol; Hartmann Analytic) pro Ansatz verwandt. Dieser Ansatz aus den zu untersuchenden Proteinen und dem jeweiligen Puffer wurde kurz inkubiert und die Reaktion durch Zugabe des radioaktiven ATPs bei Raumtemperatur gestartet. Der Abbruch der Reaktion erfolgte nach 6 Minuten durch Zugabe von SDS Probenpuffer und Erhitzen auf 90 °C für 5 Minuten. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-Gel-Elektrophorese (8 - 16 % Gradienten Acrylamidgel; PreciseTM; Thermo Scientific) getrennt. Die Gele färbten in Coomassie für mindesten 35 Minuten und wurden mit Entfärbelösung solange gewaschen, bis der Hintergrund wieder klar erschien. Dieses Prozedere diente auch dazu unspezifische Radioaktivität aus dem Gel zu entfernen. Die fertigen Gele wurden an dem Imagemaster VDS (Pharmacia Biotech) dokumentiert und danach eingeschweißt. Die Visualisierung der Phosphorylierung erfolgte mit Hilfe eines Phosphor Imagers (BAS 2000; FujiFilm; Japan). Dabei wurden die Gele auf einer „Imaging plate“ exponiert. Die Auswertung erfolgte über die Datenverarbeitungsprogramme Basread (FujiFilm) und Aida (raytest). Alternativ konnten die Gele durch Auflegen von Röntgenfilmen (Amersham HyperfilmTMMP; GeHealthcare) ausgewertet werden. Quantifiziert werden konnte die Phosphorylierung durch das Szintillations-Messgerät MicroBeta (PerkinElmer). Dazu wurden die zu untersuchenden Proteine aus dem Gel ausgeschnitten und deren Radioaktivität erfasst. Alternativ dazu wurde die Quantifizierung der Radioaktivität ebenfalls über die Software AIDA kontrolliert. Diese beiden Methoden führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

2.8.4.1 Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung

Um die Geschwindigkeit der Phosphorylierungsreaktion zu bestimmen, wurden zeitabhängige *in vitro* Kinase Assays durchgeführt. Hierzu wurden 6 verschiedene Ansätze mit SLAC1 NT, CPK21 und CPK-Kinasepuffer mit 1 μM freiem Ca^{2+} (Abschnitt 2.9.3) vorbereitet. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde das radioaktive ATP zugegeben

und die Reaktion somit gestartet. Am Ende des Versuchs stoppte man alle Ansätze gleichzeitig durch Zugabe von Probenpuffer und Aufkochen. Diese Vorgehensweise ermöglichte es, jede Probe unterschiedlich lange zu inkubieren, aber dabei alle gleichlange den proteolytischen Verfall bei Raumtemperatur auszusetzen. Insgesamt lief die Reaktion 1, 3, 5, 10 und 160 Minuten ab.

2.8.4.2 Spezifität der Kinasen zum SLAC1

Zuerst wurde mit den Kinasen OST1, CPK21 und CPK23 untersucht, wo sich die Phosphorylierungsstellen am SLAC1 befinden. Dazu führte man *in vitro* Kinase Assays der 3 unterschiedlichen Kinasen mit jeweils dem N- und dem C-terminalen Bereich des SLAC1 durch. Dabei betrug die Reaktionszeit 6 Minuten und der CPK-Kinasepuffer enthielt 1 μM freies Ca^{2+} .

Anschließend wurde unter den gleichen Bedingungen die Phosphorylierung aller erzeugten Kinasen am SLAC1 N-Terminus untersucht.

2.8.4.3 Genauere Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen

Für eine genauere Charakterisierung wurden CelluSpots peptide arrays (Intavis Bioanalytical Instruments) verwendet. Auf diesen Arrays wurden 24 Spots mit Peptiden der SLAC1 Sequenz durch Acetylierung erstellt. Die Peptide überlappten jeweils 10 Aminosäuren und deckten insgesamt die vorhergesagten cytoplasmatischen Regionen von SLAC1 ab. Sie wurden nach Herstelleranweisung und Bohmer & Uecker (2009) verwendet. Um unspezifische Bindung zu vermeiden, wurden die Arrays 2 h bei Raumtemperatur in einer **BSA**-haltigen Lösung (1% **bovine serum albumin**; 50 mM HEPES; pH 7,4; 0,05% TritonX100) inkubiert. Danach wurden die Slides 4 mal mit entsprechendem Kinasepuffer (CPK-Kinasepuffer mit 1 μM Ca^{2+} , oder OST1-Kinasepuffer; Abschnitt 2.9.3) gewaschen. Die Phosphorylierungsreaktion wurde 2 h bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler durch Zugabe von 3 ml Kinasepuffer, 5 mCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP (3,000 Ci/mmol) und 3 μg Kinase durchgeführt. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Slides 4 – 5 mal je 20 Minuten in Waschpuffer (50mM HEPES; pH 7,4; 150mM NaCl; 5mM EDTA, 0,05% TritonX100) gewaschen. Nach Trocknung der Slides

konnten diese in Frischhaltefolie eingewickelt werden und wurden, wie die eingeschweißten Gele, auf der „Imaging-Plate“ exponiert. Die Autoradiographie wurde dann am oben erwähnten (Abschnitt 2.8.4) Phosphor Imager inklusive Software visualisiert.

2.8.4.4 Ca²⁺ Abhängigkeit der Phosphorylierungsreaktion

Um die Ca²⁺ Abhängigkeit der verschiedenen CPKs heraus zu arbeiten, wurde ihre Phosphorylierung am SLAC1 NT unter verschiedenen Kalziumkonzentrationen untersucht. Dazu wurden CPK-Kinasepuffer, wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben; mit freien Ca²⁺ Konzentrationen von 0, 50, 100, 200, 500, 1000, 3000, 5000 und 10000 nM verwendet. Die *in vitro* Kinase Assays und deren Auswertung wurden gemäß (2.8.4) durchgeführt.

2.8.4.5 Regulation der Kinasen

In weiteren *in vitro* Kinase Experimenten mit SLAC1 NT und den verschiedenen Kinasen wurde der ABA-Rezeptor RCAR1 (in Kooperation mit der AG Grill rekombinant hergestellt (Lehrstuhl für Botanik, Technische Universität München, Am Hochanger 4, D-85354 Freising, Germany)) und / oder die Phosphatase ABI1 zugegeben. Dabei wurde stets die Reihenfolge bei Zusammengeben der einzelnen Komponenten eingehalten: 1. RCAR1 2. Kinasepuffer (Abschnitt 2.9.3), 3. ABI1, 4. Kinase, 5. eventuell Zugabe von Dialysepuffer, um die Volumina auszugleichen, (anschließend 10 Minuten auf Eis inkubieren), 6. SLAC1 NT, 7. ATP.

2.9 verwendete Lösungen

Die hier beschriebenen Lösungen sind nach ihrem Namen mit einem Verdünnungsfaktor versehen. Dieser gibt an, wie die entsprechende Lösung einzusetzen ist. Die Mengenangaben der einzelnen Bestandteile beziehen sich auf die Herstellung der betreffenden Lösung, also nicht unbedingt auf deren Endkonzentration.

2.9.1 Lösungen für die Molekularbiologie

TE-Puffer (1x)	10 mM Tris, (pH 8; HCl) 1 mM EDTA
MEN-Puffer (10x):	2 M MOPS (pH 7; NaOH) 500 mM Na-Acetat 50 mM EDTA
RNA-Probenpuffer (1,3x):	95 % Formamid 0,025 % SDS 0,025 % Bromphenolblau 0,025 % Xylen cyanol 0,5 mM EDTA 0,2 µl Ethidiumbromid
1 % MEN-Agarosegel:	500 mg Agarose 41 ml H ₂ O 5 ml 10x MEN 9 ml Formaldehyd (37 %)

ND96-Lösung (1x)	96 mM NaCl
	2 mM KCl
	1 mM CaCl ₂
	1 mM MgCl ₂
	10 mM HEPES pH 7,4
	100 µg / ml Gentamycin
	220 mOsmol/kg (mit D-Sorbitol eingestellt)
	(Ca ²⁺ -freie ND96-Lösung: ND96-Lösung ohne CaCl ₂)

2.9.2 Lösungen für die Elektrophysiologie

2.9.2.1: Cl⁻ basierte Standard-Badlösungen

Komponente	Standard-Badlösung [mM]	Badlösung mit 10 mM Cl ⁻ [mM]	Badlösung mit 100 mM Cl ⁻ [mM]
Mes	10	10	10
Tris	pH 5,6	pH 5,6	pH 5,6
CaCl ₂	1	1	1
MgCl ₂	1	1	1
LaCl ₃	1	1	1
KCl	2	2	2
NaCl	21	1	91
Na-Gluconat	70	90	0
D-Sorbitol	220 mOsmol/kg	220 mOsmol/kg	220 mOsmol/kg

2.9.2.2: Lösungen mit variierenden Anionen

Die Lösungen der Selektivitätsmessungen enthielten 1 mM Ca-Gluconat und 1 mM Mg-Gluconat. Der pH-Wert wurde mit 10 mM Mes durch Tris auf pH 5,6 eingestellt. Die variierenden Natrium-Anionen wurden 50 mM eingesetzt. Die Osmolarität wurde durch D-Sorbitol auf 220 mOsmol/kg eingestellt.

2.9.2.3: Lösungen mit variierenden Kationen

Diese Lösungen mit variierenden Kationen enthielten 1 mM Ca-Gluconat und 1 mM Mg-Gluconat. Der pH-Wert wurde mit 10 mM Mes durch Tris auf pH 5,6 eingestellt. Die Cl-Salze von Li⁺, Na⁺ und K⁺ wurden 100 mM verwendet. Die Osmolarität wurde durch D-Sorbitol auf 220 mOsmol/kg eingestellt.

2.9.2.4: Standard Patch-Clamp-Lösungen

Badlösung für die ABA-Aktivierung der S-Typ Anionenströme

Die Zusammensetzung dieser Badlösung war [mM] 30 CsCl, 0,5 LaCl₃, 10 Mes/Tris pH 5,6 und 25 μM S-ABA. Die Osmolarität wurde durch D-Sorbitol auf 400 mOsmol/kg eingestellt. Um ABA induzierte Anionenströme zu gewinnen, wurden die Protoplasten 30 Minuten vor der Messung mit 25 μM S-ABA inkubiert.

Badlösung für die Ca²⁺-Aktivierung der S-Typ Anionenströme

Die Zusammensetzung dieser Badlösung war [mM] 30 CsCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 0,5 LaCl₃ und 10 Mes/Tris pH 5,6. Die Osmolarität wurde durch D-Sorbitol auf 400 mOsmol/kg eingestellt.

Pipettenlösung für die ABA-Aktivierung der S-Typ Anionenströme

Die Zusammensetzung dieser Pipettenlösung war [mM] 150 TAE-Cl, 2 MgCl₂, 5 Mg-ATP, 5 Tris-GTP, 10 HEPES/Tris pH 7,1 und 25 μM S-ABA. Um eine freie Ca²⁺ Konzentration von 110 nM einzustellen, wurden 10 mM EGTA mit 3 mM CaCl₂ eingesetzt. Die Osmolarität wurde durch D-Sorbitol auf 440 mOsmol/kg eingestellt.

Pipettenlösung für die Ca²⁺-Aktivierung der S-Typ Anionenströme

Die Zusammensetzung dieser Pipettenlösung war [mM] 150 TAE-Cl, 2 MgCl₂, 5 Mg-ATP, 5 Tris-GTP und 10 HEPES/Tris pH 7,1. Um eine freie Ca²⁺ Konzentration von 2 μM einzustellen, wurden 6,7 mM EGTA mit 5,86 mM CaCl₂ eingesetzt. Die Osmolarität wurde durch D-Sorbitol auf 440 mOsmol/kg eingestellt.

2.9.3 Lösungen für die Proteinbiochemie

TB-Medium

1,2 % Trypton
2,4 % Hefeextrakt
72 mM K_2HPO_4
17 mM KH_2PO_4
0,4 % Glycerin
pH Wert sollte ~7,4 betragen

PBS-Puffer (10x)

1,4 M NaCl
27 mM KCl
100 mM Na_2HPO_4
18 mM K_2HPO_4
pH Wert sollte ~7,3 betragen (unbedingt nach Herstellen der 1x Lösung kontrollieren).

GST-Elutionspuffer (1x)

50 mM TRIS (pH 8; HCl)
10 mM reduziertes Glutathion

HIS-Puffer (1x)

50 mM Na_2HPO_4 (pH 8)
300 mM NaCl

SDS-Laufpuffer (10x)

121 g TRIS
238 g HEPES
10 g SDS
H₂O auffüllen auf 1 Liter

Protein-Probenpuffer (6x)	500 mM TRIS (pH 6,8; HCl) 20 % SDS 24 % Glycerin 0,012 % Bromphenolblau 200 mM DTT
Coomassie	0,1 % Brilliant Blue R250 50 % MeOH 10 % Essigsäure (Lösung ist vor Gebrauch zu Filtrieren)
Entfärbe-Lösung	25 % MeOH 10 % Essigsäure
OST1-Kinasepuffer (2x)	40 mM HEPES (pH 7,5) 1% Triton X-100 4 mM MnCl ₂ 20 mM NaF 10 mM β-Glycerophosphat 1x Protease Inhibitor EDTA frei (Roche)

CPK-Kinasepuffer (2x)

100 mM HEPES (pH 7,4)

20 mM MgCl₂,

4 mM DTT

10 mM EGTA

1x Protease Inhibitor EDTA frei (Roche)

Um definierte Ca²⁺ Konzentrationen im Puffer einzustellen wurde der Kalkulator WEBMXC (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) benutzt.

Freie Ca ²⁺ Konzentration im Puffer (2x) [nM]	Eingesetztes Ca ²⁺ [mM] ((2x) für 2x Puffer)
0	0
50	2x 1,93
100	2x 2,76
200	2x 3,48
500	2x 4,26
1000	2x 4,60
3000	2x 4,86
5000	2x 4,919
10000	2x 4,966

RKAR1-Kinasepuffer (10x)

1 M TRIS (pH 7,9)

1 M NaCl

50 mM DTT

3 mM MnCl₂

1x Protease Inhibitor EDTA frei (Roche)

Für die Experimente mit dem ABA-Rezeptor RCAR1 wurde dieser Puffer ohne und mit 125 µM S-ABA eingesetzt.

3 Ergebnisse

Wie bereits einleitend erwähnt initiieren S-Typ Anionenströme den Stomaschluss. Erst kürzlich konnte SLAC1 als ein Bestandteil des langsamen Anionenkanals identifiziert werden. Allerdings blieb seine tatsächliche Funktion bislang unklar, da die Expression in Bakterien, Hefe und *Xenopus Oozyten* zu keiner Anionenkanalaktivität führte (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Zur funktionellen Charakterisierung des inaktiven SLAC1 Proteins, wurde daher mit der Suche nach aktivierenden Interaktionspartnern begonnen. Durch Experimente mit Kinase- und Phosphatase-Inhibitoren konnte bereits gezeigt werden, dass De- und Phosphorylierungsereignisse die Kanalaktivität regulieren (Li et al. 2000; Mori et al. 2006; Schmidt et al. 1995). Weiterhin kann der Stomaschluss auf einem Ca^{2+} -abhängigen und einem Ca^{2+} -unabhängigen Weg erfolgen (Allan et al. 1994; Hetherington & Brownlee 2004; Levchenko et al. 2005; Schroeder & Hagiwara 1989). Daher wurde bei der Suche nach potentiellen Interaktionspartnern von SLAC1 ein besonderes Augenmerk auf Kalzium-abhängige und -unabhängige Kinasen sowie Phosphatasen gelegt, die bereits mit einer Funktion in der Stomaregulation in Verbindung gebracht wurden.

3.1 Transkriptions-Analysen

Um den ABA induzierten Stomaschluss mit dem jüngst entdeckten Bestandteil des S-Typ Anionenkanals SLAC1 (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008) zu untersuchen, wurde damit begonnen die Transkripte mutmaßlicher Komponenten der ABA Signaltransduktionskette in Schließzellen nachzuweisen.

Eine Ca^{2+} unabhängige Anionenkanalaktivierung könnte durch die Kinasefamilie den SnRKs erfolgen (Hrabak et al. 2003; Mustilli et al. 2002; Umezawa et al. 2004; Yoshida et al. 2006). Die ABA aktivierte Proteinkinase SnRK2.6 (**OST1** (**open stomata 1**)) fungiert als positiver Regulator im ABA Signaltransduktionsweg (Mustilli et al. 2002; Yoshida et al. 2002) und wird von der Phosphatase ABI1 durch Dephosphorylierung

inhibiert (Mustilli et al. 2002; Umezawa et al. 2009; Vlad et al. 2009; Yoshida et al. 2006).

Die Phosphatase **ABI1** (**ABA insensitive 1**) stellt somit einen negativen Regulator der ABA-Signaltransduktion dar (Allen et al. 1999; Grabov et al. 1997; Leonhardt et al. 2004; Murata et al. 2001; Pei et al. 1997; Robert et al. 2006; Saez et al. 2004). Zudem konnte sie als direkter Interaktionspartner des kürzlich entdeckten ABA-Rezeptors RCAR1 bestimmt werden (Nishimura et al. 2010).

Mögliche Kandidaten der Ca^{2+} abhängigen Reizweiterleitung stammen aus der Familie der **CPKs** (**Kalzium abhängige Protein Kinasen**). Fünf der 34 Mitglieder umfassenden Familie wurden bereits mit der Stomaregulation in Verbindung gebracht. *cpk3/6* doppel knock-out Pflanzen zeigen verminderte Anionenströme nach Ca^{2+} Behandlung (Mori et al. 2006). Ebenso sind die Verlustmutanten von *cpk4* und *cpk11* ABA insensitiv (Zhu et al. 2007). Weiterhin akkumuliert die Kinase CPK23 nach Trockenstress in Blättern (Ma & Wu 2007).

Um diese Ergebnisse zu verifizieren und putative Mitglieder der ABA-Signaltransduktionskette von Beginn an auszuschließen, wurde anfänglich mit der Methode der quantitativen „real time PCR“ nach Transkriptmengen der oben erwähnten Komponenten gesucht. Die Daten der „real time PCR“ Messungen wurden von Frau Melanie Papenfuß generiert.

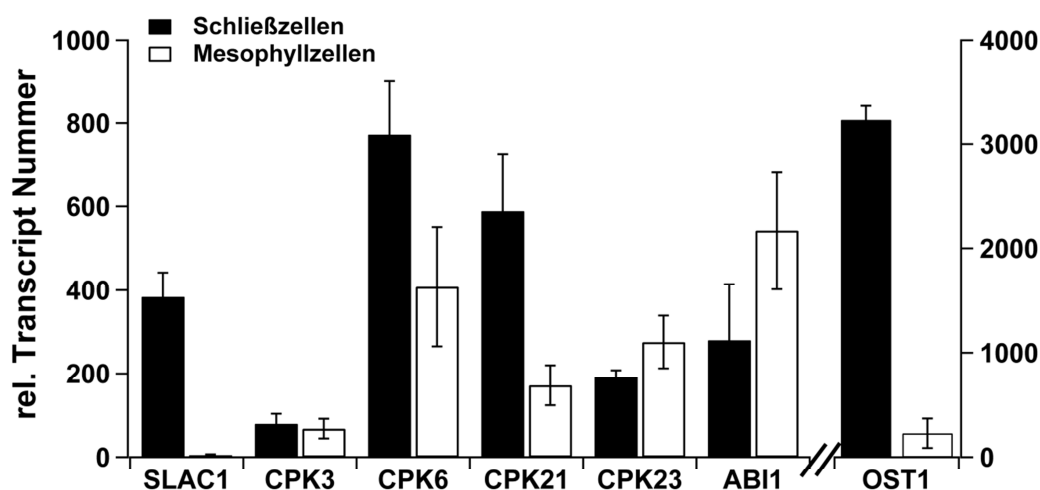


Abbildung 3.1: Transkriptmengen

Bestimmung der Transkriptmengen (relativ zu 10000 Aktintranskripten) von SLAC1, CPK3, 6, 21, 23, ABI1, und OST1 in *Arabidopsis* Schließzellen (schwarze Balken) im Vergleich zu Mesophyllzellen (weiße Balken).

Tatsächlich konnten mutmaßliche Mitglieder der ABA-Signaltransduktion in *Arabidopsis* Schließzellen gefunden werden. Dieses Experiment bestätigte zugleich, dass SLAC1 ausschließlich in Schließzellen und nicht in Mesophyllzellen exprimiert wurde. Ähnlich deutlich ist die Schließzellspezifität bei der Ca^{2+} unabhängigen Kinase OST1 zu erkennen. Sie wurde besonders hoch in Schließzellen exprimiert und ist daher ein möglicher Interaktionspartner von SLAC1. Im Gegensatz zu OST1 waren alle getesteten CPKs ubiquitär exprimiert. Sie kommen somit auch als potentielle Kandidaten für die Ca^{2+} abhängige Stomaregulation in Frage. Beispielhaft ist dies hier für CPK3, 6, 23 und CPK21, die die größte Homologie zu CPK23 aufweist, gezeigt.

Ebenso konnten Transkriptmengen der Phosphatase ABI1 in beiden getesteten Geweben gefunden werden. Von diesem negativen Regulator der ABA-Signaltransduktion ist bereits eine Interaktion mit OST1 beschrieben worden (Nishimura et al. 2010; Umezawa et al. 2009; Vlad et al. 2009).

Somit kommen alle getesteten Kandidaten für die ABA vermittelte Anionenkanal-Aktivierung in Frage. Um nun direkte Interaktionspartner von SLAC1 zu identifizieren, wurden im weiteren Verlauf Interaktionsstudien mit Hilfe der BIFC-Methode durchgeführt.

3.2 Aktivierung von SLAC1

Zwar konnte SLAC1 als essentieller Bestandteil der S-Typ Anionenströme in Schließzellen identifiziert werden, da seine Verlustmutanten stark verminderte S-Typ Anionenkanalaktivität und einen verminderten Stomaschluss aufwiesen. Doch bislang konnte seine Funktion nicht gezeigt werden (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Beide Autoren vermuten hierfür das Fehlen von essentiellen Regulationskomponenten in den getesteten heterologen Expressionssystemen. Diese Stellglieder der Signalkette galt es im Rahmen meiner Doktorarbeit zu identifizieren.

3.2.1 Ca²⁺ unabhängige Aktivierung von SLAC1 durch Kinasen der SnRK Familie

Levchenko et al konnte zeigen, dass die ABA-abhängige Aktivierung von S-Typ Anionenkanälen in Schließzellen mit einer Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺ Konzentration einhergehen kann, es aber nicht muss (2005). Daher ist zu vermuten, dass sich der ABA Signaltransduktionsweg zwischen der ABA Perzeption und Aktivierung von SLAC Strömen in einen Ca²⁺-abhängigen und einen Ca²⁺-unabhängigen Weg verzweigt. Ein aussichtsreicher Kandidat für die Ca²⁺-unabhängige Regulation von SLAC1 stellt OST1 dar. OST1 Verlustmutanten zeigen einerseits einen sehr starken ABA insensitiven Phänotyp und andererseits besitzt OST1 eine Ca²⁺-unabhängige Kinaseaktivität.

3.2.1.0 Die BIFC Methode

Die Interaktion der mutmaßlichen ABA-Signaltransduktions-Komponenten kann mit Hilfe der **bi**-molekulare Fluoreszenzkomplementation (**BiFC**) untersucht werden. Dazu wurden der putative Anionenkanal SLAC1, die verschiedenen Kinasen und Phosphatasen mit den komplementären Hälften eines YFP Fluorophors versehen (Abschnitt 2.1 und 2.6.1). Diese Konstrukte wurden dann in verschiedenen Kombinationen in *Xenopus Oozyten* exprimiert und an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Sollten dabei zwei Proteine miteinander wechselwirken, so lagern sich auch die beiden komplementären Hälften des YFPs zusammen und stellen somit dessen Fluoreszenz wieder her.

Um das System zu testen und so zu eichen, dass keine falsch positiven Interaktionen angezeigt werden, wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt.

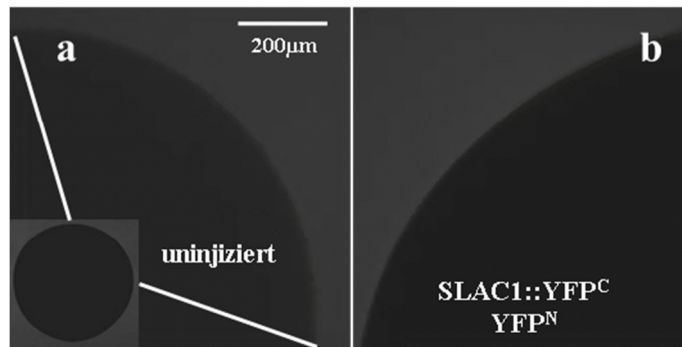


Abbildung 3.2.1.0: BIFC Kontrollen

LSM Aufnahmen eines Viertels einer *Xenopus Oocyte* (Einschub in Bild a). Die bi-molekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) wurde an uninjizierten Kontrolloozyten (Bild a) und an Oozyten untersucht, die SLAC1::YFP^C und YFP^N exprimierten (Bild b).

In Bild a ist ein Viertel einer uninjizierten Kontrolloozyte dargestellt. Die Fokusebene wurde auf den Äquator gerichtet und es ist keinerlei Fluoreszenz erkennbar. In Bild b wurde der mutmaßliche Anionenkanal SLAC1 mit der C-terminalen Hälfte des YFP-Moleküls (Abschnitt 2.1.4; Vektor Nr. 18) fusioniert (SLAC1::YFP^C) und mit der komplementären, N-terminalen Hälfte (YFP^N) des Fluorophors in der Oozyte koexprimiert. Auch hier ist keinerlei unspezifische Fluoreszenz zu beobachten. Somit kann ausgeschlossen werden, dass, unter den gewählten Bedingungen, eine Interaktion angezeigt wird, nur weil die komplementären Hälften des YFPs koexprimiert werden. Für eine positive Fluoreszenzkomplementation müssen also die beiden Zielproteine miteinander interagieren.

3.2.1.1 BIFC Experimente zwischen SLAC1 und den Kinasen der SnRK Familie

Um die ABA-Signaltransduktions-Komponenten der Ca²⁺ unabhängigen Anionenkanalaktivierung zu identifizieren, wurde der mutmaßliche Anionenkanal SLAC1 zusammen mit den potentiellen Ca²⁺ unabhängigen Interaktionspartnern, der SnRK Familie, zu denen auch OST1 zählt (SnRK 2.6), koexprimiert. Dabei wurde SLAC1 mit der C-terminalen Hälfte des YFP-Moleküls (SLAC1::YFP^C) und vier Mitglieder der SnRK Familie mit der N-terminalen Hälfte (SnRK2::YFP^N) fusioniert.

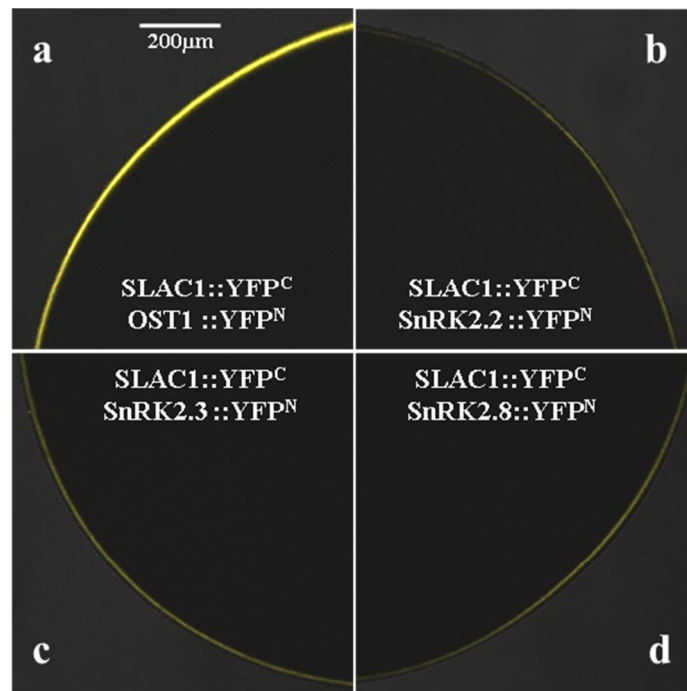


Abbildung 3.2.1.1.a: Spezifität der SnRKs zu SLAC1

Bi-molekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in *Xenopus Oozyten* mit SLAC1::YFP^C und OST1::YFP^N (a), SnRK2.2::YFP^N (b), SnRK2.3::YFP^N (c) und SnRK2.8::YFP^N (d). Die detektierte Fluoreszenz wurde durch den gelben Kanal wiedergegeben.

Hierbei ist eine deutliche Fluoreszenzkomplementation (gelber Kanal) bei SLAC1::YFP^C und OST1::YFP^N konjizierten Oozyten (Bild a) zu beobachten. Dies spricht für eine eindeutige Interaktion von OST1 mit SLAC1. Im Gegensatz zu OST1 ist bei den anderen Mitgliedern der SnRK Familie (SnRK 2.2; 2.3 und 2.8) eine wesentlich schwächere physikalische Interaktion mit SLAC1 durch ein sehr schwache YFP-Fluoreszenz angezeigt (Bilder b; c; d).

Um diese Interaktion auch *in planta* zu verifizieren, wurde SLAC1 zusammen mit OST1 in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten exprimiert (Tabelle 2.1.4). Tatsächlich konnte auch hier diese deutlichen Interaktionen bestätigt werden.

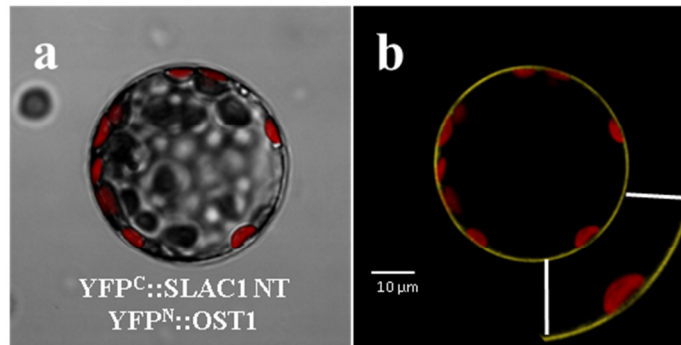


Abbildung 3.2.1.1.b: Protoplastentransformation

Interaktion von YFP^N::OST1 (Vektor Nr. p02; Abschnitt 2.1.4) mit YFP^C::SLAC1 (Vektor Nr. p02 in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten. Im roten Kanal wurde die Autofluoreszenz des Chlorophylls dargestellt. (a) Durchlichtbild inklusive Autofluoreszenz der Chloroplasten, (b) In gelb wird die YFP-Fluoreszenz und in rot wiederum die Autofluoreszenz der Chloroplasten gezeigt.

Nach der Transformation der Protoplasten mit YFP^N::OST1 mit YFP^C::SLAC1 konnte ebenso wie in Oozyten eine deutliche Fluoreszenzkomplementation beobachtet werden. Dabei ist auffällig, dass SLAC1 und OST1 an der Plasmamembran miteinander interagieren (Einschub in b).

Um festzustellen welcher Bereich von SLAC1 mit OST1 interagiert, wurde die Kinase (OST1::YFP^N) zusammen mit dem C-terminalen Bereich (AS 496 bis 556) von SLAC1 (SLAC1 CT::YFP^C) oder dem N-terminalen Bereich von SLAC1 (AS 1 bis 186) (SLAC1 NT::YFP^C) koexprimiert. Hierfür wurde wieder das heterologe Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten benutzt.

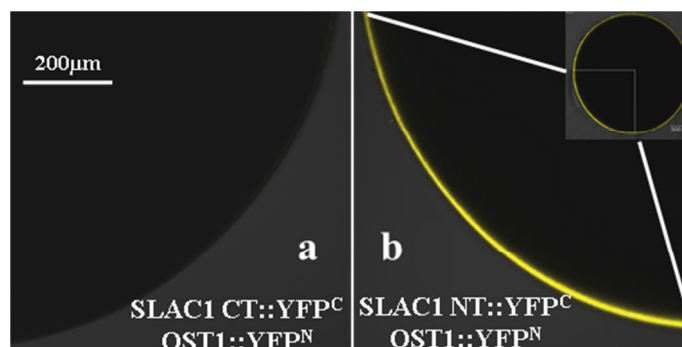


Abbildung 3.2.1.1.c: Interaktionslokus von SLAC1 mit OST1

Interaktionsstudien zwischen OST1::YFP^N mit dem C-terminalen Bereich (AS 496 bis 556) von SLAC1 (SLAC1 CT::YFP^C) (Bild a) oder dem N-terminalen Bereich (AS 1 bis 186) von SLAC1 (Bild b). Beide Bilder zeigen ein Viertel einer Oozyte (Einschub in Bild b). Die detektierte Fluoreszenz wurde durch den gelben Kanal wiedergegeben und konnte ausschließlich zwischen dem SLAC1 NT und OST1 festgestellt werden.

Während keine Interaktion zwischen dem SLAC1 CT und der Kinase OST1 festzustellen war (Bild a), fiel hingegen bei SLAC1 NT, OST1 koexprimierten Oozyten eine deutliche Fluoreszenz auf (Bild b). Dies deutet darauf hin, dass die Erkennungssequenz für die Kinase am SLAC1 N-Terminus lokalisiert ist.

In diesen Experimenten konnte somit gezeigt werden, dass die Ca^{2+} unabhängige Kinase OST1 spezifisch mit dem N-terminalen Bereich von SLAC1 interagiert.

3.2.1.2 TEVC Experimente mit Kinasen der SnRK Familie

Bislang konnte die Funktion von SLAC1 weder direkt, als auch indirekt, gezeigt werden, da sowohl seine heterologe Expression in *Xenopus* Oozyten zu keinerlei Anionenströmen führte, als auch Aufnahmeexperimente in *E. coli* Zellen und Hefe scheiterten (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Beide Autoren vermuten hierfür das Fehlen von essentiellen regulatorischen Komponenten, die im heterologen Expressionssystem nicht exprimiert wurden.

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass der mutmaßliche Anionenkanal mit der Ca^{2+} unabhängigen Kinase OST1 im gleichen Gewebe exprimiert ist und mit dieser *in vivo* interagiert, konnte die Auswirkung dieser Interaktion mit der TEVC-Methode weitergehend untersucht werden.

Bei der TEVC-Methode wurden die exprimierenden Oozyten einem Spannungsprotokoll ausgesetzt (Abschnitt 2.7.4). Dieses Pulsprotokoll bestand aus 24 Durchläufen. Die Haltespannung zwischen den einzelnen Spannungspulsen betrug 0 mV. An der Oozytemembran wurden sukzessive Testspannungen im Spannungsbereich von +50 mV bis -180 mV in 20 mV Dekrementen für 15s angelegt. Zur Bestimmung der relativen Offenwahrscheinlichkeit (rel. P_O) wurde im Anschluss an jede Testspannung eine konstante Spannung von -120 mV angelegt, bevor die Spannung im letzten Segment wieder das Haltepotential von 0 mV erreichte. Um die Anionenströme durch SLAC1 zu untersuchen, waren in der extrazellulären Standard-Badlösung 30 mM Cl^- enthalten (Abschnitt 2.9.2.1).

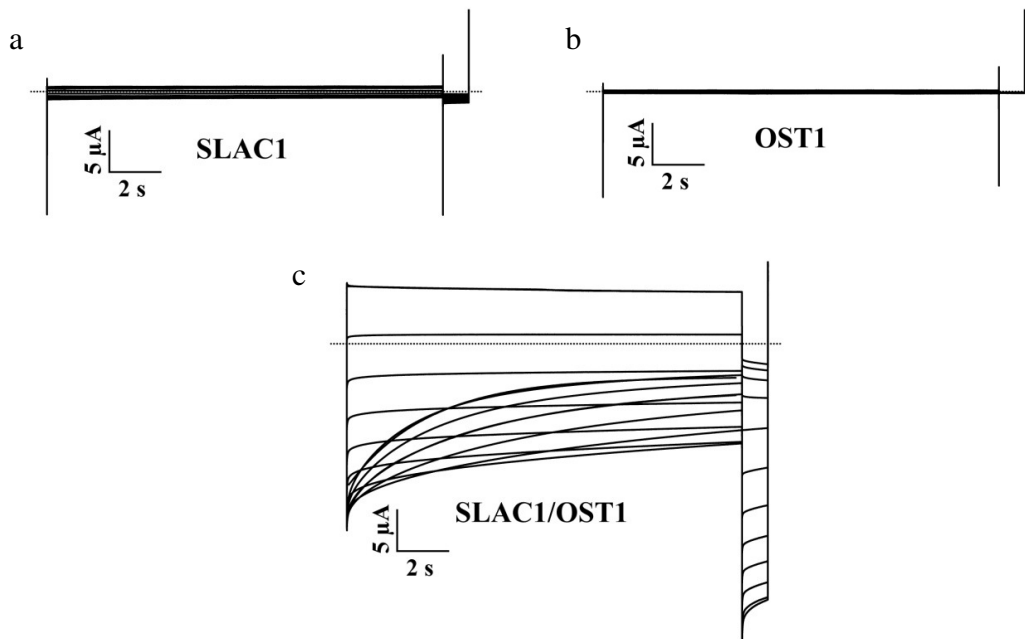


Abbildung 3.2.1.2.a: Anionenkanalaktivierung durch OST1

Ganzzellströme von *Xenopus* Oozyten in der Standard-Badlösung (30 mM Cl⁻, pH 5.6). Es wurde das Spannungsprotokoll, wie im Abschnitt 2.7.4 beschrieben, verwandt, wobei das 15 sekundige Testspannungssegment von +50 bis -180 mV in 20 mV Schritten durchlaufen wurde. Danach wurde im dritten Segment für eine Sekunde eine konstante Spannung von -120 mV angelegt. Die Haltespannung betrug 0 mV. Bei den Oozyten, die nur mit SLAC1 cRNA (a), oder OST1 cRNA (b) injiziert wurden, waren keinerlei makroskopische Anionenströme zu verzeichnen. Wurden allerdings SLAC1 und OST1 koinjiziert (c), so kam es zu deutlichen Anionenströmen, die bei negativen Spannungen langsam deaktivierten.

Wie bereits beschrieben wurde (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008), konnten in SLAC1 injizierten Oozyten keine makroskopischen Anionenströme über das gesamte Spannungsspektrum aufgezeichnet werden (Abbildung 3.2.1.2.a a). Genauso verhielt es sich, wenn statt SLAC1 die Ca²⁺-unabhängige Kinase OST1, die die stärkste Interaktion mit SLAC1 zeigte, in den Oozyten exprimiert wurde (Abbildung 3.2.1.2.a b). Wenn allerdings beide Komponenten koexprimiert wurden, so waren makroskopische Anionenströme zu verzeichnen (Abbildung 3.2.1.2.a c). Dabei waren die instantanen Ströme (I_t) kurz nach dem Anlegen der Testspannung mit bis zu -50 μ A bei -180 mV besonders groß. Im Folgenden deaktivierten diese instantanen Ströme langsam bei hyperpolarisierten Spannungen bis zu den Gleichgewichtsströmen (I_{ss}) (Abschnitt 2.7.4). Diese langsame Deaktivierungskinetik ist ein charakteristisches Merkmal von S-Typ Anionenkanälen, wie es von Patch-Clamp-Experimenten an Schließzellprotoplasten bekannt ist. Allerdings zeigten nur etwa 25 % aller koinjizierten Oozyten diese typischen Ströme. Wurde der Anionenkanal und die Kinase aber mit komplementären YFP-Hälften fusioniert, wie sie für die BIFC-Experimente (Abschnitt 3.2.1.1; (SLAC1::YFP^C; Vektor

Nr. 18) (OST1::YFP^N; Nr. 20)) verwandt wurden, so zeigten nahezu 100% der injizierten Oozyten starke Anionenkanalaktivität. Daher wurden diese BiFC-Konstrukte eingesetzt, um SLAC1 reproduzierbar durch SnRK-Kinasen zu aktivieren und funktionell zu charakterisieren.

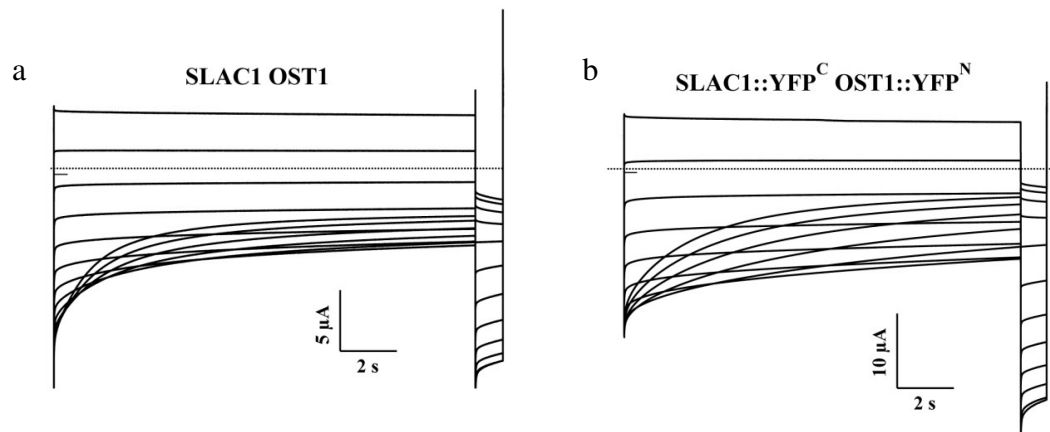


Abbildung 3.2.1.2.b: Stabilisierung der Expressionseffizienz durch die Verwendung von BiFC Konstrukten

Ganzzellströme von repräsentativen Oozyten, die SLAC1 und OST1 in ihrer nativen Form (a), oder als BiFC-Konstrukte (SLAC1::YFP^C OST1::YFP^N; Abschnitt 3.2.1.1; b) exprimierten. Die elektrischen Charakteristika, wie z.B. die langsame Deaktivierungskinetik, wurden dabei nicht von den YFP-Hälften beeinflusst.

Der Einsatz der BiFC-Konstrukte hatte keinerlei Einfluss auf die elektrische Charakteristik der Anionenströme.

Nachdem nun die SLAC1-Aktivierung durch OST1 gelungen war, wurde die Kinasespezifität dieser Aktivierung getestet. Dazu wurde SLAC1 zusammen mit OST1 und den anderen Mitgliedern der SnRK Familie koexprimiert. Bereits die BiFC Interaktionsstudien (Abschnitt 3.2.1.1) legten nahe, dass die physikalische Interaktion von SLAC1 mit den anderen SnRK Proteinkinasen deutlich geringer ist als zu OST1.

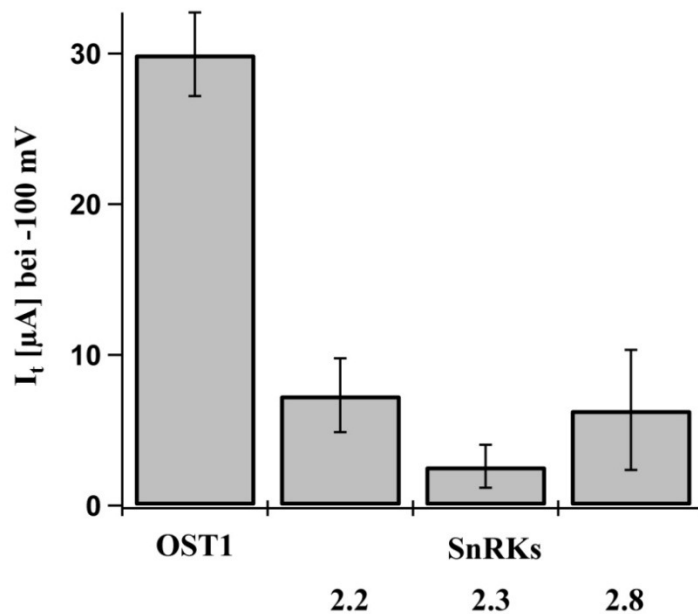


Abbildung 3.2.1.2.c: Spezifität der SLAC1 Aktivierung durch verschiedene SnRKs

Instantane Ströme von Oozyten, die SLAC1 in Kombination mit verschiedenen SnRKs exprimierten (Testspannung -100 mV in der Standard-Badlösung ($n \geq 5$)). Von links nach rechts: SnRK 2.6 (OST1), 2.2, 2.3 2.8.

Die Aktivierung von SLAC1 durch OST1 resultierte in instantanen Strömen von etwa 30 μ A bei -100 mV (Abschnitt. 2.7.4) in der Standard Badlösung (Abschnitt 2.9.2). Die Koexpression der OST1-homologen Kinasen SnRK2.2, 2.3 und 2.8 führte zu deutlich geringeren Anionenströmen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den BIFC-Experimenten (3.2.1.1), bei denen die Kinase OST1 die stärkste Interaktion zu SLAC1 zeigte.

3.2.1.3 Patch-Clamp Experimente mit *ost1-2* knock out Pflanzen

Zur *in vivo* Bestätigung der TEVC-Ergebnisse, wurden Patch-Clamp-Experimente mit *Arabidopsis thaliana* Schließzell-Protoplasten von Wildtyp Pflanzen, OST1-Verlustmutanten (*ost1-2*) (Abschnitt 1.3.5 und 1.5) und SLAC1 Verlustmutanten (*slac1-3*) durchgeführt. Diese Daten wurden von Patrick Mumm generiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

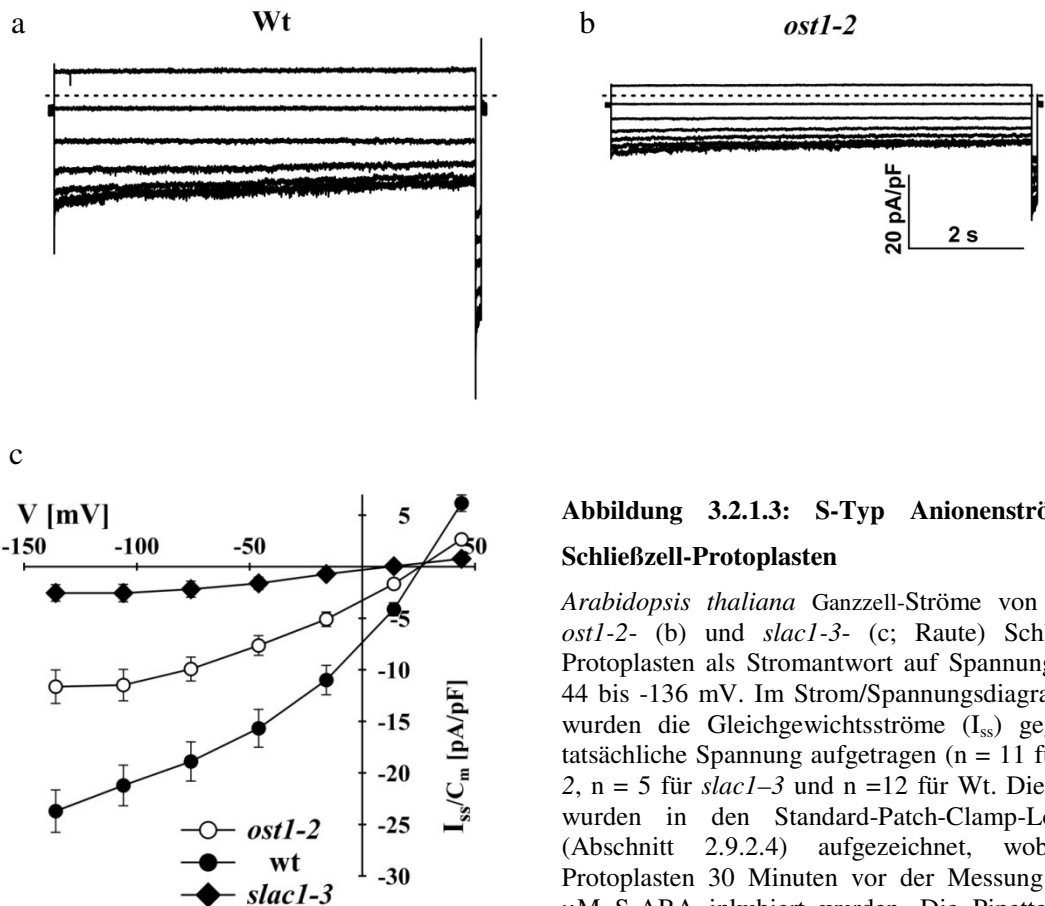


Abbildung 3.2.1.3: S-Typ Anionenströme in Schließzell-Protooplasten

Arabidopsis thaliana Ganzzell-Ströme von Wt-(a), *ost1-2*- (b) und *slac1-3*- (c; Raute) Schließzell-Protooplasten als Stromantwort auf Spannungen von 44 bis -136 mV. Im Strom/Spannungsdiagramm (c) wurden die Gleichgewichtsströme (I_{ss}) gegen die tatsächliche Spannung aufgetragen ($n = 11$ für *ost1-2*, $n = 5$ für *slac1-3* und $n = 12$ für Wt). Die Ströme wurden in den Standard-Patch-Clamp-Lösungen (Abschnitt 2.9.2.4) aufgezeichnet, wobei die Protooplasten 30 Minuten vor der Messung mit 25 μM S-ABA inkubiert wurden. Die Pipettenlösung (2.9.2.4) enthielt 110 nM freies zytosolisches Ca^{2+} .

Unter den gewählten Bedingungen konnten typische S-Typ Anionenströme nach ABA-Aktivierung beobachtet werden (Abbildung 3.2.1.3 a). Die S-Typ Anionenströme in der OST1-Verlustmutante waren im Vergleich zum WT deutlich verringert (b). Im Strom/Spannungsdiagramm (c) wird deutlich, dass die Gleichgewichtsströme (I_{ss}) von *ost1-2* im Vergleich zu den Wildtyp Strömen über den gesamten Spannungsbereich nahezu halbiert waren. Allerdings war unter den gewählten Bedingungen noch SLAC1-Aktivität zu verzeichnen, da die Anionenströme von Protooplasten der *slac1-3* knock out Mutante, im Vergleich zu den Strömen bei den *ost1-2* Protooplasten, nochmals signifikant verringert waren. Die verbliebenen Anionenströme deuten auf eine alternative SLAC1-Aktivierung hin.

Bislang konnte somit gezeigt werden, dass der mutmaßliche Anionenkanal SLAC1 zusammen mit der kalziumunabhängigen Kinase OST1 in Schließzellen exprimiert wird. Weiterhin interagierten diese Proteine spezifisch in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten und *Xenopus* Oozyten miteinander. Diese Interaktion führte in Oozyten zu einer deutlichen Aktivierung von Anionenströmen. Weiterhin konnte mittels Patch-Clamp-Experimenten mit Schließzell-Protoplasten gezeigt werden, dass das Fehlen der Kinase OST1 zu reduzierten Anionenströmen nach ABA Behandlung führte.

Um herauszufinden, ob SLAC1 tatsächlich dem aus Schließzellprotoplasten bekannten S-Typ Anionenkanal gleicht, werden in den folgenden Absätzen die elektrischen Eigenschaften von SLAC1 in *Xenopus* Oozyten bestimmt. Die Schließzell-S-Typ Anionenströme wurden mittels Patch-Clamp Untersuchungen eingehend studiert (Frachisse et al. 2000; Linder & Raschke 1992; Marten et al. 2007; Marten et al. 1993; Schmidt & Schroeder 1994; Schroeder & Keller 1992; Schroeder et al. 1993). Somit sind die Spannungsabhängigkeit, die Sensitivität gegenüber Blockern und die Leitfähigkeit bekannte Merkmale des S-Typ Anionenkanals. Mittels der TEVC-Methode sollen im Folgenden an *Xenopus* Oozyten, ohne den pflanzlichen Hintergrund, SLAC1-Ströme auf diese Merkmale hin untersucht werden, um zu verifizieren, dass es sich bei SLAC1 um den S-Typ Anionenkanal aus Schließzellen handelt.

3.2.1.4 Elektrophysiologische Charakterisierung der Anionenströme

Ein erstes charakteristisches Merkmal der S-Typ Anionenströme in Schließzellen ist ihre langsame Deaktivierungskinetik bei negativen Spannungen (Linder & Raschke 1992; Schroeder & Keller 1992). In diesen Arbeiten wurden mittels der Patch-Clamp-Methode die langsamen Anionenströme in Schließzellprotoplasten durch Depolarisation (+40 mV) aktiviert. Bei einer anschließenden Hyperpolarisation zu -140 mV deaktivierten die langsamen Anionenströme bis zu einem Gleichgewichtsstrom I_{ss} („steady-state“-Strom / Abschnitt 2.7.4). Daher wurde bei der Charakterisierung der SLAC1 vermittelten Ströme in *Xenopus* Oozyten damit begonnen diese Kinetik genauer zu untersuchen.

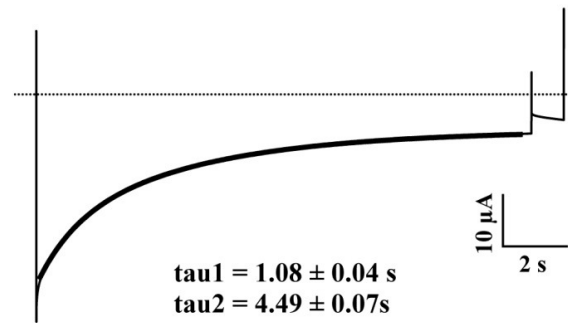


Abbildung 3.2.1.4.a: Deaktivierungskinetik von SLAC1

Deaktivierung des Anionenstroms nach einem Spannungssprung von 0 zu -180 mV für 15 Sekunden in der Standard-Badlösung. Die Deaktivierungskinetik kann mit einer doppelten Exponentialfunktion beschrieben werden.

Tatsächlich zeigten die gemessenen Ströme der SLAC1 und OST1 koexprimierenden Oozyten die typischen Charakteristika der S-Typ Anionenströme auf. Bei negativen Spannungen konnte eine langsame Deaktivierungskinetik beobachtet werden.

Nach einem Spannungssprung von 0 zu -180 mV deaktiviert der instantane SLAC1-Strom langsam von etwa 30 μA innerhalb von 15 Sekunden zu einem Gleichgewichtsstrom von 7 μA . Diese Deaktivierungskinetik konnte mit einer zweifachen Exponential-Funktion beschrieben werden. Die zugehörigen Zeitkonstanten waren: $\tau_1 = 1,08 \pm 0,04 \text{ s}$ und $\tau_2 = 4,49 \pm 0,07 \text{ Sekunden}$. Die in der Literatur beschriebene Zeitkonstanten für den S-Typ Anionenkanal liegen *in planta* in einem ähnlichen Zeitfenster ($\tau = 1,3 \text{ s}$) (Marten et al. 2007). Diese Übereinstimmung ist ein Indiz dafür, dass es sich bei SLAC1 tatsächlich um den S-Typ Anionenkanal handelt.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal, bekannt aus früheren Patch-Clamp Untersuchungen an Protoplasten, ist die inhibierende Wirkung des Anionen-Kanal-Blockers DIDS (4, 4'-diisothiocyanatostilbene-2, 2'-disulfonic acid) auf die S-Typ Anionenströme (Frachisse et al. 2000; Marten et al. 1993; Schroeder et al. 1993). Um weitere Hinweise zu sammeln, dass es sich bei SLAC1 um den S-Typ Anionenkanal handelt, wurden diese Experimente auch am heterolog exprimiertem SLAC1 durchgeführt.

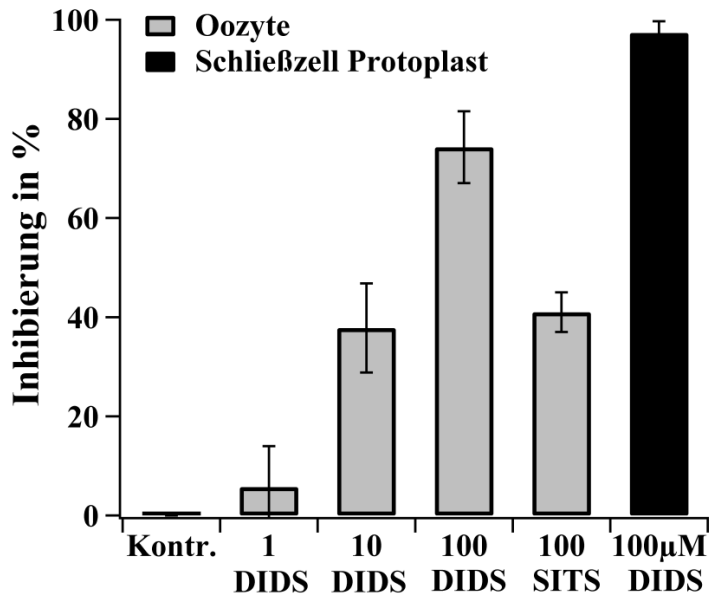


Abbildung 3.2.1.4.b: Block von SLAC1-Strömen

Dargestellt ist die relative Inhibierung der I_r -Ströme in Standard-Badlösung durch die Zugabe von DIDS in den Konzentrationen 1, 10 und 100 μM und 100 μM SITS in Oozyten bei einer Spannung von -100 mV (graue Balken, $n = 4$). Der schwarze Balken zeigt den Block der Anionenströme durch 100 μM DIDS an *Arabidopsis* Schließzell-Protoplasten bei -96 mV ($n = 3$).

Tatsächlich kann auch der, in Oozyten, heterolog exprimierte SLAC1 durch die Anionenkanalblocker DIDS und SITS inhibiert werden. Diese Inhibierung steigt mit zunehmender InhibitorKonzentration und erreicht bei 100 μM DIDS 74 %. Bei Protoplasten (schwarzer Balken) ist der Block bei dieser Konzentration sogar vollständig. Der reversible Blocker SITS hingegen ist etwa um den Faktor 10 weniger effektiv. Vergleicht man die inhibitorische Wirkung von 100 μM DIDS auf SLAC1 in Oozyten mit der Inhibierung der S-Typ Anionenströme in Schließzell-Protoplasten, so ist eine deutliche Parallele ersichtlich. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass es sich bei SLAC1 um den langsamen Anionenkanal handelt.

Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass SLAC1 ein Strukturmotiv besitzt, das ihn in die Familie der C4-Dicarboxylat Transporter eingruppiert. Zu dieser Familie gehören z.B. auch MAE1 aus Hefe (Grobler et al. 1995; Negi et al. 2008). Dieser Transporter transportiert Malat vermutlich im Kotransport mit Protonen (Camarasa et al. 2001). Dabei treibt der elektrochemische Protonengradient über der Hefemembran den Import von Malat an. Um zu klären, ob die Anionenströme, die von SLAC1-vermittelt werden, auch im Kotransport mit Protonen geschehen und eventuell über den H^+ Gradienten angetrieben werden, wurden Stromableitungen von SLAC1/OST1 exprimierenden Oozyten bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Wenn SLAC1 einen Kotransport von Protonen und Anionen vermittelt, dann sollten sich die Ströme und das Umkehrpotential mit der externen H^+ Konzentration verändern.

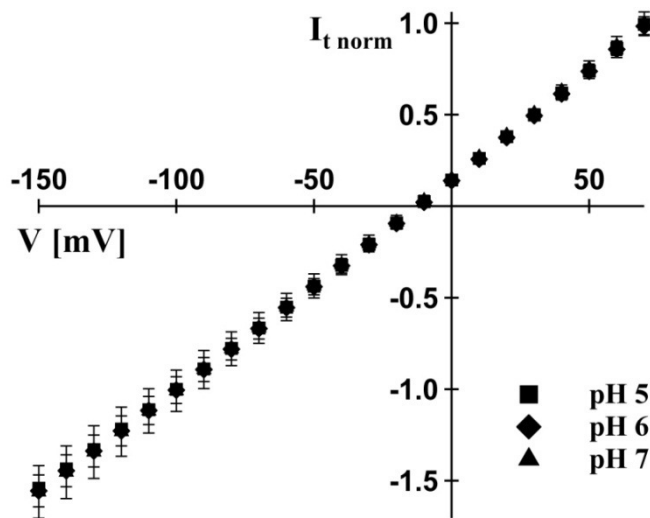


Abbildung 3.2.1.4.c: pH-Abhängigkeit von SLAC1

Dargestellt sind die instantanen Ströme (I_t) durch SLAC1 bei 100mM KCl in der Badlösung. Die variierenden pH-Werte betragen dabei 5, 6 und 7. Die Ströme wurden normalisiert auf den Wert von pH 5 bei -100 mV ($n = 3$).

In Grafik 3.2.1.4.c zeigt sich deutlich, dass SLAC1 keine pH-Abhängigkeit aufweist. Der Strom bei den verwendeten 100 mM KCl Lösungen mit den pH-Werten von 5, 6 und 7 wurde nicht von der Protonenkonzentration beeinflusst und das Umkehrpotential blieb ebenfalls stabil. Somit ist SLAC1 eindeutig als Kanal und nicht als ein Protonen gekoppelter Transporter charakterisiert. Er unterscheidet sich damit funktionell deutlich von den verwandten Transportern der C4-Dicarboxilat-Transporter Familie.

Bislang konnte gezeigt werden, dass SLAC1-Aktivierung durch OST1 in *Xenopus* Oozyten zu Protonen unabhängigen Strömen führte. Es ist aber noch nicht klar, ob die SLAC1-vermittelten Ströme von der Natur des Kations im Perfusionspuffer beeinflusst sind. Deshalb wurden die SLAC1 vermittelten Ströme auf ihre Kationenabhängigkeit hin untersucht.

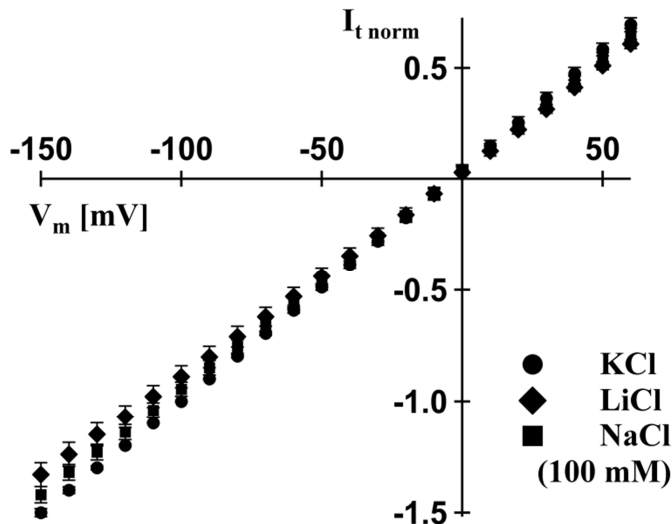


Abbildung 3.2.1.4.d: Kationenabhängigkeit von SLAC1

Dargestellt sind die instantanen Ströme (I_t) durch SLAC1 in Anwesenheit verschiedener Kationen (Abschnitt 2.9.2.3). Die Ströme wurden normalisiert auf den Wert von 100 mM KCl bei -100 mV ($n \geq 3$).

Der Wechsel zwischen Na^+ , K^+ oder Li^+ hatte keinerlei Einfluss auf die detektierten Ströme oder Umkehrpotentiale (Abbildung 3.2.1.4.d). Daher ist es wahrscheinlich, dass SLAC1 ein Kationen unabhängiger Anionenkanal ist.

Bei den bisherigen elektrophysiologischen Untersuchungen wurde immer das Anion Cl^- verwendet. Um die Anionenselektivität von SLAC1 weiterreichend zu charakterisieren, wurden variierende Anionen in der externen Badlösung angeboten und die Umkehrpotentiale (U_{rev}) im Stromklemmenmodus des Messverstärkers bestimmt (Abschnitt 2.7.5). Als Umkehrspannung gilt hierbei die Spannung, bei der der Strom über die Oozytenmembran null beträgt. Mit Hilfe der Umkehrpotentiale und der physikalischen Zusammenhänge, die in Abschnitt 2.7.5 beschrieben sind, konnte die relative Permeabilität von SLAC1 für verschieden Anionen berechnet werden. Diese Anionen wurden mit einer Konzentration von 50 mM in der Badlösung eingesetzt (Abschnitt 2.9.2).

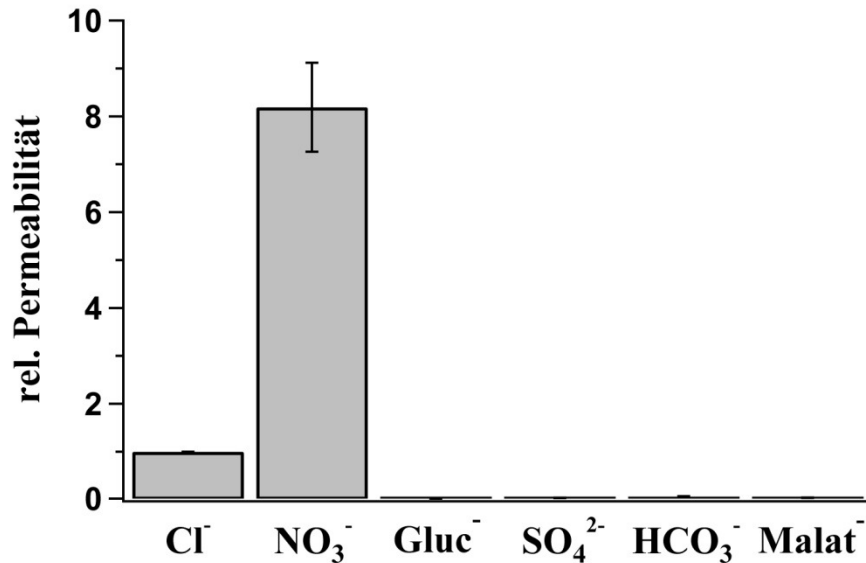


Abbildung 3.2.1.4.e: relative Permeabilität von SLAC1

Dargestellt sind die relativen Permeabilitäten von NO₃⁻, Gluconat, SO₄²⁻, HCO₃⁻ und Malat in Relation zu Cl⁻. Dabei betrug die externe Anionenkonzentration jeweils 50 mM (Abschnitt 2.9.2) (n = 5).

Wie sich herausstellte ist SLAC1 ein Anionenkanal mit Präferenz zu Nitrat und Chlorid. Die Reihenfolge der relativen Permeabilitäten ist dabei: NO₃⁻ (8.19 ± 0.44), Cl⁻ (1 ± 0.00), HCO₃⁻ (0.05 ± 0.01), Malat (0.04 ± 0.00), SO₄²⁻ (0.04 ± 0.00). Diese Werte sind vergleichbar zu den rel. Permeabilitäten, die durch Patch-Clamp Experimente an Schließzell-Protoplasten gewonnenen wurden: (NO₃⁻ (20.9 ± 11.2), Cl⁻ (1 ± 0.00) und Malat (0.24 ± 0.19)) (Schmidt & Schroeder 1994). Dieses Ergebnis unterstreicht die Vermutung, dass SLAC1 der dominierende S-Typ Anionenkanal in Schließzellen ist.

Wird die Leitfähigkeit einer Membran maßgeblich durch einen Anionen-spezifischen Kanal bestimmt, wie es bei SLAC1 exprimierenden Oozyten der Fall sein sollte, so sollte sich bei einer Veränderung der extrazellulären Anionenkonzentration das Umkehrpotential zum Nernstpotential des entsprechenden Anions verschieben. Die Nernstgleichung sagt für eine zehnfache Änderung der Anionenkonzentration im Außenmedium eine Verschiebung des Umkehrpotentials von 60 mV bei Raumtemperatur voraus. Um zu überprüfen, ob SLAC1 tatsächlich ein Anionen spezifischer Anionenkanal ist, wurde die extrazelluläre Konzentration der Anionen Chlorid, Nitrat und Thiocyanat verändert (Abschnitt 2.7.5).

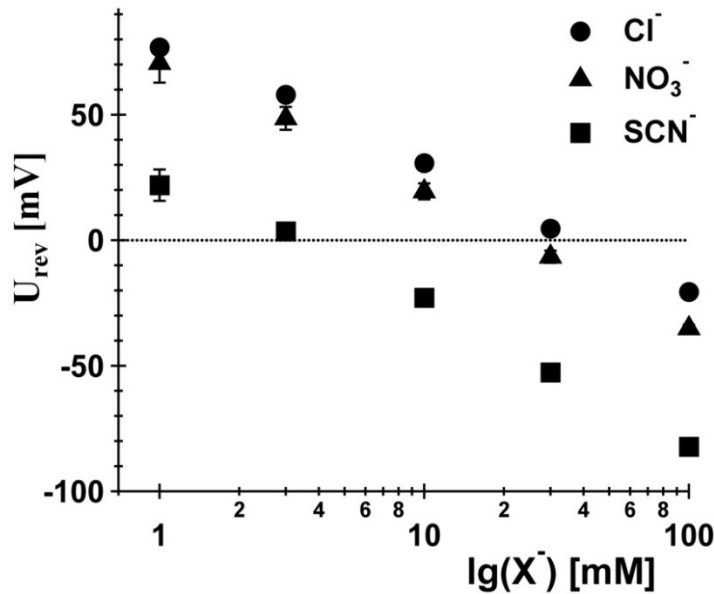


Abbildung 3.2.1.4.f: Umkehrspannungen bei variierenden Anionenkonzentrationen im Außenmedium

Aufgetragen sind die Umkehrspannungen (U_{rev}) in Anwesenheit der Anionen Cl^- , NO_3^- oder SCN^- . Deren Konzentrationen betragen jeweils 1, 3, 10, 30 oder 100 mM (Abschnitt 2.9.2) ($n \geq 4$).

In der Abbildung 3.2.1.4.f sind die Umkehrspannungen von Cl^- , NO_3^- und SCN^- gegen die logarithmisch skalierte Konzentration dieser Anionen aufgetragen. Dazu wurden Konzentrationen von jeweils 1, 3, 10, 30 und 100 mM verwendet. Bei einer 10fachen Konzentrationsänderung in der externen Cl^- Konzentration veränderte sich das Umkehrpotential um $49,7 \pm 1,6$ mV. Im Vergleich dazu verschob sich U_{rev} bei den Anionen NO_3^- und SCN^- um $51,4 \pm 3,0$ respektive um $52,9 \pm 1,9$ mV bei einer 10fachen Konzentrationsänderung. Diese Verschiebung des Umkehrpotentials mit der Konzentration des jeweiligen Anions bestätigt die Anionenselektivität von SLAC1, die schon durch die Experimente zur pH- (Abschnitt 3.2.1.4.c) und Kationen-Abhängigkeit (Abschnitt 3.2.1.4.d) vermutet wurden.

Bei genauerer Betrachtung der von SLAC1 bewirkten S-Typ Anionenströme (Abbildung 3.2.1.4.a) ist die langsame Deaktivierung des Kanals bei hyperpolarisierten Spannungen auffällig. Im Folgenden galt es die Ursache dieser Deaktivierung aufzuklären. Hierzu wurden die Gleichgewichtsströme I_{ss} (Abschnitt 2.7.4) bei verschiedenen Cl^- Konzentration im Außenmedium gegen die Membranspannung der Oozyten aufgetragen.

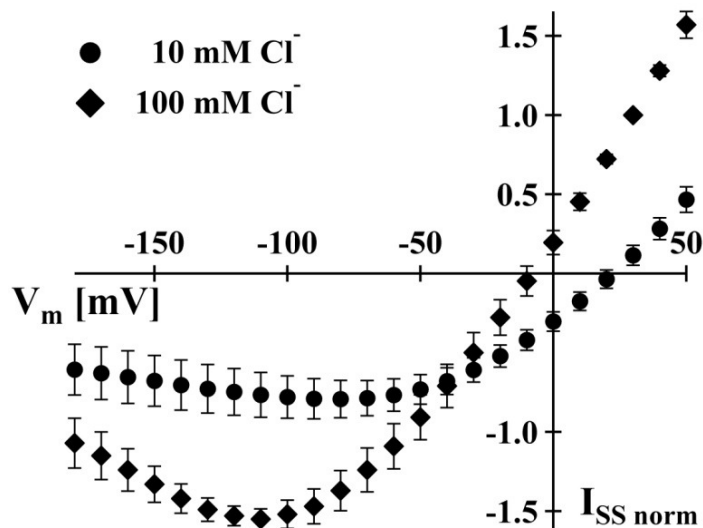


Abbildung 3.2.1.4.g: Cl⁻ Abhängigkeit der Gleichgewichtsströme von SLAC1

SLAC1-vermittelte Gleichgewichtsströme (I_{ss}) wurden gegen die Spannung in Anwesenheit von 10 mM Cl⁻ und 100 mM Cl⁻ in der Badlösung aufgetragen. Die Ströme wurden auf den Wert bei 100 mM Cl⁻ und +30 mV normalisiert ($n = 4$).

In Übereinstimmung mit der Cl⁻ Leitfähigkeit von SLAC1 kam es bei Membranspannungen positiv vom Nernstpotential für Cl⁻ (Abbildung 3.2.1.4.g) zu einem deutlichen Cl⁻-Einstrom in die Oozyte (Abschnitt 2.7.1). Bei negativeren Spannungen hingegen ist ein Ausstrom von Chlorid ersichtlich. Dieser Ausstrom erreichte ein Maximum bei -90 mV bei einer Cl⁻ Konzentration von 10 mM im Außenmedium während bei 100 mM Cl⁻ die höchste Amplitude bei -110 mV zu verzeichnen war. Bei stärker hyperpolarisierenden Spannungen deaktivierten diese Ausströme, obwohl der elektrochemische Gradient für einen Ausstrom von Chlorid weiter zunahm. Dieses Verhalten deutet auf eine Spannungs-abhängige Regulation der SLAC1 Aktivität hin.

Nach der Formel (1) (Abschnitt 2.7.4) wird der Strom durch einen Kanal von drei Variablen bestimmt. Entscheidend sind die Anzahl der aktivierbaren Kanäle in der Membran, der Einzelkanalstrom und die Offenwahrscheinlichkeit P_o . Da im Laufe einer Messung sich die Anzahl der Kanäle nicht maßgeblich ändert, kommen für das spannungsabhängige Verhalten der I_{ss} von SLAC1 der Einzelkanalstrom und die Offenwahrscheinlichkeit P_o in Betracht. Um die Frage zu beantworten, welcher dieser beiden Faktoren für die charakteristische Spannungsabhängigkeit verantwortlich zeichnet, wurde mit der Untersuchung der Offenwahrscheinlichkeit begonnen. Anhand der Auswertung der Folgepulsströme kann die relative Offenwahrscheinlichkeit des Anionenkanals abhängig von der Membranspannung bestimmt werden (Abschnitt 2.7.4).

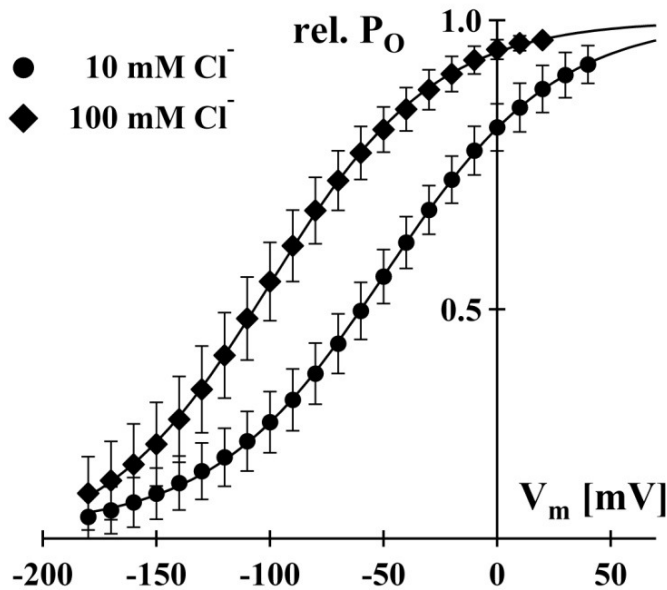


Abbildung 3.2.1.4.h: Offenwahrscheinlichkeit von SLAC1

Die relative Offenwahrscheinlichkeit (P_o) von SLAC1 wurde für 10 mM Cl^- und 100 mM Cl^- in der externen Badlösung bestimmt und gegen die Spannung aufgetragen. Die einzelnen Datenpunkte wurden mit einer Boltzmann-Funktion beschrieben/gefittet.

Bei Betrachtung der Offenwahrscheinlichkeiten (Abbildung 3.2.1.4.h) fällt eine Chlorid-abhängige Spannungsabhängigkeit dieser auf. Bei depolarisierenden Membranspannungen wurde die größte relative Offenwahrscheinlichkeit bestimmt. Mit hyperpolarisierender Spannung sank die Offenwahrscheinlichkeit von SLAC1.

Bei einer Änderung der externen Cl^- -Konzentration von 10 zu 100 mM veränderte sich die halbmaximale relative Offenwahrscheinlichkeit ($U_{1/2}$) um 51 mV von $-49,6 \pm 5,8$ mV zu $-100,4 \pm 7,9$ mV. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Offenwahrscheinlichkeit von SLAC1 neben der Membranspannung zudem von der externen Cl^- Konzentration abhängig ist.

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Experimente, dass SLAC1 mit der Ca^{2+} unabhängigen Kinase OST1 interagiert. Diese Interaktion führt zu einer Aktivierung des SLAC1, der alle typischen S-Typ Anionenstrom-Charakteristika aufweist. In Verbindung mit den Patch-Clamp Untersuchungen an Schließzell-Protoplasten ist festzustellen, dass SLAC1 der dominierende S-Typ Anionenkanal in Schließzellen ist.

Um herauszufinden, ob für diese Aktivierung die bloße Interaktion ausreichend ist, oder ob SLAC1 durch die Kinase OST1 phosphoryliert werden muss, wurde eine inaktive Kinase hergestellt (Hanks & Hunter 1995). OST1 D140A trägt eine Mutation in der Kinasedomäne wodurch sie keine Phosphorylierungsaktivität mehr besitzt. Diese Mutante wurde zusammen mit SLAC1 in Oozyten exprimiert.

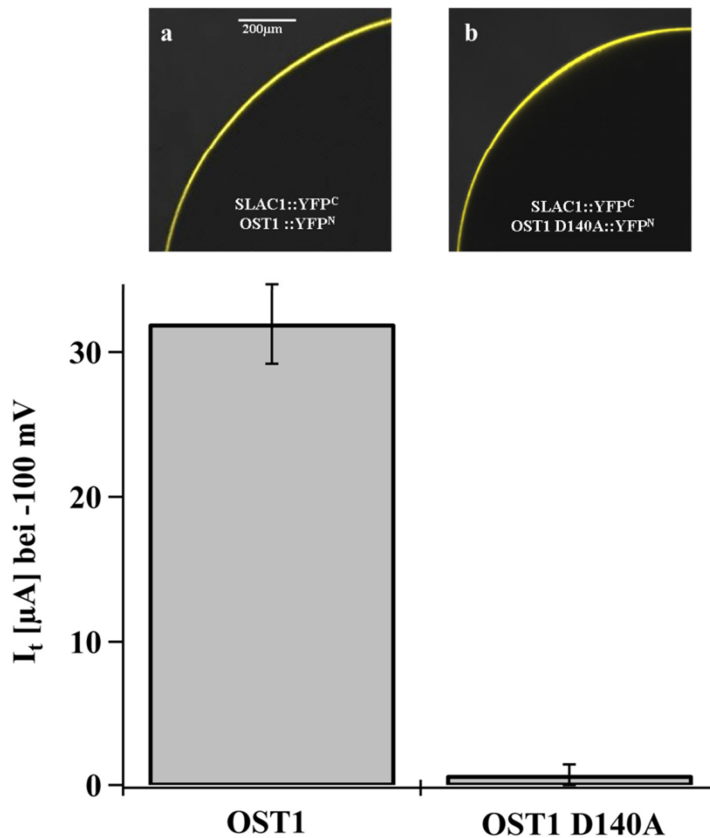


Abbildung 3.2.1.4.i: SLAC1 Aktivität erfordert Phosphorylierung durch OST1

In den beiden BIFC-Analysen oben ist die Interaktion zwischen SLAC1::YFP^C mit OST1::YFP^N (Einschub a) und SLAC1::YFP^C mit OST1 D140A::YFP^N (Einschub b) dargestellt. Der gelbe Kanal zeigt die Fluoreszenzkomplementation des YFPs. Darunter sind die instantanen Ströme (I_t) der beiden Konstrukte in Standard-Badlösung bei -100 mV gegeneinander aufgetragen ($n \geq 3$).

Bei den Interaktionsstudien zwischen SLAC1::YFP^C und OST1::YFP^N (Einschub a) und OST1 D140A::YFP^N (Einschub b) ist ersichtlich, dass beide Kinasen mit SLAC1 wechselwirken. Die Mutation D140A hat keinen Einfluss auf die Interaktion der Kinase mit SLAC1. Allerdings zeigen die TEVC-Analysen (unten) einen deutlichen Unterschied auf. Während SLAC1 durch die Wildtyp Kinase zu durchschnittlichen $32\ \mu\text{A}$ Anionenstrom aktiviert wurde, so blieb diese Aktivierung bei der OST1-Mutante, mit der zerstörten Kinasedomäne, völlig aus. Somit bewirkt vermutlich eine Phosphorylierung durch OST1 am SLAC1 Kanal dessen Aktivierung.

Um diese Vermutung zu bestätigen wurden *in vitro* Kinase Experimente mit den rekombinanten Proteinen durchgeführt. Diese sollten schließlich klären, ob SLAC1-Aktivierung mittels OST1 durch Phosphorylierung bewirkt wird und falls ja, wo diese Phosphorylierung stattfindet.

3.2.1.5 SLAC1 N-terminus Phosphorylierung durch OST1

Um die vermutliche Phosphorylierung von SLAC1 durch OST1 zu bestätigen und genaueren Einblick in die SLAC1-Aktivierung zu bekommen, wurden die kodierenden Sequenzen der entsprechenden Gene in den Proteinexpressionsvektor Nr. 23 (pGEX 6p1 V5 HIS / Abschnitt 2.1) eingebracht. Mit diesen Konstrukten wurden *E. coli* Zellen (Rosetta; Merck) transformiert, in denen die Proteine rekombinant hergestellt wurden (Abschnitt 2.8.3). Nach ihrer Aufreinigung konnten diese Proteine in *in vitro* Kinase Experimenten eingesetzt werden (Abschnitt 2.8.4). Um die phosphorylierte Domäne in SLAC1 zu identifizieren, wurden die zytosolisch lokalisierten Teile von SLAC1 (SLAC1 NT (AS 1 – 186), SLAC1 CT (AS 496 – 556)) zusammen mit der aktiven OST1 Kinase oder deren Kinase-inaktive Mutante OST1 D140A inkubiert. Durchführung und Pufferbedingungen sind in Abschnitt 2.8.4.2 und Abschnitt 2.9.3 detailliert beschrieben.

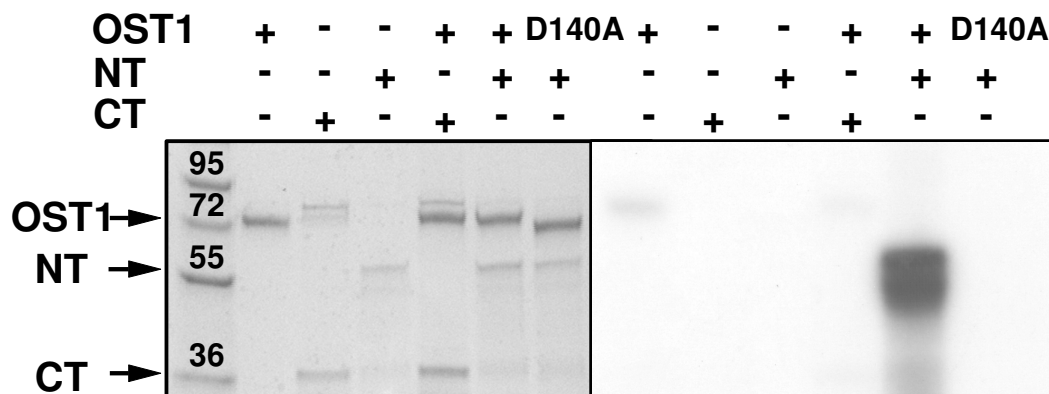


Abbildung 3.2.1.5.a: *In vitro* Kinase Assay mit den Termini von SLAC1 und der Kinase OST1

In vitro Kinase Aktivität der rekombinanten und mit GST-versehenen Proteine SLAC1 NT (AS 1 – 186), SLAC1 CT (AS 496 – 556), OST1 und OST1 D140A. Die Phosphorylierung wurde durch radioaktiv-markiertes γ^{32P} ATP auf einem Radioautogramm visualisiert. Links ist das Coomassie gefärbte SDS-Gel der Reaktionen und rechts das zugehörige Autoradiogramm zu sehen. Die Größe der Markerbanden ist in kD angegeben. Die Pfeile zeigen die Positionen der einzelnen Proteine an. Über den Bildern ist die Zusammensetzung der *in vitro* Kinase Reaktionen verdeutlicht.

Die Abbildung 3.2.1.5.a zeigt links das Coomassie gefärbte Gel eines *in vitro* Kinase Assays und rechts ist das entsprechende Autoradiogramm dieses Gels zu sehen. Die Phosphorylierung konnte durch den Einsatz von radioaktivem γ^{32P} ATP visualisiert werden. In der ersten Spalte ist die schwache Autophosphorylierung von OST1 in Abwesenheit eines Substrats zu sehen. In der zweiten Spur befand sich lediglich der C-Terminus bzw. in der dritten Spur der N-Terminus von SLAC1. In den Reaktionsansätzen, die in Spur 4 und 5 aufgetragen wurden, wurde zum N- bzw. C-Terminus noch die Kinase OST1 hinzugefügt (siehe Abschnitt 2.8.4.2). Dabei fällt sofort auf, dass nur der SLAC1 NT von OST1 phosphoryliert wurde. Der C-Terminus konnte hingegen nicht von OST1 phosphoryliert werden. Diese Erkenntnis passt auffallend gut zu den Interaktionsstudien (Abbildung 3.2.1.1.c), bei denen OST1 nur mit dem N-terminus von SLAC1 wechselwirkte. Wurde der SLAC1 NT mit der inaktiven Mutante OST1 D140A inkubiert, so fand keinerlei Phosphorylierung statt (Spur 6).

Um die Phosphorylierungsstelle weiter einzugrenzen, wurden CelluSpots peptide arrays verwendet. Auf diesen Arrays wurden Peptide des zytosolischen N- bzw. C-Terminus durch Acetylierung aufgetragen. Die Peptide überlappten um jeweils 10 Aminosäuren und deckten so die vorhergesagten zytoplasmatischen Regionen von SLAC1 ab. Sie wurden wie in Abschnitt 2.8.4.3 beschrieben verwendet.

Das Ergebnis dieser Experimente ist in Tabelle 3.2.1.5.b zusammengefasst. In der zweiten Spalte sind die Aminosäurepositionen im SLAC1 Protein angegeben während in der dritten Spalte die zugehörigen Peptidesequenzen dargestellt sind. In der letzten Spalte wurde durch -, + und ++ die Intensität der Phosphorylierung an diesen Stellen verdeutlicht.

Terminus und Spottnummer	Aminosäure-Position	Aminosäure Sequenz	Phosphorylierung
SLAC1 NT			
#1	1 - 20	MERKQSNHSTFADINEVED	-
#2	11 - 30	TFADINEVEDEAEQELQQQE	-
#3	21 - 40	EAEQELQQQENNNNKRFSGN	-
#4	31 - 50	NNNNKRFSGNRGPNRGKQRP	-
#5	41 - 60	RGPNRGKQRPFRGFSRQVSL	+
#6	51 - 70	FRGFSRQVSLETGFSVLNRE	-
#7	61 - 80	ETGFSVLNRESRERDDKKSL	-
#8	71 - 90	SRERDDKKSLPRSGRSFGGF	+
#9	81 - 100	PRSGRSFGGFESGGIINGGD	-
#10	91 - 110	ESGGIINGGDGRKTDfSMFR	-
#11	101 - 120	GRKTDfSMFRtKSTLSKQKS	++
#12	111 - 130	TKSTLSKQKSLLPSIIRERD	++
#13	121 - 140	LLPSIIRERDIENSLRTEDG	-
#14	131 - 150	IENSLRTEDGETKDDSinEN	-
#15	141 - 160	ETKDDSinENVsAGRYFAAL	-
#16	151 - 170	VsAGRYFAALRGPELDEVKD	-
#17	161 - 180	RGPELDEVKDnEDILLPKEE	-
#18	171 - 186	NEDILLPKEEQWPfLL	-
			-
SLAC1 CT			-
#19	496 - 515	HAFVWQTLFPNDLAIAITKR	-
#20	506 - 525	NDLAIAITKRKLtREKKPFK	+
#21	516 - 535	KLtREKKPFKRAYDLKRWTK	-
#22	526 - 545	RAYDLKRWTKQALAKKISAE	-
#23	536 - 555	QALAKKISAEKDFEAEESH	-
#24	546 - 556	KDFEAEESH	-

Tabelle 3.2.1.5.b: Phosphorylierung von CelluSpots Peptid Arrays durch OST1

In der Tabelle sind die Peptide von SLAC1 mit ihrer Position und Aminosäuresequenz dargestellt. Die Phosphorylierungsintensität der einzelnen Peptide durch OST1 ist durch -, + und ++ verdeutlicht, wobei ++ für besonders starke Phosphorylierung steht.

Insgesamt konnten durch die Verwendung von CelluSpot Peptid Arrays vier phosphorylierte Regionen im SLAC1 identifiziert werden. Die erste Region reicht von R41 bis L60. Die zweite befindet sich bei S71 bis F90. Die dritte liegt bei T101 bis D130. Im C-Terminus von SLAC1 findet sich eine vierte Region die eine schwache Phosphorylierung in dem Bereich zwischen N506 und K525 erahnen lässt. Geht man davon aus, dass es sich bei OST1 um eine Serin/Threonin Kinase handelt (Yunta et al. 2011), so kommen im SLAC1 NT Serine an den Positionen 55, 59, 71, 79, 83, 86, 107, 113, 116, 120 und 124 und die Threonine 104, 111 und 114 für eine Phosphorylierung in Betracht. Am C-Terminus von SLAC1 hingegen sind nur die Threonine an den Positionen 513 und 518 mögliche Ziele von OST1.

Somit bestätigen sich die durchgeführten *in vitro* Kinasereaktionen, die hauptsächlich eine Phosphorylierung von SLAC1 an seinem N-Terminus ergaben. Die tatsächliche Phosphorylierungsstelle muss nun über gezielte Mutagenese identifiziert werden.

3.2.2 Ca²⁺ abhängige Aktivierung von SLAC1 durch Kinasen der CPK Familie

Neben der Ca²⁺ unabhängigen Aktivierung (Abschnitt 3.2.1) von S-Typ Anionenströmen durch OST1 konnte gezeigt werden, dass auch eine Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺ Konzentration zur Aktivierung von S-Typ Anionenströmen führt (Allen et al. 1999; Schmidt et al. 1995). Diese Ca²⁺ abhängige Aktivierung wurde mit Ca²⁺ abhängigen Kinasen der CPK-Familie in Verbindung gebracht (Ma & Wu 2007; Mori et al. 2006). Im Abschnitt 3.1 haben wir bereits gezeigt das Transkripte der CPKs 3, 6, 21 und 23 in Schließzellen zu finden sind. Um die Ca²⁺ abhängige Aktivierung des SLAC1 zu untersuchen, wurden, wie bei der Ca²⁺ unabhängigen Aktivierung (Abschnitt 3.2.1), zuerst Interaktionsstudien zwischen SLAC1 und Mitgliedern der CPK Familie mit Hilfe der BIFC-Technik durchgeführt. Die Interaktionspartner wurden dann in TEVC-Analysen und *in vitro* Kinase Assays weitergehend untersucht.

3.2.2.1 BIFC Experimente zwischen SLAC1 und Kinasen der CPK Familie

Um Komponenten der Ca^{2+} abhängigen Anionenkanalaktivierung in der ABA-Signaltransduktionskette zu identifizieren, wurde SLAC1 zusammen mit den Mitgliedern der CPK-Familie koexprimiert. Wie bei den Ca^{2+} unabhängigen Kinasen wurde dazu SLAC1 mit der C-terminalen Hälfte des YFP-Moleküls ($\text{SLAC1}::\text{YFP}^{\text{C}}$; Vektor Nr. 18) fusioniert, während die Ca^{2+} abhängigen Kinasen die N-terminale Hälfte ($\text{CPK}::\text{YFP}^{\text{N}}$; Nr. 20) trugen (Tabelle 2.1.4).

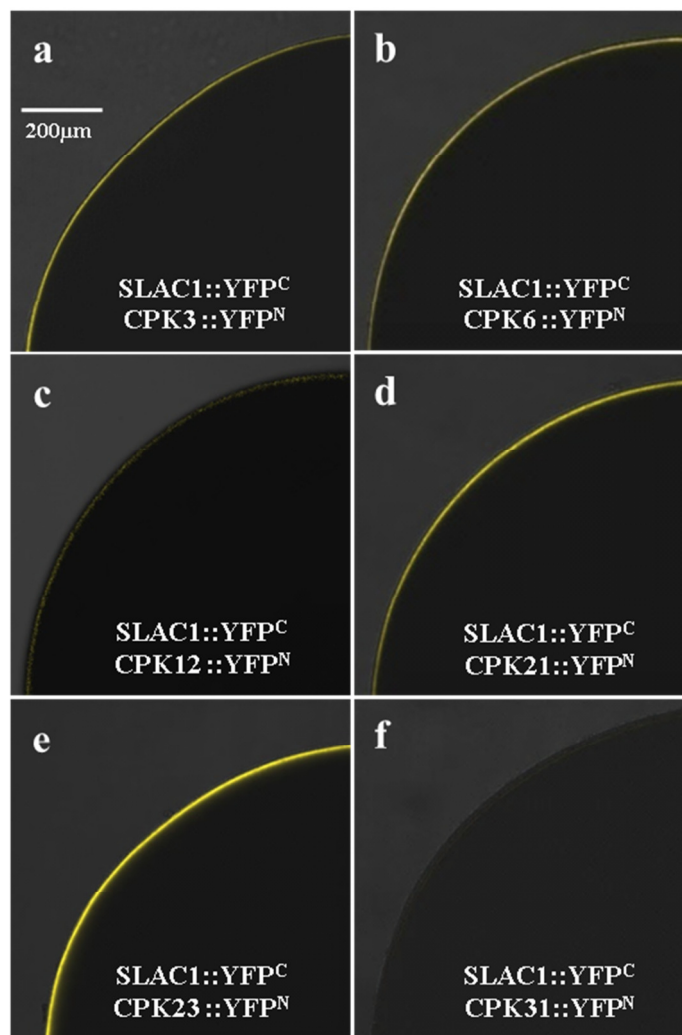


Abbildung 3.2.2.1.a: Spezifität der CPKs zu SLAC1

Bi-molekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in *Xenopus* Oozyten: $\text{SLAC1}::\text{YFP}^{\text{C}}$ und $\text{CPK3}::\text{YFP}^{\text{N}}$ (a), $\text{CPK6}::\text{YFP}^{\text{N}}$ (b), $\text{CPK12}::\text{YFP}^{\text{N}}$ (c), $\text{CPK21}::\text{YFP}^{\text{N}}$ (d), $\text{CPK23}::\text{YFP}^{\text{N}}$ (e) und $\text{CPK31}::\text{YFP}^{\text{N}}$ (f). Die detektierte Fluoreszenz wurde durch den gelben Kanal wiedergegeben.

Bei den Interaktionsstudien ist zu erkennen, dass viele der getesteten CPKs mehr oder weniger stark mit SLAC1 wechselwirkten. Dies galt zum Beispiel für die hier gezeigten CPK3 (a), CPK6 (b), CPK12 (c) und CPK21 (d). Eine besonders starke Interaktion zeigte CPK23 (e) während CPK31 (f), die ebenfalls eine hohe Homologie zur CPK23 aufweist, keine Interaktion zu SLAC1 zeigte.

Um festzustellen, mit welcher zytosolischen Domäne des SLAC1 die Kinase CPK23 interagiert, wurde das gleiche Experiment, wie mit OST1 durchgeführt (Abschnitt 3.2.1). Dazu exprimierte man die Kinase (CPK23::YFP^N) zusammen mit dem C-terminalen Bereich (AS 496 bis 556) von SLAC1 (SLAC1 CT::YFP^C) oder dem N-terminalen Bereich (AS 1 bis 186) (SLAC1 NT::YFP^C).

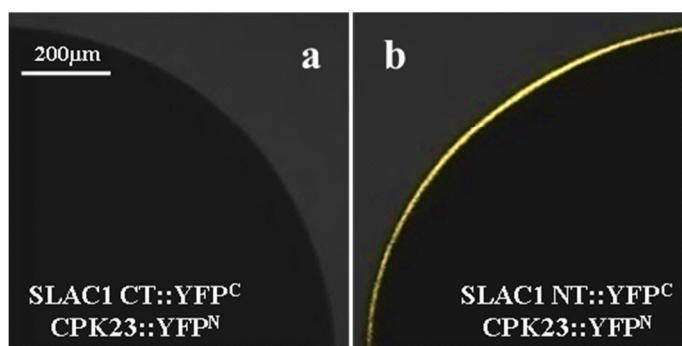


Abbildung 3.2.2.1.b: Interaktionslokus von SLAC1 mit CPK23

Interaktionsstudien von CPK23::YFP^N mit dem C-terminalen Bereich (AS 496 bis 556) von SLAC1 (SLAC1 CT::YFP^C) (Bild a) oder dem N-terminalen Bereich (AS 1 bis 186) (Bild b). Die detektierte Fluoreszenz wurde durch den gelben Kanal wiedergegeben und konnte ausschließlich zwischen dem SLAC1 NT und der CPK23 festgestellt werden.

Während keine Interaktion zwischen dem SLAC1 CT und der Kinase CPK23 festzustellen war (Bild a), konnte eine deutliche Interaktion zwischen dem N-Terminus von SLAC1 und der Proteinkinase CPK23 detektiert werden (Bild b). Genau wie OST1 scheint auch die Ca²⁺ abhängige Kinase CPK23 an den N-terminalen Bereich von SLAC1 zu binden.

Die Interaktion der Kinase CPK23 mit SLAC1 konnten durch Co-Transformationsstudien in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten bestätigt werden.

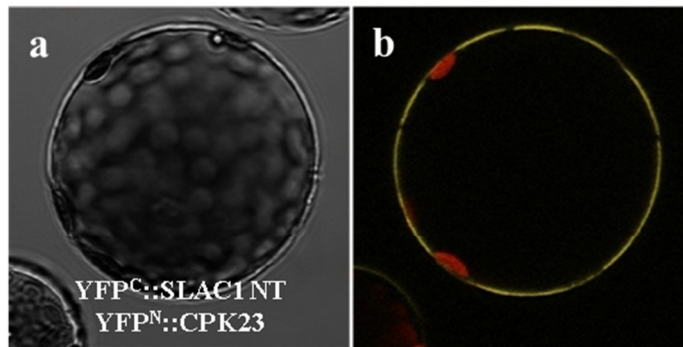


Abbildung 3.2.2.1.c: Protoplastentransformation

Interaktion von YFP^N::CPK23 (Vektor Nr. p02; Abschnitt 2.1.4) mit YFP^C::SLAC1 (Vektor Nr. p02) in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten. Links ist das Durchlichtbild und rechts sind die beiden Fluoreszenz-Kanäle gezeigt, wobei gelb die YFP-Fluoreszenz und rot die Autofluoreszenz des Chlorophylls repräsentiert.

Nach der Transformation der Protoplasten mit YFP^N::CPK23 und YFP^C::SLAC1 konnte genau wie in Oozyten eine deutliche Fluoreszenzkomplementation beobachtet werden. Ebenso wie OST1 interagiert dabei die CPK23 mit SLAC1 an der Plasmamembran.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass, analog zu OST1, die Ca²⁺ abhängige Kinase CPK23 besonders stark mit dem SLAC1 NT interagiert. Jedoch zeigten auch andere Mitglieder dieser Familie, wie z.B. die CPK3, 6 und 21 eine deutliche Wechselwirkung mit SLAC1.

3.2.2.2 TEVC Experimente mit Kinasen der CPK Familie

Im Abschnitt 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass der S-Typ Anionenkanal SLAC1 von der Ca²⁺ unabhängigen Kinase OST1 aktiviert wird. In OST1 Verlustmutanten waren allerdings immer noch S-Typ Anionenströme mittels der Patch-Clamp Technik festzustellen (Abbildung 3.2.1.3). Diese Tatsache deutet auf eine alternative SLAC1-Aktivierung hin. Diese Ca²⁺ abhängige Aktivierung könnte durch die Mitglieder der CPK Familie bewirkt werden. In Abschnitt 3.1 konnten bereits Transkriptmengen einiger CPKs in Schließzellen nachgewiesen werden und in Abschnitt 3.2.2.1 wurden Interaktionen zwischen SLAC1 und den CPKs 3, 6, 21 und 23 gezeigt. Daher wurden diese CPKs nun, vergleichbar zu OST1, in TEVC-Experimenten mit SLAC1 eingesetzt.

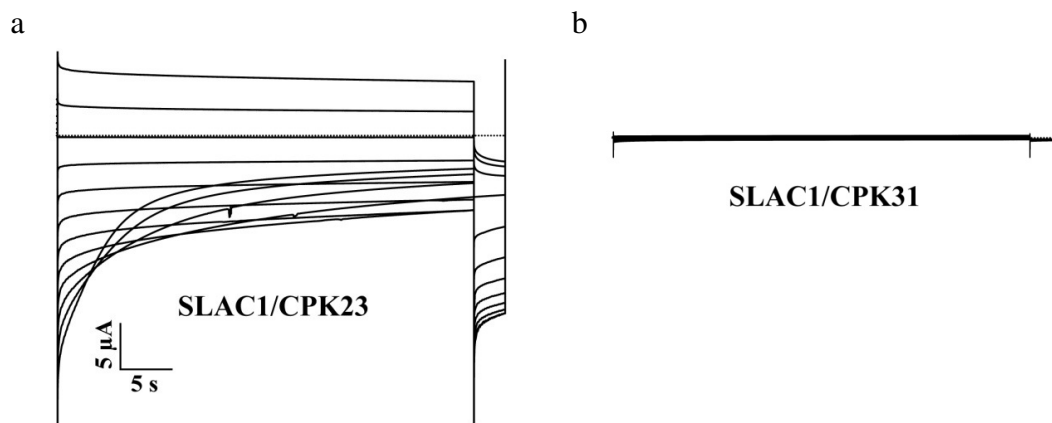


Abbildung 3.2.2.2.a: Ca²⁺ abhängige Anionenkanalaktivierung

Ganzzellströme von *Xenopus* Oozyten in der Standard-Badlösung (30 mM Cl⁻, pH 5.6). Es wurde das Spannungsprotokoll, wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben, verwandt, wobei das 45 sekundige 2. Segment von +40 bis -180 mV in 20 mV Schritten durchlaufen wurde. Danach wurde im dritten Segment für 3 Sekunden eine konstante Spannung von -120 mV angelegt. Die Haltespannung betrug 0 mV. Wurde SLAC1 zusammen mit der CPK23 koinjiziert (a), so kam es zu makroskopischen Anionenströmen, die bei negativen Spannungen langsam deaktivierten. Bei den Oozyten, die statt der CPK23, die CPK31 mit SLAC1 koexprimierten (b), konnten hingegen keine deutlichen Anionenströme verzeichnet werden.

Wie bereits in Abschnitt 3.2.1.2 gezeigt werden konnte, treten in SLAC1 exprimierenden Oozyten keine Anionenströme auf. Genauso verhält es sich, wenn nur die einzelnen CPKs exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Wurden allerdings die Kinasen mit dem Anionenkanal koinjiziert, so traten deutliche S-Typ Anionenströme auf. Die stärkste Aktivierung trat bei der Koexpression von SLAC1 mit CPK23 auf (Grafik 3.2.2.2.a; a). Diese CPK zeigte auch in den BIFC-Experimenten die stärkste Interaktion mit SLAC1. Die nahe verwandte Kinase CPK31, zeigte hingegen weder Interaktion mit SLAC1 noch war sie in der Lage SLAC1 in TEVC-Experimenten zu aktivieren (3.2.2.2.a; b). Im Gegensatz zur OST1-Aktivierung von SLAC1 war die CPK-Aktivierung sehr gut reproduzierbar und erforderte nicht den Einsatz von BIFC-Konstrukten (Abschnitt 2.1.4).

Die elektrophysiologischen Charakteristika von SLAC1-vermittelten Strömen waren unabhängig von der Art der aktivierenden Kinase. So war die Selektivität, Spannungsabhängigkeit, pH- und Kationenabhängigkeit der Anionenströme unabhängig davon, ob SLAC1 durch OST1 oder durch eine Ca²⁺-abhängige Kinase (CPK) aktiviert wurde. Daher werden die Daten der CPK-induzierten Anionenstrom-Charakteristika im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht gezeigt.

Nachdem die SLAC1-Aktivierung durch die Ca^{2+} -abhängigen Kinasen der CPK-Familie gelungen war, wurde die Spezifität dieser Aktivierung getestet. Dazu koexprimierte man SLAC1 zusammen mit verschiedenen Mitgliedern der CPK Familie, die in den BIFC-Experimenten ebenfalls eine eindeutige Interaktion zu SLAC1 zeigten.

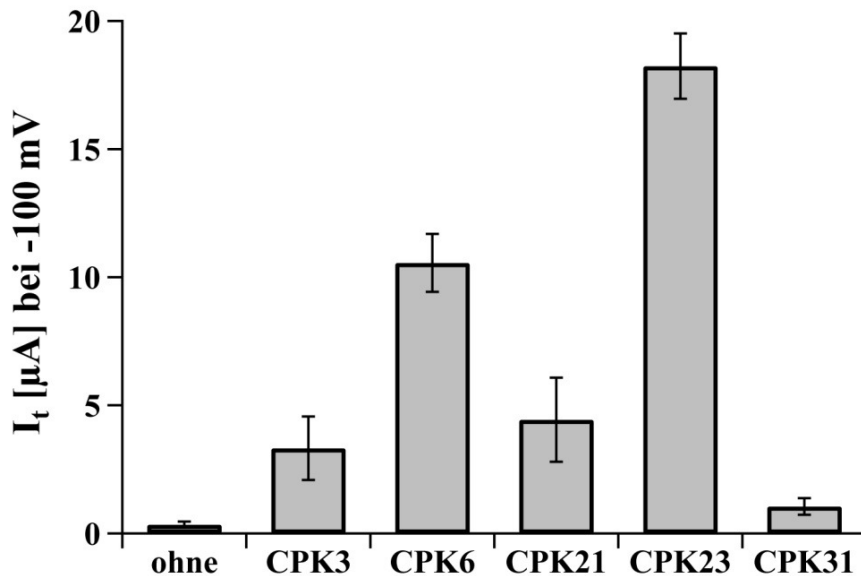


Abbildung 3.2.2.2.b: Spezifität der CPKs zu SLAC1

SLAC1-vermittelte instantane Ströme bei -100 mV in der Standard-Badlösung. Von links nach rechts: ohne CPK, CPK3, 6, 21, 23, 31 ($n \geq 5$).

Die Koexpression von SLAC1 mit verschiedenen CPKs in *Xenopus* Oozyten resultierte in SLAC1 Anionenströmen mit unterschiedlicher Intensität. Diejenigen CPKs, die in Schließzellen exprimiert werden (3.1), sind in dem Abbildung 3.2.2.2.b vergleichend aufgetragen. Dabei fiel auf, dass die Koexpression von SLAC1 mit CPK23 die stärkste SLAC1-Aktivierung aller getesteten CPKs bewirkte. Die zur CPK23 nahe verwandte CPK31 vermochte es nicht SLAC1 zu aktivieren. Die Intensität der SLAC1 Aktivierung spiegelte sich auch in den BIFC-Ergebnissen (3.2.2.1) wieder, bei denen ebenfalls CPK23 die stärkste und CPK31 fast gar keine Interaktion zu SLAC1 zeigte.

Somit wurde die Spezifität der einzelnen CPKs zu SLAC1 durch TEVC-Experimente und Interaktionsstudien (Abschnitt 3.2.2.1). Dabei wurde die stärkste Interaktion und SLAC1-Aktivierung durch die Proteinkinase CPK23 beobachtet. Diese Spezifität sollte durch *in vitro* Kinase Experimente untermauert werden, was sich allerdings als ausgesprochen schwierig erwies. Die Gründe für das Scheitern dieser Experimente lagen an der

Tatsache, dass bei jeder Aufreinigung die Aktivität der einzelnen rekombinanten Kinasen stark variierte. Zudem werden bei *in vitro* Kinase Assays die rekombinanten Proteine auf engstem Raum zu einer Reaktion gezwungen, so dass es zu unspezifischen Phosphorylierungsereignissen kommt, die *in vivo* wahrscheinlich so niemals stattfinden würden. Aus diesen Gründen eigneten sich *in vitro* Kinase Assays nicht, um die Stärke der Phosphorylierung der einzelnen CPKs miteinander zu vergleichen. Aussagen über die grundsätzliche Fähigkeit der Kinasen SLAC1 zu phosphorylieren, ihre Kalziumabhängigkeiten und die Regulation der Kinasen konnten aber sehr wohl getroffen werden. Dabei zeigte sich, dass alle Kinasen, die in den BIFC-Interaktionsstudien mit SLAC1 interagierten und auch Anionenströme in den TEVC-Experimenten auslösten, in der Lage waren den SLAC1 NT zu phosphorylieren. CPK31 hingegen zeigte keine Interaktion, Ströme und auch keine Phosphorylierung (Daten der *in vitro* Kinase Assays nicht gezeigt).

3.2.2.3 CPK23 Verlustmutanten zeigen reduzierte S-Typ Anionenströme

Um die physiologische Relevanz der Kinase CPK23 für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von S-Typ Anionenkanälen in Schließzellen zu untersuchen, wurden Patch-Clamp Experimente mit *Arabidopsis thaliana* Schließzell-Protoplasten von Wildtyp Pflanzen, CPK23 Verlustmutanten (Salk 007958) sowie *slac1-3* knock out Pflanzen durchgeführt. Diese Patch-Clamp-Daten wurden von Patrick Mumm generiert und bestätigen die Messungen an *Xenopus* Oozyten.

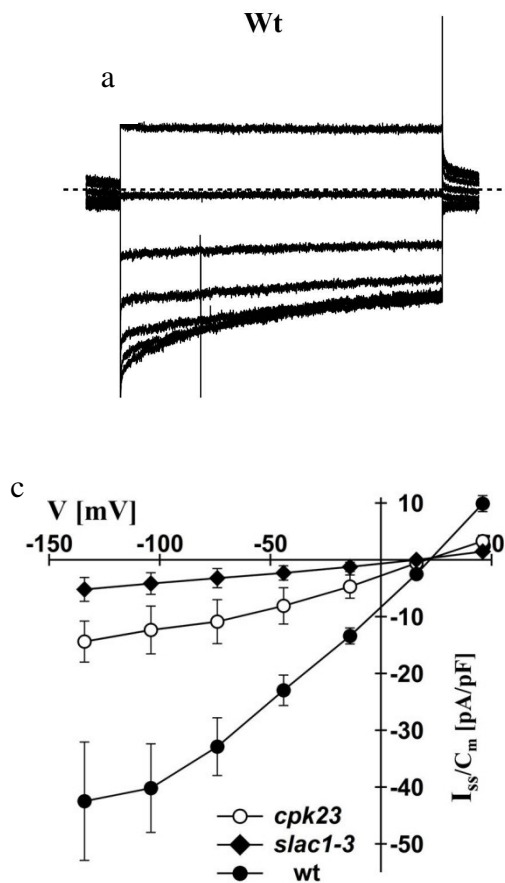


Abbildung 3.2.2.3: S-Typ Anionenströme in Schließzell-Protoplasten

Arabidopsis thaliana Ganzzellströme von Wt-(a), *cpk23*- (b) und *slac1-3*- (c) Schließzell-Protoplasten als Antwort auf 7,5 Sekunden lange Pulse von 46 bis -134 mV. Im unteren Diagramm wurden die Gleichgewichtsströme (I_{ss}) gegen die tatsächliche Spannung aufgetragen (n = 7 für *cpk23*, n = 5 für *slac1-3*, und n = 6 für Wt. Die Pipettenlösung (zytosolisch) enthielt zur Aktivierung von S-Typ Anionenströmen 2 μ M freies Ca^{2+} .

In diesem Experiment wurden die Ca^{2+} induzierten Anionenströme in Schließzell-Protoplasten untersucht. Dazu verwendete man 2 μ M freies Ca^{2+} in der Patch-Pipette (Mori et al. 2006). In Abbildung 3.2.2.3 a sind die typischen S-Typ Anionenströme von Wild-Typ Protoplasten dargestellt. Rechts daneben (b) befinden sich Stromableitungen von *cpk23* knock out Schließzellprotoplasten unter identischen Bedingungen. Die Gleichgewichtsströme solcher Patch-Clamp Experimente wurden im unteren Strom-Spannungs Diagramm (c) mit den Strömen von *slac1-3* knock out Schließzellprotoplasten verglichen. Es fällt sofort eine deutliche Reduktion der I_{ss} Ströme bei den *cpk23* Verlustmutanten im Vergleich zum WT auf. Obwohl die Expression nur eines Vertreters der CPK Familie (CPK23) verhindert wurde und obwohl die Ca^{2+} unabhängige Kinase OST1 weiterhin vorhanden war, waren die Ganzzellströme um 70 % bei einer Spannung von -104 mV reduziert. Die verbliebenen Anionenströme in der *cpk23* Mutante liegen nur leicht über dem Niveau von *slac1-3* knock out Pflanzen. Dieses Ergebnis deutet auf eine entscheidende Rolle der CPK23 bei der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung von S-Typ Anionenkanälen hin. Wie diese CPK-vermittelte Anionenkanal-Aktivierung erreicht wird, soll in den folgenden Experimenten untersucht werden.

3.2.2.4 CPK23 phosphoryliert SLAC1 in *in vitro* Kinase Experimenten

Um herauszufinden, ob für die SLAC1-Aktivierung die Interaktion zwischen Kanal und Kinase ausreicht, oder ob SLAC1 dafür durch CPK23 phosphoryliert werden muss, wurde in *Xenopus* Oozyten eine inaktive Kinase zusammen mit SLAC1 koexprimiert (Hanks & Hunter 1995). CPK23 D193A trägt eine Mutation in der Kinasedomäne und ist deshalb nicht mehr in der Lage ihr Substrat zu phosphorylieren.

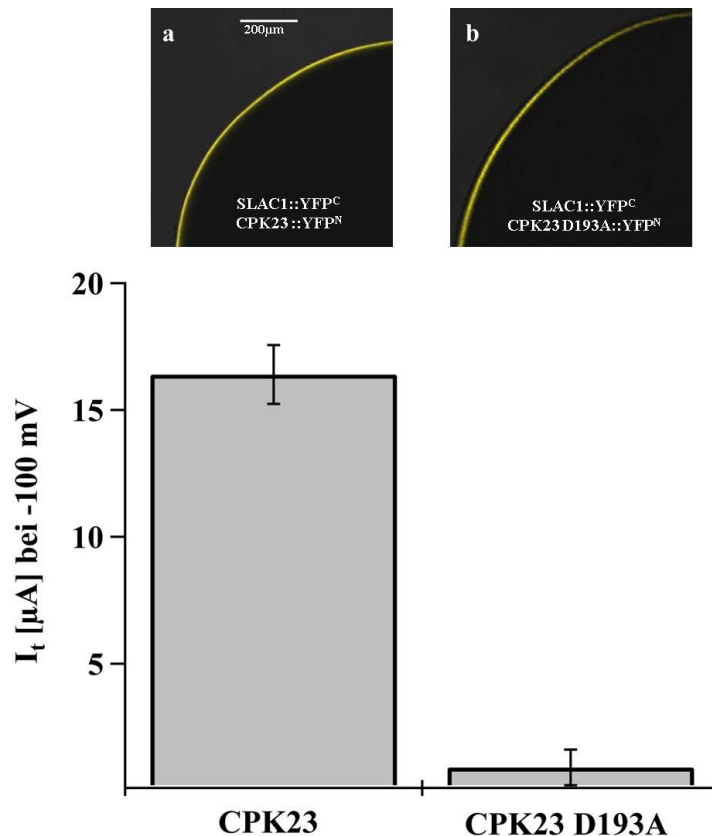


Abbildung 3.2.2.4.a: SLAC1 Aktivität erfordert Phosphorylierung durch CPK23

In den beiden BIFC-Analysen ist die Interaktion zwischen SLAC1::YFP^C mit CPK23::YFP^N (Einschub a) und SLAC1::YFP^C mit CPK23 D193A::YFP^N (Einschub b) dargestellt. Der gelbe Kanal zeigt die Fluoreszenzkomplementation des YFPs. Darunter sind die instantanen Ströme in Standard-Badlösung bei -100 mV gegeneinander aufgetragen (n ≥ 4).

Bei den Interaktionsstudien zwischen SLAC1::YFP^C und CPK23::YFP^N (Einschub a) bzw. CPK23 D193A::YFP^N (Einschub b) war ersichtlich, dass beide Kinasen mit SLAC1 wechselwirken. Die Mutation D193A hatte keinen Einfluss auf die Interaktion mit SLAC1. Allerdings zeigten die TEVC-Analysen (unten), dass nur die Wildtyp CPK23 in der Lage war SLAC1 zu aktivieren. Während diese SLAC1-Aktivierung zu durchschnittlichen 17 μA Anionenkanal-Aktivität führte, blieben die Ströme bei der CPK23 mit der inaktiven Kinasedomäne aus. Somit bewirkt vermutlich eine Phosphorylierung am SLAC1 NT dessen Aktivität. Diese Vermutung galt es mit anschließenden *in vitro* Kinase Experimenten zu untermauern.

Die bisherigen Daten der BIFC- und TEVC-Untersuchungen an *Xenopus* Oozyten deuten auf eine Aktivierung des Anionenkanals durch Phosphorylierung seines N-terminalen Bereichs durch die Kinase CPK23 hin. Um dies zu bestätigen und genaueren Einblick in die Charakteristika der SLAC1-Aktivierung zu bekommen, wurden *in vitro* Kinase Experimente mit den rekombinanten Proteinen von SLAC1 NT (AS 1 – 186), SLAC1 CT (AS 496 – 556) und der Kinase CPK23 durchgeführt (Abschnitt 2.8.4). Der Kinasepuffer (Abschnitt 2.9.3) enthielt neben $\gamma^{32}\text{P}$ ATP zur Visualisierung von Phosphorylierungen auf einem Autoradiogramm, $1\ \mu\text{M}$ freies Ca^{2+} zur Aktivierung von CPK23.

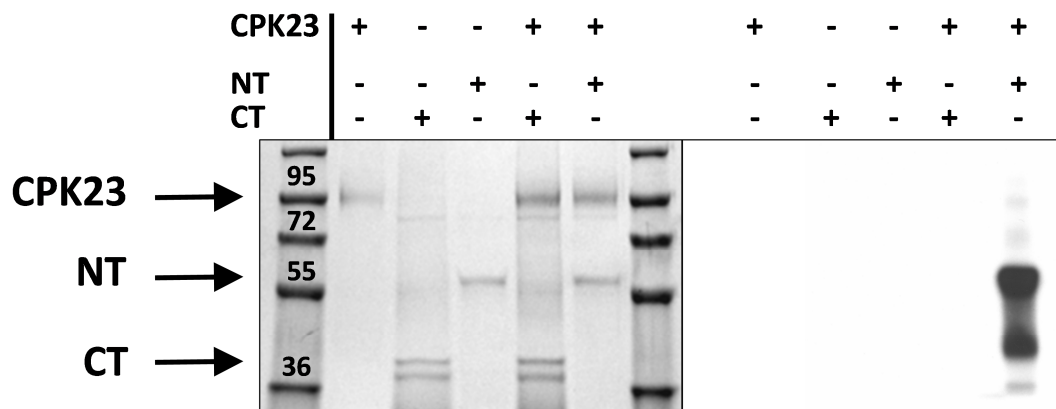


Abbildung 3.2.2.4.b: *In vitro* Kinase Assays zeigen die Phosphorylierung von SLAC1 NT durch CPK23

In vitro Kinase Experiment mit den rekombinanten und GST-versehenen Proteinen SLAC1 NT (AS 1 – 186), SLAC1 CT (AS 496 – 556) und CPK23. Die Phosphorylierung konnte durch die Verwendung von radioaktiv markiertem $\gamma^{32}\text{P}$ ATP auf einem Autoradiogramm visualisiert werden. Links ist das Coomassie gefärbte SDS-Gel mit den aufgetragenen Reaktionen zu sehen und rechts das entsprechende Autoradiogramm. Die Größe des Markers ist in kD über den entsprechenden Banden angegeben. Die Pfeile zeigen die Position der einzelnen Proteine an. Über den Bildern ist die Zusammensetzung der *in vitro* Kinase Reaktionen graphisch illustriert.

Die Abbildung 3.2.2.4.b zeigt links das Coomassie gefärbte Gel eines solchen *in vitro* Kinase Assays und rechts ist das Autoradiogramm dieses Gels gezeigt. In Spur 1 wurde ein Reaktionsansatz aufgetragen, der nur die rekombinante Kinase CPK23 enthielt. In der zweiten und dritten Spur befanden sich entweder der C-Terminus oder der N-Terminus von SLAC1. In den Reaktionsansätzen in Spur 4 und 5 wurden die zytosolischen Bereiche von SLAC1 zusammen mit der Kinase (siehe 2.8.4.2) inkubiert. Dabei fiel auf, dass nur

der SLAC1 NT von CPK23 phosphoryliert wurde (Spur 5). Dieses Ergebnis bestätigt unsere BIFC Studien in *Xenopus* Oozyten (Abbildung 3.2.2.1.b).

Als Kontrolle wurde die Phosphorylierungsaktivität der Kinase-inaktiven Mutante CPK23 D193A mit der CPK23 WT Kinase verglichen. Der *in vitro* Kinase Assay zeigte deutlich, dass nur CPK23 Wildtyp in der Lage ist das radioaktive Phosphat auf den SLAC1 NT zu übertragen.

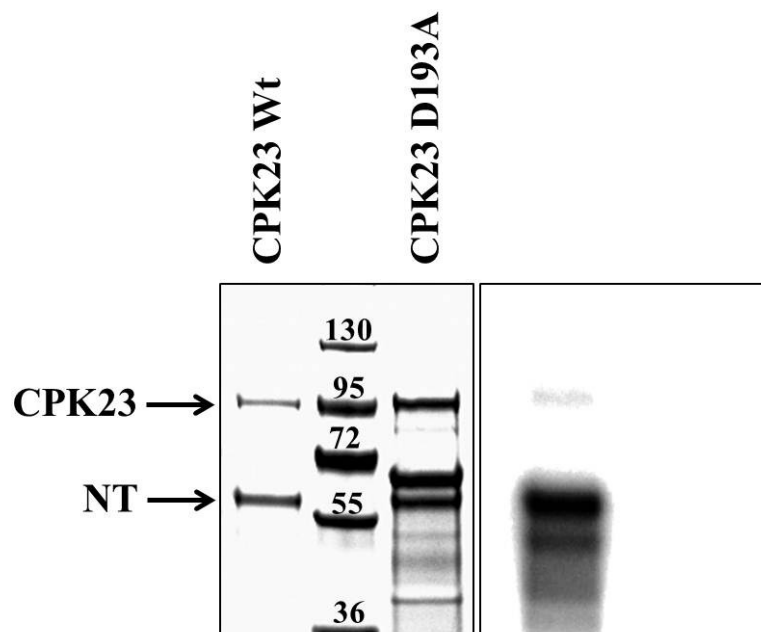


Abbildung 3.2.2.4.c: CPK23 D193A besitzt keine Kinaseaktivität

Der *in vitro* Kinase Assay zeigt die Phosphorylierung am SLAC1 NT durch die Wild-Typ CPK23 während die inaktive Mutante D193A keine Phosphorylierungsaktivität aufwies. Links ist das Coomassie gefärbte SDS-Gel zu sehen und rechts das entsprechende Autoradiogramm. Die Größe des Markers ist in kD angegeben. Die Pfeile zeigen die Position der einzelnen Proteine an.

In der ersten Spur ist neben der deutlichen Phosphorylierung am SLAC1 NT auch die Autophosphorylierung der Wildtyp CPK23 als Schwärzung zu erkennen. Diese Autophosphorylierung ist bei der Mutante D193A in Spur 2 nicht zu beobachten, obwohl entscheidend mehr Protein eingesetzt wurde als von der Wildtyp Kinase. Auch ist die inaktive Mutante D193A (Hanks & Hunter 1995) nicht befähigt SLAC1 NT zu phosphorylieren.

Dieses Ergebnis zeigt in Verbindung mit den BIFC- und TEVC-Experimenten, dass die Aktivierung von SLAC1 sehr wahrscheinlich durch eine Phosphorylierung am N-terminalen Bereich von SLAC1 bewirkt wird.

Zur näheren Eingrenzung der Phosphorylierungsstelle wurden, wie bei den OST1 Experimenten, CelluSpots Peptid Arrays verwendet. Die 20mer Peptide überlappten jeweils um 10 Aminosäuren und deckten insgesamt die vorhergesagten zytoplasmatischen Regionen von SLAC1 ab. Diese Experimente wurden wie in Abschnitt 2.8.4.3 beschrieben durchgeführt. Zur Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Kinase CPK23 wurde der CPK-spezifische Kinasepuffer mit $1\mu\text{M}$ freiem Ca^{2+} verwendet.

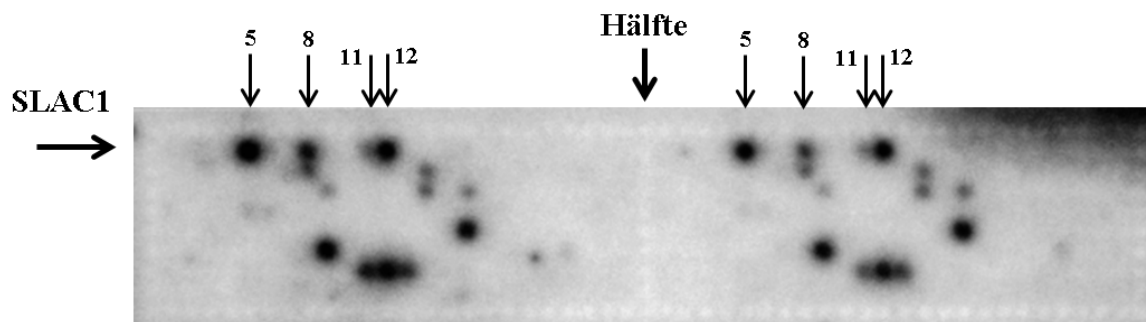


Abbildung 3.2.2.4.d: Peptid Arrays der CPK23

Dargestellt ist das Phosphorylierungsmuster der Kinase CPK23 auf einem Autoradiogramm eines CelluSpots Peptid Arrays. Der Array ist in der Mitte halbiert und auf jedem der beiden Seiten sind identische 384 Spots mit den gewünschten Peptiden aufgetragen. Die Spots mit den Peptiden des SLAC1 befinden sich in der obersten Reihe (Pfeil SLAC1). Es wurden jeweils 4 Peptide (Pfeile mit entsprechenden Nummern) in der Reihe der SLAC1-Peptide phosphoryliert.

Peptide Arrays, die in Anwesenheit von radioaktiv markiertem $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP mit der Kinase CPK23 inkubiert wurden, wiesen an 4 von 24 Peptiden eine Phosphorylierung auf (Pfeile mit den entsprechenden Nummern). Besonders stark ist die Phosphorylierung an den Stellen 5 und 12. Geringere Aktivität ist an den Stellen 8 und 11 zu verzeichnen. Diese Stellen entsprechen genau denjenigen Peptiden, die auch von der Kinase OST1 phosphoryliert wurden (Tabelle 3.2.1.5.b). Allerdings sind die Intensitäten zwischen OST1 und CPK23 phosphorylierten Peptiden unterschiedlich. So ist im Vergleich das Peptid #5 mit den putativen Phosphorylierungsstellen S55 und S59 stärker von der CPK23 phosphoryliert. Entgegengesetzt verhält es sich für das Peptid #11 mit Serinen an den Positionen 107, 113, 116 und 120, welches deutlich stärker von OST1 phosphoryliert wurde. Unabhängig von der CPK Kinase, die für die Phosphorylierung benutzt wurde, wurden immer genau diese vier Peptide phosphoryliert. Lediglich die Phosphorylierungsintensität variierte auch innerhalb der CPK-Familie leicht. Im Gegensatz zu OST1 zeigten die CPKs allerdings keine Phosphorylierung der Peptide des

C-terminalen Bereichs von SLAC1. Der Vergleich zum SLAC1 Phosphorylierungsmuster durch OST1 und die Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptide sind in Tabelle 3.2.1.5.b ersichtlich.

3.2.2.5 CPK23 und OST1 phosphorylieren unterschiedliche Aminosäurereste im N-terminus von SLAC1

Um genauere Erkenntnisse über die Phosphorylierungsstellen im SLAC1 zu gewinnen, wurden putative Phosphorylierungsstellen mutiert und die entsprechenden Mutanten mit der TEVC-Methode in *Xenopus* Oozyten untersucht. Dazu wurden Serine, Threonine und Tyrosine im SLAC1 NT einzeln jeweils zu einem Aspartat mutiert, um eine Phosphorylierung vorzutäuschen und dadurch einen konstitutiv aktiven Kanal zu generieren. Allerdings wiesen keine der erzeugten Mutanten makroskopische Anionenströme auf, solange keine Kinase koexprimiert wurde. Weiterhin wurden diese Serine, Threonine und Tyrosine einzeln durch ein Alanin ersetzt. Somit kann an diesen Stellen keine Phosphorylierung mehr erfolgen und der mutierte Kanal sollte sich nicht mehr durch eine Kinase aktivieren lassen. Bei diesen Experimenten konnte eine interessante Stelle im SLAC1 NT identifiziert werden.

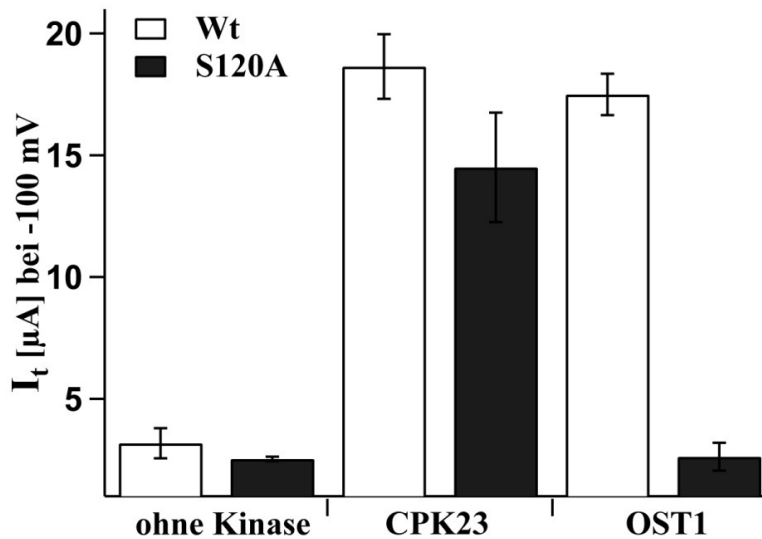


Abbildung 3.2.2.5: Die Mutante SLAC1 S120A lässt sich durch CPK23 aber nicht durch OST1 aktivieren.

Instantane Ströme von SLAC1 WT (weiße Balken) und SLAC1 S120A (schwarze Balken) exprimierenden Oozyten bei einer Spannung von -100 mV (links). In diesen Oozyten wurde entweder keine Kinase (links), die Kinase CPK23 (mitte) oder OST1 (rechts) mit dem Anionenkanal oder seiner Mutante koexprimiert. Die Messungen wurden in der Standard-Badlösung durchgeführt ($n \geq 4$).

In diesem Versuch wurde SLAC1 (weiße Balken) und die SLAC1 Mutante S120A (schwarze Balken) ohne Kinase, zusammen mit der Kinase CPK23 oder OST1, in Oozyten koexprimiert. Dabei zeigte sich, dass die beiden Kanäle ohne Kinasen nur wenig Anionenströme in den Oozyten vermittelten (Balken links). Wurde die Kinase CPK23 koexprimiert, so konnten deutliche Anionenströme sowohl beim SLAC1 Wildtyp, als auch bei der Mutante verzeichnet werden (Balken mitte). Bei der Aktivierung durch die Ca^{2+} unabhängige Kinase OST1 zeigte sich allerdings, dass im Vergleich zum Wildtyp die Anionenströme bei der Mutante S120A ausblieben (Balken rechts). Somit stellt das Serin120 vermutlich eine essentielle Phosphorylierungsstelle für OST1 dar. Dieses Ergebnis wird durch die vorhergegangenen Experimente an den Peptide Arrays bekräftigt, da hier das Peptid, welches das Serin120 trug deutlich stärker von OST1, als von CPK23 phosphoryliert wurde (Tabelle 3.2.1.5.b und Abbildung 3.2.2.4.d). BIFC Interaktionsstudien zeigten, dass die Wechselwirkung der SLAC1 Mutante S120A mit OST1 weiterhin stattfindet (Daten nicht gezeigt).

Somit ist festzustellen, dass S120A eine essentielle Bedeutung für die Aktivierbarkeit des SLAC1 durch die Kinase OST1 hat. Fehlt dieses Serin an der Position 120 kann SLAC1 nicht mehr durch OST1, aber noch sehr wohl durch CPK23, aktiviert werden. Dennoch

zeigten die Daten der Peptid Arrays eine Phosphorylierung durch OST1 an mindestens 3 unterschiedlichen Stellen auf. Weiterhin ist die vorgetäuschte Phosphorylierung bei der Mutante S120D nicht ausreichend, um eine Anionenkanalaktivität in Abwesenheit einer Kinase zu bewirken (Daten nicht gezeigt). Daher werden vermutlich zusätzlich zur Position S120 noch andere Stellen im SLAC1 N-terminus phosphoryliert bevor es zu einer Aktivierung des Anionenkanals kommt.

3.2.2.6 Affinitätsbestimmung der CPK Proteinkinasen zu Ca^{2+}

C-terminal von ihrer Kinasedomäne besitzen Kinasen der CPK Familie eine Junktion-Domäne und 4 EF-Hände zur Koordination von Ca^{2+} -Ionen (siehe Abschnitt 1.4.2.1). Nach Ca^{2+} -Bindung an die EF-Hände kommt es zu einer Konformationsänderung, wobei die als Pseudosubstrat wirkende Junktion-Domäne aus dem aktiven Zentrum der Kinase entfernt wird. Somit werden die CPKs durch Ca^{2+} -Bindung aktiviert. Werden Mutanten erzeugt, bei denen die Junktion-Domäne und die EF-Hände deletiert sind, so verlieren diese CPKs ihre Ca^{2+} Abhängigkeit und sind konstitutiv aktiv (Harmon et al. 1994; Harper et al. 1994; Vitart et al. 2000). Bei den TEVC-Experimenten in Oozyten mit den Vollängen der CPKs ist deren Aktivität also von der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration der Oozyten bestimmt. Werden allerdings die Deletionsmutanten der CPKs zusammen mit SLAC1 koexprimiert, so hat diese zytosolische Kalziumkonzentration keinen regulatorischen Effekt auf die konstitutiv aktiven Kinasen. Auf diese Weise kann die Aktivierung von SLAC1 durch die CPKs in Oozyten unabhängig von der vorherrschenden Kalziumkonzentration analysiert werden.

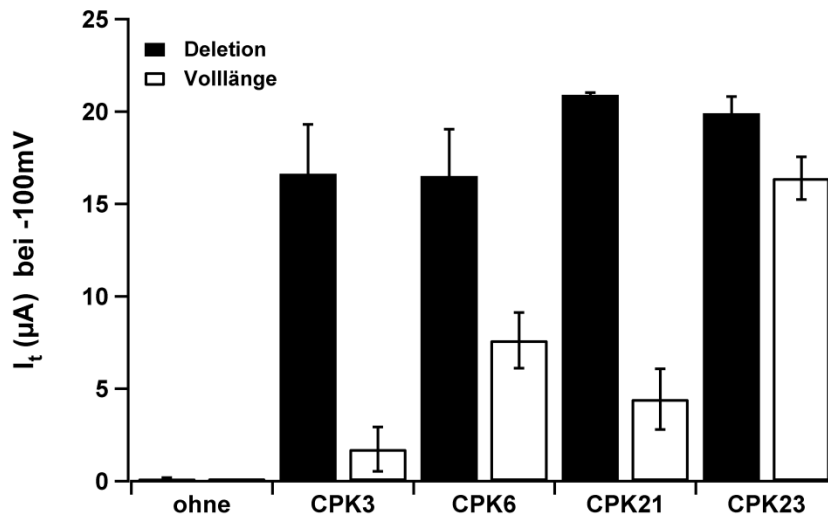


Abbildung 3.2.2.6.a: Deletionsmutanten der CPKs

Instantane Ströme von Oozyten, die SLAC1 zusammen mit den Vollängen, oder den konstitutiv aktiven Deletionsmutanten der CPKs 3, 6, 21 und 23 exprimierten. Bei den beiden CPKs 3 und 21 wurden die Anionenströme durch die Deletion der EF-Hände deutlich gesteigert. CPK23 hingegen war bereits als Volllänge nahezu zu 100 % aktiv. Die Ströme wurden in Standard-Badlösung bei -100 mV gemessen (n = 5).

Um die Kalziumabhängigkeit der, mit SLAC1 interagierenden (Abbildung 3.2.2.1.a), CPKs zu untersuchen, wurde die SLAC1-Aktivierung durch die Vollängen (weiße Balken) und Deletionsmutanten (schwarze Balken) der CPK3, 6, 21 und 23 dargestellt. Wie bereits gezeigt (3.2.2.2) ist die Aktivierung der Anionenströme durch die CPK23 am stärksten ausgeprägt. Bei den CPKs 3 und 21 fällt diese Aktivierung um etwa 82 % geringer aus. Vergleicht man aber diese Vollängen-Kinasen mit den entsprechenden Deletionsmutanten, so fällt sofort auf, dass die Steigerung der Anionenströme bei der CPK23 del nur gering ausfällt, während eine deutliche Steigerung auf etwa das 9,6fache für CPK3, das 4,8fache für CPK21 und das doppelte für CPK6 durch deren Deletion zu beobachten ist. Vermutlich bewirkt die zytoplasmatische Ca^{2+} Konzentration der Oozyten bereits eine hohe Kinaseaktivität bei der CPK23 und eine halbmaximale Aktivität für CPK6. Die Kinasen CPK3 und 21 benötigen hingegen eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration, um voll aktiv zu werden. Die Tatsache, dass SLAC1 nicht von der CPK31 phosphoryliert wurde ist allerdings nicht in ihrer Ca^{2+} Abhängigkeit begründet, da auch deren Deletionsmutante es nicht vermag SLAC1 zu aktivieren (Daten nicht gezeigt). Weitere Untersuchungen zur Ca^{2+} Abhängigkeit der CPK Kinasen erweisen sich allerdings im lebenden System der *Xenopus* Oozyten als schwierig. Daher erfolgte eine genauere Bestimmung dieser Ca^{2+} Abhängigkeit der CPK Kinasen unter den

kontrollierten Bedingungen der *in vitro* Kinase Assays. Durch den Einsatz der rekombinanten Proteine und verschiedener Kinasepuffer konnten definierte Ca^{2+} Konzentrationen von 0 – 5 μM getestet werden (Abschnitt 2.9.3).

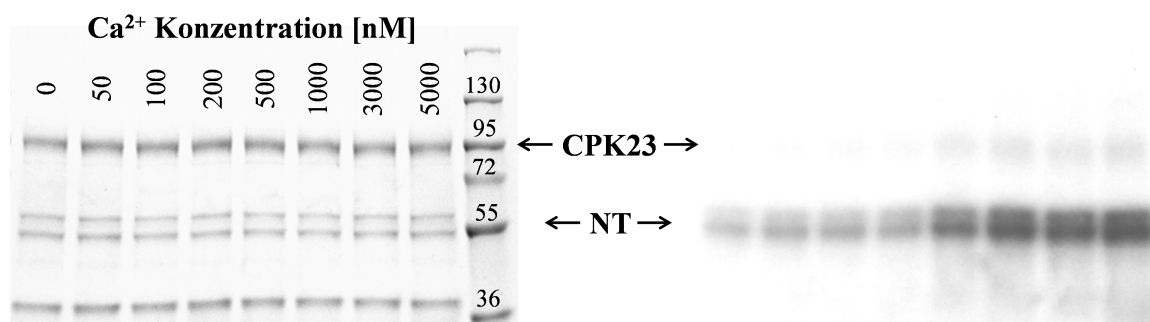


Abbildung 3.2.2.6.b: Ca^{2+} Abhängigkeit der CPK23

In vitro Kinase Assay mit den rekombinanten Proteinen SLAC1 NT (AS 1 – 186) und CPK23 unter definierten Ca^{2+} Konzentrationen. Links ist das Coomassie gefärbte Gel der Reaktionen gezeigt und rechts dessen Autoradiogramm. Die Größe des Markers ist in kD angegeben. Die Pfeile zeigen die Position der einzelnen Proteine an. In den Reaktionen wurden verschiedene Ca^{2+} Konzentrationen eingesetzt, wie sie über den einzelnen Spuren links verdeutlicht sind.

In diesem *in vitro* Kinase Experiment wurde der SLAC1 N-Terminus durch CPK23 in Anwesenheit verschiedener Ca^{2+} Konzentrationen phosphoryliert. Die unterschiedlichen Konzentrationen sind oben links über den einzelnen Spuren dargestellt. Durch den geschickten Einsatz eines Master-Reaktionsansatzes konnte gewährleistet werden, dass in jedem der 8 Ansätze konstante Proteinmengen enthalten waren. Dies wurde zudem auf dem Coomassie gefärbten SDS Gel (links) überprüft. Rechts daneben ist das Autoradiogramm des SDS-Gels gezeigt. Hier ist deutlich zu erkennen, wie die Kinaseaktivität mit steigender Ca^{2+} Konzentration zunimmt. Dabei konnte nicht nur ein Anstieg in der SLAC1 NT Phosphorylierung beobachtet werden, sondern im gleichen Maß nahm auch die Autophosphorylierung der CPK23 zu. Die Phosphorylierungsintensität wurde, wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben, quantifiziert. Zur Normierung der einzelnen Experimente wurden die Aktivitäten der einzelnen CPKs auf ihren jeweils höchsten Wert normiert und gegen die entsprechenden Ca^{2+} Konzentrationen aufgetragen.

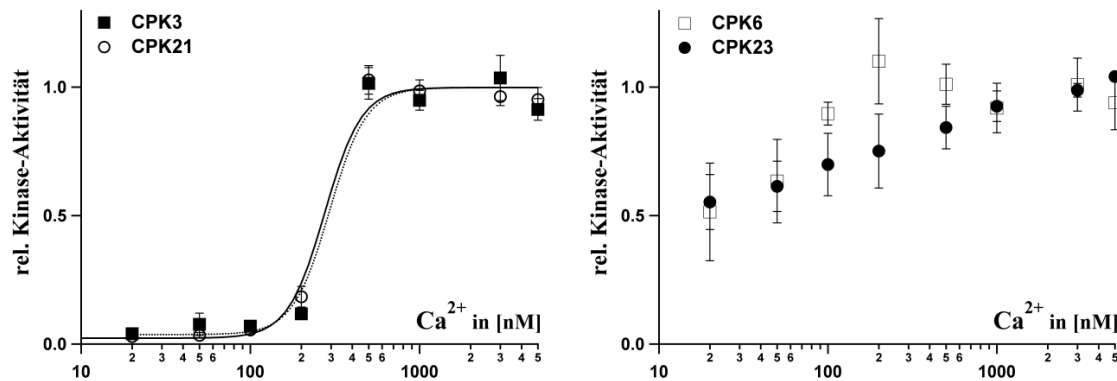


Abbildung 3.2.2.6.c: Vergleich der Ca²⁺ abhängigen Kinaseaktivität von CPK3, 6, 21 und 23

In vitro Phosphorylierungs-Aktivität von CPK3 und 21 (links) und CPK 6 und 23 (rechts) gegen SLAC1 NT in Abhängigkeit von verschiedenen Kalziumkonzentrationen. Die Ca²⁺-Abhängigkeit der CPK3 und 21 Kinaseaktivitäten konnte durch eine 4fache Hill-Funktion beschrieben werden. Im Gegensatz dazu zeigten die CPK6 und 23 eine 60 %ige Basisaktivität und nur eine gering Ca²⁺ abhängige SLAC1 NT Phosphorylierung ($n \geq 4$).

Im Gegensatz zur stark Ca²⁺-abhängigen Phosphorylierung des N-Terminus von SLAC1 durch CPK3 und 21 (links), zeigten identische Versuche eine hohe Basisaktivität der CPK6 und 23 selbst in nominell Ca²⁺-freier Umgebung (rechts). Eine Steigerung der Ca²⁺ Konzentration resultierte nur in einer Verdopplung der Kinaseaktivität bei CPK6 und CPK23. Dagegen konnten die starken Ca²⁺-Abhängigkeiten der CPK3 und CPK21 sehr gut mit einer Hillfunktion und einem Hillfaktor von vier beschrieben werden. Der Hillfaktor von vier deutet auf die Anwesenheit von vier Ca²⁺ Bindestellen hin, was sehr gut mit dem Vorhandensein von vier Ca²⁺-bindenden EF-Händen im C-terminus von CPK Kinasen korreliert (Abschnitt 1.4.2.1). Die halbmaximale Aktivität der CPK21 wurde bei einer Ca²⁺ Konzentration von $274,9 \pm 27$ nM erreicht ($n \geq 3$) und liegt damit leicht über der zytosolischen Ca²⁺ Konzentration im Ruhezustand von eukariotischen Zellen (Takahashi et al. 1987). Die Kinase CPK3 verhielt sich ähnlich: Sie besaß eine Basisaktivität von weniger als 4% ihrer Maximalaktivität und eine halbmaximale Aktivität bei einer Ca²⁺ Konzentration von $293,18 \pm 42,8$ nM ($n \geq 3$). Damit weisen diese beiden CPKs starke Ca²⁺ Abhängigkeiten auf (links). Bis zu einem Schwellenwert von etwa 100 nM ist nur eine sehr geringe Basisaktivität vorhanden. Mit zunehmender Ca²⁺ Konzentration stieg die Kinaseaktivität schnell an und erreichte bei 500 nM Ca²⁺ ihr Maximum. Diese Werte stützen die Theorie der kooperativen Kalziumbindung, wie sie von Lee gezeigt wurde (Lee et al. 1998)(Abschnitt 1.4.2.1). Bei den Kinasen CPK6 und CPK23 ist hingegen eine deutlich weniger ausgeprägte Ca²⁺ Abhängigkeit zu

verzeichnen. CPK23 wies bereits bei nominell Ca^{2+} -freier Umgebung eine hohe Basisaktivität von 42% auf. Dann stieg diese Aktivität mit Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration konstant an. Deshalb werden die Kinasen CPK6 und CPK23 im Folgenden als schwach Ca^{2+} abhängige Kinasen bezeichnet obwohl sie aufgrund ihrer Struktur als Ca^{2+} -abhängige Kinase der CPK Familie klassifiziert wurden.

Mit diesen Erkenntnissen lassen sich die TEVC-Daten der *Xenopus* Oozyten genauer interpretieren (Abbildung 3.2.2.6.b). Hier konnten die Wildtyp Kinasen CPK3 und CPK21 SLAC1 nur zu etwa 18% gegenüber ihren deletierten Mutanten aktivieren (Abbildung 3.2.2.6.a). Diese geringe Aktivität ist auf die niedrige endogene Kalziumkonzentration von ungefähr 100nM in den Oozyten zurückzuführen (Takahashi et al. 1987). Diese Konzentration liegt deutlich unter der, die für die halbmaximale Aktivität der Kinasen benötigt wird. Im Vergleich zu diesen stark Ca^{2+} abhängigen Kinasen zeigen die schwach Ca^{2+} abhängigen CPK6 und CPK23 in den TEVC Experimenten eine deutlich größere SLAC1-Aktivierung. Dies ist dadurch zu erklären, dass diese beiden Kinasen mit etwa 100nM schon mehr als ihre halb-maximale Aktivität aufweisen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass SLAC1 auf einem Ca^{2+} unabhängigen Weg durch die Kinase OST1 phosphoryliert wird. Die schwach Ca^{2+} abhängige Phosphorylierung durch die Kinasen CPK6 und 23 und stark Ca^{2+} abhängig Phosphorylierung durch die Kinasen CPK3 und 21 markieren einen zweiten Ca^{2+} abhängigen Weg bei der Aktivierung von SLAC1. Dennoch scheint die Kinase CPK23 eine hervorragende Funktion bei der Ca^{2+} vermittelten SLAC1-Aktivierung einzunehmen, da ihre knock out Mutante kaum Ca^{2+} induzierte Anionenströme aufwies (Abschnitt 3.2.2.3). Weiterhin bestätigen die BIFC- und TEVC-Experimente CPK23 als stärksten Aktivator von SLAC1 unter den getesteten CPKs.

Dennoch müssen diese Kinasen zusätzlichen Regulationsmechanismen unterliegen, da zum Beispiel OST1 und CPK23 mit ihrer hohen Basisaktivität, auch ohne die ABA induzierte zytosolische Ca^{2+} Erhöhung, SLAC1 aktivieren würden.

3.3 Regulation der ABA-abhängigen Aktivierung von SLAC1

Für diese übergeordnete Regulation wurden die Phosphatasen der PP2C-Familie in Betracht gezogen.

Bislang konnten wir zeigen, dass SLAC1 durch die Kinasen OST1 und CPK23 aktiviert werden kann. Diese Kinasen müssen allerdings einer übergeordneten Regulation unterliegen, um zu vermeiden, dass der Schließzell-spezifische Anionenkanal konstitutiv aktiv ist. Es wurde gezeigt, dass SLAC1 nur beim Stomaschluss aktiviert wird, um durch den Efflux von Anionen das osmotische Potential herabzusetzen und gleichzeitig das Membranpotential zu depolarisieren. Abiotische Stressfaktoren, wie z.B. Trockenheit, induzieren die Aktivität von S-Typ Anionenkanälen durch die Synthese des Phytohormons ABA (Abschnitt 1.3). In diesem ABA-Signaltransduktionsweg, sind bereits die beiden PP2C-Phosphatasen als wichtige negativ-regulierende Komponenten beschrieben worden. Mutanten der PP2C-Phosphatasen, *abi1-1* und *abi2-1*, sind ABA insensitiv und zeigen deshalb einen verminderten Stomaschluss nach ABA-Gabe (Koornneef et al. 1984; Leung et al. 1994; Leung et al. 1997; Meyer et al. 1994; Roelfsema & Prins 1995). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die ABA vermittelte SLAC1 Aktivierung durch OST1 in diesen Mutanten abgeschwächt ist (Mustilli et al. 2002). Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass die Phosphatase ABI1 einen negativen Regulator der OST1 vermittelten SLAC1 Aktivierung repräsentiert. Da ABI1 in Schließzellen exprimiert wird (3.1), wurden zunächst Interaktionsstudien zwischen den SLAC1 aktivierenden Kinasen und ABI1 durchgeführt.

3.3.1 ABI interagiert sowohl mit OST1 als auch mit CPK23

In diesen BIFC Experimenten wurde die Interaktion zwischen der Ca^{2+} unabhängigen Kinase OST1 und Mitgliedern der PP2C Phosphatase Familie untersucht.

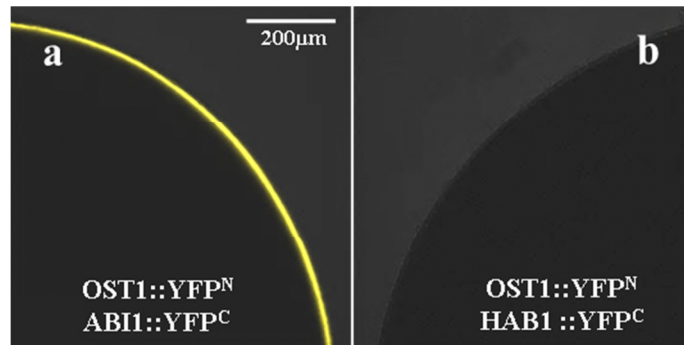


Abbildung 3.3.1.a: BIFC zwischen OSI1 und PP2Cs

Interaktion zwischen OST1::YFP^N und den Phosphatasen ABI1::YFP^C (Bild a) und HAB1::YFP^C (Bild b) in *Xenopus* Oozyten. Die detektierte Fluoreszenz wurde durch den gelben Kanal wiedergegeben und konnte ausschließlich zwischen dem OST1 und ABI1 festgestellt werden.

In diesem Experiment wurde OST1::YFP^N mit Mitgliedern der PP2C-Familie in *Xenopus* Oozyten koexprimiert. In Bild (a) ist eine sehr starke BIFC-Interaktionen zwischen OST1 und ABI1 zu erkennen. Vergleichbare Fluoreszenzkomplementation ist bei OST1::YFP^N und ABI2::YFP^C injizierten Oozyten zu beobachten (Bilder nicht gezeigt). **HAB1** (homology to **ABI1**) hingegen ging keine physikalische Wechselwirkung zu OST1 ein (Bild b).

Die deutliche Interaktion zwischen ABI1 und OST1 konnte in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten bestätigt werden.

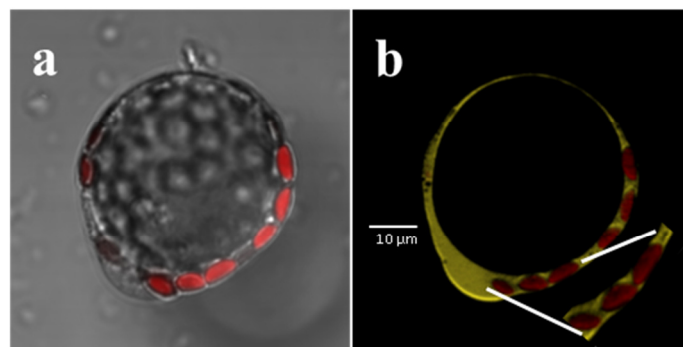


Abbildung 3.3.1.b: Protoplastentransformation

Interaktion von YFP^N::OST1 (Vektor Nr. p02; Abschnitt 2.1.4) mit YFP^C::ABI1 (Vektor Nr. p02) in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten. Im roten Kanal wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz dargestellt. Links ist das Durchlichtbild inklusive rotem Kanal gezeigt, rechts wurde statt des Durchlichts der Gelbe Kanal für die YFP-Fluoreszenz gezeigt.

Nach der Transformation der Protoplasten durch YFP^N::OST1 und YFP^C::ABI1 konnte ebenso wie in Oozyten eine deutliche Fluoreszenzkomplementation beobachtet werden.

Dabei fiel auf, dass ABI1 und OST1 im Zytosol miteinander interagierten, wie man es von zwei zytosolischen Proteinen erwartet (Einschub in b). Zum Vergleich fand die Interaktion von OST1 mit SLAC1 an der Plasmamembran statt (3.2.1.1.b).

Analog zu den Experimenten mit OST1 wurden auch nach Interaktionen der Ca^{2+} abhängigen CPK Kinasen mit PP2C Phosphatasen in *Xenopus* Oozyten gesucht.

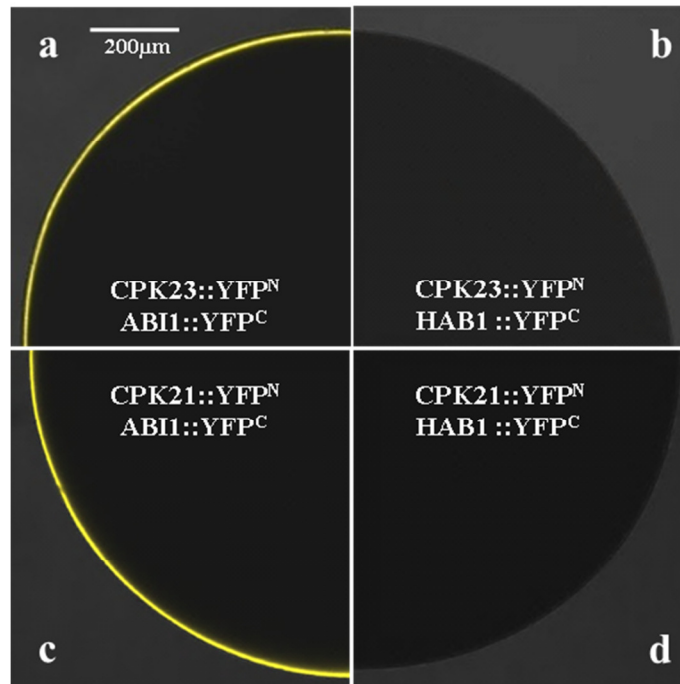


Abbildung 3.3.1.c: BIFC zwischen CPKs und PP2Cs

Interaktionsstudien in Oozyten zwischen CPK23::YFP^N und den Phosphatasen ABI1::YFP^C (Bild a) und HAB1::YFP^C (Bild b) als auch zwischen CPK21::YFP^N und den Phosphatasen ABI1::YFP^C (Bild c) und HAB1::YFP^C (Bild d). Die detektierte Fluoreszenz wurde durch den gelben Kanal wiedergegeben.

Um die übergeordnete Regulation der Ca^{2+} -abhängigen Kinasen zu studieren wurden die beiden CPKs (21 und 23) mit den PP2C-Phosphatasen ABI1 (a, c) und HAB1 (b, d) koexprimiert. In den Bildern a und c ist deutlich die Interaktionen zwischen den Kinasen CPK23 und 21 mit ABI1 zu erkennen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit CPK3 und 6 gewonnen werden (Bilder nicht gezeigt). Interaktionsstudien der CPK Kinasen mit ABI2::YFP^C resultierten in einer ähnlich starken physikalischen Wechselwirkung, wie es bereits mit ABI1 gezeigt werden konnte (Bilder nicht gezeigt). Allerdings war keine der getesteten CPKs in der Lage eine Interaktion zu **HAB1** (homology to **ABI1**) einzugehen (b und d).

3.3.2 ABI1 inhibiert die Aktivierung von SLAC1 durch OST1 und CPK23

Im vorherigen Abschnitt konnten wir zeigen, dass sowohl OST1 als auch die Kinasen aus der Familie der Ca^{2+} -abhängigen Protein Kinasen mit den Phosphatasen ABI1 und ABI2 interagieren. Um die physiologische Relevanz dieser Interaktionen zu klären, wurden die PP2C Phosphatasen, die SLAC1-aktivierenden Kinasen und SLAC1 in *Xenopus* Oozyten in verschiedenen Kombinationen koexprimiert und anschließend elektrophysiologisch untersucht. Um eine stärkere und reproduzierbarere SLAC1-Aktivierung durch OST1 zu erreichen, wurden diese beiden mit komplementären YFP-Hälften fusioniert, wie sie für die BIFC-Experimente verwendet wurden (Abschnitt 3.2.1.1; (SLAC1::YFP^C; Vektor Nr. 18) (OST1::YFP^N; Nr. 20)). Die anderen nativen cDNAs der Phosphatase ABI1, CPK23 und SLAC1, wenn der Anionenkanal mit CPK koexprimiert wurde, befanden sich in den Oozytenexpressionsvektoren Nr. 16 (Tabelle 2.1.4).

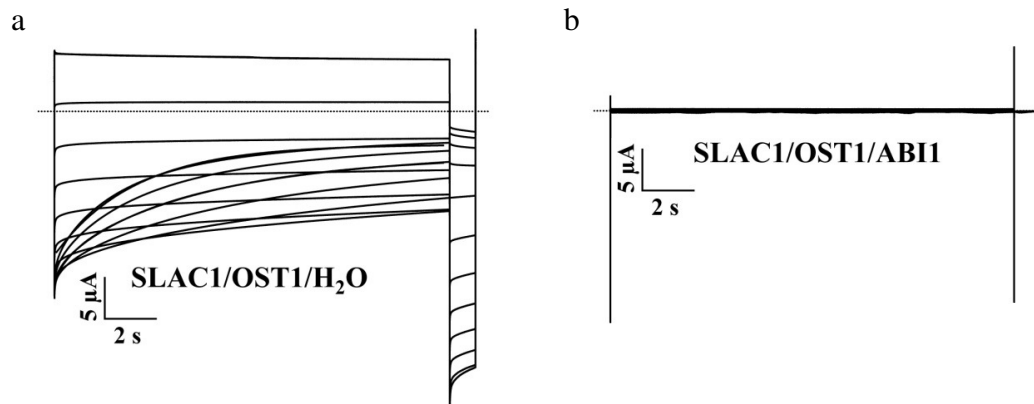


Abbildung 3.3.2.a: ABI1 inhibiert die Aktivierung von SLAC1 durch OST1

Ganzzellströme von *Xenopus* Oozyten in der Standard-Badlösung (30 mM Cl^- , pH 5.6). Es wurde das Spannungsprotokoll, wie im Abschnitt 2.7.4, verwandt, wobei das 15 sekundige 2. Segment von +40 bis -180 mV in 20 mV Schritten durchlaufen wurde. Danach wurde im dritten Segment für 3 Sekunden eine konstante Spannung von -120 mV angelegt. Die Haltespannung betrug 0 mV. Bei den Oozyten, die mit SLAC1- und OST1-cRNA koinjiziert wurden sind die typischen langsam deaktivierenden Anionenströme bei hyperpolarisierenden Spannungen zu verzeichnen (a). Wurde aber ABI1 mit SLAC1 und OST1 koexprimiert (b), so waren diese Anionenströme vollständig inhibiert.

In Abbildung 3.2.2.a ist die bekannte Anionenkanalaktivierung durch die Kinase OST1 zu sehen. SLAC1 vermittelte Anionenströme von etwa $30 \mu\text{A}$ nach Aktivierung durch OST1. Wurde allerdings 24 Stunden zuvor die Phosphatase ABI1 in den Oozyten exprimiert, so bewirkte die anschließende Expression von Kanal und Kinase keinerlei Anionenströme mehr (b). Die Expression von ABI1 alleine hatte ebenfalls keine makroskopischen Anionenströme zur Folge (Daten nicht gezeigt).

Die SLAC1-Aktivierung durch OST1 wird durch die Phosphatase ABI1 vollständig inhibiert. Ebenso verhält es sich bei der Aktivierung von SLAC1 durch die Kinase CPK23. In Anwesenheit von ABI1 blieben die Anionenströme aus.

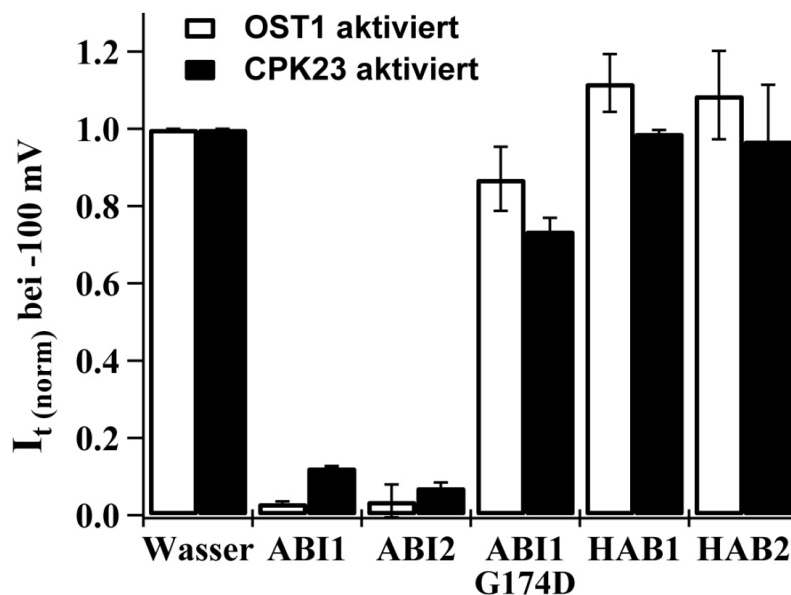


Abbildung 3.3.2.b: Phosphatase-Block der SLAC1-Ströme

Normalisierte instantane-Stromantworten von Oozyten bei -100 mV in der Standard-Badlösung. Die Oozyten wurden mit Wasser oder den cRNAs von ABI1, ABI2, ABI1 G174D, HAB1 und HAB2 vorinjiziert. 24 Stunden später wurden SLAC1 mit der Kinase OST1 (weiße Balken), oder SLAC1 zusammen mit CPK23 (schwarze Balken) in diese Oozyten injiziert. Im Vergleich zu den Wasser injizierten Oozyten war eine deutliche Reduktion der Anionenströme bei ABI1 und 2 exprimierenden Oozyten zu beobachten. Die Expression der anderen Phosphatasen hingegen hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung von SLAC1 ($n \geq 3$).

In diesem Experiment wurden Oozyten mit Wasser oder den verschiedenen PP2C Phosphatasen vorinjiziert. Darunter befand sich auch die Phosphatase-inaktive ABI1 Mutante G174D (Sheen 1998). Diese Mutation hatte allerdings keinen Einfluss auf die Bindung zu den Kinasen, da sie in BIFC-Experimenten eine ebenso deutliche

Fluoreszenzkomplementation zeigte, wie der ABI1 Wild-Typ (Daten nicht gezeigt). 24 Stunden nach der Injektion der Phosphatasen wurde dann SLAC1 zusammen mit OST1 (weiße Balken) oder CPK23 (schwarze Balken) in diese Oozyten koinjiziert. Nach weiteren 2 Tagen konnten dann die S-Typ Anionenströme mit der TEVC Methode charakterisiert werden. Dabei fiel auf, dass im Vergleich zu den Wasser injizierten Oozyten, die Anionenströme bei den ABI1 und ABI2 exprimierenden Oozyten fast vollständig geblockt waren. Diese Inhibierung von SLAC1-vermittelten Strömen durch ABI1/ABI2 fand sowohl bei der Koexpression mit OST1 als auch mit CPK23 statt. Die Phosphatasen HAB1, HAB2 und die inaktive ABI1 G174D beeinflussten die Anionenströme hingegen nicht.

Somit ist festzuhalten, dass die Phosphatasen ABI1 und ABI2 mit den SLAC1 aktivierenden Kinasen interagieren und die Anionenströme inhibieren. Wie dieser Regulationsmechanismus im Detail aussieht, galt es in anschließenden *in vitro* Kinase Experimenten zu untersuchen.

3.3.3 Regulation von SLAC1 durch Kinase/Phosphatase Komplexe

In *in vitro* Kinase Experimenten wurden die rekombinanten Proteine des SLAC1 N-Terminus, der Phosphatase ABI1 und den Kinasen OST1 oder CPK23 eingesetzt. Die Fragestellung lautete hier: Wie ist der ABI1 vermittelte Block der Anionenströme auf molekularer Ebene zu erklären? Inhibiert ABI1 die Aktivität der Kinasen oder dephosphoryliert ABI1 den N-Terminus von SLAC1 und inaktiviert damit den Anionenkanal direkt?

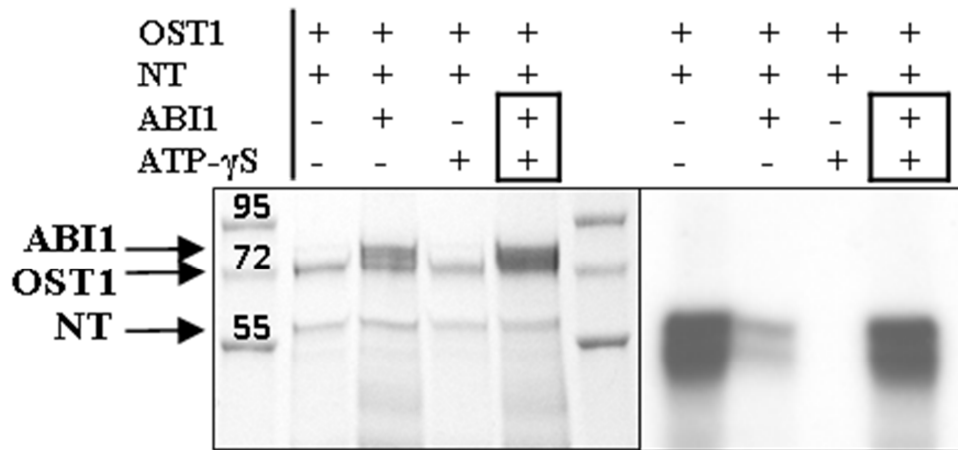


Abbildung 3.3.3.a: ABI1 inhibiert die SLAC1-aktivierende Kinase OST1

Es wurden vier *in vitro* Kinase Reaktionen in OST1-Kinasepuffer durchgeführt und in einem Coomassie gefärbten SDS Gel (links) aufgetragen. Rechts ist das entsprechende Autoradiogramm gezeigt. In der ersten Reaktion (1. Spur) befanden sich SLAC1 NT und die Kinase OST1. Durch das Autoradiogramm ist die Phosphorylierung am SLAC1 NT gut ersichtlich. In der zweiten Spur wurde zusätzlich zum SLAC1 NT und der Kinase OST1 die Phosphatase ABI1 in den Reaktionsansatz gegeben. Diese schwächt die Phosphorylierung am SLAC1 NT deutlich ab. In der dritten Reaktion (3. Spur) wurde ein Überschuss des Kinaseinhibitors (3 mM ATP γ S) anstatt ABI1 zugegeben. Dieser verhindert die Phosphorylierung des SLAC1 NT. Im vierten Ansatz (4. Spur) wurde zuerst SLAC1 NT durch die Kinase OST1 phosphoryliert (wie in Spur 1). Anschließend wurde die Kinase durch ATP γ S inhibiert und die Phosphatase ABI1 zugegeben. In der folgenden 45 minütigen Inkubation konnte im Vergleich zu Spur 1 keine Dephosphorylierung beobachtet werden.

Um diese Fragen zu beantworten, wurde im ersten Reaktionsansatz SLAC1 NT durch die Kinase OST1 phosphoryliert. Im Autoradiogramm dieser Reaktion (rechts) ist dementsprechend in der ersten Spur auch die Phosphorylierung am SLAC1 NT deutlich zu beobachten (siehe auch 3.2.1.5). Fand diese Inkubation allerdings in Anwesenheit der Phosphatase ABI1 statt, so war eine deutlich verminderte Phosphorylierung am SLAC1 NT festzustellen (Spur 2). Dieses Ergebnis passt zu dem ABI1-vermittelten Block der Anionenströme im Oozytensystem, da die Phosphorylierung, die die Aktivierung von SLAC1 auslöst, in Anwesenheit von ABI1 ausbleibt.

Allerdings ist unklar, ob dieses Ergebnis daher rührt, dass ABI1 den SLAC1 NT wieder dephosphoryliert und somit den Gegenspieler der Kinase darstellt, oder ob ABI1 die Autophosphorylierung an OST1 entfernt und somit die Kinase in einen inaktiven Zustand versetzt. Um diese Frage zu klären, wurden zwei weitere Reaktionen durchgeführt. In Spur 3 wurde zu der Reaktion aus SLAC1 und OST1 ein Überschuss des Kinaseinhibitors ATP γ S zugegeben (3 mM ATP γ S zu 100 μ M ATP γ ³²P). Das Autoradiogramm zeigt eindeutig, dass dieses ATP-Analogon die Phosphorylierung von SLAC1 durch OST1 verhindert (Spur3). In der vierten Reaktion wurde nun SLAC1 zunächst von OST1 wie in

Reaktion 1 phosphoryliert. Anschließend wurden ATP γ S und ABI1 zugegeben. Der Kinaseinhibitor verhinderte eine weitere Phosphorylierung durch OST1. Wie im Autoradiogramm allerdings zu erkennen ist, vermag ABI1 in weiteren 45 Minuten nicht eine bereits bestehende Phosphorylierung am SLAC1 NT zu entfernen. Da ABI1 scheinbar nicht direkt SLAC1 dephosphoryliert, ist die verminderte Phosphorylierung aus Spur Nr.2 durch eine Inaktivierung von OST1 durch ABI1 zu erklären. Dieses Ergebnis wird auch durch BIFC-Experimente gestützt, bei denen ABI1 eine starke Interaktion zu OST1 zeigte, wohingegen nur eine schwache Interaktion zu SLAC1 zu beobachten war. Somit scheint ABI1 ein negativer Regulator der Kinase und nicht des Kanals zu sein.

Um herauszufinden, ob die Kinasen der CPK-Familie, in ähnlicher Weise wie OST1, durch ABI1 inhibiert werden können, wurden identische Experimente mit CPK23 wiederholt.

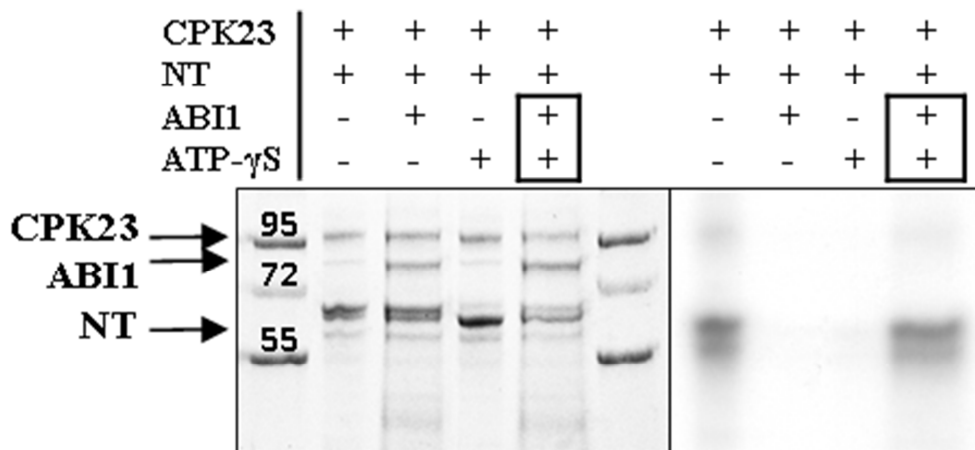


Abbildung 3.3.3.b: ABI1 inhibiert auch die Kinaseaktivität von CPK23

Links befindet sich das Coomassie gefärbte SDS Gel der vier *in vitro* Kinase Reaktionen in CPK-Kinasepuffer und rechts ist das entsprechende Autoradiogramm. Der Aufbau des Experiments und die Beschickung des SDS-Gels war identisch zum Experiment in Abbildung 3.3.3.a. Es wurde lediglich statt OST1 die rekombinante Kinase CPK23 genutzt. Im vierten Ansatz wurde wiederum zuerst SLAC1 NT durch die Kinase CPK23 phosphoryliert (wie in Spur 1) und anschließend wurde CPK23 durch ATP γ S inhibiert und die Phosphatase ABI1 zugegeben. In den folgenden 45 min Reaktionszeit konnte keine deutlich ersichtliche Dephosphorylierung des N-Terminus von SLAC1 beobachtet werden (Vergleich zu Spur 1).

Bei der Phosphorylierung durch die CPK23 ergibt sich des gleiche Bild wie bei OST1. ABI1 und der Kinaseinhibitor ATP γ S verhindern die Phosphorylierung von SLAC1 NT (Spur 2 und 3). Eine bestehende Phosphorylierung kann von ABI1 nicht mehr entfernt werden (Spur 4).

Diese Ergebnisse belegen, dass die Phosphatase ABI1 ein übergeordneter negativer Regulator von OST1 und CPK23 ist und so die Aktivierung von SLAC1 unterbindet.

Dieses Prinzip der Inhibierung der SLAC1 Phosphorylierung durch ABI1 konnte auch für die CPK Kinasen 3, 6 und 21 bestätigt werden.

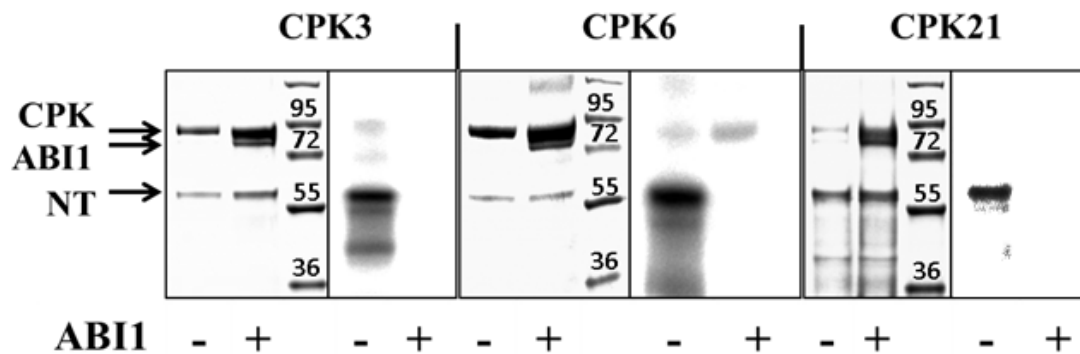


Abbildung 3.3.3.c: ABI1 Effekt auf die Kinaseaktivität von CPK3, 6 und 21

In dieser Abbildung ist die Phosphorylierung am SLAC1 NT durch die Ca^{2+} abhängigen Kinasen CPK3, 6 und 21 in Ab- (-) oder Anwesenheit (+) der Phosphatase ABI1 in CPK Kinasepuffer dargestellt. Links befindet sich jeweils das Coomassie gefärbte SDS Gel und rechts ist das entsprechende Autoradiogramm. In der ersten Spur wurde immer der Reaktionsansatz aus SLAC1 NT und der jeweiligen CPK aufgetragen. In der zweiten Reaktion/Spur wurde die Phosphatase ABI1 hinzugefügt. Die Autoradiogramme der Reaktionen (jeweils rechts vom SDS-Gel) zeigen in der ersten Spur die Phosphorylierung am SLAC1 NT. In der zweiten Spur wurde die Phosphorylierung durch ABI1 verhindert.

In diesen Experimenten wurde SLAC1 NT mit den CPKs 3, 6 oder 21 in *in vitro* Kinase Assays eingesetzt. Dabei fand die Reaktion in Ab- und Anwesenheit von ABI1 statt. An den Autoradiogrammen (jeweils rechts neben dem entsprechenden Coomassie-Gelbild) ist zu erkennen, dass jede der eingesetzten Kinasen in der Lage war, SLAC1 zu phosphorylieren. Darüber hinaus wurde jede dieser Phosphorylierungen effektiv von ABI1 verhindert. Interessanterweise scheint ABI1 die Autophosphorylierung der CPK3 zu inhibieren. Bei der CPK6 hingegen ist diese Autophosphorylierung eher verstärkt. Dennoch wird SLAC1 NT von beiden Kinasen nicht in Anwesenheit von ABI1 phosphoryliert. Somit scheint ABI1 alle SLAC1 aktivierenden Kinasen zu inhibieren, was durch BIFC-Interaktionsexperimente zwischen den Kinasen und ABI1 in Oozyten unterstützt wird (Abschnitt 3.3.1).

Damit besetzt die Phosphatase ABI1 scheinbar eine Schlüsselposition in der Regulation von SLAC1. Wie bereits in Abschnitt 1.3 erwähnt, werden S-Typ Anionenkanäle wie zum Beispiel SLAC1 durch das Trockenstress Phytohormon ABA beim Stomaschluss aktiviert. Unsere bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kinasen der CPK-Familie und OST1 zu einer Aktivierung von SLAC1 durch eine Phosphorylierung beitragen. Die Aktivität dieser Kinasen ist wiederum durch die PP2C Phosphatase ABI1 negativ reguliert. Es stellt sich nun die Frage, wie diese ABA-Signaltransduktionskette ABA-abhängig reguliert wird. Erst kürzlich konnte ABI1 als direkter Interaktionspartner des ABA-Rezeptors RCAR1 identifiziert werden (Nishimura et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus ABA-Rezeptor und ABI1 in Gegenwart von ABA zur Inhibierung der ABI1 Phosphataseaktivität führt. Um nun den kompletten ABA-Signaltransduktionsweg von der Wahrnehmung von ABA bis zur Aktivierung von SLAC1 zu rekonstruieren, wurden wiederum *in vitro* Kinase Experimente zur Hilfe genommen. Unterschiedliche Kombinationen der vier beteiligten rekombinant hergestellten Signaltransduktions-komponenten, ABI1, RCAR1, OST1/CPK23 und SLAC1 NT, wurden zu diesem Zweck in *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen vereinigt und in An- und Abwesenheit von ABA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

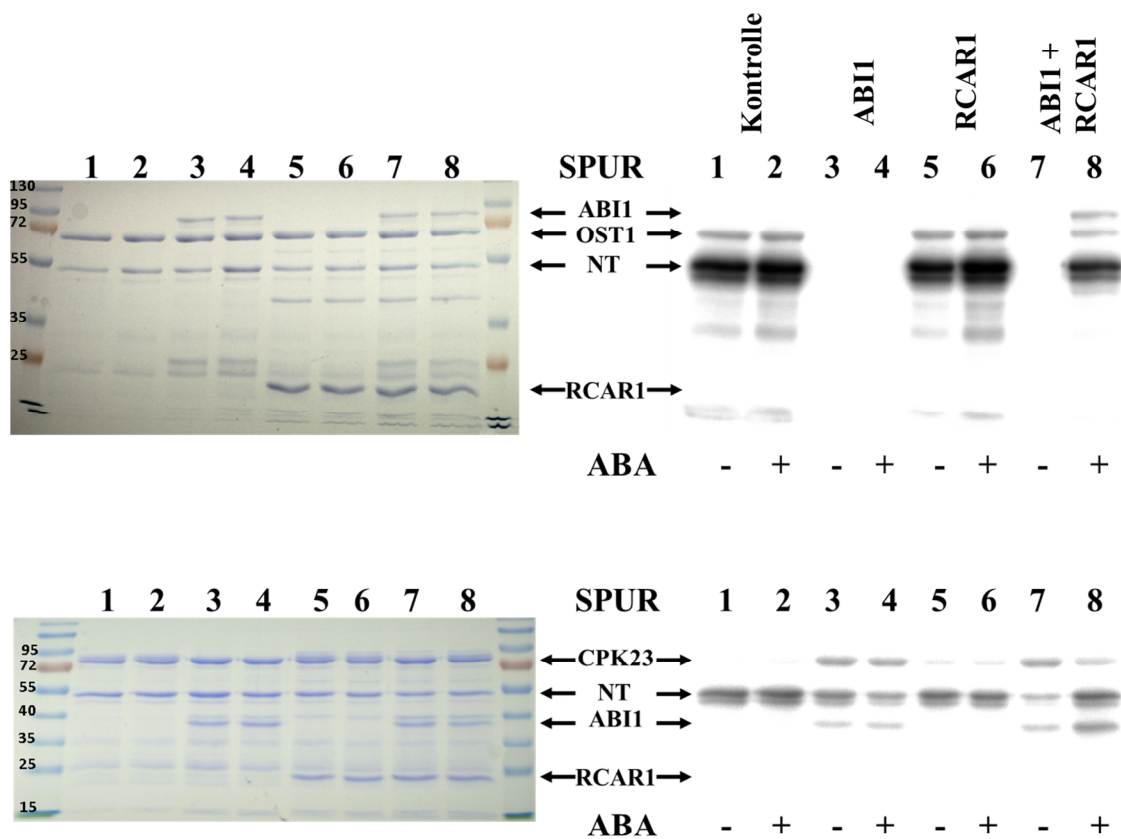


Abbildung 3.3.3.d: Rekonstruktion des ABA-Signaltransduktionsweges

Diese Abbildung setzt sich aus zwei getrennten Experimenten zusammen. Im oberen Teil wurde die ABA-abhängige Phosphorylierung von SLAC1 durch OST1 untersucht. Im unteren Experiment wurde der identische Versuch mit der Kinase CPK23 anstatt OST1 durchgeführt. Links ist jeweils das Coomassie gefärbte SDS Gel dargestellt und rechts das entsprechende Autoradiogramm. In jeder Reaktion wurde die Phosphorylierung am SLAC1 NT durch die jeweilige Kinase im RCAR-Kinasepuffer untersucht. In den Kontrollreaktionen in Spur 1 und 2 ist Phosphorylierung des N-Terminus von SLAC1 durch OST1 bzw. CPK23 in An- und Abwesenheit von ABA dokumentiert. Fügt man zusätzlich ABI1 zu den Phosphorylierungsreaktionen hinzu (Spur 3 und 4), so war eine Reduktion der Phosphorylierungsaktivität zu erkennen, die jedoch unabhängig von ABA war. Dabei war ABI in dem oberen Experiment mit einem GST-Tag versehen (so wie auch SLAC1 NT und die Kinasen) und in dem unteren Experiment wurde ABI1 mit einem HIS-Tag verwendet. In Spur 5 und 6 wurde anstatt ABI1 der ABA-Rezeptor RCAR1 zusammen mit der Kinase und dem SLAC1 NT inkubiert. RCAR1 hatte keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad des SLAC1 NT und verlieh der Phosphorylierungsreaktion auch keine ABA-Abhängigkeit. In den Spuren 7 und 8 waren alle vier rekombinanten Proteine in einem Reaktionsansatz enthalten. In Abwesenheit von ABA wurde die Phosphorylierung von SLAC1 NT gemindert im Vergleich zur Kontrollreaktion in Spur 1. Fügt man jedoch ABA zur Reaktion hinzu, so konnte man eine starke Phosphorylierung am SLAC1 NT feststellen. (- = 0 ABA, + = 125 μ M S-ABA).

Als Kontrollreaktionen dieser Experimente wurde wiederum der N-Terminus von SLAC1 mit der Kinase OST1 (oben) oder CPK23 (unten) in An- und Abwesenheit von ABA inkubiert. In den Autoradiogrammen (rechts) war kein Einfluss von ABA auf die

Phosphorylierungs-Intensität des SLAC1 NT ersichtlich. Somit wirkt das Phytohormon nicht direkt auf die Kinaseaktivität von OST1 oder von CPK23.

Bei den Reaktionen 3 und 4 (in den Spuren 3 und 4) befand sich zusätzlich die Phosphatase ABI1 in der Reaktion. Wie bereits gezeigt (siehe auch Grafik 3.3.3.a und b), verhindert ABI1 die Phosphorylierung von SLAC1. Allerdings war diese Reaktion auch völlig unabhängig von der Anwesenheit von ABA. Interessanterweise scheint ABI1 aber die Autophosphorylierung von OST1 zu inhibieren und die der CPK23 zu verstärken.

Bei den Ansätzen 5 und 6 wurde anstatt ABI1 der ABA-Rezeptor RCAR1 zugegeben. Dieser beeinflusst die Phosphorylierung weder in Ab- noch in Anwesenheit von ABA.

Im Ansatz Nr. 7 und 8 befanden sich alle vier Signaltransduktionskomponenten, SLAC1 NT, Kinase, ABI1 und RCAR1. In Spur 7 wurde wie in den Reaktionsansätzen 3 und 4 durch ABI1 die Autophosphorylierung von OST1 inhibiert, die der CPK23 verstärkt und die Phosphorylierung des N-Terminus von SLAC1 abgeschwächt. Wird diesem Reaktionsansatz allerdings ABA zugegeben (Spur 8), so ist eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung am SLAC1 NT zu beobachten. Die inhibierende Wirkung von ABI1 auf die Phosphorylierung von SLAC1 NT wird durch ABA in Kombination mit dem ABA-Rezeptor RCAR1 gänzlich aufgehoben. Zudem ist in beiden Fällen eine verstärkte Phosphorylierung von ABI1 durch die Kinasen in Anwesenheit von RCAR1 und ABA zu beobachten.

In diesen Experimenten ist es gelungen die ABA Signaltransduktionskette beginnend mit der ABA Perzeption bis hin zum Stomaschluss erfolgreich nachzustellen. Die Phosphatase ABI1 inhibiert sowohl die Kinase OST1, als auch CPK23. Durch abiotische Stressfaktoren, wie zum Beispiel Trockenheit steigt die ABA Konzentration in den Schließzellen an. Das Hormon bindet an den Rezeptor RCAR1, der daraufhin die Phosphatase ABI1 inhibiert. Ohne den negativen Einfluss von ABI1 werden die Kinasen aktiv und phosphorylieren den Anionenkanal, der seinerseits durch die Phosphorylierung aktiviert wird und den Stomaschluss initiiert.

4 Diskussion

Seitdem Pflanzen die Landflächen besiedeln, sind sie gezwungen, einen Kompromiss zwischen CO_2 Aufnahme und dem damit verbundenen Wasserverlust einzugehen. Da die Kutikula der Blätter für diese beiden Stoffe nahezu impermeabel ist, findet ihr Austausch über die Stomata statt. Durch eine ausgefeilte Regulation der Stomaöffnungsweite wird eine möglichst effektive CO_2 Aufnahme unter Berücksichtigung des Wasserverlustes gewährleistet. Die Stomata und ihre Bewegung sind Mittelpunkt intensiver Forschungen seit mehreren hundert Jahren (Malpighi 1675). Die Bemühungen die Stomaregulation zu verstehen und in Bezug auf verschiedenste Stimuli zu entschlüsseln, führten zu immer größeren und komplexeren Modellen.

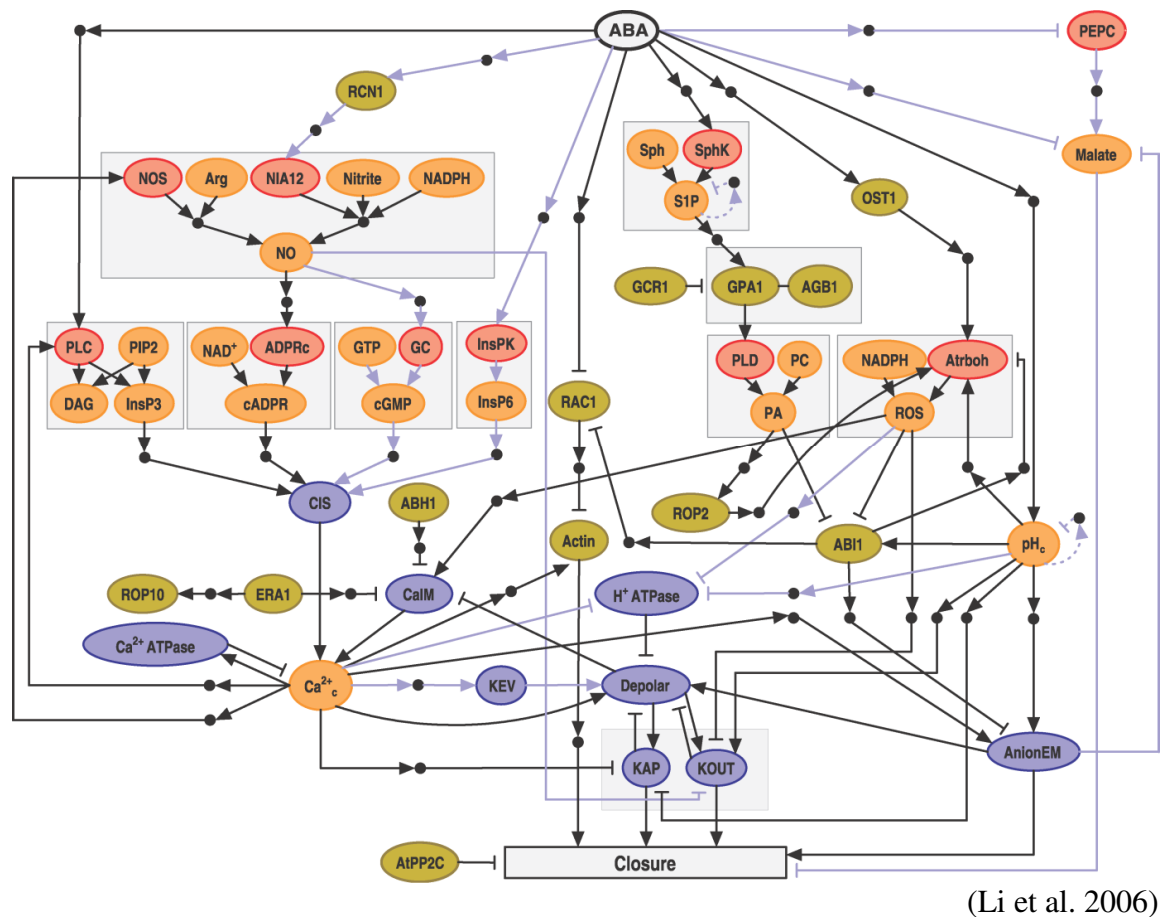


Abbildung 4.1: Bisheriges Verständnis der ABA Signaltransduktion

In diesem Modell ist das bisherige Modell der ABA Signaltransduktion in Schließzellen beginnend mit dem Stresshormon ABA und endend mit dem Stomaschluss dargestellt (Li et al. 2006). Die Farben der beteiligten Komponenten verdeutlichen deren Funktion. Enzyme sind in rot dargestellt, Signaltransduktionsproteine in grün, Transporter in blau und second Messenger in orange. Pfeile bedeuten Aktivierung und T-Striche stehen für Inhibierung.

4.1 ABA vermittelt den Stomaschluss

Ausgangspunkt vieler Signaltransduktionskaskaden ist dabei das Phytohormon ABA, welches unter Anderem den Stomaschluss bei Trockenheit bewirkt. Bereits in den späten sechziger Jahren entdeckte man, dass ABA die Transpiration herabsenkt (Little & Eidt 1968; Mittelhe & Vansteve 1969; Wright & Hiron 1969). Dabei unterteilt sich der ABA-Effekt in einen langsamen und einen schnellen Signaltransduktionsweg. In der langsamen ABA Antwort findet die Regulation von ABA-kontrollierten Genen durch Steigerung oder Inhibition deren Transkription statt. Diese Reaktion benötigt mehrere Minuten (Becker et al. 2003; Ghelis et al. 2000; Jeannette et al. 1999). Die schnelle Reaktion auf ABA geschieht im Zytosol der Schließzellen und führt nahezu ohne zeitliche Verzögerung zu einer Aktivierung von Anionenströmen (Levchenko et al. 2005). Diese Anionenströme initiieren den Stomaschluss, da sie die Schließzellen depolarisieren und zu einem Verlust von osmotisch aktiven Anionen führen (Roelfsema & Hedrich 2005). Die schnelle ABA gesteuerte Aktivierung der Anionenströme erfolgt dabei über einen Ca^{2+} unabhängigen und einen Ca^{2+} abhängigen Weg, da ABA auch zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führt (Hedrich et al. 1990; Hetherington & Brownlee 2004; Levchenko et al. 2005; Linder & Raschke 1992; Marten et al. 2007; Schroeder & Hagiwara 1989; Schroeder & Keller 1992; Siegel et al. 2009). Allerdings kann man den ABA-ausgelösten Kalziumanstieg nicht immer beobachten (Allen et al. 1999; Gilroy et al. 1991; Irving et al. 1992; Levchenko et al. 2005; Marten et al. 2007; Mcainsh et al. 1990; Schroeder & Hagiwara 1990). Dennoch erfolgt der ABA-vermittelte Stomaschluss auch in der Schließzell-Fraktion, die nicht mit einem Kalziumanstieg auf das Phytohormon reagiert (Levchenko et al. 2005). Im Gegensatz zu ABA führt auch eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration zum Stomaschluss durch Anionenkanalaktivierung (Gilroy et al. 1991; Gilroy et al. 1990; Schroeder & Hagiwara 1989). Diese geringe Kopplung zwischen dem ABA induzierten Stomaschluss und der Ca^{2+} Erhöhung nach ABA Gabe impliziert einen Kalzium unabhängigen Signaltransduktionsweg in der ABA Signalkaskade (Allan et al. 1994).

4.2 SLAC1 ist essentiell für den Stomaschluss

Diese Anionenströme, die den Stomaschluss initiieren, lassen sich entsprechend ihrer Kinetik bei der Aktivierung und Deaktivierung in schnelle R-Typ Anionenströme (Hedrich et al. 1990; Keller et al. 1989; Linder & Raschke 1992) und langsame S-Typ Anionenströme (Linder & Raschke 1992; Schroeder & Hagiwara 1989; Schroeder & Keller 1992) aufteilen. Im Laufe dieser Dissertation konnte von zwei unabhängigen Laboren SLAC1 als Bestandteil oder regulatorische Komponente des S-Typ Anionenkanals in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). In SLAC1 Verlustmutanten ist die Stomaschlussreaktion von intakten Pflanzen stark abgeschwächt und Stomata in Epidermispräparaten schließen kaum mehr nach der Applikation von ABA (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Bei der Suche nach homologen Proteinen im Genom von *Arabidopsis thaliana* konnten 3 weitere Verwandte von SLAC1 gefunden werden, die, wie SLAC1, eine schwache Homologie zu bakteriellen und pilzlichen Dicarboxylat/Malat Transportern aufweisen (Negi et al. 2008). Diese wurden als SLAC1 Homologe (SLAHs) benannt und gehören zusammen mit SLAC1 zu der SLAC1/SLAH Familie. Allerdings wurde postuliert, dass diese Homologen SLAH1-3 nicht in Schließzellen vorkommen (Negi et al. 2008). Allein SLAC1 wird spezifisch in Schließzellen exprimiert und ist dort an der Plasmamembran lokalisiert (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Allerdings konnte zunächst die Funktion von SLAC1 nicht gezeigt werden, da weder die Bemühungen einen Malattransport-defizienten Hefestamm (*mae1*) oder einen *E. coli* Stamm, durch die Transformation mit dem SLAC1 Gen zu komplementieren, sowie die heterologe Expression und elektrophysiologische Untersuchung von SLAC1 in *Xenopus* Oozyten fehl schlugen. Beide Autoren erklären dies durch das Fehlen wichtiger Regulatorischer Komponenten (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Durch Experimente mit Kinase- und Phosphatase-Inhibitoren konnte schon früher gezeigt werden, dass De- und Phosphorylierungsereignisse die Kanalaktivität beeinflussen (Li et al. 2000; Mori et al. 2006; Schmidt et al. 1995).

Somit war das Ziel dieser Arbeit Interaktionspartner von SLAC1 zu finden, dessen Regulation durch diese Interaktoren zu beleuchten und seine molekulare Funktion zu zeigen.

4.3 Identifizierung von SLAC1-Interaktionspartnern

Dazu wurde zunächst mittels quantitativer real time PCR in Schließzellen nach Transkripten von Kinasen und Phosphatasen gesucht, von denen bereits eine Einflussnahme auf die ABA Signaltransduktion gezeigt werden konnte (Abbildung 3.1). Die Daten der real time PCR Messungen wurden von Frau Melanie Papenfuß generiert. In Übereinstimmung mit seiner putativen Funktion konnten SLAC1 Transkripte spezifisch in Schließzellen und nicht in Mesophyllzellen gefunden werden (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Des Weiteren wurde die ABA aktivierte, Ca^{2+} unabhängige Proteinkinase OST1 (SnRK2.6) fast ausschließlich in Schließzellen exprimiert. Zudem wurden ubiquitär exprimierte Ca^{2+} abhängige Kinasen der CPK Familie und eine Phosphatase der PP2C Familie (ABI1) auch in Schließzellen gefunden. Diese Daten bestätigen frühere Lokalisationsstudien von OST1 (Mustilli et al. 2002), CPK3 und CPK6 (Mori et al. 2006). Weiterhin konnten die an der Stomaregulation beteiligten Kinasen CPK4 und 11 (Zhu et al. 2007)(Abbildung 4.2) in Schließzellen nachgewiesen werden. Transkripte der beiden nahe verwandten und an der ABA-Signaltransduktion beteiligten CPK21 und 23 (Franz et al. 2011; Ma & Wu 2007) wurden ebenfalls in den Schließzellen von *Arabidopsis* gefunden (Abbildung 3.1). Ebenso wie diese Kinasen wurde auch die Phosphatase ABI1 im gleichen Gewebe exprimiert (Kreps et al. 2002) (Abbildung 3.1). Daher wurden mit anschließenden BIFC Experimenten in *Xenopus* Oozyten in den Familien der SnRKs, CPKs und PP2Cs nach Interaktionspartnern von SLAC1 gesucht. Hier zeigten sich die stärksten Interaktionen zwischen SLAC1 mit OST1 (Abbildung 3.2.1.1.a) und SLAC1 mit CPK23 (Abbildung 3.2.2.1.a). Die Interaktion von OST1 und SLAC1 wurde zeitgleich von Lee et al in yeast-two-hybrid Experimenten gezeigt (2009). Beide Kinasen bevorzugten zudem für ihre Interaktion den N-terminalen Bereich von SLAC1 gegenüber seinem C-terminalen Bereich (Abbildung 3.2.1.1.c und 3.2.2.1.b). Um diese Interaktionen auch *in planta* zu bestätigen, wurden die BIFC-Versuche in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten wiederholt (Abbildung 3.2.1.1.b und 3.2.2.1.c). Zusätzlich konnte die Interaktion von CPK23 zu SLAC1 NT durch *in planta* pull down Experimente im Labor von Tina Romeis (Institut für Pflanzen-Biochemie, Freie Universität Berlin) belegt werden. Bei der Aufreinigung von CPK23 aus Mesophyllprotoplasten, fand man auch hier den N-terminale Bereich von SLAC1 an diese CPK gebunden (Daten nicht gezeigt).

4.4 SLAC1 ist der S-Typ Anionenkanal aus Schließzellen

Da die Kinasen und der putative Anionenkanal im gleichen Gewebe exprimiert werden und beide miteinander interagieren, wurden diese in Oozyten exprimiert und mittels der TEVC Methode auf ihre Funktion hin untersucht. In Übereinstimmung zu früheren Arbeiten (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008) konnten in SLAC1 exprimierenden Oozyten keine makroskopischen Anionenströme gemessen werden. Wurden aber die beiden Kinase OST1 oder CPK23 koexprimiert, so waren deutliche Anionenströme von etwa 30 μA zu verzeichnen (Abbildung 3.2.1.2.a und 3.2.2.2.c).

Im Gegensatz zu der Aktivierung von SLAC1 durch CPK-Kinasen zeigen nur etwa 25% der Oozyten eine vergleichbare Aktivierung von SLAC1 durch die Kinase OST1. In den anderen Fällen war eine deutlich geringere Anionenkanalaktivität zu verzeichnen. Dazu passt, dass zeitgleich von einer unabhängigen Arbeitsgruppe ebenso die Aktivierung von SLAC1 durch OST1 beobachtet werden konnte. In deren Studie wurden allerdings auch nur sehr geringe Anionenströme ($\sim 1,2 \mu\text{A}$ bei -100 mV) gemessen (Lee et al. 2009). Wurden aber in dieser Arbeit der Anionenkanal und die Kinase mit den komplementären YFP-Hälften, wie sie für die BiFC-Experimente (Abschnitt 3.2.1.1) verwandt wurden, eingesetzt, so zeigten nahezu 100% der injizierten Oozyten eine starke Anionenkanalaktivität von etwa 30 μA (Abbildung 3.2.1.2.c). Eine mögliche Ursache ist die Tatsache, dass Interaktionen, die durch BiFC visualisiert werden, durch die Komplementation des YFP Moleküls stabilisiert werden und so für die räumliche Nähe von SLAC1 und OST1 sorgen. Im Gegensatz zu OST1 können Kinasen der CPK-Familie an ihrem N-Terminus myristoyliert oder palmitoyliert vorliegen. Dabei handelt es sich um posttranslationale Modifikationen, die eine Membranassoziation ermöglichen (Bucher & Bairoch 1994). Ein solcher Membrananker fehlt OST1, weshalb die Kinase rein zytosolisch lokalisiert ist. Da *Xenopus* Oozyten durch das Fehlen einer Vakuole im Vergleich zu Schließzellen ein viel größeres Verhältnis von Zytoplasma zu Plasmamembranoberfläche haben, wird die Interaktion von OST1 zu SLAC1 unwahrscheinlicher. Durch die Erhöhung der Bindekapazität von OST1 zu SLAC1 über die beiden YFP-Hälften wird diese Interaktion der beiden Proteine in Oozyten gefestigt, wodurch nahezu alle injizierten Oozyten große SLAC1 Aktivität zeigten.

SLAC1 stellt einen neuen Typ eines Kanals für anorganische Anionen mit bis dahin unbekannter Tertiärstruktur dar. Nach Abschluss der hier gezeigten Experimente konnte Chen et al die Kristallstruktur eines homologen Anionenkanals TehA aus *Haemophilu*

influenzae aufklären und anhand dieser die Struktur von AtSLAC1 modellieren (2010). Dabei zeigte sich, dass SLAC1 10 Transmembranen besitzt. Jeweils 3 SLAC1-Untereinheiten formen zusammen ein funktionelles Trimer. Interessanterweise besitzt jede Untereinheit eine eigene Pore. Schon in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts konnte die S-Typ Anionenkanalaktivität und die elektrophysiologischen Eigenschaften dieses Kanals in *Xanthium strumarium* und *Vicia faba* Schließzellen beschrieben werden (Linder & Raschke 1992; Schroeder & Keller 1992). In dieser Arbeit gelang es dann den S-Typ Anionenkanal, aus dem pflanzlichen Hintergrund losgelöst, einer detaillierten elektrophysiologischen Charakterisierung in *Xenopus* Oozyten zu unterziehen. Die langsame Deaktivierungskinetik von SLAC1 kann mit einer zweifachen Exponentialfunktion beschrieben werden (Abbildung 3.2.1.4.a). Die Deaktivierungskinetiken im Sekundenbereich passen dabei zu den in der Literatur beschriebenen Zeitkonstanten für den S-Typ Anionenkanal, der in Protoplasten aus Schließzellen mit der Patch-Clamp Methode gemessen werden konnte (Linder & Raschke 1992; Schroeder & Keller 1992). Negi und Vahisalu konnten eine schwache Homologie von SLAC1 zu bakteriellen und pilzlichen Dicarboxylat/Malat Transportern feststellen (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Selektivitätsstudien mit SLAC1 exprimierenden Oozyten zeigten jedoch, dass dieser weder einen Malat, noch einen Dicarboxylat Transporter darstellt. Auch besitzt er kaum Homologie zu den bekannten Aluminium-aktivierten Malattransportern aus Weizen und Arabidopsis. Frühere Studien an *Vicia faba* Schließzellprotoplasten zeigen relative Permeabilitäten der S-typ Anionenkanäle von NO_3^- (20.9 ± 11.2), Cl^- (1 ± 0.00) und Malat (0.24 ± 0.19) auf (Schmidt & Schroeder 1994). Die elektrophysiologische Charakterisierung von SLAC1 in *Xenopus* Oozyten zeigte nun, dass es sich bei SLAC1 um einen anionenspezifischen Kanal mit Präferenz zu Nitrat handelt. Seine relativen Permeabilitäten sind: I^- (16.92 ± 0.28), NO_3^- (8.19 ± 0.44), Br^- (4.02 ± 0.309), Cl^- (1 ± 0.00), HCO_3^- (0.05 ± 0.01), Malat (0.04 ± 0.00), SO_4^{2-} (0.04 ± 0.00) (Abbildung 3.2.1.4.e). Malat stellt also kein permeierendes Substrat für SLAC1 dar, was im Gegensatz zu bisherigen Ergebnissen aus Schließzellprotoplasten steht (Schmidt & Schroeder 1994). Diese relativ hohe Malatleitfähigkeit, die in den Schließzellprotoplasten gefunden wurde, rührt vermutlich von weiteren Malattransportern/-kanälen her. Ein möglicher Kandidat für einen solchen Malatkanal ist der kürzlich entdeckte schnelle Anionenkanal (QUAC1) AtALMT12, der ebenso wie SLAC1 in Schließzellen exprimiert wird und eine Rolle beim Stomaschluss spielt (Meyer et al. 2010; Sasaki et al. 2010).

Weiterhin zeigten SLAC1 injizierte Oozyten ebenso wie der S-Typ Anionenkanal in Schließzellen keine pH-Abhängigkeit (Abbildung 3.2.1.4.c) (Barbier-Brygoo et al. 2000). Dagegen weisen Anionen / Protonen-Antiporter der CLC-Familie, die lange Zeit als Kandidaten für den S-Typ Anionenkanal gehandelt wurden, zum Teil einen starken Einfluss von Protonen auf ihre Transportaktivität auf (De Angeli et al. 2006; Miller 2006).

In früheren Patch-Clamp Untersuchungen an Protoplasten konnte die inhibierende Wirkung des Anionen-Kanal-Blockers DIDS auf die S-Typ Anionenströme gezeigt werden (Frachisse et al. 2000; Marten et al. 1993; Schroeder et al. 1993). Dieser Block konnte ebenso an SLAC1 exprimierenden Oozyten nachvollzogen werden (Abbildung 3.2.1.4.b). Mit dieser elektrophysiologischen Charakterisierung und den unterstützenden Ergebnissen der Patch-Clamp Studien an SLAC1 Verlustmutanten, (Abbildung 3.2.1.3 und 3.2.2.3 / von Patrick Mumm generiert) ist nun bewiesen, dass es sich bei SLAC1 um den S-Typ Anionenkanal handelt.

Allerdings sind bei der genaueren Betrachtung dieser Patch-Clamp Experimente an den *slac1-3* Protoplasten (Abbildung 3.2.1.3 und 3.2.2.3) immer noch geringe S-Typ Anionenströme ersichtlich. Diese verbliebenen Anionenströme konnten in Verlauf dieser Arbeit auf ein weiteres Mitglied der SLAC1/SLAH Familie zurückgeführt werden (Geiger et al. 2011). Gegensätzlich zu den Ergebnissen von Negi et al (2008) wurden SLAH3 Transkripte (SLAC1 homolog 3) mittels quantitativer PCR in Arabidopsis Schließzellen gefunden. Promotor GUS Färbungen bestätigten diese Ergebnisse. Detaillierte elektrophysiologische und biochemische Untersuchungen zeigten schließlich, dass SLAH3 ein Nitrat aktivierter S-Typ Anionenkanal ist, der wahrscheinlich neben SLAC1 ebenfalls an der Stomaregulation beteiligt ist (Geiger et al. 2011).

4.5 SLAC1 wird durch OST1 und Kinasen der CPK-Familie phosphoryliert und somit aktiviert

Die funktionelle Interaktion der Kinasen OST1 und CPK23 mit SLAC1 konnte in dieser Arbeit zudem durch Patch-Clamp Studien an Schließzell-Protoplasten bekräftigt werden. Hier zeigte sich, dass sowohl in OST1, als auch in CPK23 Verlustmutanten stark verminderte S-Typ Anionenströme auftreten (Abbildung 3.2.1.3 und 3.2.2.3). Die Ergebnisse mit *ost1-2* Mutanten erklären den open Stomata Phänotyp, der von Mustilli et al mittels Infrarot-Thermographie beobachtet wurde (2002). Es zeigte sich in diesen Experimenten, dass der Stomaschluss in *ost1-2* Pflanzen durch ABA aber nicht durch Ca^{2+} vermindert ist. Daher vermuteten Mustilli et al damals OST1 als positiven ABA-Regulator zwischen ABI1 und der Produktion von ROS (reaktive Sauerstoff-Verbindungen), die zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration führt (Mustilli et al. 2002; Pei et al. 2000). In dieser Arbeit konnte die Bedeutung von OST1 in der schnellen ABA-Signaltransduktion mit der direkten Aktivierung von SLAC1 gezeigt werden. Allerdings erfüllt OST1 noch andere Aufgaben in Schließzellen. Neben SLAC1 wird der kaliumeinwärtsgerichtete Kanal KAT1 von OST1 phosphoryliert (Sato et al. 2009). Durch die resultierende Inaktivierung von KAT1 wird ein schnellerer und effizienterer Stomaschluss gewährleistet. Weiterhin wird die NADPH Oxidase AtrbohF durch OST1 phosphoryliert und somit aktiviert. Der resultierende Anstieg von ROS in den Schließzellen bewirkt einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration durch die Aktivierung von H_2O_2 -induzierten Ca^{2+} Kanälen (Pei et al. 2000). Der genaue Mechanismus dahinter ist allerdings immer noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings hat Kalzium als eines der wichtigsten Signalmoleküle in den Schließzellen weitere Effekte.

So vermag auch die Ca^{2+} abhängige Kinase CPK23 neben OST1, SLAC1 zu aktivieren (Abbildung 3.2.2.2.a), was diese CPK zu einem positiven Regulator der ABA-Signaltransduktion erklärt. Ma und Wu konnten allerdings bei CPK23 Verlustmutanten eine leicht verminderte Stomaöffnungsweite beobachten. Daher vermuteten die Autoren CPK23 als positiven Regulator der Stomaöffnung. In diesem Experiment wurde die Epidermis stark invasiv von den Blättern abgezogen und mehrere Stunden in einer Lösung mit $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} inkubiert (Ma & Wu 2007). In unseren Experimenten mit der gleichen *cpk23* knock out Linie (Salk 007958) war kein offensichtlicher Stomaphänotyp ersichtlich. Lediglich unter den definierten Bedingungen der Patch-Clamp Analysen

konnten in diesen Mutanten um 70 % verminderte SLAC1-Anionenströme gemessen werden (Abbildung 3.2.2.3). Deshalb schlossen wir aus unseren Studien auf eine positive Regulation von SLAC1 durch CPK23, was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ma und Wu steht (2007). Auf Grund dieser Diskrepanz wurden Transkripte von Genen mit einer Relevanz für die ABA-Signaltransduktion in *cpk23* knock out Pflanzen bestimmt.

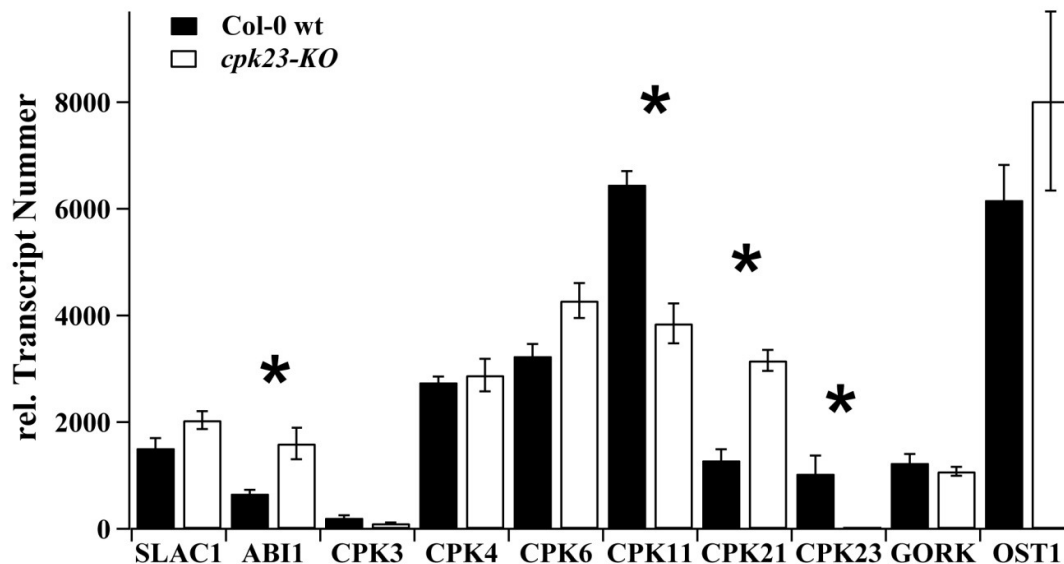


Abbildung 4.2: Transkriptmengen von *cpk23* Pflanzen

Bestimmung der Transkriptmengen in *Arabidopsis* Schließzellen von SLAC1, ABI1, verschiedener CPKs GORK und OST1 in Wildtyp Pflanzen (schwarze Balken) im Vergleich zu *cpk23* knock out Pflanzen (weiße Balken). (Die Daten der „real time PCR“ Messungen wurden von Frau Melanie Papenfuß generiert.)

Ist in *Arabidopsis* Schließzellen die CPK23 nicht mehr vorhanden, so ist eine Deregulation vieler ABA-Signaltransduktionskomponenten zu erkennen. Durch den Verlust der CPK23 wird die Kinase CPK21 hochreguliert, die ebenfalls in der Lage ist SLAC1 zu aktivieren (Abbildung 3.2.2.2.c und 3.2.2.6.a). Diese stark Ca^{2+} abhängige Kinase (Abbildung 3.2.2.6.c) könnte unter hohen Ca^{2+} Konzentrationen das Fehlen der CPK23 durchaus kompensieren. Weiterhin wird CPK11 in *cpk23* knock out Pflanzen vermindert transkribiert. Diese Kinase stellt ebenfalls einen positiven Regulator der ABA-Signaltransduktion auf Transkriptionsebene dar (Zhu et al. 2007). Auch der negative Regulator ABI1 wird verstärkt in diesen Pflanzen transkribiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Gleichgewicht auf Proteinebene zwischen den beteiligten Mitgliedern der ABA-Signaltransduktion verschoben ist. Es ist nicht auszuschließen, dass das Missverhältnis zwischen Kinasen und Phosphatasen deshalb zur Reduktion der

S-Typ Anionenströme führt, weil im Vergleich zur Menge an Kinasen eine zu hohe Menge an Phosphatasen der PP2C Familie vorhanden ist.

In den TEVC Experimenten an *Xenopus* Oozyten bewirkte die Koexpression der Kinase CPK23 mit SLAC1 im Vergleich zu anderen Mitgliedern der CPK-Familie besonders große Anionenströme (Abbildung 3.2.2.2.c). Somit ist schon die geringe Ca^{2+} Konzentration in den Oozyten ausreichend für die Aktivität der CPK23. Die Expression von konstitutiv aktiven Deletionsmutanten dieser CPKs zeigte allerdings, dass auch andere Mitglieder dieser Familie SLAC1 in Oozyten ebenso deutlich aktivieren können (Abbildung 3.2.2.6). Da während der Ca^{2+} induzierten Anionenkanalaktivierung diese Konzentration in den Schließzellen von etwa 100 Nanomolar bis zu mehreren Mikromolar ansteigen kann (Roelfsema & Hedrich 2010; Siegel et al. 2009; Stange et al. 2010), wurden die CPKs unter definierten Ca^{2+} Konzentrationen in *in vitro* Kinase Assays auf ihre Ca^{2+} Abhängigkeit hin untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die unterschiedlichen CPKs durchaus unterschiedliche Ca^{2+} Abhängigkeiten aufweisen. CPK23 ist im Vergleich zu der CPK3 und der CPK21 nur wenig Ca^{2+} abhängig. Sie erreicht bereits unter sehr geringen Ca^{2+} Konzentrationen 60 % ihrer Maximalaktivität. Mit Steigerung der Ca^{2+} Konzentration nimmt diese Aktivität dann konstant zu. Somit ist die CPK23 neben der CPK6 als eine wenig Ca^{2+} abhängige Kinase klassifiziert und damit in der Lage auf ein breites Ca^{2+} Konzentrationsspektrum zu reagieren (Abbildung 3.2.2.6.b und c). CPK21 hingegen weist eine sehr geringe Basisaktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} auf. Ihre halbmaximale Aktivität erreicht sie erst bei $274,9 \pm 27$ nM Ca^{2+} . Der Konzentrationsbereich zwischen geringer und maximaler Aktivität ist dabei sehr klein (Abbildung 3.2.2.6.c). Mit dieser Charakteristik könnten die stark Ca^{2+} abhängigen Kinasen CPK3 und CPK21 geringe Konzentrationsänderungen wahrnehmen und in ein quasi digitales Signal übersetzen. Die Ca^{2+} Konzentrationen ihrer Aktivierung passen dabei zu kürzlich veröffentlichten Studien der Ca^{2+} vermittelten Anionenkanalaktivität (Stange et al. 2010). Hier wurde gezeigt, dass eine halbmaximale Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle bei zytosolischen Ca^{2+} Konzentrationen von 300 bis 500 nM erfolgt. Somit ermöglichen Kinasen mit unterschiedlichen Ca^{2+} Abhängigkeiten eine Aktivierung der S-Typ Anionenströme in Schließzellen. OST1 ist völlig unabhängig von der Ca^{2+} Konzentration. CPK23 ist hingegen wenig Ca^{2+} abhängig und stellt damit den Übergang zu der stark Ca^{2+} abhängigen CPK21 dar. In Experimenten mit Ca^{2+} sensitiven Farbstoffen an ABA behandelten Schließzellen konnte gezeigt werden, dass nicht alle der Zellen mit einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration reagieren (Allan et al.

1994; Allen et al. 1999; Gilroy et al. 1991; Irving et al. 1992; Levchenko et al. 2005; Marten et al. 2007; Mcainsh et al. 1990; Schroeder & Hagiwara 1990). In den Schließzellen ohne Anstieg der Ca^{2+} Konzentration reichen bereits die Aktivitäten der Ca^{2+} unabhängigen Kinase OST1 und der wenig Ca^{2+} abhängigen Kinase CPK23 für die Aktivierung von SLAC1 aus. Bei den Schließzellen, die eine Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration zeigen, aktiviert zudem auch die stark Ca^{2+} abhängige CPK21. Für 2 getrennte Wege der Anionenkanalaktivierung sprechen zudem die unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen im SLAC1 NT von OST1 und den CPK-Kinasen (Abschnitt 3.2.2.4 und 3.2.2.5).

Mit der Hilfe von *in vitro* Kinase Assays wurde im Rahmen dieser Arbeit nach den spezifischen Phosphorylierungsstellen im SLAC1 gesucht. Durch vorhergegangene BIFC-Studien konnte bereits die Interaktion der Kinasen besonders mit dem N-terminalen Bereich von SLAC1 festgestellt werden (Abbildung 3.2.1.1.c und 3.2.2.1.b). Bei den *in vitro* Kinase Assays mit den rekombinanten Proteinen konnte entsprechend eine Phosphorylierung durch OST1 und verschiedene CPKs am SLAC1 NT beobachtet werden (Abbildung 3.2.1.5.a, 3.2.2.4.b und 3.3.3.c). Zu ähnlichen Ergebnissen für die Kinase OST1 gelangte zeitgleich die Arbeitsgruppe von Sheng Luan (Lee et al. 2009). Um die Lokalisation der Phosphorylierung am SLAC1 weiter einzugrenzen, wurden CelluSpots Peptide Arrays verwendet. Auf diesen Arrays befanden sich 24 Spots mit Peptiden der SLAC1 Sequenz. Die Peptide überlappten jeweils 10 Aminosäuren und deckten insgesamt die vorhergesagten zytoplasmatischen Regionen von SLAC1 ab. Bei der Phosphorylierung durch OST1 und die CPKs 3, 6, 21 und 23 fallen 4 phosphorylierte Stellen in der SLAC1 Sequenz auf (Abbildung 3.2.2.4.d und Tabelle 3.2.1.5.b). Durch Mutageneseexperimente konnte eine essentielle Stelle für die OST1-Aktivierung von SLAC1 gefunden werden. SLAC1 S120A konnte in TEVC-Experimenten an Oozyten nicht mehr von der Kinase OST1, aber noch sehr wohl durch die Kinase CPK23 aktiviert werden (Abbildung 3.2.2.5). Die Phosphorylierung von Serin 120 durch OST1 konnte später von der Arbeitsgruppe unter Jaakko Kangasjarvi bei der Identifikation von ungerichtet mutierten *Arabidopsis* Pflanzen bestätigt werden (Vahisalu et al. 2010). Dabei wurden mittels der Tilling-Methode (Till et al. 2003) 2 Serine in N-terminus von SLAC1 (S120 und S146) identifiziert, die eine essentielle Funktion für den Oozon-ausgelösten Stomaschluss haben. Mittels *in vitro* Kinase Experimenten von OST1 mit SLAC1 und massenspektrometischer Analysen konnten insgesamt 4 Phosphorylierungsstellen am SLAC1 NT gefunden werden. Dabei handelt es sich um die Serine an den Positionen 59,

86, 113 und 120. Bei den, in dieser Arbeit durchgeführten, Kinase Experimenten an CelluSpots Peptide Arrays (Tabelle 3.2.1.5.b und Abbildung 3.2.2.4.d) konnten am SLAC1 NT 4 Peptide phosphoryliert werden, die eben diese 4 Serine beinhalten.

4.6 SLAC1 Anionenkanalaktivität wird über PP2C-Phosphatasen reguliert

SLAC1 wird von den Kinasen OST1, CPK3, 6, 21 und 23 phosphoryliert, was zu seiner Aktivierung führt. Bereits in frühen Studien konnte gezeigt werden, dass auch die dominanten PP2C Mutanten *abi1-1* und *abi2-1* einen starken Einfluss auf schnelle ABA Antworten besitzen. Die Mutanten dieser beiden Phosphatasen können nicht mehr durch den ABA-Rezeptor inhibiert werden und sind daher negative Regulatoren der ABA-Signaltransduktion (Ma 2009; Park et al. 2009). Sie sind inhibiert in der Produktion von ROS durch NADPH Oxidasen, welche wiederum durch die Kinase OST1 aktiviert werden (Mustilli et al. 2002), dem Ca^{2+} Einstrom (Allen et al. 1999; Pei et al. 2000) und damit verbunden auch in der Aktivierung der S-Typ Anionenströme (Grabov et al. 1997; Pei et al. 1997).

In den BIFC Experimenten an *Xenopus* Oozyten und Mesophyllprotoplasten konnte die Interaktion zwischen den Kinasen OST1, CPK21 und CPK23 mit der Phosphatase ABI1 gezeigt werden (Abbildung 3.3.1. a, b und c). Die Interaktion zwischen OST1 und ABI1 wurde schon zuvor mittels yeast-two-hybrid Experimenten bestimmt und bestätigen unsere experimentellen Daten (Yoshida et al. 2006). Der negative regulatorische Effekt der beiden PP2C Phosphatasen ABI1 und ABI2 auf den Stomaschluss wurde dann in den TEVC Experimenten erklärt. Die Koexpression dieser beiden Phosphatasen mit SLAC1 und den aktivierenden Kinasen OST1 oder CPK23 führte zu einer drastischen Verminderung der Anionenströme (Abbildung 3.3.2.a und b). Die Koexpression zweier verwandter PP2C Phosphatasen HAB1 und HAB2 hingegen hatte keinerlei Einfluss auf die SLAC1-Aktivität (Abbildung 3.3.2.b). Dieses Ergebnis konnte mit Hilfe weiterer *in vitro* Kinase Experimente verstanden werden.

Die Anwesenheit der Phosphatase ABI1 bewirkte hierbei eine deutliche Verminderung der Phosphorylierung am SLAC1 NT durch die Kinasen OST1 CPK3, 6, 21 und 23

(Abbildung 3.3.3.a, b und c). Lee et al konnten zeitgleich ein Ausbleiben der SLAC1 NT Phosphorylierung durch OST1 in Anwesenheit der Phosphatase PP2CA beobachten (2009). Interessanter Weise wurde OST1 in ihren Händen gleichermaßen durch Zugabe einer inaktiven PP2CA Mutante (PP2CA G139D/G145D) gehemmt. Daher vermuten die Autoren, dass die bloße Interaktion von PP2CA mit OST1 für die Inhibierung der Kinase verantwortlich ist (Lee et al. 2009). Eine inaktive PP2C Mutante (ABI1 G174D) konnte in dieser Arbeit hingegen bei TEVC Analysen kaum eine Reduktion der OST1 oder CPK23 ausgelösten SLAC1 Ströme bewirken (Abbildung 3.3.2.b). In weiterreichenden *in vitro* Kinase Studien wurde dann gezeigt, dass die Phosphatase ABI1 nicht in der Lage ist einen bereits phosphorylierten SLAC1 NT wieder zu dephosphorylieren (Abbildung 3.3.3.a - c). Vielmehr liegt die Aufgabe der Phosphatasen ABI1 und ABI2 in der Inhibierung der Aktivität der Kinasen durch deren Dephosphorylierung. Diese übergeordnete Regulation der Phosphatasen ABI1 und ABI2 auf die SLAC1 aktivierenden Kinasen erscheint auch aus einem zell-ökonomischen Grund plausibel. Würden die Phosphatasen nicht die Kinasen inhibieren, sondern den Anionenkanal selbst dephosphorylieren, würde dieser in einer ATP verschwendenden Schleife wiederum über die Kinasen phosphoryliert. TEVC Experimente mit der inaktiven ABI1 Mutante bestätigen diese Vermutung (Abbildung 3.3.2.b), denn sie resultierten in einer ausbleibenden Inhibierung der Aktivierung von SLAC1 durch CPK23 oder OST1. Diese Folgerung wird untermauert von Fujii et al und Vlad et al. Mit Hilfe von synthetischen Peptiden von OST1 konnten sie schließlich in *in vitro* Phosphatase Assays zeigen, dass ABI1 OST1 an der Position S175 dephosphorylieren kann (Fujii et al. 2009; Vlad et al. 2009). Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu der Vermutung von Lee et al, dass reine Interaktion von PP2CA mit OST1 für die Inhibierung der Kinase verantwortlich ist (Lee et al. 2009). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass OST1 durch die Phosphatasen PP2CA und ABI1 in unterschiedlichen Weisen reguliert wird.

Die Dephosphorylierung von OST1 durch ABI1 in *in vitro* Phosphatase Assays wurde auch in einer weiteren Arbeit gezeigt (Umezawa et al. 2009). Hier konnte zudem der ABA-Rezeptor RCAR/PYR (Ma et al. 2009; Park et al. 2009) in diese Phosphatasereaktion mit einbezogen werden. Es stellte sich heraus, dass die Phosphataseaktivität von ABI1 in Anwesenheit von ABA und dem Rezeptor PYR1 deutlich verringert war. Interessanterweise konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *abil-1*, eine Mutation, die einen ABA-insensitiven Phänotyp in Pflanzen hervorruft, im Vergleich zum Wildtyp vermindert ist. Durch die geschwächte

Inaktivierung der Phosphatase mittels ABA und RCAR/PYR verbleibt *abi-1* aktiv und agiert somit weiterhin als negativer Regulator der ABA Signaltransduktion auch in Anwesenheit von ABA (Umezawa et al. 2009).

Mit diesem Wissen um die Regulation der Phosphatase ABI1 wurde in dieser Arbeit der schnelle ABA Signaltransduktionsweg *in vitro* erfolgreich nachgestellt (Abbildung 3.3.3.d). Dabei wurde ersichtlich, dass die Phosphatase ABI1 die Kinasen OST1 und CPK23 durch Dephosphorylierung (Umezawa et al. 2009) inhibiert. Der ABA Rezeptor RCAR1 alleine hat keinen Einfluss auf diese Inhibition der Kinasen. Wird allerdings ABA der Reaktion zugegeben, so inhibiert der ABA-RCAR1-Komplex die Phosphatase ABI1. Die Kinasen werden aus der inhibierenden Wirkung der Phosphatase entlassen, autophosphorylieren und aktivieren anschließend den Anionenkanal SLAC1. Die Ergebnisse sind im folgenden Schema für die schnelle ABA Signaltransduktion in Schließzellen zusammengefasst.

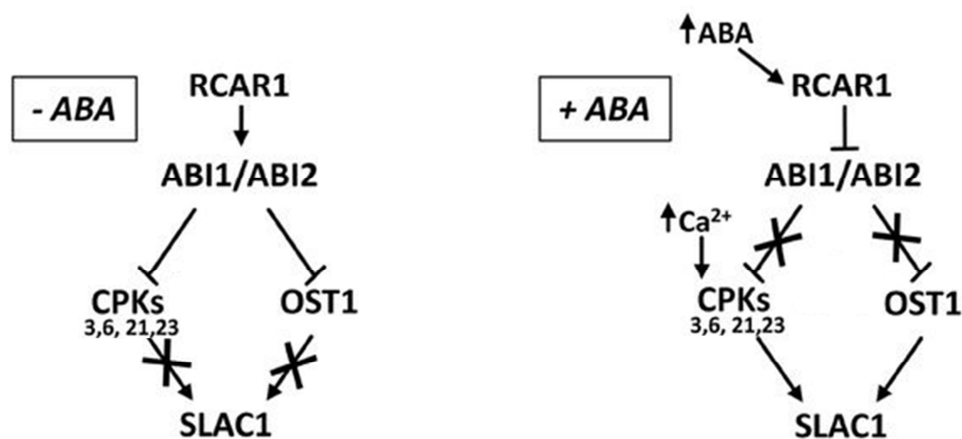


Abbildung 4.3: Aktuelles Verständnis der ABA Signaltransduktion zur SLAC1-Aktivierung

In diesen beiden Modellen ist die Wirkung der beteiligten ABA-Signaltransduktionskomponenten in Ab- und in Anwesenheit von ABA dargestellt. Ohne ABA (links) übt der ABA-Rezeptor keine inhibierende Wirkung auf die Phosphatasen ABI1 und ABI2 aus. Diese inhibieren daher die Kinase OST1 und die Ca^{2+} abhängigen Kinasen CPK3, 6, 21 und 23. In Anwesenheit von ABA (rechts) bildet sich ein Komplex aus ABA, dem Rezeptor und den Phosphatasen. Somit sind ABI1 und ABI2 inhibiert, was die Aktivität der Kinasen zulässt. Die Kinase OST1 und die schwach Ca^{2+} abhängigen Kinasen CPK6 und 23 aktivieren in Folge den S-Typ Anionenkanal durch Phosphorylierung. Die stark Ca^{2+} abhängigen Kinasen CPK3 und 21 benötigen für ihre Aktivierung noch den Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. Pfeile bedeuten Aktivierung und T-Striche stehen für Inhibition. Die Durchkreuzung dieser Symbole bedeutet, dass deren Funktion unterbrochen ist.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit das bisherige Modell für die schnelle ABA Signaltransduktion zur Aktivierung von S-Typ Anionenkanälen in Schließzellen (Abbildung 4.1) deutlich erweitert und vereinfacht werden. Zusammen mit den jüngst entdeckten ABA Rezeptoren, der funktionellen Charakterisierung von SLAC1 und der Identifikation von regulatorischen Komponenten konnte die schnelle ABA Signaltransduktion von der Perzeption des Phytohormons bis zur Aktivierung der Anionenströme mittels BIFC-, TEVC und *in vitro* Kinase Assays verstanden und nachvollzogen werden. Somit ergibt sich für den ABA induzierten Stomaschluss folgende Kette an Ereignissen (Abbildung 4.3). Unter Wasserstress-Bedingungen wird das Phytohormon ABA synthetisiert und bindet in den Schließzellen an die zytosolischen Rezeptoren der RCAR/PYR/PYL-Familie. Durch diese Aktivierung des Rezeptors bindet die Phosphatase ABI1 an den ABA-RCAR1 Komplex. In ihrer freien Form inhibiert die Phosphatase ABI1 die Kinasen OST1, CPK21 und CPK23 durch Dephosphorylierung. Nach Bindung von ABI1 an RCAR1 sind diese Kinasen von der inhibierenden Wirkung von ABI1 entlassen. Die beiden Kinasen OST1 und CPK23 stellen ihre Aktivität durch Autophosphorylierung wieder her. Die stark Ca^{2+} abhängige Kinase CPK21 benötigt hierzu noch einen ABA induzierten Ca^{2+} -Anstieg im Zytoplasma. Diese Kinasen phosphorylieren anschließend SLAC1 am N-Terminus. Diese Phosphorylierung bewirkt die Aktivierung von SLAC1 woraufhin Anionen aus der Schließzelle entlassen werden. Das Fehlen dieser negativen Ladungen führt zur Depolarisation der Membran woraufhin der auswärtsgleichrichtende Kaliumkanal GORK aktiviert und K^+ aus der Schließzelle entlässt. Der Verlust an Osmolyten bewirkt einen osmotisch getriebenen Wasserausstrom und das Stoma schließt sich.

5 Referenzen

(2001). "Arabidopsis Genome Sequence completed in 2000." Plant Molecular Biology Reporter 19(1): 3-3.

Abenavoli, A., M. L. DiFrancesco, I. Schroeder, S. Epimashko, S. Gazzarrini, U. P. Hansen, G. Thiel and A. Moroni (2009). "Fast and slow gating are inherent properties of the pore module of the K⁺ channel Kcv." J Gen Physiol 134(3): 219-229.

Accardi, A., L. Kolmakova-Partensky, C. Williams and C. Miller (2004). "Ionic currents mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels." Journal of General Physiology 123(2): 109-119.

Ache, P., D. Becker, N. Ivashikina, P. Dietrich, M. R. Roelfsema and R. Hedrich (2000). "GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of Arabidopsis thaliana, is a K⁽⁺⁾-selective, K⁽⁺⁾-sensing ion channel." FEBS Lett 486(2): 93-98.

Akaboshi, M., H. Hashimoto, H. Ishida, S. Saijo, N. Koizumi, M. Sato and T. Shimizu (2008). "The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14." J Mol Biol 377(1): 246-257.

Albrecht, V., O. Ritz, S. Linder, K. Harter and J. Kudla (2001). "The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated kinases." Embo Journal 20(5): 1051-1063.

Albrecht, V., S. Weinl, D. Blazevic, C. D'Angelo, O. Batistic, U. Kolukisaoglu, R. Bock, B. Schulz, K. Harter and J. Kudla (2003). "The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses." Plant Journal 36(4): 457-470.

Allan, A. C., M. D. Fricker, J. L. Ward, M. H. Beale and A. J. Trewavas (1994). "Two Transduction Pathways Mediate Rapid Effects of Abscisic Acid in Commelina Guard Cells." Plant Cell 6(9): 1319-1328.

Allaway, W. G. (1973). "Accumulation of Malate in Guard Cells of Vicia-Faba during Stomatal Opening." Planta 110(1): 63-70.

Allen, G. J., K. Kuchitsu, S. P. Chu, Y. Murata and J. I. Schroeder (1999). "Arabidopsis abi1-1 and abi2-1 phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells." Plant Cell 11(9): 1785-1798.

Allen, G. J., J. M. Kwak, S. P. Chu, J. Llopis, R. Y. Tsien, J. F. Harper and J. I. Schroeder (1999). "Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in Arabidopsis guard cells." Plant J 19(6): 735-747.

Allen, G. J. and D. Sanders (1996). "Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium." Plant J 10(6): 1055-1069.

- Apse, M. P., G. S. Aharon, W. A. Snedden and E. Blumwald** (1999). "Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis." Science 285(5431): 1256-1258.
- Asai, T., G. Tena, J. Plotnikova, M. R. Willmann, W. L. Chiu, L. Gomez-Gomez, T. Boller, F. M. Ausubel and J. Sheen** (2002). "MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity." Nature 415(6875): 977-983.
- Assmann, S. M.** (2003). "OPEN STOMATA1 opens the door to ABA signaling in Arabidopsis guard cells." Trends in Plant Science 8(4): 151-153.
- Assmann, S. M. and K. Shimazaki** (1999). "The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid." Plant Physiology 119(3): 809-815.
- Assmann, S. M., L. Simoncini and J. I. Schroeder** (1985). "Blue-Light Activates Electrogenic Ion Pumping in Guard-Cell Protoplasts of Vicia-Faba." Nature 318(6043): 285-287.
- Baekgaard, L., A. T. Fuglsang and M. G. Palmgren** (2005). "Regulation of plant plasma membrane H⁺- and Ca²⁺-ATPases by terminal domains." Journal of Bioenergetics and Biomembranes 37(6): 369-374.
- Baekgaard, L., L. Luoni, M. I. De Michelis and M. G. Palmgren** (2006). "The plant plasma membrane Ca²⁺ pump ACA8 contains overlapping as well as physically separated autoinhibitory and calmodulin-binding domains." Journal of Biological Chemistry 281(2): 1058-1065.
- Barbier-Brygoo, H., M. Vinauger, J. Colcombet, G. Ephritikhine, J. Frachisse and C. Maurel** (2000). "Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role." Biochim Biophys Acta 1465(1-2): 199-218.
- Barragan, V., E. O. Leidi, Z. Andres, L. Rubio, A. De Luca, J. A. Fernandez, B. Cubero and J. M. Pardo** (2012). "Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis." Plant Cell 24(3): 1127-1142.
- Bassil, E., H. Tajima, Y. C. Liang, M. A. Ohto, K. Ushijima, R. Nakano, T. Esumi, A. Coku, M. Belmonte and E. Blumwald** (2011). "The Arabidopsis Na⁺/H⁺ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K⁺ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction." Plant Cell 23(9): 3482-3497.
- Batistic, O. and J. Kudla** (2004). "Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network." Planta 219(6): 915-924.
- Batistic, O., N. Sorek, S. Schultke, S. Yalovsky and J. Kudla** (2008). "Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in Arabidopsis." Plant Cell 20(5): 1346-1362.

Baxter, I., J. Tchieu, M. R. Sussman, M. Boutry, M. G. Palmgren, M. Gribskov, J. F. Harper and K. B. Axelsen (2003). "Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice." *Plant Physiol* 132(2): 618-628.

Becker, D., S. Hoth, P. Ache, S. Wenkel, M. R. Roelfsema, O. Meyerhoff, W. Hartung and R. Hedrich (2003). "Regulation of the ABA-sensitive Arabidopsis potassium channel gene GORK in response to water stress." *FEBS Lett* 554(1-2): 119-126.

Becker, D., S. Hoth, P. Ache, S. Wenkel, M. R. G. Roelfsema, O. Meyerhoff, W. Hartung and R. Hedrich (2003). "Regulation of the ABA-sensitive Arabidopsis potassium channel gene GORK in response to water stress." *Febs Letters* 554(1-2): 119-126.

Becker, D., C. Zeilinger, G. Lohse, H. Depta and R. Hedrich (1993). "Identification and Biochemical-Characterization of the Plasma-Membrane H⁺-Atpase in Guard-Cells of Vicia-Faba L." *Planta* 190(1): 44-50.

Beekman, J. M., A. J. Cooney, J. F. Elliston, S. Y. Tsai and M. J. Tsai (1994). "A rapid one-step method to purify baculovirus-expressed human estrogen receptor to be used in the analysis of the oxytocin promoter." *Gene* 146(2): 285-289.

Berberich, T. and T. Kusano (1997). "Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize." *Molecular & General Genetics* 254(3): 275-283.

Bergmann, D. C. and F. D. Sack (2007). "Stomatal development." *Annu Rev Plant Biol* 58: 163-181.

Berkowitz, G., X. Zhang, R. Mercie, Q. Leng and M. Lawton (2000). "Co-expression of calcium-dependent protein kinase with the inward rectified guard cell K⁺ channel KAT1 alters current parameters in *Xenopus laevis* oocytes." *Plant Cell Physiol* 41(6): 785-790.

Bethmann, B., M. Thaler, W. Simonis and G. Schonknecht (1995). "Electrochemical Potential Gradients of H⁺, K⁺, Ca²⁺, and Cl⁻ across the Tonoplast of the Green-Alga *Eremosphaera-Viridis*." *Plant Physiology* 109(4): 1317-1326.

Bewell, M. A., F. J. M. Maathuis, G. J. Allen and D. Sanders (1999). "Calcium-induced calcium release mediated by a voltage-activated cation channel in vacuolar vesicles from red beet." *Febs Letters* 458(1): 41-44.

Blatt, M. R. (1988). "Potassium-Dependent, Bipolar Gating of K⁺ Channels in Guard-Cells." *Journal of Membrane Biology* 102(3): 235-246.

Blatt, M. R. (1990). "Potassium Channel Currents in Intact Stomatal Guard-Cells - Rapid Enhancement by Abscisic-Acid." *Planta* 180(3): 445-455.

Blatt, M. R. (1992). "K⁺ channels of stomatal guard cells. Characteristics of the inward rectifier and its control by pH." *J Gen Physiol* 99(4): 615-644.

Blatt, M. R. and F. Armstrong (1993). "K⁺ Channels of Stomatal Guard-Cells - Abscisic-Acid-Evoked Control of the Outward Rectifier Mediated by Cytoplasmic Ph." Planta 191(3): 330-341.

Bohmer, F. D. and A. Uecker (2009). "A substrate peptide for the FLT3 receptor tyrosine kinase." British Journal of Haematology 144(1): 127-130.

Boller, T. and A. Wiemken (1986). "Dynamics of Vacuolar Compartmentation." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 37: 137-164.

Bolte, S., S. Brown and B. Satiat-Jeunemaitre (2004). "The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rab(mc) is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells." Journal of Cell Science 117(6): 943-954.

Bonza, M. C., P. Morandini, L. Luoni, M. Geisler, M. G. Palmgren and M. I. De Michelis (2000). "At-ACA8 encodes a plasma membrane-localized calcium-ATPase of Arabidopsis with a calmodulin-binding domain at the N terminus." Plant Physiol 123(4): 1495-1506.

Briskin, D. P., S. Basu and S. M. Assmann (1995). "Characterization of the Red Beet Plasma-Membrane H⁺-Atpase Reconstituted in a Planar Bilayer System." Plant Physiology 108(1): 393-398.

Bucher, P. and A. Bairoch (1994). "A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation." Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol 2: 53-61.

Burgoyne, R. D. and J. L. Weiss (2001). "The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins." Biochemical Journal 353: 1-12.

Camarasa, C., F. Bidard, M. Bony, P. Barre and S. Dequin (2001). "Characterization of Schizosaccharomyces pombe malate permease by expression in Saccharomyces cerevisiae." Appl Environ Microbiol 67(9): 4144-4151.

Camoni, L., V. Iori, M. Marra and P. Aducci (2000). "Phosphorylation-dependent interaction between plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase and 14-3-3 proteins." J Biol Chem 275(14): 9919-9923.

Carafoli, E. (1997). "Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships." Basic Res Cardiol 92 Suppl 1: 59-61.

Case, R. M., D. Eisner, A. Gurney, O. Jones, S. Muallem and A. Verkhratsky (2007). "Evolution of calcium homeostasis: From birth of the first cell to an omnipresent signalling system." Cell Calcium 42(4-5): 345-350.

Chaga, G., D. E. Bochkariov, G. G. Jokhadze, J. Hopp and P. Nelson (1999). "Natural poly-histidine affinity tag for purification of recombinant proteins on cobalt(II)-carboxymethylaspartate crosslinked agarose." J Chromatogr A 864(2): 247-256.

Chaga, G., J. Hopp and P. Nelson (1999). "Immobilized metal ion affinity chromatography on Co²⁺-carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle." *Biotechnol Appl Biochem* 29 (Pt 1): 19-24.

Chandran, V., E. J. Stollar, K. Lindorff-Larsen, J. F. Harper, W. J. Chazin, C. M. Dobson, B. F. Luisi and J. Christodoulou (2006). "Structure of the regulatory apparatus of a calciumdependent protein kinase (CDPK): A novel mode of calmodulin-target recognition." *Journal of Molecular Biology* 357(2): 400-410.

Chapman, A. D. (2009). "Numbers of Living Species in Australia and the World." *Australian Biological Resources Study 2nd edition*.

Chaumont, F., M. Moshelion and M. J. Daniels (2005). "Regulation of plant aquaporin activity." *Biology of the Cell* 97(10): 749-764.

Chen, H. J., C. T. Su, C. H. Lin, G. J. Huang and Y. H. Lin (2010). "Expression of sweet potato cysteine protease SPCP2 altered developmental characteristics and stress responses in transgenic Arabidopsis plants." *Journal of Plant Physiology* 167(10): 838-847.

Chen, L. Q., X. Q. Qu, B. H. Hou, D. Sosso, S. Osorio, A. R. Fernie and W. B. Frommer (2012). "Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport." *Science* 335(6065): 207-211.

Chen, M. F., R. Niggeweg, P. A. Iaizzo, F. LehmannHorn and H. Jockusch (1997). "Chloride conductance in mouse muscle is subject to post-transcriptional compensation of the functional Cl⁻ channel 1 gene dosage." *Journal of Physiology-London* 504(1): 75-81.

Chen, Y., F. Ji, H. Xie, J. Liang and J. Zhang (2006). "The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in Arabidopsis seed germination." *Plant Physiol* 140(1): 302-310.

Chen, Y. H., L. Hu, M. Punta, R. Bruni, B. Hillerich, B. Kloss, B. Rost, J. Love, S. A. Siegelbaum and W. A. Hendrickson (2010). "Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves." *Nature* 467(7319): 1074-1080.

Cheng, N. H., J. K. Pittman, J. K. Zhu and K. D. Hirschi (2004). "The protein kinase SOS2 activates the Arabidopsis H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance." *Journal of Biological Chemistry* 279(4): 2922-2926.

Cheng, W. H., A. Endo, L. Zhou, J. Penney, H. C. Chen, A. Arroyo, P. Leon, E. Nambara, T. Asami, M. Seo, T. Koshiba and J. Sheen (2002). "A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions." *Plant Cell* 14(11): 2723-2743.

Cheong, Y. H., K. N. Kim, G. K. Pandey, R. Gupta, J. J. Grant and S. Luan (2003). "CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis." *Plant Cell* 15(8): 1833-1845.

Cheong, Y. H., G. K. Pandey, J. J. Grant, O. Batistic, L. Li, B. G. Kim, S. C. Lee, J. Kudla and S. Luan (2007). "Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis." Plant Journal 52(2): 223-239.

Cho, D., D. J. Shin, B. W. Jeon and J. M. Kwak (2009). "ROS-Mediated ABA Signaling." Journal of Plant Biology 52(2): 102-113.

Choi, H. I., H. J. Park, J. H. Park, S. Kim, M. Y. Im, H. H. Seo, Y. W. Kim, I. Hwang and S. Y. Kim (2005). "Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity." Plant Physiol 139(4): 1750-1761.

Christie, J. M., P. Reymond, G. K. Powell, P. Bernasconi, A. A. Raibekas, E. Liscum and W. R. Briggs (1998). "Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism." Science 282(5394): 1698-1701.

Christmann, A., E. W. Weiler, E. Steudle and E. Grill (2007). "A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage." Plant Journal 52(1): 167-174.

Cole, K. S. (1949). "Dynamic Electrical Characteristics of the Squid Axon Membrane." Archives Des Sciences Physiologiques 3(2): 253-258.

Cosgrove, D. J. and R. Hedrich (1991). "Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L." Planta 186(1): 143-153.

Cotelle, V., J. N. Pierre and A. Vavasseur (1999). "Potential strong regulation of guard cell phosphoenolpyruvate carboxylase through phosphorylation." Journal of Experimental Botany 50(335): 777-783.

D'Angelo, C., S. Weinl, O. Batistic, G. K. Pandey, Y. H. Cheong, S. Schultke, V. Albrecht, B. Ehlert, B. Schulz, K. Harter, S. Luan, R. Bock and J. Kudla (2006). "Alternative complex formation of the Ca-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis." Plant J 48(6): 857-872.

De Angeli, A., D. Monachello, G. Ephritikhine, J. M. Frachisse, S. Thomine, F. Gambale and H. Barbier-Brygoo (2006). "The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles." Nature 442(7105): 939-942.

De Angeli, A., D. Monachello, G. Ephritikhine, J. M. Frachisse, S. Thomine, F. Gambale and H. Barbier-Brygoo (2009). "Review. CLC-mediated anion transport in plant cells." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364(1514): 195-201.

Demichel, D. and P. J. H. Sharpe (1973). "Analysis of Mechanics of Guard Cell Motion." Journal of Theoretical Biology 41(1): 77-&.

Dietrich, P. and R. Hedrich (1998). "Anions permeate and gate GCAC1, a voltage-dependent guard cell anion channel." Plant Journal 15(4): 479-487.

Edwards, D., H. Kerp and H. Hass (1998). "Stomata in early land plants: an anatomical and ecophysiological approach." Journal of Experimental Botany 49: 255-278.

Emi, T., T. Kinoshita and K. Shimazaki (2001). "Specific binding of vf14-3-3a isoform to the plasma membrane H⁺-ATPase in response to blue light and fusicoccin in guard cells of broad bean." Plant Physiol 125(2): 1115-1125.

Endo, A., Y. Sawada, H. Takahashi, M. Okamoto, K. Ikegami, H. Koiwai, M. Seo, T. Toyomasu, W. Mitsuhashi, K. Shinozaki, M. Nakazono, Y. Kamiya, T. Koshiha and E. Nambara (2008). "Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells." Plant Physiology 147(4): 1984-1993.

Felle, H. (1988). "Cytoplasmic Free Calcium in Riccia-Fluitans L and Zea-Mays-L - Interaction of Ca²⁺ and Ph." Planta 176(2): 248-255.

Felle, H. H., S. Hanstein, R. Steinmeyer and R. Hedrich (2000). "Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact Vicia faba leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness." Plant Journal 24(3): 297-304.

Felle, H. H. and P. K. Hepler (1997). "The cytosolic Ca²⁺ concentration gradient of Sinapis alba root hairs as revealed by Ca²⁺-selective microelectrode tests and fura-dextran ratio imaging." Plant Physiology 114(1): 39-45.

Felle, H. H., A. Herrmann, R. Huckelhoven and K. H. Kogel (2005). "Root-to-shoot signalling: apoplastic alkalinization, a general stress response and defence factor in barley (Hordeum vulgare)." Protoplasma 227(1): 17-24.

Finkel, A. G. and P. W. Gage (1985). "Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes." Smith TG, Lecar H, Redman SJ, Gage PW, eds. Voltage and patch clamping with microelectrodes. Baltimore, USA: Williams and Wilkins Co.: 47-94.

Finkel, A. S. and S. J. Redman (1985). "Optimal Voltage Clamping with Single Microelectrode, in Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes." Ed. T. Smith Jr. et al, Baltimore: Williams & Wilkins: 95-120.

Fischer, R. A. (1968). "Stomatal opening: role of potassium uptake by guard cells." Science 160(829): 784-785.

Forestier, C., F. Bouteau, N. Leonhardt and A. Vavasseur (1998). "Pharmacological properties of slow anion currents in intact guard cells of Arabidopsis. Application of the discontinuous single-electrode voltage-clamp to different species." Pflugers Arch 436(6): 920-927.

Frachisse, J. M., J. Colcombet, J. Guern and H. Barbier-Brygoo (2000). "Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from Arabidopsis thaliana." Plant J 21(4): 361-371.

Franks, P. J., T. N. Buckley, J. C. Shope and K. A. Mott (2001). "Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe." *Plant Physiology* 125(4): 1577-1584.

Franks, P. J., I. R. Cowan and G. D. Farquhar (1998). "A study of stomatal mechanics using the cell pressure probe." *Plant Cell and Environment* 21(1): 94-100.

Franz, S., B. Ehlert, A. Liese, J. Kurth, A. C. Cazale and T. Romeis (2011). "Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*." *Mol Plant* 4(1): 83-96.

Fraysse, L. C., B. Wells, M. C. McCann and P. Kjellbom (2005). "Specific plasma membrane aquaporins of the PIP1 subfamily are expressed in sieve elements and guard cells." *Biology of the Cell* 97(7): 519-534.

Fuglsang, A. T., Y. Guo, T. A. Cui, Q. Qiu, C. Song, K. A. Kristiansen, K. Bych, A. Schulz, S. Shabala, K. S. Schumaker, M. G. Palmgren and J. K. Zhu (2007). "Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein." *Plant Cell* 19(5): 1617-1634.

Fuglsang, A. T., G. Tulinus, N. Cui and M. G. Palmgren (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(2): 334-340.

Fujii, H., V. Chinnusamy, A. Rodrigues, S. Rubio, R. Antoni, S. Y. Park, S. R. Cutler, J. Sheen, P. L. Rodriguez and J. K. Zhu (2009). "In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway." *Nature* 462(7273): 660-664.

Fujii, H., P. E. Verslues and J. K. Zhu (2011). "Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(4): 1717-1722.

Fujii, H. and J. K. Zhu (2009). "Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(20): 8380-8385.

Gaedeke, N., M. Klein, U. Kolukisaoglu, C. Forestier, A. Muller, M. Ansoerge, D. Becker, Y. Mamnun, K. Kuchler, B. Schulz, B. Mueller-Roeber and E. Martinoia (2001). "The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement." *Embo Journal* 20(8): 1875-1887.

Gao, Y., Q. Zeng, J. Guo, J. Cheng, B. E. Ellis and J. G. Chen (2007). "Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in *Arabidopsis*." *Plant J* 52(6): 1001-1013.

Gaymard, F., M. Cerutti, C. Horeau, G. Lemaillet, S. Urbach, M. Ravallec, G. Devauchelle, H. Sentenac and J. B. Thibaud (1996). "The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocytes. First characterization of the AKT1 K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* 271(37): 22863-22870.

Geelen, D., C. Lurin, D. Bouchez, J. M. Frachisse, F. Lelievre, B. Courtial, H. Barbier-Brygoo and C. Maurel (2000). "Disruption of putative anion channel gene AtCLC-a in Arabidopsis suggests a role in the regulation of nitrate content." Plant J 21(3): 259-267.

Geiger, D., D. Becker, D. Vosloh, F. Gambale, K. Palme, M. Rehers, U. Anschutz, I. Dreyer, J. Kudla and R. Hedrich (2009). "Heteromeric AtKC1-AKT1 channels in Arabidopsis roots facilitate growth under K⁺-limiting conditions." J Biol Chem 284(32): 21288-21295.

Geiger, D., T. Maierhofer, K. A. Al-Rasheid, S. Scherzer, P. Mumm, A. Liese, P. Ache, C. Wellmann, I. Marten, E. Grill, T. Romeis and R. Hedrich (2011). "Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1." Sci Signal 4(173): ra32.

Geisler, M., N. Frangne, E. Gomes, E. Martinoia and M. G. Palmgren (2000). "The ACA4 gene of Arabidopsis encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast." Plant Physiology 124(4): 1814-1827.

Gelli, A. and E. Blumwald (1997). "Hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channels in the plasma membrane of tomato cells." Journal of Membrane Biology 155(1): 35-45.

Gerbeau, P., G. Amodeo, T. Henzler, V. Santoni, P. Ripoche and C. Maurel (2002). "The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH." Plant J 30(1): 71-81.

Ghelis, T., O. Dellis, E. Jeannette, F. Bardat, D. Cornel, E. Miginiac, J. Rona and B. Sotta (2000). "Corrigendum to: abscisic acid specific expression of RAB18 involves activation of anion channels in Arabidopsis thaliana suspension cells (FEBS 23703)." FEBS Lett 481(1): 89.

Gilroy, S., M. D. Fricker, N. D. Read and A. J. Trewavas (1991). "Role of Calcium in Signal Transduction of Commelina Guard Cells." Plant Cell 3(4): 333-344.

Gilroy, S., N. D. Read and A. J. Trewavas (1990). "Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure." Nature 346(6286): 769-771.

Gobert, A., S. Isayenkov, C. Voelker, K. Czempinski and F. J. M. Maathuis (2007). "The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(25): 10726-10731.

Goldman, D. E. (1943). "Potential, Impedance, and Rectification in Membranes." J Gen Physiol 27(1): 37-60.

Gonzalez, W., J. Riedelsberger, S. E. Morales-Navarro, J. Caballero, J. H. Alzate-Morales, F. D. Gonzalez-Nilo and I. Dreyer (2012). "The pH sensor of the plant K⁺-uptake channel KAT1 is built from a sensory cloud rather than from single key amino acids." Biochemical Journal 442: 57-63.

Gosti, F., N. Beaudoin, C. Serizet, A. A. R. Webb, N. Vartanian and J. Giraudat (1999). "ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling." Plant Cell 11(10): 1897-1909.

Gotow, K., S. Taylor and E. Zeiger (1988). "Photosynthetic Carbon Fixation in Guard Cell Protoplasts of *Vicia faba* L. : Evidence from Radiolabel Experiments." Plant Physiol 86(3): 700-705.

Grabov, A. and M. R. Blatt (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(8): 4778-4783.

Grabov, A., J. Leung, J. Giraudat and M. R. Blatt (1997). "Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid." Plant Journal 12(1): 203-213.

Grobler, J., F. Bauer, R. E. Subden and H. J. Van Vuuren (1995). "The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C₄ dicarboxylic acids." Yeast 11(15): 1485-1491.

Guo, F. O., J. Young and N. M. Crawford (2003). "The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*." Plant Cell 15(1): 107-117.

Gurdon, J. B., C. D. Lane, H. R. Woodland and G. Marbaix (1971). "Use of Frog Eggs and Oocytes for Study of Messenger Rna and Its Translation in Living Cells." Nature 233(5316): 177-&.

Hamilton, D. W. A., A. Hills, B. Kohler and M. R. Blatt (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(9): 4967-4972.

Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein Kinases .6. The Eukaryotic Protein-Kinase Superfamily - Kinase (Catalytic) Domain-Structure and Classification." Faseb Journal 9(8): 576-596.

Harmon, A. C., B. C. Yoo and C. McCaffery (1994). "Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain." Biochemistry 33(23): 7278-7287.

Harper, J. F., B. Hong, I. Hwang, H. Q. Guo, R. Stoddard, J. F. Huang, M. G. Palmgren and H. Sze (1998). "A novel calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal autoinhibitory domain." J Biol Chem 273(2): 1099-1106.

Harper, J. F., J. F. Huang and S. J. Lloyd (1994). "Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain." Biochemistry 33(23): 7267-7277.

Harris, M. J., W. H. Outlaw, R. Mertens and E. W. Weiler (1988). "Water-Stress-Induced Changes in the Abscisic-Acid Content of Guard-Cells and Other Cells of Vicia-Faba L Leaves as Determined by Enzyme-Amplified Immunoassay." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85(8): 2584-2588.

Haswell, E. S., R. Peyronnet, H. Barbier-Brygoo, E. M. Meyerowitz and J. M. Frachisse (2008). "Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root." Current Biology 18(10): 730-734.

Hayashi, M., S. Inoue, K. Takahashi and T. Kinoshita (2011). "Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in stomatal guard cells." Plant Cell Physiol 52(7): 1238-1248.

Heckman, D. S., D. M. Geiser, B. R. Eidell, R. L. Stauffer, N. L. Kardos and S. B. Hedges (2001). "Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants." Science 293(5532): 1129-1133.

Hedrich, R. (1994). "Voltage-dependent chloride channels in plant cells: identification, characterization, and regulation of a guard cell anion channel." Current Topics in Membranes 42: 1-33.

Hedrich, R., H. Busch and K. Raschke (1990). "Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells." EMBO J 9(12): 3889-3892.

Hedrich, R., U. I. Flugge and J. M. Fernandez (1986). "Patch-Clamp Studies of Ion-Transport in Isolated Plant Vacuoles." Febs Letters 204(2): 228-232.

Hedrich, R. and J. Kudla (2006). "Calcium signaling plant K⁺ uptake networks channel." Cell 125(7): 1221-1223.

Hedrich, R., A. Kurkdjian, J. Guern and U. I. Flugge (1989). "Comparative Studies on the Electrical-Properties of the H⁺ Translocating Atpase and Pyrophosphatase of the Vacuolar-Lysosomal Compartment." Embo Journal 8(10): 2835-2841.

Hedrich, R. and I. Marten (1993). "Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells." EMBO J 12(3): 897-901.

Hedrich, R. and I. Marten (2011). "TPC1-SV channels gain shape." Mol Plant 4(3): 428-441.

Hedrich, R., I. Marten, G. Lohse, P. Dietrich, H. Winter, G. Lohaus and H. W. Heldt (1994). "Malate-Sensitive Anion Channels Enable Guard-Cells to Sense Changes in the Ambient CO₂ Concentration." Plant Journal 6(5): 741-748.

Hedrich, R. and E. Neher (1987). "Cytoplasmic Calcium Regulates Voltage-Dependent Ion Channels in Plant Vacuoles." Nature 329(6142): 833-836.

Hedrich, R., K. Raschke and M. Stitt (1985). "A role for fructose 2,6-bisphosphate in regulating carbohydrate metabolism in guard cells." Plant Physiol 79(4): 977-982.

Hertel, B., F. Horvath, B. Wodala, A. Hurst, A. Moroni and G. Thiel (2005). "KAT1 inactivates at sub-millimolar concentrations of external potassium." J Exp Bot 56(422): 3103-3110.

Herzschuh, U., J. Ni, H. J. B. Birks and J. Böhner (2011). "Driving forces of mid-Holocene vegetation shifts on the upper Tibetan Plateau, with emphasis on changes in atmospheric CO₂ concentrations." Quaternary Science Reviews 30(15-16): 1907-1917.

Hetherington, A. M. and C. Brownlee (2004). "The generation of Ca²⁺ signals in plants." Annu Rev Plant Biol 55: 401-427.

Hetherington, A. M. and F. I. Woodward (2003). "The role of stomata in sensing and driving environmental change." Nature 424(6951): 901-908.

Hille, B. (1992). "Ionic channels of excitable membranes." 2nd edition edn. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.

Hirai, N., R. Yoshida, Y. Todoroki and H. Ohgashi (2000). "Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi." Biosci Biotechnol Biochem 64(7): 1448-1458.

Hirayama, T. and K. Shinozaki (2007). "Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA." Trends in Plant Science 12(8): 343-351.

Hochuli, E., H. Dobeli and A. Schacher (1987). "New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues." J Chromatogr 411: 177-184.

Hodgkin, A. L., A. F. Huxley and B. Katz (1949). "Ionic Currents Underlying Activity in the Giant Axon of the Squid." Archives Des Sciences Physiologiques 3(2): 129-150.

Hodgkin, A. L., A. F. Huxley and B. Katz (1952). "Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo." Journal of Physiology-London 116(4): 424-448.

Hodgkin, A. L. and B. Katz (1949). "The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid." J Physiol 108(1): 37-77.

Homann, U. (1998). "Fusion and fission of plasma-membrane material accommodates for osmotically induced changes in the surface area of guard-cell protoplasts." Planta 206(2): 329-333.

Homann, U. and G. Thiel (2002). "The number of K(+) channels in the plasma membrane of guard cell protoplasts changes in parallel with the surface area." Proc Natl Acad Sci U S A 99(15): 10215-10220.

Hong, B., A. Ichida, Y. Wang, J. S. Gens, B. G. Pickard and J. F. Harper (1999). "Identification of a calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase in the endoplasmic reticulum." Plant Physiol 119(4): 1165-1176.

Hoshi, T. (1995). "Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors." J Gen Physiol 105(3): 309-328.

Hosy, E., A. Vavasseur, K. Mouline, I. Dreyer, F. Gaymard, F. Poree, J. Boucherez, A. Lebaudy, D. Bouchez, A. A. Very, T. Simonneau, J. B. Thibaud and H. Sentenac (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(9): 5549-5554.

Hoth, S., I. Dreyer, P. Dietrich, D. Becker, B. Muller-Rober and R. Hedrich (1997). "Molecular basis of plant-specific acid activation of K⁺ uptake channels." Proc Natl Acad Sci U S A 94(9): 4806-4810.

Hrabak, E. M., C. W. Chan, M. Gribskov, J. F. Harper, J. H. Choi, N. Halford, J. Kudla, S. Luan, H. G. Nimmo, M. R. Sussman, M. Thomas, K. Walker-Simmons, J. K. Zhu and A. C. Harmon (2003). "The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases." Plant Physiol 132(2): 666-680.

Huang, J. F., L. Teyton and J. F. Harper (1996). "Activation of a Ca(2+)-dependent protein kinase involves intramolecular binding of a calmodulin-like regulatory domain." Biochemistry 35(40): 13222-13230.

Humble, G. D. and T. C. Hsiao (1969). "Specific Requirement of Potassium for Light-Activated Opening of Stomata in Epidermal Strips." Plant Physiology 44: 230-234.

Humble, G. D. and K. Raschke (1971). "Stomatal Opening Quantitatively Related to Potassium Transport: Evidence from Electron Probe Analysis." Plant Physiol 48(4): 447-453.

Hurst, A. C., T. Meckel, S. Tayefeh, G. Thiel and U. Homann (2004). "Trafficking of the plant potassium inward rectifier KAT1 in guard cell protoplasts of *Vicia faba*." Plant Journal 37(3): 391-397.

Imamura, H., M. Nakano, H. Noji, E. Muneyuki, S. Ohkuma, M. Yoshida and K. Yokoyama (2003). "Evidence for rotation of V-1-ATPase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(5): 2312-2315.

Irving, H. R., C. A. Gehring and R. W. Parish (1992). "Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements." Proc Natl Acad Sci U S A 89(5): 1790-1794.

Ishikawa, H., H. Aizawa, H. Kishira, T. Ogawa and M. Sakata (1983). "Light-Induced-Changes of Membrane-Potential in Guard-Cells of *Vicia-Faba*." Plant and Cell Physiology 24(4): 769-772.

Ishitani, M., J. P. Liu, U. Halfter, C. S. Kim, W. M. Shi and J. K. Zhu (2000). "SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding." Plant Cell 12(9): 1667-1677.

Islam, M. M., S. Munemasa, M. A. Hossain, Y. Nakamura, I. C. Mori and Y. Murata (2010). "Roles of AtTPC1, vacuolar two pore channel 1, in Arabidopsis stomatal closure." Plant Cell Physiol 51(2): 302-311.

Israelsson, M., R. S. Siegel, J. Young, M. Hashimoto, K. Iba and J. I. Schroeder (2006). "Guard cell ABA and CO₂ signaling network updates and Ca²⁺ sensor priming hypothesis." Curr Opin Plant Biol 9(6): 654-663.

Jarvis, R. G. and T. A. Mansfield (1980). "Reduced stomatal responses to light, carbon dioxide and abscisic acid in the presence of sodium ions." Plant, Cell & Environment 3: 279-283.

Jeannette, E., J. P. Rona, F. Bardat, D. Cornel, B. Sotta and E. Miginiac (1999). "Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in Arabidopsis thaliana suspension cells." Plant J 18(1): 13-22.

Jiang, F. and W. Hartung (2008). "Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal." Journal of Experimental Botany 59(1): 37-43.

Johansson, I., M. Karlsson, V. K. Shukla, M. J. Chrispeels, C. Larsson and P. Kjellbom (1998). "Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation." Plant Cell 10(3): 451-459.

Kaldenhoff, R. and M. Fischer (2006). "Aquaporins in plants." Acta Physiol (Oxf) 187(1-2): 169-176.

Kasahara, H., K. Takei, N. Ueda, S. Hishiyama, T. Yamaya, Y. Kamiya, S. Yamaguchi and H. Sakakibara (2004). "Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in Arabidopsis." J Biol Chem 279(14): 14049-14054.

Keller, B. U., R. Hedrich and K. Raschke (1989). "Voltage-Dependent Anion Channels in the Plasma-Membrane of Guard-Cells." Nature 341(6241): 450-453.

Kim, K. N., Y. H. Cheong, J. J. Grant, G. K. Pandey and S. Luan (2003). "CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis." Plant Cell 15(2): 411-423.

Kim, M. J., R. Shin and D. P. Schachtman (2009). "A nuclear factor regulates abscisic acid responses in Arabidopsis." Plant Physiol 151(3): 1433-1445.

Kim, T. H., M. Bohmer, H. Hu, N. Nishimura and J. I. Schroeder (2010). "Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling." Annu Rev Plant Biol 61: 561-591.

Kinoshita, T., M. Doi, N. Suetsugu, T. Kagawa, M. Wada and K. Shimazaki (2001). "Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening." Nature 414(6864): 656-660.

Kinoshita, T., T. Emi, M. Tominaga, K. Sakamoto, A. Shigenaga, M. Doi and K. Shimazaki (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(4): 1453-1463.

Kinoshita, T., M. Nishimura and K. Shimazaki (1995). "Cytosolic Concentration of Ca²⁺ Regulates the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Guard Cells of Fava Bean." Plant Cell 7(8): 1333-1342.

Kinoshita, T. and K. Shimazaki (1999). "Blue light activates the plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells." EMBO J 18(20): 5548-5558.

Kinoshita, T. and K. Shimazaki (2001). "Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasma membrane H⁺-ATPase in response to fusicoccin." Plant Cell Physiol 42(4): 424-432.

Klein, M., G. Cheng, M. Chung and G. Tallman (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 and Environment 19(12): 1399-1407.

Klein, M., M. Geisler, S. J. Suh, H. U. Kolukisaoglu, L. Azevedo, S. Plaza, M. D. Curtis, A. Richter, B. Weder, B. Schulz and E. Martinoia (2004). "Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility." Plant J 39(2): 219-236.

Klein, M., L. Perfus-Barbeoch, A. Frelet, N. Gaedeke, D. Reinhardt, B. Mueller-Roeber, E. Martinoia and C. Forestier (2003). "The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use." Plant Journal 33(1): 119-129.

Kluge, C., J. Lahr, M. Hanitzsch, S. Bolte, D. Golldack and K. J. Dietz (2003). "New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H⁺-ATPase." Journal of Bioenergetics and Biomembranes 35(4): 377-388.

Klusener, B., J. J. Young, Y. Murata, G. J. Allen, I. C. Mori, V. Hugouvieux and J. I. Schroeder (2002). "Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis* guard cells." Plant Physiol 130(4): 2152-2163.

Knight, M. R., A. K. Campbell, S. M. Smith and A. J. Trewavas (1991). "Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium." *Nature* 352(6335): 524-526.

Knight, M. R., S. M. Smith and A. J. Trewavas (1992). "Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(11): 4967-4971.

Koiwai, H., K. Nakaminami, M. Seo, W. Mitsuhashi, T. Toyomasu and T. Koshiba (2004). "Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis." *Plant Physiol* 134(4): 1697-1707.

Kolb, H. A., I. Marten and R. Hedrich (1995). "Hodgkin-Huxley analysis of a GCAC1 anion channel in the plasma membrane of guard cells." *J Membr Biol* 146(3): 273-282.

Kolukisaoglu, U., S. Weinl, D. Blazevic, O. Batistic and J. Kudla (2004). "Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks." *Plant Physiology* 134(1): 43-58.

Konrad, K. R. and R. Hedrich (2008). "The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells." *Plant Journal* 55(1): 161-173.

Koornneef, M., G. Reuling and C. M. Karssen (1984). "The Isolation and Characterization of Abscisic-Acid Insensitive Mutants of Arabidopsis-Thaliana." *Physiologia Plantarum* 61(3): 377-383.

Kreps, J. A., Y. Wu, H. S. Chang, T. Zhu, X. Wang and J. F. Harper (2002). "Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress." *Plant Physiol* 130(4): 2129-2141.

Kudla, J., Q. Xu, K. Harter, W. Gruissem and S. Luan (1999). "Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(8): 4718-4723.

Kushiro, T., M. Okamoto, K. Nakabayashi, K. Yamagishi, S. Kitamura, T. Asami, N. Hirai, T. Koshiba, Y. Kamiya and E. Nambara (2004). "The Arabidopsis cytochrome P450CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism." *Embo Journal* 23(7): 1647-1656.

Kwak, J. M., I. C. Mori, Z. M. Pei, N. Leonhardt, M. A. Torres, J. L. Dangl, R. E. Bloom, S. Bodde, J. D. Jones and J. I. Schroeder (2003). "NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis." *EMBO J* 22(11): 2623-2633.

Lasceve, G., J. Leymarie and A. Vavasseur (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.

Lassar, A. B., J. N. Buskin, D. Lockshon, R. L. Davis, S. Apone, S. D. Hauschka and H. Weintraub (1989). "MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer." *Cell* 58(5): 823-831.

Latorre, R., R. Olcese, C. Basso, C. Gonzalez, F. Munoz, D. Cosmelli and O. Alvarez (2003). "Molecular coupling between voltage sensor and pore opening in the Arabidopsis inward rectifier K⁺ channel KAT1." *J Gen Physiol* 122(4): 459-469.

Lee, J. Y., B. C. Yoo and A. C. Harmon (1998). "Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean." *Biochemistry* 37(19): 6801-6809.

Lee, K. H., H. L. Piao, H. Y. Kim, S. M. Choi, F. Jiang, W. Hartung, I. Hwang, J. M. Kwak, I. J. Lee and I. Hwang (2006). "Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid." *Cell* 126(6): 1109-1120.

Lee, M., Y. Choi, B. Burla, Y. Y. Kim, B. Jeon, M. Maeshima, J. Y. Yoo, E. Martinoia and Y. Lee (2008). "The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂." *Nat Cell Biol* 10(10): 1217-1223.

Lee, S. C., W. Z. Lan, B. B. Buchanan and S. Luan (2009). "A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(50): 21419-21424.

Lee, S. M., H. S. Kim, H. J. Han, B. C. Moon, C. Y. Kim, J. F. Harper and W. S. Chung (2007). "Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited Ca²⁺-ATPase (ACA11) that is localized to vacuole membranes in Arabidopsis." *Febs Letters* 581(21): 3943-3949.

Leigh, R. A. (2001). "Potassium homeostasis and membrane transport." *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 164(2): 193-198.

Leon-Kloosterziel, K. M., M. A. Gil, G. J. Ruijs, S. E. Jacobsen, N. E. Olszewski, S. H. Schwartz, J. A. Zeevaart and M. Koornneef (1996). "Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci." *Plant J* 10(4): 655-661.

Leonhardt, N., J. M. Kwak, N. Robert, D. Waner, G. Leonhardt and J. I. Schroeder (2004). "Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant." *Plant Cell* 16(3): 596-615.

Leonhardt, N., A. Vavasseur and C. Forestier (1999). "ATP binding cassette modulators control abscisic acid-regulated slow anion channels in guard cells." *Plant Cell* 11(6): 1141-1152.

Leung, J., M. Bouvierdurand, P. C. Morris, D. Guerrier, F. Chefdor and J. Giraudat (1994). "Arabidopsis Aba Response Gene *Abi1* - Features of a Calcium-Modulated Protein Phosphatase." Science 264(5164): 1448-1452.

Leung, J., S. Merlot and J. Giraudat (1997). "The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction." Plant Cell 9(5): 759-771.

Levchenko, V., K. R. Konrad, P. Dietrich, M. R. Roelfsema and R. Hedrich (2005). "Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca^{2+} signals." Proc Natl Acad Sci U S A 102(11): 4203-4208.

Li, J., Y. R. Lee and S. M. Assmann (1998). "Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the *KAT1* potassium channel." Plant Physiol 116(2): 785-795.

Li, J., X. Q. Wang, M. B. Watson and S. M. Assmann (2000). "Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase." Science 287(5451): 300-303.

Li, L., B. G. Kim, Y. H. Cheong, G. K. Pandey and S. Luan (2006). "A Ca^{2+} signaling pathway regulates a K^{+} channel for low-K response in Arabidopsis." Proc Natl Acad Sci U S A 103(33): 12625-12630.

Li, S., S. M. Assmann and R. Albert (2006). "Predicting essential components of signal transduction networks: a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling." PLoS Biol 4(10): e312.

Linder, B. and K. Raschke (1992). "A Slow Anion Channel in Guard-Cells, Activating at Large Hyperpolarization, May Be Principal for Stomatal Closing." Febs Letters 313(1): 27-30.

Lino, B., V. M. Baizabal-Aguirre and L. E. Gonzalez de la Vara (1998). "The plasma-membrane H^{+} -ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation." Planta 204(3): 352-359.

Lisal, J. and M. Maduke (2008). "The *ClC-0* chloride channel is a 'broken' Cl^{-}/H^{+} antiporter." Nat Struct Mol Biol 15(8): 805-810.

Little, C. H. A. and D. C. Eidt (1968). "Effect of Abscisic Acid on Budbreak and Transpiration in Woody Species." Nature 220(5166): 498-&.

Liu, X., Y. Yue, B. Li, Y. Nie, W. Li, W. H. Wu and L. Ma (2007). "A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid." Science 315(5819): 1712-1716.

Lohse, G. and R. Hedrich (1992). "Characterization of the Plasma-Membrane H^{+} -ATPase from *Vicia-Faba* Guard-Cells - Modulation by Extracellular Factors and Seasonal-Changes." Planta 188(2): 206-214.

Lohse, G. and R. Hedrich (1995). "Anions Modify the Response of Guard-Cell Anion Channels to Auxin." Planta 197(3): 546-552.

Lu, Q., J. C. Bauer and A. Greener (1997). "Using *Schizosaccharomyces pombe* as a host for expression and purification of eukaryotic proteins." Gene 200(1-2): 135-144.

Luan, S. (2009). "The CBL-CIPK network in plant calcium signaling." Trends in Plant Science 14(1): 37-42.

Luan, S., W. Li, F. Rusnak, S. M. Assmann and S. L. Schreiber (1993). "Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells." Proc Natl Acad Sci U S A 90(6): 2202-2206.

Lucca, N. and G. Leon (2012). "Arabidopsis ACA7, encoding a putative auto-regulated Ca²⁺-ATPase, is required for normal pollen development." Plant Cell Reports 31(4): 651-659.

Lüttge, U. K., M.; Thiel, G. (2010). "Botanik - Die umfassende Biologie der Pflanzen." Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Ma, S. Y. and W. H. Wu (2007). "AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses." Plant Molecular Biology 65(4): 511-518.

Ma, Y., I. Szostkiewicz, A. Korte, D. Moes, Y. Yang, A. Christmann and E. Grill (2009). "Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors." Science 324(5930): 1064-1068.

Macallum, A. B. (1905). "On the distribution of potassium in animal and vegetable cells." J Physiol 32(2): 95-198 193.

MacRobbie, E. A. (1998). "Signal transduction and ion channels in guard cells." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353(1374): 1475-1488.

MacRobbie, E. A. and S. Kurup (2007). "Signalling mechanisms in the regulation of vacuolar ion release in guard cells." New Phytol 175(4): 630-640.

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(154): 707-726.

MacRobbie, E. A. C. (2006). "Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(4): 1135-1140.

Maeshima, M. (2001). "TONOPLAST TRANSPORTERS: Organization and Function." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52: 469-497.

Malpighi, M. (1675). "Anatome Plantarum." Royal Society, London.

Marmont, G. (1949). "Studies on the Axon Membrane .1. A New Method." Journal of Cellular and Comparative Physiology 34(3): 351-382.

Marten, H., R. Hedrich and M. R. Roelfsema (2007). "Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner." Plant J 50(1): 29-39.

Marten, H., K. R. Konrad, P. Dietrich, M. R. Roelfsema and R. Hedrich (2007). "Ca²⁺-dependent and -independent abscisic acid activation of plasma membrane anion channels in guard cells of *Nicotiana tabacum*." Plant Physiol 143(1): 28-37.

Marten, I., H. Busch, K. Raschke and R. Hedrich (1993). "Modulation and Block of the Plasma-Membrane Anion Channel of Guard-Cells by Stilbene Derivatives." European Biophysics Journal with Biophysics Letters 21(6): 403-408.

Marten, I. and T. Hoshi (1998). "The N-terminus of the K channel KAT1 controls its voltage-dependent gating by altering the membrane electric field." Biophys J 74(6): 2953-2962.

Marten, I., G. Lohse and R. Hedrich (1991). "Plant-Growth Hormones Control Voltage-Dependent Activity of Anion Channels in Plasma-Membrane of Guard-Cells." Nature 353(6346): 758-762.

Martin, M. L. and L. Busconi (2001). "A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature." Plant Physiol 125(3): 1442-1449.

Martinoia, E., M. Maeshima and H. E. Neuhaus (2007). "Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism." J Exp Bot 58(1): 83-102.

Mäser, P., S. Thomine, J. I. Schroeder, J. M. Ward, K. Hirschi, H. Sze, I. N. Talke, A. Amtmann, F. J. M. Maathuis, D. Sanders, J. F. Harper, J. Tchieu, M. Gribskov, M. W. Persans, D. E. Salt, S. A. Kim and M. L. Guerinot (2001). "Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*." Plant Physiology 126(4): 1646-1667.

Mayer, B. J., P. K. Jackson and D. Baltimore (1991). "The noncatalytic src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity." Proc Natl Acad Sci U S A 88(2): 627-631.

Mcainsh, M. R., C. Brownlee and A. M. Hetherington (1990). "Abscisic Acid-Induced Elevation of Guard-Cell Cytosolic Ca²⁺ Precedes Stomatal Closure." Nature 343(6254): 186-188.

McTigue, M. A., D. R. Williams and J. A. Tainer (1995). "Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel." J Mol Biol 246(1): 21-27.

Mei, H., N. H. Cheng, J. Zhao, S. Park, R. A. Escareno, J. K. Pittman and K. D. Hirschi (2009). "Root development under metal stress in *Arabidopsis thaliana* requires the H⁺/cation antiporter CAX4." New Phytologist 183(1): 95-105.

Melcher, K., L. M. Ng, X. E. Zhou, F. F. Soon, Y. Xu, K. M. Suino-Powell, S. Y. Park, J. J. Weiner, H. Fujii, V. Chinnusamy, A. Kovach, J. Li, Y. H. Wang, J. Y. Li, F. C. Peterson, D. R. Jensen, E. L. Yong, B. F. Volkman, S. R. Cutler, J. K. Zhu and H. E. Xu (2009). "A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors." *Nature* 462(7273): 602-U672.

Merlot, S., F. Gosti, D. Guerrier, A. Vavasseur and J. Giraudat (2001). "The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway." *Plant Journal* 25(3): 295-303.

Merlot, S., N. Leonhardt, F. Fenzi, C. Valon, M. Costa, L. Piette, A. Vavasseur, B. Genty, K. Boivin, A. Muller, J. Giraudat and J. Leung (2007). "Constitutive activation of a plasma membrane H(+)-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure." *EMBO J* 26(13): 3216-3226.

Meyer, K., M. P. Leube and E. Grill (1994). "A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*." *Science* 264(5164): 1452-1455.

Meyer, S., C. Lauterbach, M. Niedermeier, I. Barth, R. D. Sjolund and N. Sauer (2004). "Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues." *Plant Physiol* 134(2): 684-693.

Meyer, S., P. Mumm, D. Imes, A. Endler, B. Weder, K. A. Al-Rasheid, D. Geiger, I. Marten, E. Martinoia and R. Hedrich (2010). "AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells." *Plant J* 63(6): 1054-1062.

Milborrow, B. V. and H. S. Lee (1998). "Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid. VI - Carotenoids and ABA are formed by the 'non-mevalonate' triose-pyruvate pathway in chloroplasts." *Australian Journal of Plant Physiology* 25(5): 507-512.

Miller, A. J. and D. Sanders (1987). "Depletion of Cytosolic Free Calcium Induced by Photosynthesis." *Nature* 326(6111): 397-400.

Miller, C. (2006). "CIC chloride channels viewed through a transporter lens." *Nature* 440(7083): 484-489.

Mishra, G., W. Zhang, F. Deng, J. Zhao and X. Wang (2006). "A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*." *Science* 312(5771): 264-266.

Mittelhe, C. and R. Vansteve (1969). "Stomatal Closure and Inhibition of Transpiration Induced by (Rs)-Abscisic Acid." *Nature* 221(5177): 281-&.

Miyazono, K., T. Miyakawa, Y. Sawano, K. Kubota, H. J. Kang, A. Asano, Y. Miyauchi, M. Takahashi, Y. H. Zhi, Y. Fujita, T. Yoshida, K. S. Kodaira, K. Yamaguchi-Shinozaki and M. Tanokura (2009). "Structural basis of abscisic acid signalling." *Nature* 462(7273): 609-U679.

Mori, I. C., Y. Murata, Y. Yang, S. Munemasa, Y. F. Wang, S. Andreoli, H. Tiriac, J. M. Alonso, J. F. Harper, J. R. Ecker, J. M. Kwak and J. I. Schroeder (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(10): e327.

Muller, A. H. and M. Hansson (2009). "The barley magnesium chelatase 150-kd subunit is not an abscisic acid receptor." *Plant Physiol* 150(1): 157-166.

Murata, Y., Z. M. Pei, I. C. Mori and J. Schroeder (2001). "Abscisic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants." *Plant Cell* 13(11): 2513-2523.

Mustilli, A. C., S. Merlot, A. Vavasseur, F. Fenzi and J. Giraudat (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(12): 3089-3099.

Nambara, E. and A. Marion-Poll (2005). "Abscisic acid biosynthesis and catabolism." *Annual Review of Plant Biology* 56: 165-185.

Negi, J., O. Matsuda, T. Nagasawa, Y. Oba, H. Takahashi, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya, M. Hashimoto and K. Iba (2008). "CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells." *Nature* 452(7186): 483-486.

Neher, E., B. Sakmann and J. H. Steinbach (1978). "Extracellular Patch Clamp - Method for Resolving Currents through Individual Open Channels in Biological-Membranes." *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 375(2): 219-228.

Neumayer, P., R. Bock, S. Borneis, E. Brambrink, H. Brand, J. Caird, E. M. Campbell, E. Gaul, S. Goette, C. Haefner, T. Hahn, H. M. Heuck, D. H. H. Hoffmann, D. Javorkova, H. J. Kluge, T. Kuehl, S. Kunzer, T. Merz, E. Onkels, M. D. Perry, D. Reemts, M. Roth, S. Samek, G. Schaumann, F. Schrader, W. Seelig, A. Tauschwitz, R. Thiel, D. Ursescu, P. Wiewior, U. Wittrock and B. Zielbauer (2005). "Status of PHELIX laser and first experiments." *Laser and Particle Beams* 23(3): 385-389.

Nishimura, N., K. Hitomi, A. S. Arvai, R. P. Rambo, C. Hitomi, S. R. Cutler, J. I. Schroeder and E. D. Getzoff (2009). "Structural Mechanism of Abscisic Acid Binding and Signaling by Dimeric PYR1." *Science* 326(5958): 1373-1379.

Nishimura, N., A. Sarkeshik, K. Nito, S. Y. Park, A. Wang, P. C. Carvalho, S. Lee, D. F. Caddell, S. R. Cutler, J. Chory, J. R. Yates and J. I. Schroeder (2010). "PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis." *Plant J* 61(2): 290-299.

Nobel, P. S. (1999). "Physicochemical and Environmental Plant Physiology." *Academic Press*.

Norholm, M. H. H. (2010). "A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering." *Bmc Biotechnology* 10: -.

Nour-Eldin, H. H., B. G. Hansen, M. H. H. Norholm, J. K. Jensen and B. A. Halkier (2006). "Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments." *Nucleic Acids Research* 34(18): -.

Okamoto, M., Y. Tanaka, S. R. Abrams, Y. Kamiya, M. Seki and E. Nambara (2009). "High Humidity Induces Abscisic Acid 8'-Hydroxylase in Stomata and Vasculature to Regulate Local and Systemic Abscisic Acid Responses in Arabidopsis." *Plant Physiology* 149(2): 825-834.

Olsen, R. L., R. B. Pratt, P. Gump, A. Kemper and G. Tallman (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. (1980). "A Descriptive Evaluation of Quantitative Histochemical Methods Based on Pyridine-Nucleotides." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 31: 299-311.

Outlaw, W. H. and J. Manchester (1979). "Guard Cell Starch Concentration Quantitatively Related to Stomatal Aperture." *Plant Physiol* 64(1): 79-82.

Overlach, S., W. Diekmann and K. Raschke (1993). "Phosphate Translocator of Isolated Guard-Cell Chloroplasts from *Pisum-Sativum* L Transports Glucose-6-Phosphate." *Plant Physiology* 101(4): 1201-1207.

Palmgren, M. G. (2001). "PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 817-845.

Palmgren, M. G., M. Sommarin, R. Serrano and C. Larsson (1991). "Identification of an Autoinhibitory Domain in the C-Terminal Region of the Plant Plasma-Membrane H⁺-Atpase." *Journal of Biological Chemistry* 266(30): 20470-20475.

Pandey, G. K., Y. H. Cheong, K. N. Kim, J. J. Grant, L. Li, W. Hung, C. D'Angelo, S. Weinl, J. Kudla and S. Luan (2004). "The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in Arabidopsis." *Plant Cell* 16(7): 1912-1924.

Pandey, G. K., J. J. Grant, Y. H. Cheong, B. G. Kim, G. Li le and S. Luan (2008). "Calcineurin-B-like protein CBL9 interacts with target kinase CIPK3 in the regulation of ABA response in seed germination." *Mol Plant* 1(2): 238-248.

Pandey, S., J. G. Chen, A. M. Jones and S. M. Assmann (2006). "G-protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development." *Plant Physiol* 141(1): 243-256.

Pandey, S., D. C. Nelson and S. M. Assmann (2009). "Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis." *Cell* 136(1): 136-148.

Pandey, S., W. Zhang and S. M. Assmann (2007). "Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction." *FEBS Lett* 581(12): 2325-2336.

Park, M. R., W. Leber and M. R. Klee (1981). "Single Electrode Voltage Clamp by Iteration." *Journal of Neuroscience Methods* 3(3): 271-283.

Park, S. Y., P. Fung, N. Nishimura, D. R. Jensen, H. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, T. F. Chow, S. E. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, N. J. Provart, D. Desveaux, P. L. Rodriguez, P. McCourt, J. K. Zhu, J. I. Schroeder, B. F. Volkman and S. R. Cutler (2009). "Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins." *Science* 324(5930): 1068-1071.

Pei, Z. M., K. Kuchitsu, J. M. Ward, M. Schwarz and J. I. Schroeder (1997). "Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in Arabidopsis wild-type and abi1 and abi2 mutants." *Plant Cell* 9(3): 409-423.

Pei, Z. M., Y. Murata, G. Benning, S. Thomine, B. Klusener, G. J. Allen, E. Grill and J. I. Schroeder (2000). "Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells." *Nature* 406(6797): 731-734.

Peiter, E., F. J. M. Maathuis, L. N. Mills, H. Knight, J. Pelloux, A. M. Hetherington and D. Sanders (2005). "The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement." *Nature* 434(7031): 404-408.

Penny, M. G., L. S. Kelday and D. J. F. Bowling (1976). "Active Chloride Transport in Leaf Epidermis of Commelina-Communis in Relation to Stomatal Activity." *Planta* 130(3): 291-294.

Piccolo, A. and M. Pusch (2005). "Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5." *Nature* 436(7049): 420-423.

Pilot, G., B. Lacombe, F. Gaymard, I. Cherel, J. Boucherez, J. B. Thibaud and H. Sentenac (2001). "Guard cell inward K⁺ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2." *J Biol Chem* 276(5): 3215-3221.

Pineros, M. A., G. M. Cancado, L. G. Maron, S. M. Lyi, M. Menossi and L. V. Kochian (2008). "Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of ZmALMT1 - an anion-selective transporter." *Plant J* 53(2): 352-367.

Porath, J., J. Carlsson, I. Olsson and G. Belfrage (1975). "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." *Nature* 258(5536): 598-599.

Priest, D. M., S. J. Ambrose, F. E. Vaistij, L. Elias, G. S. Higgins, A. R. S. Ross, S. R. Abrams and D. J. Bowles (2006). "Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in Arabidopsis thaliana." *Plant Journal* 46(3): 492-502.

Qiu, Q. S., Y. Guo, M. A. Dietrich, K. S. Schumaker and J. K. Zhu (2002). "Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3." Proc Natl Acad Sci U S A 99(12): 8436-8441.

Quintero, F. J., M. Ohta, H. Shi, J. K. Zhu and J. M. Pardo (2002). "Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A 99(13): 9061-9066.

Quintero, F. J., M. Ohta, H. Z. Shi, J. K. Zhu and J. M. Pardo (2002). "Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(13): 9061-9066.

Randak, C. and M. J. Welsh (2003). "An intrinsic adenylate kinase activity regulates gating of the ABC transporter CFTR." Cell 115(7): 837-850.

Ranf, S., P. Wunnenberg, J. Lee, D. Becker, M. Dunkel, R. Hedrich, D. Scheel and P. Dietrich (2008). "Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca²⁺ signals induced by abiotic and biotic stresses." Plant J 53(2): 287-299.

Raschke, K. and M. Dickerson (1972). "Changes in shape and volume of guard cells during stomatal movement." Plant Research: 153-154.

Raschke, K. and H. Schnabl (1978). "Availability of Chloride Affects Balance between Potassium-Chloride and Potassium Malate in Guard Cells of *Vicia-Faba* L." Plant Physiology 62(1): 84-87.

Raschke, K., M. Shabahang and R. Wolf (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(4): 639-650.

Rea, P. A. (2007). "Plant ATP-Binding cassette transporters." Annual Review of Plant Biology 58: 347-375.

Reckmann, U., R. Scheibe and K. Raschke (1990). "Rubisco Activity in Guard Cells Compared with the Solute Requirement for Stomatal Opening." Plant Physiol 92(1): 246-253.

Reddy, A. R. and V. S. R. Das (1986). "Stomatal Movement and Sucrose Uptake by Guard-Cell Protoplasts of *Commelina-Benghalensis* L." Plant and Cell Physiology 27(8): 1565-1570.

Risk, J. M., C. L. Day and R. C. Macknight (2009). "Reevaluation of abscisic acid-binding assays shows that G-Protein-Coupled Receptor2 does not bind abscisic Acid." Plant Physiology 150(1): 6-11.

Ritte, G., J. Rosenfeld, K. Rohrig and K. Raschke (1999). "Rates of sugar uptake by guard cell protoplasts of *Pisum sativum* L. related to the solute requirement for stomatal opening." Plant Physiology 121(2): 647-655.

Robert, N., S. Merlot, V. N'Guyen, A. Boisson-Dernier and J. I. Schroeder (2006). "A hypermorphic mutation in the protein phosphatase 2C HAB1 strongly affects ABA signaling in Arabidopsis." FEBS Lett 580(19): 4691-4696.

Robinson, N. L. and J. Preiss (1987). "Localization of Carbohydrate Metabolizing Enzymes in Guard Cells of *Commelina communis*." Plant Physiol 85(2): 360-364.

Roelfsema, M. R. and R. Hedrich (2005). "In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'." New Phytol 167(3): 665-691.

Roelfsema, M. R. and R. Hedrich (2010). "Making sense out of Ca(2+) signals: their role in regulating stomatal movements." Plant Cell Environ 33(3): 305-321.

Roelfsema, M. R., K. R. Konrad, H. Marten, G. K. Psaras, W. Hartung and R. Hedrich (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(8): 1595-1605.

Roelfsema, M. R., V. Levchenko and R. Hedrich (2004). "ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels." Plant J 37(4): 578-588.

Roelfsema, M. R., R. Steinmeyer, M. Staal and R. Hedrich (2001). "Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane." Plant J 26(1): 1-13.

Roelfsema, M. R. G. and R. Hedrich (2005). "In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'." New Phytologist 167(3): 665-691.

Roelfsema, M. R. G. and H. B. A. Prins (1995). "Effect of abscisic acid on stomatal opening in isolated epidermal strips of abi mutants of *Arabidopsis thaliana*." Physiologia Plantarum 95(3): 373-378.

Roelfsema, M. R. G. and H. B. A. Prins (1997). "Ion channels in guard cells of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh." Planta 202(1): 18-27.

Roelfsema, M. R. G., M. Staal and H. B. A. Prins (1998). "Blue light-induced apoplastic acidification of *Arabidopsis thaliana* guard cells: Inhibition by ABA is mediated through protein phosphatases." Physiologia Plantarum 103(4): 466-474.

Ron, D. and H. Dressler (1992). "pGStag--a versatile bacterial expression plasmid for enzymatic labeling of recombinant proteins." Biotechniques 13(6): 866-869.

Rubio, S., A. Rodrigues, A. Saez, M. B. Dizon, A. Galle, T. H. Kim, J. Santiago, J. Flexas, J. I. Schroeder and P. L. Rodriguez (2009). "Triple Loss of Function of Protein Phosphatases Type 2C Leads to Partial Constitutive Response to Endogenous Abscisic Acid." Plant Physiology 150(3): 1345-1355.

Rudert, F., E. Visser, G. Gradl, P. Grandison, L. Shemshedini, Y. Wang, A. Grierson and J. Watson (1996). "pLEF, a novel vector for expression of glutathione S-transferase fusion proteins in mammalian cells." Gene 169(2): 281-282.

Rutschmann, F., U. Stalder, M. Piotrowski, C. Oecking and A. Schaller (2002). "LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization." Plant Physiology 129(1): 156-168.

Saez, A., N. Apostolova, M. Gonzalez-Guzman, M. P. Gonzalez-Garcia, C. Nicolas, O. Lorenzo and P. L. Rodriguez (2004). "Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling." Plant J 37(3): 354-369.

Sanchez-Barrena, M. J., H. Fujii, I. Angulo, M. Martinez-Ripoll, J. K. Zhu and A. Albert (2007). "The structure of the C-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3." Mol Cell 26(3): 427-435.

Sanchez-Fernandez, R., T. G. E. Davies, J. O. D. Coleman and P. A. Rea (2001). "The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory." Journal of Biological Chemistry 276(32): 30231-30244.

Santiago, J., F. Dupeux, A. Round, R. Antoni, S. Y. Park, M. Jamin, S. R. Cutler, P. L. Rodriguez and J. A. Marquez (2009). "The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid." Nature 462(7273): 665-U143.

Sarda, X., D. Tusch, K. Ferrare, E. Legrand, J. M. Dupuis, F. Casse-Delbart and T. Lamaze (1997). "Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells." Plant J 12(5): 1103-1111.

Sasaki, T., I. C. Mori, T. Furuichi, S. Munemasa, K. Toyooka, K. Matsuoka, Y. Murata and Y. Yamamoto (2010). "Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter." Plant Cell Physiol 51(3): 354-365.

Sasaki, T., Y. Yamamoto, B. Ezaki, M. Katsuhara, S. J. Ahn, P. R. Ryan, E. Delhaize and H. Matsumoto (2004). "A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter." Plant J 37(5): 645-653.

Sato, A., Y. Sato, Y. Fukao, M. Fujiwara, T. Umezawa, K. Shinozaki, T. Hibi, M. Taniguchi, H. Miyake, D. B. Goto and N. Uozumi (2009). "Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase." Biochem J 424(3): 439-448.

Sauter, A., W. J. Davies and W. Hartung (2001). "The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot." J Exp Bot 52(363): 1991-1997.

Schachtman, D. P., J. I. Schroeder, W. J. Lucas, J. A. Anderson and R. F. Gaber (1992). "Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA." Science 258(5088): 1654-1658.

Schiott, M., S. M. Romanowsky, L. Baekgaard, M. K. Jakobsen, M. G. Palmgren and J. F. Harper (2004). "A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is required for normal pollen tube growth and fertilization." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(25): 9502-9507.

Schmidt, C., I. Schelle, Y. J. Liao and J. I. Schroeder (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(21): 9535-9539.

Schmidt, C. and J. I. Schroeder (1994). "Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma Membrane of Guard Cells (Large Nitrate Permeability)." Plant Physiol 106(1): 383-391.

Schnabl, H. and C. Kottmeier (1984). "Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Desalted Extracts from Isolated Guard-Cell Protoplasts." Planta 162(3): 220-225.

Scholz-Starke, J., A. Carpaneto and F. Gambale (2006). "On the interaction of neomycin with the slow vacuolar channel of *Arabidopsis thaliana*." Journal of General Physiology 127(3): 329-340.

Schopfer, P. and A. Brennicke (1999). Pflanzenphysiologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.

Schroeder, J. I. (1988). "K⁺ transport properties of K⁺ channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells." J Gen Physiol 92(5): 667-683.

Schroeder, J. I., G. J. Allen, V. Hugouvieux, J. M. Kwak and D. Waner (2001). "Guard Cell Signal Transduction." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52: 627-658.

Schroeder, J. I. and S. Hagiwara (1989). "Cytosolic Calcium Regulates Ion Channels in the Plasma-Membrane of *Vicia-Faba* Guard-Cells." Nature 338(6214): 427-430.

Schroeder, J. I. and S. Hagiwara (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(23): 9305-9309.

Schroeder, J. I. and B. U. Keller (1992). "Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation." Proc Natl Acad Sci U S A 89(11): 5025-5029.

Schroeder, J. I., C. Schmidt and J. Sheaffer (1993). "Identification of High-Affinity Slow Anion Channel Blockers and Evidence for Stomatal Regulation by Slow Anion Channels in Guard-Cells." Plant Cell 5(12): 1831-1841.

Schulz-Lessdorf, B., P. Dietrich, I. Marten, G. Lohse, H. Busch and R. Hedrich (1994). "Coordination of plasma membrane and vacuolar membrane ion channels during stomatal movement." Symp Soc Exp Biol 48: 99-112.

Schulz-Lessdorf, B., G. Lohse and R. Hedrich (1996). "GCAC1 recognizes the pH gradient across the plasma membrane: A pH-sensitive and ATP-dependent anion channel

links guard cell membrane potential to acid and energy metabolism." Plant Journal 10(6): 993-1004.

Sheen, J. (1998). "Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(3): 975-980.

Shemarova, I. V. and V. P. Nesterov (2005). "Evolution of mechanisms of Ca²⁺-signaling: Role of calcium ions in signal transduction in prokaryotes." Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 41(1): 12-19.

Shen, Y. Y., X. F. Wang, F. Q. Wu, S. Y. Du, Z. Cao, Y. Shang, X. L. Wang, C. C. Peng, X. C. Yu, S. Y. Zhu, R. C. Fan, Y. H. Xu and D. P. Zhang (2006). "The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor." Nature 443(7113): 823-826.

Shi, J. R., K. N. Kim, O. Ritz, V. Albrecht, R. Gupta, K. Harter, S. Luan and J. Kudla (1999). "Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in Arabidopsis." Plant Cell 11(12): 2393-2405.

Shigaki, T. and K. D. Hirschi (2006). "Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H⁺ exchangers in plants." Plant Biology 8(4): 419-429.

Shimazaki, K., M. Doi, S. M. Assmann and T. Kinoshita (2007). "Light regulation of stomatal movement." Annu Rev Plant Biol 58: 219-247.

Shimazaki, K., M. Iino and E. Zeiger (1986). "Blue Light-Dependent Proton Extrusion by Guard-Cell Protoplasts of Vicia-Faba." Nature 319(6051): 324-326.

Shoemaker, E. and L. Srivasta (1973). "Mechanics of Stomatal Opening in Corn (Zea-Mays L) Leaves." Journal of Theoretical Biology 42(2): 219-&.

Shope, J. C., D. B. DeWald and K. A. Mott (2003). "Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization." Plant Physiol 133(3): 1314-1321.

Shope, J. C. and K. A. Mott (2006). "Membrane trafficking and osmotically induced volume changes in guard cells." J Exp Bot 57(15): 4123-4131.

Siegel, R. S., S. Xue, Y. Murata, Y. Yang, N. Nishimura, A. Wang and J. I. Schroeder (2009). "Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in Arabidopsis guard cells." Plant J 59(2): 207-220.

Sirichandra, C., D. Gu, H. C. Hu, M. Davanture, S. Lee, M. Djaoui, B. Valot, M. Zivy, J. Leung, S. Merlot and J. M. Kwak (2009). "Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase (vol 583, pg 2982, 2009)." Febs Letters 583(20): 3375-3375.

Smith, D. B. and K. S. Johnson (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." Gene 67(1): 31-40.

Sottocornola, B., S. Gazzarrini, C. Olivari, G. Romani, P. Valbuzzi, G. Thiel and A. Moroni (2008). "14-3-3 proteins regulate the potassium channel KAT1 by dual modes." Plant Biology 10(2): 231-236.

Stadler, R., M. Buttner, P. Ache, R. Hedrich, N. Ivashikina, M. Melzer, S. M. Shearson, S. M. Smith and N. Sauer (2003). "Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of *Arabidopsis*." Plant Physiology 133(2): 528-537.

Stange, A., R. Hedrich and M. R. Roelfsema (2010). "Ca(2+)-dependent activation of guard cell anion channels, triggered by hyperpolarization, is promoted by prolonged depolarization." Plant J 62(2): 265-276.

Staxen, I., C. Pical, L. T. Montgomery, J. E. Gray, A. M. Hetherington and M. R. McAinsh (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(4): 1779-1784.

Strugger, S. and F. Weber (1926). "Zur Physiologie der Stomata-Nebenzellen." Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 44: 272-278.

Suh, S. J., Y. F. Wang, A. Frelet, N. Leonhardt, M. Klein, C. Forestier, B. Mueller-Roeber, M. H. Cho, E. Martinoia and J. I. Schroeder (2007). "The ATP binding cassette transporter AtMRP5 modulates anion and calcium channel activities in *Arabidopsis* guard cells." Journal of Biological Chemistry 282(3): 1916-1924.

Suhita, D., A. S. Raghavendra, J. M. Kwak and A. Vavasseur (2004). "Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure." Plant Physiology 134(4): 1536-1545.

Sutter, J. U., P. Campanoni, M. Tyrrell and M. R. Blatt (2006). "Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel at the plasma membrane." Plant Cell 18(4): 935-954.

Svennelid, F., A. Olsson, M. Piotrowski, M. Rosenquist, C. Ottman, C. Larsson, C. Oecking and M. Sommarin (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(12): 2379-2391.

Sze, H., X. Li and M. G. Palmgren (1999). "Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis." Plant Cell 11(4): 677-690.

Szyroki, A., N. Ivashikina, P. Dietrich, M. R. Roelfsema, P. Ache, B. Reintanz, R. Deeken, M. Godde, H. Felle, R. Steinmeyer, K. Palme and R. Hedrich (2001). "KAT1 is not essential for stomatal opening." Proc Natl Acad Sci U S A 98(5): 2917-2921.

Tahtiharju, S., V. Sangwan, A. F. Monroy, R. S. Dhindsa and M. Borg (1997). "The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium." Planta 203(4): 442-447.

Taiz, L. and E. Zeiger (2000). "Physiologie der Pflanzen." Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl.

Takahashi, K., M. Isobe, M. R. Knight, A. J. Trewavas and S. Muto (1997). "Hypoosmotic Shock Induces Increases in Cytosolic Ca²⁺ in Tobacco Suspension-Culture Cells." Plant Physiol 113(2): 587-594.

Takahashi, T., E. Neher and B. Sakmann (1987). "Rat brain serotonin receptors in *Xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels." Proc Natl Acad Sci U S A 84(14): 5063-5067.

Takemiya, A., S. Yamauchi, T. Yano, C. Ariyoshi and K. I. Shimazaki (2012). "Identification of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Which Mediates Blue Light Signaling for Stomatal Opening." Plant Cell Physiol.

Talbott, L. D. and E. Zeiger (1993). "Sugar and Organic Acid Accumulation in Guard Cells of *Vicia faba* in Response to Red and Blue Light." Plant Physiol 102(4): 1163-1169.

Talbott, L. D. and E. Zeiger (1996). "Central Roles for Potassium and Sucrose in Guard-Cell Osmoregulation." Plant Physiol 111(4): 1051-1057.

Tan, B. C., L. M. Joseph, W. T. Deng, L. J. Liu, Q. B. Li, K. Cline and D. R. McCarty (2003). "Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family." Plant Journal 35(1): 44-56.

Tang, X. D., R. Xu, M. F. Reynolds, M. L. Garcia, S. H. Heinemann and T. Hoshi (2003). "Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels." Nature 425(6957): 531-535.

Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." Appl Microbiol Biotechnol 60(5): 523-533.

Thiel, G., E. A. C. MacRobbie and M. R. Blatt (1992). "Membrane-Transport in Stomatal Guard-Cells - the Importance of Voltage Control." Journal of Membrane Biology 126(1): 1-18.

Till, B. J., S. H. Reynolds, E. A. Greene, C. A. Codomo, L. C. Enns, J. E. Johnson, C. Burtner, A. R. Odden, K. Young, N. E. Taylor, J. G. Henikoff, L. Comai and S. Henikoff (2003). "Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING." Genome Res 13(3): 524-530.

Tornroth-Horsefield, S., Y. Wang, K. Hedfalk, U. Johanson, M. Karlsson, E. Tajkhorshid, R. Neutze and P. Kjellbom (2006). "Structural mechanism of plant aquaporin gating." Nature 439(7077): 688-694.

Uehlein, N., C. Lovisolo, F. Siefritz and R. Kaldenhoff (2003). "The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions." *Nature* 425(6959): 734-737.

Ueno, K., T. Kinoshita, S. Inoue, T. Emi and K. Shimazaki (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(6): 955-963.

Umezawa, T., N. Sugiyama, M. Mizoguchi, S. Hayashi, F. Myouga, K. Yamaguchi-Shinozaki, Y. Ishihama, T. Hirayama and K. Shinozaki (2009). "Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(41): 17588-17593.

Umezawa, T., R. Yoshida, K. Maruyama, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki (2004). "SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49): 17306-17311.

Uozumi, N., W. Gassmann, Y. Cao and J. I. Schroeder (1995). "Identification of strong modifications in cation selectivity in an *Arabidopsis* inward rectifying potassium channel by mutant selection in yeast." *J Biol Chem* 270(41): 24276-24281.

Uozumi, N., T. Nakamura, J. I. Schroeder and S. Muto (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(17): 9773-9778.

Urao, T., T. Katagiri, T. Mizoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, N. Hayashida and K. Shinozaki (1994). "Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*." *Mol Gen Genet* 244(4): 331-340.

Vahisalu, T., H. Kollist, Y. F. Wang, N. Nishimura, W. Y. Chan, G. Valerio, A. Lamminmaki, M. Brosche, H. Moldau, R. Desikan, J. I. Schroeder and J. Kangasjarvi (2008). "SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling." *Nature* 452(7186): 487-491.

Vahisalu, T., I. Puzorjova, M. Brosche, E. Valk, M. Lepiku, H. Moldau, P. Pechter, Y. S. Wang, O. Lindgren, J. Salojarvi, M. Loog, J. Kangasjarvi and H. Kollist (2010). "Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1." *Plant J* 62(3): 442-453.

van den Wijngaard, P. W., M. P. Sinnige, I. Roobeek, A. Reumer, P. J. Schoonheim, J. N. Mol, M. Wang and A. H. De Boer (2005). "Abscisic acid and 14-3-3 proteins control K channel activity in barley embryonic root." *Plant J* 41(1): 43-55.

Van Kirk, C. A. and K. Raschke (1978). "Presence of Chloride Reduces Malate Production in Epidermis during Stomatal Opening." *Plant Physiol* 61(3): 361-364.

Van Kirk, C. A. and K. Raschke (1978). "Release of Malate from Epidermal Strips during Stomatal Closure." Plant Physiol 61(3): 474-475.

Very, A. A., F. Gaymard, C. Bosseux, H. Sentenac and J. B. Thibaud (1995). "Expression of a cloned plant K⁺ channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents." Plant J 7(2): 321-332.

Very, A. A. and H. Sentenac (2003). "Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants." Annual Review of Plant Biology 54: 575-603.

Vitart, V., J. Christodoulou, J. F. Huang, W. J. Chazin and J. F. Harper (2000). "Intramolecular activation of a Ca²⁺-dependent protein kinase is disrupted by insertions in the tether that connects the calmodulin-like domain to the kinase (vol 39, pg 4004, 2000)." Biochemistry 39(39): 12102-12102.

Vlad, F., S. Rubio, A. Rodrigues, C. Sirichandra, C. Belin, N. Robert, J. Leung, P. L. Rodriguez, C. Lauriere and S. Merlot (2009). "Protein Phosphatases 2C Regulate the Activation of the Snf1-Related Kinase OST1 by Abscisic Acid in *Arabidopsis*." Plant Cell 21(10): 3170-3184.

Walker, D. J., R. A. Leigh and A. J. Miller (1996). "Potassium homeostasis in vacuolate plant cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(19): 10510-10514.

Walter, M., C. Chaban, K. Schutze, O. Batistic, K. Weckermann, C. Nake, D. Blazevic, C. Grefen, K. Schumacher, C. Oecking, K. Harter and J. Kudla (2004). "Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation." Plant Journal 40(3): 428-438.

Wanke, D. and H. U. Kolukisaoglu (2010). "An update on the ABCC transporter family in plants: many genes, many proteins, but how many functions?" Plant Biology 12: 15-25.

Ward, J. M. and J. I. Schroeder (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(5): 669-683.

Wille, A. C. and W. J. Lucas (1984). "Ultrastructural and Histochemical-Studies on Guard-Cells." Planta 160(2): 129-142.

Willmer, C. M. and M. D. Fricker (1996). "Stomata." 2nd Ed. Chapman and Hall.

Wright, S. T. C. and R. W. P. Hiron (1969). "(+)-Abscisic Acid, Growth Inhibitor Induced in Detached Wheat Leaves by a Period of Wilting." Nature 224(5220): 719-&.

Wu, F. Q., Q. Xin, Z. Cao, Z. Q. Liu, S. Y. Du, C. Mei, C. X. Zhao, X. F. Wang, Y. Shang, T. Jiang, X. F. Zhang, L. Yan, R. Zhao, Z. N. Cui, R. Liu, H. L. Sun, X. L. Yang, Z. Su and D. P. Zhang (2009). "The magnesium-chelatase H subunit binds abscisic acid and functions in abscisic acid signaling: new evidence in *Arabidopsis*." Plant Physiol 150(4): 1940-1954.

- Xu, J., H. D. Li, L. Q. Chen, Y. Wang, L. L. Liu, L. He and W. H. Wu** (2006). "A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis." Cell 125(7): 1347-1360.
- Yamaguchi, M. and K. Kasamo** (2001). "Modulation in the activity of purified tonoplast H⁺-ATPase by tonoplast glycolipids prepared from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Boro) cells." Plant Cell Physiol 42(5): 516-523.
- Yin, P., H. Fan, Q. Hao, X. Q. Yuan, D. Wu, Y. X. Pang, C. Y. Yan, W. Q. Li, J. W. Wang and N. Yan** (2009). "Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins." Nature Structural & Molecular Biology 16(12): 1230-U1242.
- Yoo, B. C. and A. C. Harmon** (1996). "Intramolecular binding contributes to the activation of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain." Biochemistry 35(37): 12029-12037.
- Yoshida, R., T. Hobo, K. Ichimura, T. Mizoguchi, F. Takahashi, J. Aronso, J. R. Ecker and K. Shinozaki** (2002). "ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis." Plant and Cell Physiology 43(12): 1473-1483.
- Yoshida, R., T. Umezawa, T. Mizoguchi, S. Takahashi, F. Takahashi and K. Shinozaki** (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(8): 5310-5318.
- Yunta, C., M. Martinez-Ripoll and A. Albert** (2011). "SnRK2.6/OST1 from Arabidopsis thaliana: cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of K50N and D160A mutants." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 67(Pt 3): 364-368.
- Zeevaart, J. A. D. and R. A. Creelman** (1988). "Metabolism and Physiology of Abscisic-Acid." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 39: 439-473.
- Zhang, S. Q., W. H. Outlaw, Jr. and R. Chollet** (1994). "Lessened malate inhibition of guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase velocity during stomatal opening." FEBS Lett 352(1): 45-48.
- Zhang, X., H. Wang, A. Takemiya, C. P. Song, T. Kinoshita and K. Shimazaki** (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(4): 4150-4158.
- Zhao, J., J. M. Connorton, Y. Q. Guo, X. K. Li, T. Shigaki, K. D. Hirschi and J. K. Pittman** (2009). "Functional Studies of Split Arabidopsis Ca²⁺/H⁺ Exchangers." Journal of Biological Chemistry 284(49): 34075-34083.
- Zhu, S. Y., X. C. Yu, X. J. Wang, R. Zhao, Y. Li, R. C. Fan, Y. Shang, S. Y. Du, X. F. Wang, F. Q. Wu, Y. H. Xu, X. Y. Zhang and D. P. Zhang** (2007). "Two calcium-

dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis." Plant Cell 19(10): 3019-3036.

Zifarelli, G. and M. Pusch (2010). "CLC transport proteins in plants." Febs Letters 584(10): 2122-2127.

6 Anhang

6.1 Veröffentlichungsverzeichnis

D. Geiger*, **S. Scherzer***, P. Mumm, A. Stange, I. Marten, H. Bauer, P. Ache, S. Matschi, A. Liese, K. A. Al-Rasheid, T. Romeis and R. Hedrich (2009). "Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair." Proc Natl Acad Sci U S A 106(50): 21425-21430.

D. Geiger*, **S. Scherzer***, P. Mumm, I. Marten, P. Ache, S. Matschi, A. Liese, C. Wellmann, K. A. Al-Rasheid, E. Grill, T. Romeis and R. Hedrich (2010). "Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities." Proc Natl Acad Sci U S A 107(17): 8023-8028.

D. Geiger*, T. Maierhofer*, K. A. Al-Rasheid, **S. Scherzer**, P. Mumm, A. Liese, P. Ache, C. Wellmann, I. Marten, E. Grill, T. Romeis and R. Hedrich (2011). "Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1." Sci Signal 4(173): ra32.

S. Scherzer, T. Maierhofer, K. A. Al-Rasheid, D. Geiger and R. Hedrich (2012). "Multiple Calcium-Dependent Kinases Modulate ABA-Activated Guard Cell Anion Channels." Mol Plant.

F. Demir*, C. Horntrich*, J. O. Blachutzik, **S. Scherzer**, Y. Reinders, G. S. Harms, R. Hedrich, D. Geiger, I. Kreuzer (in revision). "Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3." Proc Natl Acad Sci U S A "

* Autoren sind gleichberechtigt

6.2 Lebenslauf

Sönke Helmut Scherzer

Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften
 Universität Würzburg
 Julius-von-Sachs-Platz 2
 97082 Würzburg
 Tel.: 0931 - 31 80153
 Fax: 0931 - 31-86157
 E-mail: s.scherzer@botanik.uni-wuerzburg.de

Privat:
 Kärnergasse 5
 97070 Würzburg
 Tel.: 0931/4044692

E-mail: soenke.scherzer@web.de

Geboren am: 11. März 1980 in Geldern
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig
 Kinder: keine

Ausbildung an Schulen und Universitäten:

- seit 2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen bei Prof. Dr. Rainer Hedrich und Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Neher
 Mit dem Thema: Amperometrische Visualisierung der Sekretion an *Dionaea muscipula* und biophysikalische Analysen der beteiligten Transporter
- 2007-2010 Doktorandenstipendium am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg, bei Prof. Dr. Rainer Hedrich.
 Thema der Dissertation: Biophysikalische Analyse und Rekonstitution des schnellen ABA-Signaltransduktionsweges aus *Arabidopsis thaliana*
- 2005-2006 Anfertigung der Diplomarbeit im Fach Biotechnologie bei Prof. Dr. Ulrich Zimmermann
 Thema der Diplomarbeit: Druckmesssondenexperimente am Xylem höherer Pflanzen. Entwicklung einer Nitrat-Selektiven Xylemsonde
- 2000-2006 Studium der Biologie (Diplom) an der Bayerischen Julius- Maximilians-Universität Würzburg
 Ausrichtung des Hauptstudiums: Biotechnologie
 Nebenfächer: Genetik und Biochemie
 Abschluss: Diplom
- 1999-2000 Bundeswehr, Grundwehrdienst im Koblenz
- Mai-1999 Abitur
- 1990-1999 Besuch des Gymnasiums Thomaeum, Kempen
- 1986-1990 Besuch der Grundschule, Kerken-Aldekerk

6.3 Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABI	ABA-insensitive
AgCl	Silberchlorid
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
<i>C. communis</i>	<i>Commelina communis</i>
CDPK	Ca ²⁺ -dependent protein kinase
CIPK	CBL-interacting protein kinase
CBL	Calcineurin B-like
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CO ₂	Kohlendioxid
CPK	Ca ²⁺ -dependent protein kinase
°C	Grad Celsius
TEVC	Two electrode voltage clamp
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
Erev	Umkehrpotential
EtOH	Ethanol
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
I	Strom
I _{SS}	Gleichgewichtsstrom
K ⁺	Kalium-Ion
K ⁺ _{in}	Kaliumeinwärtsgleichrichter
K ⁺ _{out}	Kaliumauswärtsgleichrichter
KCl	Kaliumchlorid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer □
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
M	Molar
max.	maximal
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
min, Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MPa	Megapascal

ms	Millisekunde
mV	Millivolt
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NTP	Nukleotidtriphosphat
O ₂	Sauerstoff
OST	Open stomata
PAR	Photosynthetic active radiation
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potentia Hydrogenii
PM	Plasmamembran
R	Gaskonstante
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
rpm	rotation per minute
s, Sek.	Sekunde
SLAC1	Slow anion channel associated 1
SnRK	Snf-1 related kinase
t	Zeit
T	absolute Temperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
V	Spannung
<i>V. faba</i>	<i>Vicia faba</i>
V _m	Membranspannung
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
τ	Zeitkonstante
%	Prozent
~	ungefähr

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Übersicht der USER TM Technik	49
Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten USER TM Vektoren	52
Abbildung 2.3: Ersatzschaltbild der TEVC-Technik	59
Abbildung 2.4: Standard Spannungspulsprotokoll	62
Abbildung 3.1: Transkriptmengen	79
Abbildung 3.2.1.0: BIFC Kontrollen	82
Abbildung 3.2.1.1.a: Spezifität der SnRKs zu SLAC1	83
Abbildung 3.2.1.1.b: Protoplastentransformation	84
Abbildung 3.2.1.1.c: Interaktionslokus von SLAC1 mit OST1	84
Abbildung 3.2.1.2.a: Anionenkanalaktivierung durch OST1	86
Abbildung 3.2.1.2.b: Stabilisierung der Expressionseffizienz durch die Verwendung von BIFC Konstrukten	87
Abbildung 3.2.1.2.c: Spezifität der SLAC1 Aktivierung durch verschiedene SnRKs	88
Abbildung 3.2.1.3: S-Typ Anionenströme in Schließzell-Protoplasten	89
Abbildung 3.2.1.4.a: Deaktivierungskinetik von SLAC1	91
Abbildung 3.2.1.4.b: Block von SLAC1-Strömen	92
Abbildung 3.2.1.4.c: pH-Abhängigkeit von SLAC1	93
Abbildung 3.2.1.4.d: Kationenabhängigkeit von SLAC1	94
Abbildung 3.2.1.4.e: relative Permeabilität von SLAC1	95
Abbildung 3.2.1.4.f: Umkehrspannungen bei variierenden Anionenkonzentrationen im Außenmedium	96
Abbildung 3.2.1.4.g: Cl ⁻ Abhängigkeit der Gleichgewichtsströme von SLAC1	97
Abbildung 3.2.1.4.h: Offenwahrscheinlichkeit von SLAC1	98
Abbildung 3.2.1.4.i: SLAC1 Aktivität erfordert Phosphorylierung durch OST1	99
Abbildung 3.2.1.5.a: <i>In vitro</i> Kinase Assay mit den Termini von SLAC1 und der Kinase OST1	100
Tabelle 3.2.1.5.b: Phosphorylierung von CelluSpots Peptid Arrays durch OST1	102
Abbildung 3.2.2.1.a: Spezifität der CPKs zu SLAC1	104
Abbildung 3.2.2.1.b: Interaktionslokus von SLAC1 mit CPK23	105
Abbildung 3.2.2.1.c: Protoplastentransformation	106
Abbildung 3.2.2.2.a: Ca ²⁺ abhängige Anionenkanalaktivierung	107
Abbildung 3.2.2.2.b: Spezifität der CPKs zu SLAC1	108
Abbildung 3.2.2.3: S-Typ Anionenströme in Schließzell-Protoplasten	110
Abbildung 3.2.2.4.a: SLAC1 Aktivität erfordert Phosphorylierung durch CPK23	111
Abbildung 3.2.2.4.b: <i>In vitro</i> Kinase Assays zeigen die Phosphorylierung von SLAC1 NT durch CPK23	112
Abbildung 3.2.2.4.c: CPK23 D193A besitzt keine Kinaseaktivität	113
Abbildung 3.2.2.4.d: Peptid Arrays der CPK23	114
Abbildung 3.2.2.5: Die Mutante SLAC1 S120A lässt sich durch CPK23 aber nicht durch OST1 aktivieren.	116
Abbildung 3.2.2.6.a: Deletionsmutanten der CPKs	118
Abbildung 3.2.2.6.b: Ca ²⁺ Abhängigkeit der CPK23	119
Abbildung 3.2.2.6.c: Vergleich der Ca ²⁺ abhängigen Kinaseaktivität von CPK3, 6, 21 und 23	120
Abbildung 3.3.1.a: BIFC zwischen OSI1 und PP2Cs	123
Abbildung 3.3.1.b: Protoplastentransformation	123
Abbildung 3.3.1.c: BIFC zwischen CPKs und PP2Cs	124
Abbildung 3.3.2.a: ABI1 inhibiert die Aktivierung von SLAC1 durch OST1	125
Abbildung 3.3.2.b: Phosphatase-Block der SLAC1-Ströme	126
Abbildung 3.3.3.a: ABI1 inhibiert die SLAC1-aktivierende Kinase OST1	128
Abbildung 3.3.3.b: ABI1 inhibiert auch die Kinaseaktivität von CPK23	129
Abbildung 3.3.3.c: ABI1 Effekt auf die Kinaseaktivität von CPK3, 6 und 21	130
Abbildung 3.3.3.d: Rekonstruktion des ABA-Signaltransduktionsweges	132
Abbildung 4.1: Bisheriges Verständnis der ABA Signaltransduktion	134
Abbildung 4.2: Transkriptmengen von <i>cpk23</i> Pflanzen	142
Abbildung 4.3: Aktuelles Verständnis der ABA Signaltransduktion zur SLAC1-Aktivierung	147

6.5 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, den.....

.....

Sönke Scherzer

6.6 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei **Prof. Dr. Rainer Hedrich** für die Bereitstellung der interessanten Themengebiete, die Betreuung dieser Arbeit, die Diskussionen und im Besonderen für die Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn danken. Er war der beste Chef, den ich mir wünschen konnte. Die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seinem Labor waren für mich von unschätzbarem Wert.

Frau Prof. Dr. Tina Romeis danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit, die Bereitstellung der codierenden Sequenzen der CPKs und die Übernahme des Gutachtens dieser Dissertation.

Bedanken möchte ich mich sehr bei **Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Neher** für die Einführung in neue Methoden und die angenehmen Gespräche, in denen ich so vieles vom Ihm lernen durfte.

Danken möchte ich **Prof. Dr. Erwin Grill** und **Christian Wellmann** für die erfolgreichen Nächte im Freisinger Isotopenlabor.

Prof. Dr. Dietmar Geiger und seiner AG habe ich viel mehr zu verdanken, als diese Dissertation Platz bietet. Danke: Anke, Carmen, Christoph, Dennis, Jessi, Melanie und Tobi!

Ein großer Dank gebührt **Frau Melanie Papenfuß** für die Durchführung der „real time PCR“ Messungen und **Dr. Patrick Mumm** für die Bereitstellung der Patch-Clamp Daten.

Ein großes Dankeschön möchte ich an **alle Mitarbeiter des Institutes** für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik richten. Die Freundschaft, Kollegialität und Hilfsbereitschaft lassen am Institut eine Atmosphäre entstehen, in der es Spaß macht zusammen zu forschen. Im Besonderen wurde diese Arbeit durch die Hilfe der beiden Werkstätten getragen.

Meiner Freundin **Sybille Ullrich** danke ich von ganzem Herzen, dass sie mich ertragen hat, wenn die Arbeit auch mal wichtiger war und sie mich vor dem Chaos bewahrt hat.

Zu guter Letzt wäre ich doch Nichts ohne meine Familie und besonders ohne meine Mutter. Vielen Dank.

