

**Licht- und Redoxregulation von Calcium-permeablen Kanälen
in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen**

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

vorgelegt von

Sonja Stölzle

aus

Memmingen

Würzburg 2003

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Peter Hegemann

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danke

Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung dieser Arbeit,

Prof. Dr. Peter Hegemann für die Bereitschaft, sich als Gutachter meiner Arbeit zur Verfügung zu stellen,

PD Dr. Petra Dietrich für die gute Betreuung,

der gesamten Arbeitsgruppe Hedrich für den Beistand in wissenschaftlichen Fragen,

PD Dr. Petra Dietrich, Dr. Rob Roelfsema und Ralf Steinmeyer für das Korrekturlesen dieser Arbeit,

und vor allem meiner Familie und Frank.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS _____ i

1. EINLEITUNG _____ 1

1.1 Homöostase des sekundären Botenstoffs Calcium _____ 2

1.1.1 Calcium-permeable Kanäle in tierischen Zellen _____ 3

1.1.2 Calcium-permeable Kanäle in pflanzlichen Zellen _____ 5

1.2 Cyclische Nukleotide als sekundäre Botenstoffe _____ 8

1.2.1 Cyclische Nukleotide in Vertebraten _____ 8

1.2.2 Cyclische Nukleotide in Pflanzen _____ 9

1.2.3 Putative CNG-Kanäle in Pflanzen _____ 10

1.3 Reaktive Sauerstoff-Spezies als sekundäre Botenstoffe _____ 13

1.3.1 Entstehung, Abbau und Kontrolle von reaktiven Sauerstoff-Spezies _____ 13

1.3.2 Reaktive Sauerstoff-Spezies in verschiedenen Signalketten _____ 15

1.3.2.1 ROS in Signalketten bei abiotischem und biotischem Stress _____ 15

1.3.2.2 ROS beim Wachstum und bei Phytohormon-abhängigen Signalketten _____ 16

1.4 Sekundäre Botenstoffe in Signalketten der pflanzlichen Pathogenabwehr _____ 17

1.5 Die Signalwirkung von Licht auf Pflanzen _____ 19

1.5.1 Blaulicht-induzierte Ca²⁺-Signale _____ 19

1.5.2 Blaulicht-Rezeptoren _____ 20

1.6 Zielsetzung _____ 23

2. MATERIAL UND METHODEN _____ 24

2.1. Arbeiten mit Protoplasten und Zellkultur _____ 24

2.1.1 Pflanzen und Anzuchtbedingungen _____ 24

2.1.1.1 Vorbereitung von Mesophyll-Protoplasten für die *Patch-Clamp*-Technik _____ 24

2.1.2 Arbeiten mit Zellkulturen	25
2.1.2.1 Kultivierung und Subkultivierung von HEK293-Zellen	26
2.1.2.2 Transfektion der HEK293-Zellen	26
2.2 Elektrophysiologische Methoden	29
2.2.1 <i>Patch-Clamp</i> -Technik	29
2.2.1.1 Konfigurationen der <i>Patch-Clamp</i> -Technik	29
2.2.1.2 Messprinzip	31
2.2.1.3 Korrektur von Spannungsfehlern und Kapazitäten	32
2.2.1.4 Vorbereitung der Elektroden und <i>Patch</i> -Pipetten	32
2.2.1.5 Korrektur der Diffusionspotentialdifferenzen	33
2.2.1.6 Vorzeichenkonvention	34
2.2.2 Spannungspulsprotokolle	34
2.2.2.1 Einfachspannungspulsprotokoll	34
2.2.2.2 Rampenprotokoll	35
2.2.3 Datenauswertung	35
2.2.3.1 Auswertung von spannungsabhängigen Strömen anhand der Einfachspannungspulsexperimente	35
2.2.3.2 Bestimmung der Umkehrspannung	36
2.2.3.3 Auswertung der zeitabhängigen Stromzunahme anhand gemittelter Rampen	37
2.2.4 Lösungen	37
2.2.5 Aktivierung der Calcium-permeablen Kanäle durch Blaulicht und H ₂ O ₂	39
2.3 Molekularbiologische Methoden	40
2.3.1 Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i> -Bakterien	40
2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	40
2.3.3 Fragmentierung der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
2.3.4 Separation von DNA-Fragmenten durch Elektrophorese	41
2.3.5 Elution der DNA aus Agarosegel	42
2.3.6 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	42
2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten	43
2.3.8 Hergestellte Konstrukte	43

2.4 Histochemische Detektion von reaktiven Sauerstoff-Spezies mit DAB-Färbung	44
2.5 Luminometrische Messungen mit dem biolumineszентem Ca²⁺-Indikator Aequorin	45
3. ERGEBNISSE	47
3.1 Charakterisierung von Calcium-permeablen Kanälen in der Plasmamembran von <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllzellen	47
3.1.1 Untersuchungen zur Permeabilität divalenter Kationen	48
3.1.2 Blockierung der Calcium-permeablen Kanäle durch externe Lanthanide	50
3.2 Aktivierung eines Calcium-permeablen Kanals durch Blaulicht	51
3.2.1 Insensitivität gegenüber DCMU	53
3.2.2 Blaulicht-aktivierte Calcium-Ströme in Phototropin und Cryptochrom Mutanten	54
3.3 Aktivierung eines Calcium-permeablen Kanals durch ROS	56
3.3.1 Calcium-permeable Kanäle in der <i>dnd1</i> -Mutante	60
3.3.2 <i>dnd1</i> besitzt eine dem Wildtyp vergleichbare Produktion an ROS	61
3.3.3 <i>dnd1</i> ist in der ROS-Aktivierung von Calcium-permeablen Kanälen beeinträchtigt	62
3.3.4 Regulation der Calcium-permeablen Kanäle durch cytosolische Faktoren	63
3.3.5 Subzelluläre Lokalisation von CNGC2	67
3.3.6 Der spannungsabhängige, Calcium-permeable Kanal in der Plasmamembran wird durch Calcium/Calmodulin reguliert	69
3.4 Charakterisierung cytosolischer Ca²⁺-Signale mit Luminometrie	71
3.5 Heterologe Expression der pflanzlichen CNG-Kanäle CNGC2 und CNBT1	73
3.5.1 CNGC2 war nach heterologer Expression nicht funktionell nachweisbar	73
3.5.2 CNBT1 Δ 119 wird funktionell in die Plasmamembran eingebaut	75
3.5.3 Subzelluläre Lokalisation der putativen CNG-Kanäle CNBT1 und CNBT2 in pflanzlichen Zellen	78

4. DISKUSSION	80
4.1 Biophysikalische Eigenschaften Calcium-permeabler Kanäle in der Plasmamembran von Mesophyllzellen	80
4.1.1 Gene für Calcium-permeable Kanäle pflanzlicher Zellen	81
4.2 Regulation des Calcium-permeablen Kanals durch Blaulicht	83
4.2.1 Mögliche Blaulicht-Regulation von Calcium-permeablen Kanälen in anderen Zelltypen	85
4.3 Regulation des Calcium-permeablen Kanals durch H₂O₂	86
4.3.1 In <i>dnd1</i> ist die H ₂ O ₂ -Aktivierung der Kanäle beeinträchtigt	87
4.3.2 Vermittlung der H ₂ O ₂ -Aktivierung durch cytosolische Komponenten	89
4.6 Putative CNG-Kanäle in Pflanzen	93
4.7 Ausblick	96
5. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	97
6. LITERATURVERZEICHNIS	104
7. ANHANG	119

1. EINLEITUNG

Pflanzen sind einer sehr großen Anzahl biotischer und abiotischer Reize ausgesetzt. Biotische Reize sind beispielsweise Hormone, Elicitoren von Pathogenen oder Nodulations-Faktoren, unter abiotischen Reizen versteht man Licht, Temperatur, Berührung, osmotischen oder oxidativen Stress. In einer nach Reizperzeption ausgelösten Signalkette agieren eine Reihe von Rezeptoren, Botenstoffen, regulatorischen Enzymen und Transkriptionsfaktoren in einem komplexen Netzwerk, das die zelluläre Antwort auslöst. Rezeptoren, Enzyme und Transkriptionsfaktoren sind meist hochspezifisch, weshalb sie auch im Genom in einer großen Anzahl auftreten. In ihrer Vielfalt sind Botenstoffe, die nicht aus Peptiden aufgebaut sind, den Proteinen weit unterlegen. Zu nennen sind hier cyclische Nukleotide (Newton *et al.* 1999), Protonen (Guern *et al.* 1991), reaktive Sauerstoff-Spezies (Van Breusegem *et al.* 2001), Lipide (Ng *et al.* 2001, Nurnberger und Scheel 2001, Munne-Bosch und Alegre 2000), G-Proteine (Wickman und Clapham 1995, Zamponi und Snutch 1998, Lam *et al.* 1999) und allen voran Calcium-Ionen.

Die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration wird hauptsächlich durch verschiedene Ca^{2+} -permeable Kanäle und Pumpen reguliert (Kap. 1.1), weiterhin durch Ca^{2+} -bindende Proteine wie Calmodulin. Als Botenstoff reguliert Calcium eine große Anzahl von zellulären Abläufen, in tierischen Zellen z.B. Muskelkontraktion, Sekretionsprozesse von Neurotransmittern, Zellteilung, Genexpression und Zelltod. In Pflanzen wird durch Calcium z.B. die Stomabewegung, der programmierte Zelltod oder die Exocytose reguliert (Übersicht z.B. Sanders *et al.* 2002). Abbildung 1 demonstriert in einem vereinfachten Schema, wie ein Typ von Calcium-permeablen Kanälen, solche die durch Spannung aktiviert werden, verschiedene zelluläre Antworten in tierischen oder pflanzlichen Zellen generieren können. Für die Gewährleistung einer spezifischen Reaktion müssen Ca^{2+} -Transienten räumlich und zeitlich genauestens reguliert sein, und die Zielmoleküle müssen hochsensibel auf geringste Konzentrations-Änderungen reagieren (Übersichten in: Evenas *et al.* 1998, Rudd 2001, Sanders *et al.* 2002).

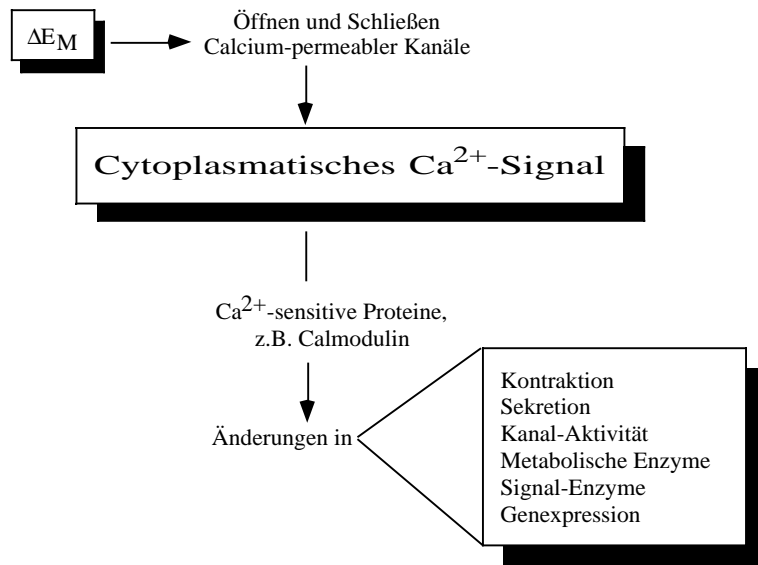


Abb. 1. Calcium transduziert elektrische Signale. Eine Änderung im Membranpotential bewirkt eine Modifikation der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration. Dieses Signal wird von Ca^{2+} -sensitiven Molekülen in eine große Anzahl von mechanischen und enzymatischen Abläufen und in eine veränderte Genexpression umgesetzt. Aus Hille 2001.

1.1 Homöostase des sekundären Botenstoffs Calcium

In tierischen und pflanzlichen Zellen liegt die cytoplasmatische Calcium-Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) in einer „ruhenden“ Zelle bei ca. 100 nM und steigt bis zu 1-10 μM in einer „stimulierten“ Zelle. Extrazellulär liegt die Calcium-Konzentration bei ungefähr 1 mM (Evenas *et al.* 1998). Aufgrund dieses ca. 1000-fachen Konzentrations-Gradienten kann Ca^{2+} passiv ins Cytosol gelangen, sobald Ca^{2+} -permeable Kanäle in der Plasmamembran öffnen. Kanäle interner Ca^{2+} -Speicher entlassen aufgrund des Konzentrations-Gradienten zwischen Cytosol und den Ca^{2+} -Speichern Ca^{2+} ins Cytosol.

Für den Erhalt oder die Wiederherstellung eines niedrigen Ca^{2+} -Levels sind aus tierischen Zellsystemen zwei Möglichkeiten bekannt:

1. Ca^{2+} -Pumpen mit niedriger Ca^{2+} -Transport-Kapazität, die Ca^{2+} in den extrazellulären Raum pumpen (*Plasmamembran Ca^{2+} Pumpe*, PMCA, siehe Carafoli und Stauffer 1994, Penniston 1998). Einige Zelltypen, z.B. Muskelzellen, haben einen weiteren Ca^{2+} -Transporter mit hoher Ca^{2+} -Transport-Kapazität, der den Ca^{2+} -Efflux mit einem Na^{+} -Influx koppelt (Blaustein und Lederer 1999).
2. Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasen (sog. SERCA-Pumpen für *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases*, Hussain und Inesi 1999, Misquitta *et al.* 1999), die Ca^{2+} in die internen Speicher zurück pumpen.

In pflanzlichen Zellen ist über Ca^{2+} -transportierende Carrier und Pumpen weniger bekannt. In *Arabidopsis* wurden beispielsweise zwei Gene, CAX1 und CAX2, mit Sequenz-

ähnlichkeiten zu mikrobiellen H^+/Ca^{2+} Antiportern isoliert (Hirschi *et al.* 1996). In Vakuolen-angereicherten Vesikeln aus CAX1 und CAX2-exprimierenden Hefen wurde ihre Eigenschaft als H^+/Ca^{2+} Antiporter demonstriert. Deswegen wird ihnen die Funktion zugeschrieben, eine niedrige cytosolische Ca^{2+} -Konzentration zu erhalten, indem Ca^{2+} in der Vakuole akkumuliert wird. Die Energetisierung des Transports wird durch den pH-Gradienten gewährleistet.

Für pflanzliche Ca^{2+} -Pumpen (Übersicht in Sanders *et al.* 1999), die aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten mit tierischen Pumpen im ER lokalisiert sein könnten, wurden mehrere Gene kloniert, z.B. LCA1 aus Tomaten, OCA1 aus Reis und ECA1/ACA1 aus *Arabidopsis*. Drei Gene, die einen anderen Typ (Plasmamembran-Typ) repräsentieren, wurden ebenfalls kloniert, ACA1 und 2 in *Arabidopsis* und BCA1 aus *Brassica oleracea*.

Insgesamt sind in *Arabidopsis* mindestens 26 Ca^{2+} -Pumpen und Antiporter bekannt, die möglicherweise gleichzeitig im selben Membransystem lokalisiert sein können. In Vakuolen könnten z.B. CAX1 und ACA4, eine autoinhibierende Calcium-Pumpe, lokalisiert sein, im ER ECA1 sowie ACA2. Die spezifischen bzw. redundanten Funktionen der jeweiligen Efflux-Systeme sind jedoch noch nicht bekannt (Harper 2001; Wu *et al.* 2002).

1.1.1 Calcium-permeable Kanäle in tierischen Zellen

Calcium-permeable Kanäle in Endomembranen

Das wichtigste Ca^{2+} -speichernde und -puffernde Kompartiment ist das endoplasmatische (sarkoplasmatische) Reticulum (ER/SR) oder davon abgeleitete Organellen (Pozzan *et al.* 1994). Die durch einen Stimulus induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER wird wahrscheinlich durch zwei Typen von „ Ca^{2+} -release“-Kanälen vermittelt (Furuichi *et al.* 1994, Striggow und Ehrlich 1996), (i) den Ryanodin Rezeptoren (RyR) und (ii) den Inositol-1,4,5-triphosphat ($InsP_3$) Rezeptoren ($InsP_3R$).

- (i) RyR werden generell durch eine Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert (sog. *Calcium-induced Calcium release, CICR*) (Übersichten in Coronado *et al.* 1994, Meissner 1994). Im Skelettmuskel dagegen resultiert die initiale Aktivierung von RyR aus einer direkten Kopplung an Spannungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ in der Plasmamembran (Franzini-Armstrong und Protasi 1997). Weiterhin werden

diese Kanäle auch durch cyclische ADP-Ribose (cADPR) aktiviert. Teilweise wird durch cADPR-abhängige Modulationen an RyR deren Ca^{2+} -Sensitivität erhöht (Galione *et al.* 1991).

- (ii) InsP_3R werden durch die Bindung von InsP_3 aktiviert (Übersichten in Taylor 1998, Galvan *et al.* 1999). Durch cytosolisches Ca^{2+} wird zudem der Aktivitätsstatus reguliert.

Kürzlich wurde ein weiterer Ca^{2+} -mobilisierender Botenstoff, Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat (NAADP) identifiziert (Patel *et al.* 2001, Genazzani und Billington 2002). NAADP-Rezeptoren sind im Gegensatz zu InsP_3R und RyR nicht sensitiv gegenüber Ca^{2+} . NAADP soll die Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern regulieren, die insensitiv gegenüber InsP_3 und cADPR sind. Somit könnte eine NAADP-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung die Effizienz von InsP_3 und RyR erhöhen und dadurch ihre Aktivierung triggern.

Calcium-permeable Kanäle in der Plasmamembran

Ein Ca^{2+} -Influx über die Plasmamembran wird durch verschiedene Typen von Calcium-permeablen Kanälen vermittelt (Übersicht z.B. in Hille 2001). Man unterscheidet *voltage-operated Ca^{2+} channels* (VOCs), die durch Depolarisation geöffnet werden, und Spannungs-unabhängige Kanäle. Bei den Spannungs-unabhängigen Kanälen gibt es solche, die durch Bindung extrazellulärer Moleküle aktiviert werden. Hierbei werden Ligandenbindung und Kanalstrom durch unterschiedliche Proteine vermittelt (*receptor-operated channels*, ROCs). Andererseits wurden Spannungs-unabhängige Kanäle beschrieben, die durch Bindung eines Liganden aktiviert werden (*ligand-operated channels*, LOCs), z.B. Nikotin-Acetylcholin Rezeptoren und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren. Dazu gehören auch Cyclisch-Nukleotid-aktivierte Kanäle (CNGC für *cyclic nucleotide gated channels*, Kap. 1.2.1), die beispielsweise in Synapsen NO-(*nitric oxide*)-abhängige, G-Protein-gekoppelte Signalwege mit Ca^{2+} -Signalen verknüpfen (Zufall *et al.* 1997). In nicht-erregbaren Zellen, die keine Spannungs-abhängigen, einwärtsgerichteten Ca^{2+} -Kanäle besitzen, gibt es einen sog. *kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom*. Dieser I_{CRAC} (*Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} -current*) wird durch einen weiteren Kanaltyp vermittelt, dem SOC (*store operated Ca^{2+} -channel*). SOC werden durch Ca^{2+} , das aus internen Speichern wie ER oder Mitochondrien freigesetzt wird, aktiviert (Hoth und Penner 1992, Parekh und Penner 1997, Glitsch *et al.* 2002).

1.1.2 Calcium-permeable Kanäle in pflanzlichen Zellen

Calcium-permeable Kanäle wurden in der Plasmamembran, im ER, im Tonoplasten, im Nukleus und in Plastidmembranen pflanzlicher Zellen charakterisiert (Übersicht z.B. in White 2000). Die Kanäle werden grundsätzlich in Depolarisations-aktivierte, Hyperpolarisations-aktivierte und Spannungs-unabhängige Kanäle eingeteilt.

Ionenkanäle, die nur geringfügig zwischen verschiedenen Kationen selektieren, werden Nichtselektive Kationenkanäle (NSCCs) genannt (Übersicht z.B. in *Plant Physiology*, Februar 2002, Vol. 128, Nr. 2). Sie sind im Besonderen wegen ihrer Permeabilität für Natrium interessant, weswegen sie eine wichtige Funktion bei Salzstress bzw. bei der Toleranz gegenüber Salzstress übernehmen könnten. Zu den NSCCs gehören Kanäle, deren Aktivität nicht nur durch Spannung, sondern durch divalente Kationen (Roberts 2002), Glutamat (Demidchik 2002) oder cyclische Nukleotide (Maathuis und Sanders 2001) reguliert wird, wie beispielsweise einige pflanzliche CNG-(*cyclic nucleotide gated*)-Kanäle, von denen jedoch bis jetzt nur wenige elektrophysiologische Daten vorhanden sind (Kap. 1.2.3).

Calcium-permeable Kanäle in pflanzlichen Endomembranen

Ausgehend von den bisher verfügbaren Daten scheint eine Regulation putativer pflanzlicher InsP₃- und cADPR-Rezeptoren substanziell anders zu sein als in tierischen Zellen. Vakuolen, wo durch InsP₃ eine Ca²⁺-Freisetzung mobilisiert werden kann, könnten in pflanzlichen Zellen die wichtigsten Ca²⁺-Speicher darstellen (Muir und Sanders 1996, 1997, Schumaker und Sze 1987). Eine Arbeit von Allen *et al.* (1995) beschreibt eine Ca²⁺-Freisetzung aus Vakuolen, die sowohl durch InsP₃ als auch durch cADPR induziert wurde (Allen *et al.* 1995). Eine Sensitivität einer nicht-vakuolären Membran gegenüber InsP₃ wurde ebenfalls gezeigt, wobei nicht eindeutig war, ob es sich dabei um die Plasmamembran oder das ER handelt (Muir und Sanders 1997). Eine spätere Arbeit demonstrierte eine Ca²⁺-Freisetzung aus ER-abgeleiteten Mikrosomen (Navazio *et al.* 2000). Dieser Ca²⁺-Speicher war sensitiv gegenüber NAADP, aber nicht gegenüber cADPR. Konzentrations-Anstiege von InsP₃ und cADPR konnten nach Reizen wie Elicitoren von Pilzen, ABA und nach einem Gravistimulus (Walton *et al.* 1993, Perera *et al.* 2001, Wu *et al.* 1997, Sun *et al.* 2002) induziert werden. Mit Hilfe von *caged* InsP₃ und cADPR wurde eine Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ demonstriert, was für die Existenz von InsP₃- und cADPR-Rezeptoren spricht (Fricker *et al.* 1991, Franklin-Tong *et al.* 1996, Leckie *et al.* 1998).

Trotz der Hinweise auf cADPR-, NAADP- und InsP₃-abhängige Ca²⁺-Kanäle im ER wurden elektrophysiologisch noch keine identifiziert. Bis jetzt wurden im ER zwei stark rektifizierende Kanäle, die bei positiven Spannungen öffnen, beschrieben (BCC1 aus *Bryonica dioica*, Kluesener *et al.* 1995, Kluesener *et al.* 1997 und LCC1 aus *Lepidium sativum*, Kluesener und Weiler 1999). H₂O₂ in submillimolaren Konzentrationen auf der cytoplasmatischen Seite inhibierte das Öffnen von BCC1, möglicherweise aufgrund eines Verlustes der Kanalfunktion (Kluesener *et al.* 1997). D.h. H₂O₂, ein wichtiger sekundärer Botenstoff (Kap. 1.3), könnte die cytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration mit Hilfe von BCC1 modulieren.

In Vakuolen wird, bei einer cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration > 300-600 nM, die Leitfähigkeit der Membran durch langsame, bei depolarisierenden Spannungen aktivierende Ströme dominiert. Diese *slow vacuolar*-(SV)-Ströme wurden in mehreren Geweben beobachtet (Übersichten in Hedrich *et al.* 1988, Ward *et al.* 1995, Allen und Sanders 1997). Der Kanal ist für Ca²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺ und auch für K⁺, Na⁺, Rb⁺, und Cs⁺ permeabel, die Kanal-Aktivität wird über Phosphorylierungen an zwei Stellen reguliert. Weitere Depolarisations-aktivierte, Ca²⁺-permeable Kanäle wurden in Vakuolen aus Tabak-Suspensionszellen beobachtet (Ping *et al.* 1992). Hyperpolarisations-aktivierte Kanäle, die negativ von -20 bis -70 mV aktivieren und einen Ca²⁺-Efflux aus der Vakuole vermitteln, wurden in Vakuolen aus *Beta vulgaris* L. (Johannes *et al.* 1992, Gelli und Blumwald 1993) und in Vakuolen aus Schließzellen von *Vicia faba* (Allen und Sanders 1994) und *Commelina communis* (Johannes *et al.* 1994) charakterisiert. Die Kanalaktivität wird teilweise durch [Ca²⁺]_{cyt} > 1 µM inhibiert (Gelli und Blumwald 1993), teilweise sind die Kanäle insensitiv gegenüber [Ca²⁺]_{cyt}, werden aber über die vakuoläre Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_{vac} reguliert. Eine erhöhte [Ca²⁺]_{vac} erhöht die Offenwahrscheinlichkeit, indem die Aktivierungsschwelle der Kanäle in positivere Spannungsbereiche verschoben wird (Johannes *et al.* 1992, Allen und Sanders 1994, Johannes und Sanders 1995). Leckie *et al.* (1998) demonstrierte einwärtsgerichtete Ca²⁺-Kanäle in Schließzell-Vakuolen, die eine Rolle in der Abszissinsäure-(ABA)-induzierten Stomabewegung spielen könnten. Ihre Pharmakologie ähnelt den RyR aus tierischen Endomembranen, sie werden z.B. durch Ryanodin und Coffein aktiviert und durch Ruthenium Rot geblockt.

Calcium-permeable Kanäle in der pflanzlichen Plasmamembran

Ein aus Pathogenen isolierter Peptid-Elicitor aktivierte Spannungs-unabhängige, Calcium-permeable Kanäle in Petersilien-Zellkulturen (LEAC, Zimmermann *et al.* 1997). In Tomaten-Zellsuspensionen und Schließzellen wurden durch Elicitoren Hyperpolarisations-abhängige, Calcium-permeable Kanäle aktiviert (Gelli *et al.* 1997, Kluesener *et al.* 2002). Für die Bereitstellung eines erhöhten apikalen Ca^{2+} -Levels bei wachsenden Wurzelhaaren ist ein Hyperpolarisations-aktivierter Kanal verantwortlich, der selbst durch Ca^{2+} reguliert ist (Véry und Davies 2000). ABA aktiviert einen Hyperpolarisations-abhängigen Kanal in Schließzellen (Hamilton *et al.* 2000). In einer anderen Arbeit wurde demonstriert, dass eine ABA-induzierte H_2O_2 -Produktion einen Zwischenschritt bei der Aktivierung eines solchen Kanals in Schließzellen bildet (Pei *et al.* 2000), und den Stomaschluss auslöst. Hyperpolarisations-aktivierte, mechano-sensitive Kanäle in der Schließzell-Plasmamembran beeinflussen die Volumen- und Turgor-Regulation von Schließzellen und kontrollieren dadurch den Gasaustausch (Cosgrove und Hedrich 1991). Die in Zwiebelepidermis-Zellen beobachteten mechano-sensitiven, Hyperpolarisations-abhängigen Calcium-Kanäle sollen als Mechanorezeptoren wirken (Ding und Pickard 1993). Putative mechano-sensitive, Calcium-permeable Kanäle spielen bei der Befruchtung blühender Pflanzen eine Rolle (Antoine *et al.* 2000). Kürzlich wurden Hinweise gefunden, dass putative ionotropische Glutamat-Rezeptoren (iGluR) Calcium-permeable Kanäle in der Plasmamembran bilden (Dennison und Spalding 2000).

Ein Depolarisations-aktivierter Calcium-Kanal wurde zuerst in Suspensions-Zellkulturen von Karotten charakterisiert (Thuleau *et al.* 1994a, Thuleau *et al.* 1994b, Thion *et al.* 1996), später in *Arabidopsis* Wurzel-Protoplasten (Kiegle *et al.* 2000, Thion *et al.* 1998). In Vesikeln von Wurzel-Protoplasten aus Getreide, die in Lipid-Doppelschichten eingebracht wurden, damit sie einer elektrophysiologischen Ableitung zugänglich gemacht werden konnten, wurden ebenfalls Depolarisations-aktivierte Calcium-Kanäle gemessen (*rca*, Pinosos und Tester 1995, Pinosos und Tester 1997, VDCC2 und *maxi cation channel*, White 2000). Da Membran-Depolarisationen durch viele abiotische und biotische sowie Entwicklungs-abhängige Reize verursacht werden (z.B. Niebel *et al.* 1999, Boominathan und Doran 2003), könnten Depolarisations-aktivierte Calcium-Kanäle bei solchen Reizen eine Signaltransduktion vermitteln.

Da als sekundärer Botenstoff neben Calcium in dieser Arbeit auch auf cyclische Nukleotide eingegangen werden, wird im Anschluss ein kurzer Überblick über cyclische Nukleotide als Agonisten in tierischen und pflanzlichen Zellen gegeben.

1.2 Cyclische Nukleotide als sekundäre Botenstoffe

Im Gegensatz zum pflanzlichen System sind cyclische Nukleotide wie cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) im tierischen System als sekundäre Botenstoffe gut charakterisiert (z.B. Hille 2001). Auch für Pilze wurden cAMP-abhängige Signalketten beschrieben. In Pilzen, auch in Pflanzenpathogenen Vertretern, werden durch cAMP beispielsweise morphogenetische und die Virulenz betreffende Abläufe kontrolliert (Übersicht z.B. in Lee *et al.* 2003 und D'Souza und Heitman 2001).

1.2.1 Cyclische Nukleotide in Vertebraten

Hochspezifische Rezeptoren für Hormone wie z.B. Adrenalin, Insulin, Glukagon oder Prostaglandin vermitteln die gezielte Wirkung von Hormonen. Durch Bindung an Hormonrezeptoren wird eine membranständige Adenylatcyclase aktiviert, welche aus ATP cAMP bildet und dessen Konzentration in der Zelle um ein Vielfaches erhöht. Über die Aktivierung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA) werden Enzymsysteme oder Transportsysteme in der Zellmembran reguliert. Cyclische Nukleotide sind aufgrund der Aktivität abbauender Enzyme wie der Phosphodiesterase nur transient in höheren Konzentrationen vorhanden. Dadurch wird die temporäre Spezifität des Signals gewährleistet.

Die Interaktion von cyclischen Nukleotiden wurde mit verschiedenen Zielproteinen gezeigt. (i) mit Proteinkinasen, (ii) mit Phosphodiesterasen und (iii) mit Ionenkanälen. Bei diesen Kanälen unterscheidet man solche, die durch cyclische Nukleotide als Liganden aktiviert werden, und solche, deren durch Spannung oder mechanische Stimuli induzierte Aktivität durch cyclische Nukleotide moduliert wird. In Vertebraten und Invertebraten konnten die Liganden-abhängigen CNG-Kanäle in Sinneszellen, aber auch in Neuronen und nicht-neuronalen Geweben charakterisiert werden (Übersicht in Kaupp 1995). Zuerst wurden sie in Photorezeptoren von Vertebraten und in olfaktorischen Sinneszellen entdeckt, wobei in den Photorezeptoren cGMP und in den olfaktorischen Neuronen cAMP den Liganden darstellt. CNG-Kanäle wurden auch in Spermatozoen (Weyand *et al.* 1994), im Herzmuskel, der Niere (Biel *et al.* 1994) und in der Aorta von Kaninchen (Distler *et al.* 1994) gefunden. Die rhythmische Aktivität von Neuronen und Schrittmacherzellen im Herz wird durch Hyperpolarisations-abhängige, cyclisch-Nukleotid-aktivierte Kanäle (HCN-Kanäle) kontrolliert (Wainger *et al.* 2001). Im Gegensatz zu den CNG-Kanälen

werden die Spannungs-abhängigem *ether-a-go-go-(eag)*-Kanäle durch cAMP moduliert, dadurch wird z.B. die Effizienz von Synapsen im zentralen und peripheren Nervensystem reguliert (Bruggemann *et al.* 1993).

1.2.2 Cyclische Nukleotide in Pflanzen

In Pflanzen wurden cyclische Nukleotide in einigen Prozessen als wichtige Botenstoffe identifiziert (Bolwell 1995). In wachsenden Pollenschläuchen reguliert cAMP das polarisierte Wachstum, es steigt dabei von 100 auf ca. 160 nM (Moutinho *et al.* 2001). In dieser Arbeit wurde auch erstmals eine putative pflanzliche Adenylyl Cyclase (AC), die einzige bekannte cAMP-Quelle, identifiziert. Das Protein zeigt Homologien zu funktionellen Bereichen einer AC aus Pilzen, und die Expression der cDNA in *Escherichia coli* bewirkte eine cAMP-Konzentrations-Erhöhung. Kürzlich wurde die erste pflanzliche Guanylyl Cyclase in *Arabidopsis* identifiziert und *in vitro* charakterisiert (Ludidi und Gehring 2003). Ein molekularer Beweis für die Existenz von cAMP und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA und PKG) liegt derzeit noch nicht vor, jedoch gibt es Hinweise auf cyclisch-Nukleotid-responsive Kinasen aufgrund biochemischer Daten (Newton 1999).

cGMP, Calmodulin und Calcium sind in den Signalkaskaden und bei der Regulation der Genexpression in der Photomorphogenese beteiligt (Bowler *et al.* 1994b, Bowler *et al.* 1994a, Neuhaus *et al.* 1997, Wu *et al.* 1996). Neben einer Rolle in lichtabhängigen Prozessen konnte cGMP auch eine Funktion im Gibberellinsäure-abhängigen Wachstum (Penson *et al.* 1996) nachgewiesen werden. cGMP scheint darüber hinaus in der Cytokinin-vermittelten Stomabewegung (Cousson und Vavasseur 1998, Pharmawati *et al.* 1998, Pharmawati *et al.* 2001), und cAMP in der Auxin-abhängigen Zellteilung (Ichikawa *et al.* 1997) ein Rolle zu spielen. In einem heterologen Expressionssystem (*Xenopus laevis* Oocyten) wurde elektrophysiologisch gezeigt, dass der einwärtsgerichtete K⁺-Kanal KAT1 aus *Arabidopsis thaliana*-Schließzellen durch cGMP reguliert wird (Hoshi 1995).

Die cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP regulieren auch Signalketten innerhalb pflanzlicher Abwehr-Mechanismen. In *Phaseolus vulgaris*-Zellen und Zellkulturen von *Medicago sativa* wurde eine durch Pilz-Elicitoren induzierte cAMP-Konzentrations-erhöhung beobachtet (Bolwell 1992, Cooke 1994). cAMP und Ca²⁺ sind weiterhin beide notwendig für eine ROS-Produktion in *Phaseolus vulgaris*-Zellen (Bindschedler 2001). In Tabak wurde mit NO eine transiente Erhöhung des cGMP-Levels erreicht (Durner *et al.*

1998). Hier wurde gezeigt, dass die Expression von Abwehr-Genen wie PR-1 (*pathogen-related-1* Protein) und Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) durch cGMP und cyclische ADP-Ribose induziert wird. Zudem scheint cGMP in *Arabidopsis* eine notwendige, aber nicht hinreichende Komponente in der NO-induzierten Signalkette zu sein, die zum Zelltod führt (Clarke *et al.* 2000).

Diese Beispiele zeigen, dass cyclische Nukleotide wichtige Funktionen in Signalketten erfüllen, die Quelle und die Zielproteine jedoch nur unzureichend charakterisiert sind.

1.2.3 Putative CNG-Kanäle in Pflanzen

Die erfolgreiche Identifizierung einer neuen Genfamilie in *Arabidopsis* 1998 und die anschließende Klonierung einiger Mitglieder dieser pflanzlichen putativen CNG-Kanäle lieferte die Grundlage, die physiologische Rolle dieser Kanalklasse zu entschlüsseln. Unter den klonierten Kanälen finden sich verschiedene Mitglieder aus *Arabidopsis* als auch aus *Hordeum vulgare* und Tabak (Abb.2, *AtCNGC1* u. 2 s. Köhler und Neuhaus 1998, *CNGC 3-6* s. Köhler *et al.* 1999, *HvCBT1* s. Schuurink *et al.* 1998, *NtCBP4* s. Arazi *et al.* 2000 und *NtCBP7* s. GenBank *accession no.* AF079871). CNGC-ähnliche Sequenzen wurden kürzlich für Reis (GenBank *accession no.* AAK16188 und BAB92547) und *Phaseolus vulgaris* (GenBank *accession no.* AAN65364, AAN65365 und AAN65366) beschrieben. Sie weisen Homologie zu tierischen CNG-Kanälen sowie zu den Spannungs-abhängigen K^+ -Kanälen des *Shaker*-Typs auf (Übersichten in Hedrich und Dietrich 1996, Hedrich *et al.* 1998, Warmke und Ganetzky 1994, Maser *et al.* 2001).

Mit Hilfe von Hydrophobizitätsanalysen ließ sich eine Proteinstruktur mit sechs transmembranen Domänen und cytoplasmatischen N- und C-Termini ableiten (Abb. 2, Baumann *et al.* 1994, Kaupp *et al.* 1989, Köhler und Neuhaus 1998, Zimmermann 1995). Im Gegensatz zu tierischen CNG-Kanälen ist die Calmodulin-Bindestelle im C-Terminus statt im N-Terminus lokalisiert. Dort überlappt sie partiell mit der Bindestelle für cyclische Nukleotide (Köhler und Neuhaus 1998, Köhler *et al.* 1999). Für vier bislang untersuchte putative CNG-Kanäle aus *Arabidopsis* (*AtCNGC1* und *AtCNGC2*), Tabak (*NtCBP4*) und Gerste (*HvCBT1*) wurde eine Ca^{2+} -abhängige Calmodulin-Bindung nachgewiesen (Köhler *et al.* 2000, Arazi *et al.* 2000, Schuurink *et al.* 1998).

Das konservierte Porenmotiv von K^+ -Kanälen, GYGD, das für die K^+ -Selektivität verantwortlich ist (Doyle *et al.* 1998), fehlt den CNG-Kanälen (Abb. 2). Dieser

Unterschied in der Porenregion lässt darauf schließen, dass die pflanzlichen CNG-Kanäle nicht-selektiv für Kationen sind. Tierische CNG-Kanäle, denen das konservierte Porenmotiv ebenfalls fehlt, sind z.B. für K^+ , Na^+ , Cs^+ und Ca^{2+} permeabel (Beispiele in Baumann *et al.* 1994, Dzeja *et al.* 1999, Frings *et al.* 1995, Sesti *et al.* 1995, Übersicht in Kaupp 1995). Dies deutet darauf hin, dass die putativen pflanzlichen CNG-Kanäle ebenfalls Calcium leiten könnten.

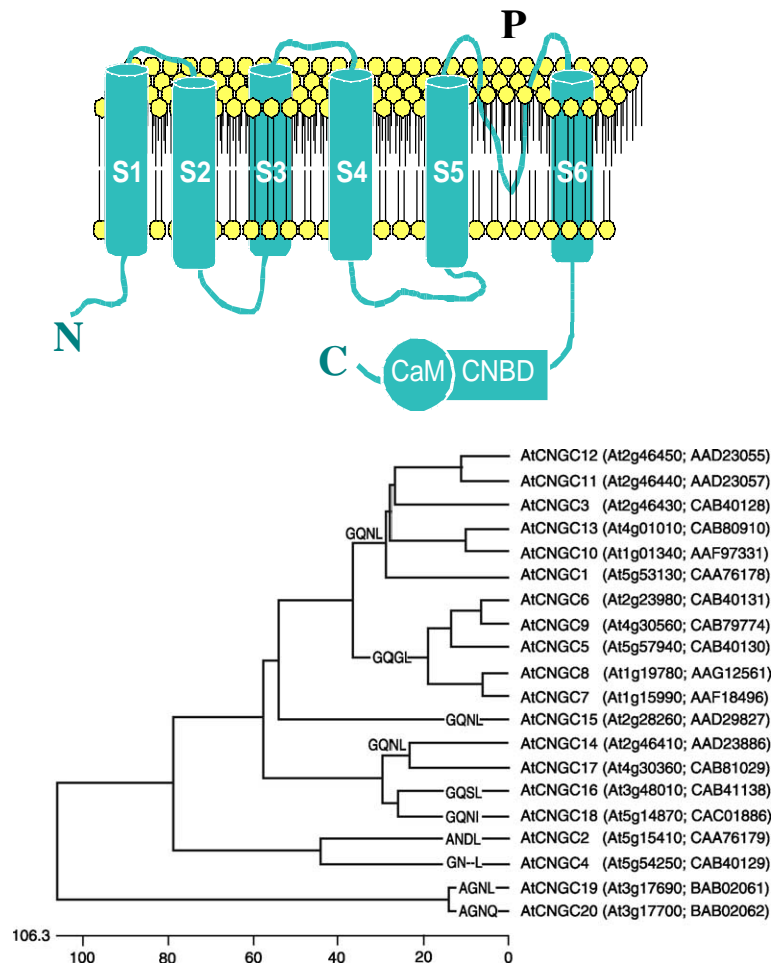


Abb. 2. Struktur und Homologie pflanzlicher CNG-Kanäle. *Oben:* Topologie pflanzlicher CNG-Kanäle mit den sechs transmembranen Domänen S1-S6, der Porenregion P und den cytoplasmatisch lokalisierten N- und C-Termini mit überlappenden Bindestellen für Calmodulin (CaM) und cyclische Nucleotide (CNBD), nach Köhler *et al.* 1999. *Unten:* Aus Sequenzvergleichen abgeleitetes Dendrogramm für die 20 CNG-Kanal-Proteine aus *Arabidopsis*, nach White *et al.* (2002)¹. Die GenBank *accession numbers* (Gen, Protein) sind in Klammern angegeben. Das Aminosäuren-Quartett der Porenregion, das für die Kationen-Selektivität verantwortlich gemacht wird, ist jeweils angezeigt.

¹ Aufgrund uneinheitlicher Nomenklatur wird *AtCNGC19* auch CNBT2 und *AtCNGC20* CNBT1 genannt. Im Verlauf der Arbeit werden die Namen CNBT2 bzw. CNBT1 verwendet.

Nach der Identifizierung dieser neuen Genfamilie an pflanzlichen Kanälen ergaben sich Hinweise auf deren Lokalisation und Rolle in verschiedenen Signalwegen. In der Gerste konnte der putative CNG-Kanal *HvCBT1* in der Plasmamembran von Gibberelinsäure-sensitiven Aleuronzellen lokalisiert werden (Schoorink *et al.* 1998). Einen Anhaltspunkt für eine physiologische Rolle von CNG-Kanälen liefern Tabakpflanzen, die den putativen CNG-Kanal *NtCBT4* überexprimieren. Sie sind durch eine erhöhte Toleranz gegenüber Nickel und in einer Hypersensitivität gegenüber Blei charakterisiert, was in einer reduzierten Nickelakkumulation und einer hohen Bleiakкумуляtion resultiert (Arazi *et al.* 1999). *NtCBT4* wurde dabei in der Plasmamembran lokalisiert, ist demnach bei der Aufnahme von Pb^{2+} ins Cytoplasma involviert. Da auch einige Ca^{2+} -permeable CNG-Kanäle aus tierischen Systemen für Pb^{2+} permeabel sind (Legare *et al.* 1998), könnte dies ein Hinweis auf eine mögliche Ca^{2+} -Permeabilität für *NtCBP4* sein.

Zwei Vertreter aus *Arabidopsis*, *AtCNGC2* und *AtCNGC1*, komplementieren teilweise eine K^+ -aufnahmedefiziente Hefemutante (Köhler *et al.* 1999), somit bestätigte sich eine durch die Sequenzanalyse vorhergesagte Permeabilität der Kanäle für monovalente Kationen. Leng *et al.* (1999 und 2002) führte eine heterologe Expression von *CNGC2*, *CNGC1* und *NtCBP4* in *Xenopus* Oocyten und/oder HEK293-(*human embryonic kidney*)-Zellen durch und beschreibt die Kanäle als cAMP- und cGMP-aktivierte, einwärtsgerichtete Kanäle, die für monovalente Kationen und Ca^{2+} permeabel sind (Leng *et al.* 1999). *CNGC2* ist z.B. für K^+ und Ca^{2+} , nicht aber für Na^+ permeabel (Leng *et al.* 2002). Im Zusammenhang mit Pathogen-Abwehr zeigte eine neuere Arbeit, dass die Zwergmutante *dnd1* (*defense, no death*), die eine Mutation in dem CNG-Kanal *CNGC2* hat, eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen besitzt (Clough *et al.* 2000). Eine Punktmutation im *AtCNGC2*-Gen führt ein Stoppcodon in das offene Leseraster ein, so dass es zu einem verkürzten, nicht funktionellem Kanalprotein des pflanzlichen CNG-Kanals kommt. Das mutierte *dnd1-1* Allel bewirkt den Verlust der hypersensitiven Reaktion (Kap. 1.3) nach Behandlung mit avirulenten Stämmen von *Pseudomonas syringae*. Weiterhin wird ein erhöhter Salizylsäure-Wert, sowie eine konstitutive systemische Resistenz verursacht. Betrachtet man die ganze Pflanze, wird ein Zwergwuchs (Abb. 23) ersichtlich, der nur teilweise von dem erhöhten Salizylsäure-Wert abhängig ist (Clough *et al.* 2000, Yu *et al.* 1998). Ähnliche Phänotypen zeigte eine weitere Mutante (*hlm1*) mit einem nicht-funktionellen putativen CNG-Kanal, *CNGC4* (Balague *et al.* 2003). Nach heterologer Expression konnten wenige elektrophysiologische Messungen an Oocyten Membran-Patches durchgeführt werden, die vermuten lassen, dass *CNGC4*

Spannungs-unabhängig, durch cyclische Nukleotide aktiviert, und gleichermaßen für K^+ und Na^+ permeabel ist (Balague *et al.* 2003). Die Expression von CNGC4 wird nach Pathogen-Infektion induziert, CNGC2 hingegen ist konstitutiv in Blättern exprimiert und wird nach Pathogen-Infektion reprimiert (Balague *et al.* 2003, Kohler *et al.* 2001). Aus diesen Arbeiten geht hervor, dass die beiden Kanäle CNGC2 und CNGC4 eine Rolle in der Pathogen-Abwehr spielen, wo sie jedoch in den Signalketten einzuordnen sind, ist noch nicht klar. Möglicherweise stellen sie jedoch die Verbindung zwischen cyclischen Nukleotiden und Ca^{2+} -Signalen dar.

1.3 Reaktive Sauerstoff-Spezies als sekundäre Botenstoffe

1.3.1 Entstehung, Abbau und Kontrolle von reaktiven Sauerstoff-Spezies

Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) sind Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl Radikale (HO^\cdot). Sie spielen eine wichtige Rolle als Stress-Indikatoren, als sekundäre Botenstoffe und können antimikrobiell wirken. Unter gewöhnlichen Wachstumsbedingungen ist in pflanzlichen Zellen die Produktion an ROS relativ gering ($240 \mu M/s O_2^-$ und $0,5 \mu M H_2O_2$ in Chloroplasten). Im normalen Zellmetabolismus entstehen ROS hauptsächlich bei der Photosynthese und bei der Photorespiration, und zwar in Chloroplasten durch die Superoxiddismutase (SOD) und in Peroxisomen z.B. durch die Glycolat Oxidase (Dat *et al.* 2000). Mehrere Formen von Stress erhöhen die Konzentration auf bis zu $720 \mu M/s O_2^-$ und $5-15 \mu M H_2O_2$. In Pflanzen sind viele potentielle Quellen von ROS bekannt, die sowohl bei abiotischem als auch bei biotischem Stress eine Rolle spielen. Der Gleichgewichts-Level an ROS wird enzymatisch oder durch spezifische zelluläre Anpassungen und Mechanismen reguliert. Tabelle 1 zeigt einen Überblick der regulatorischen Mechanismen, die die ROS-Konzentrationen kontrollieren.

Der am besten untersuchte potentielle Mechanismus zur ROS-Generierung ist das NADPH Oxidase System. In Arabidopsis wurden acht Gene charakterisiert (Atrboh A-H), die homolog zu tierischen NADPH Oxidasen sind (Keller *et al.* 1998, Torres *et al.* 1998). Einige Erkenntnisse bezüglich ihrer Beteiligung in Signalketten resultieren aus Experimenten, in denen eine Inhibierung einer ROS-Produktion durch Diphenyliodonium Chlorid (DPI), einem NADPH Oxidase Inhibitor, durchgeführt wurde (Zhang *et al.* 2001b, Zhang *et al.* 2001a, Rodriguez *et al.* 2002, Foreman *et al.* 2003, siehe auch Kap. 1.3.2). Die

NADPH Oxidase ist ein Plasmamembran-lokalisiertes Enzym mit einer FAD-Gruppe und zwei Häm-Gruppen und katalysiert unter NADPH-Verbrauch die Reaktion von molekularem Sauerstoff zu O_2^- . NADPH wird durch Calcium- und Calmodulin-abhängige NAD Kinasen (Harmon *et al.* 1984, Duval *et al.* 2002) bereitgestellt. Das durch die NADPH Oxidase-Aktivität entstehende O_2^- wird dann durch Superoxiddismutasen (SOD) weiter zu H_2O_2 katalysiert. Möglicherweise hat Ca^{2+} einen direkten Effekt auf die NADPH Oxidase, da das Enzym eine N-Terminale Sequenz mit zwei Ca^{2+} -bindenden EF-Hand Motiven besitzt (Lamb und Dixon 1997). In Protoplasten von Tomaten erhöhte die Expression einer *calmodulin-like domain protein kinase* (CDPK) die NADPH Oxidase-Aktivität (Xing *et al.* 2001), und stimulierte dadurch einen *oxidative burst* (siehe Kap. 1.3.2.1).

Mechanismus	Lokalisation	Vorherrschende ROS
Produktion		
Photosynthese ET und PSI oder II	Chl	O_2^-
Respiration ET	Mit	O_2^-
Glycolat Oxidase	Per	H_2O_2
Angeregtes Chlorophyll	Chl	O_2^1
NADPH Oxidase	PM	O_2^-
Fettsäure β -Oxidation	Per	H_2O_2
Oxalat Oxidase	Apo	H_2O_2
Xanthin Oxidase	Per	O_2^-
Peroxidasen, Mn^{2+} und NADH	CW	H_2O_2 , O_2^-
Amin Oxidasen	Apo	H_2O_2
Abbau		
Superoxid Dismutase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	O_2^-
Ascorbat Peroxidase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
Catalase	Per	H_2O_2
Glutathion Peroxidase	Cyt	H_2O_2 , ROOH
Peroxidasen	CW, Cyt, Vac	H_2O_2
Thioredoxin Peroxidasen	Chl, Cyt, Mit	H_2O_2
Ascorbin Säure	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2 , O_2^-
Glutathion	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
α -Tocopherol	Membranen	ROOH, O_2^1
Carotinoide	Chl	O_2^1
Vermeidung		
Anatomische Anpassungen	Blatt Strukturen, Epidermis	H_2O_2 , O_2^- , O_2^1
C_4 oder CAM Metabolismus	Chl, Cyt, Vac	H_2O_2 , O_2^-
Chloroplasten Bewegung	Cyt	H_2O_2 , O_2^- , O_2^1
Unterdrückung der Photosynthese	Chl	H_2O_2 , O_2^-
PS und Antennen Modulationen	Chl	O_2^- , O_2^1
Alternative Oxidase	Chl, Mit	O_2^-

Tabelle 1. Produktion, Abbau und Vermeidung von reaktiven Sauerstoff-Spezies in Pflanzen. Abkürzungen: Apo, Apoplast, Chl, Chloroplast, CW, Zellwand, Cyt, Cytosol, ET, Elektronentransport, Mit, Mitochondrien, O_2^1 , molekularer Sauerstoff, Per, Peroxisomen, PM, Plasma Membran, PS, Photosystem, ROS, Reaktive Sauerstoff-Spezies, Vac, Vakuole. Aus Mittler 2002.

1.3.2 Reaktive Sauerstoff-Spezies in verschiedenen Signalketten

1.3.2.1 ROS in Signalketten bei abiotischem und biotischem Stress

Einige der in Tabelle 1 genannten ROS-Quellen sind ein Teil von Signalketten, die bei abiotischem Stress, wie exzessivem Licht, induziert werden. Hier sind z.B. die Xanthin Oxidasen zu nennen. Eine Rolle solcher Flavin-haltigen Oxidasen wurde in der H_2O_2 -Produktion nach UV-Bestrahlung in menschlichen Zellen gezeigt (Hockberger *et al.* 1999). Die Xanthin Oxidase katalysiert mit molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel die Oxidation von Hypoxanthin zu Harnsäure, bei der Katalyse entstehen O_2^- und H_2O_2 (Hancock *et al.* 2001). Die Absorption des Photosyntheseapparates von überschüssigem Licht, das nicht für die Photosynthese verwendet werden kann, resultiert ebenfalls in der Entstehung von ROS. Die Ursache liegt in der Entstehung von O_2^- , und dadurch von H_2O_2 , durch einen univalenten Elektronentransfer auf O_2 im Photosystem I. Die Ascorbat Peroxidase in Chloroplasten ist für die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O verantwortlich (Asada 1999, Niyogi 2000, Dat *et al.* 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass in *Arabidopsis* eine reversible Photoinhibition der Photosynthese nach einer Stunde unter dem Einfluss hoher Licht-Intensitäten ($2000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) erreicht wird (Nishiyama *et al.* 2001). Blätter des Catalase-defizienten Tabaks Cat1AS bleichen bei $>300 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Licht aufgrund einer H_2O_2 -Akkumulation in Peroxisomen aus (Willekens *et al.* 1997).

Der „oxidative burst“, die Generierung von ROS als Antwort auf Pathogenbefall, ist ein ubiquitärer Schritt in pflanzlichen Abwehrmechanismen. Dabei wird meist eine zwei-phasige ROS-Produktion beobachtet, wobei die erste Phase eine Reaktion auf verschiedene Stimuli wie z.B. Verwundung zu sein scheint und auch bei kompatiblen Interaktionen auftritt (Grant und Loake 2000). Die zweite, länger andauernde Phase steht im Zusammenhang mit der Ausbildung von Resistenzantworten. Es gibt Hinweise, dass beim *oxidative burst* mehrere Komponenten eine Rolle spielen, z.B. eine Zellwand-gebundene Peroxidase, die H_2O_2 generiert, oder eine Alkalinisierung des Apoplasten sowie die Entstehung oder Freisetzung reduzierender Reagenzien (Bolwell *et al.* 2002). Eine weitere Signalkomponente ist ein cytosolischer Ca^{2+} -Anstieg, der innerhalb von Sekunden nach Elicitorbehandlung auftritt. Untersuchungen an verschiedenen Zellsuspensionskulturen zeigten, dass ebenfalls eine sehr frühe Reaktion eine Depolarisation der Plasmamembran ist (Tavernier *et al.* 1995, Jabs *et al.* 1997, Ebel 1998). Elicitorresponsive Ca^{2+} -Kanäle sollen für den Ca^{2+} -Influx und die Depolarisation verantwortlich sein (Gelli *et al.* 1997,

Zimmermann *et al.* 1997, Kluesener *et al.* 2002). Nach einem cytosolischem Ca^{2+} -Anstieg wurden eine ROS-Produktion beobachtet (Grant *et al.* 2000), sowie die Induktion von Abwehr-Genen wie z.B. Gene, die für PR-Proteine kodieren oder die in der Phytoalexin-Produktion involviert sind (Blume *et al.* 2000). Bei einer Infektion mit einem avirulenten Pathogen resultierte dies in der Entstehung eines lokalen, programmierten Zelltods (PCD), der als lokal eingegrenzte Läsion sichtbar wird. In einer Suspensions-Zellkultur von Sojabohnen wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass H_2O_2 und nicht O_2^- der Schlüsseleffektor des programmierten Zelltods ist (Delledonne *et al.* 2001).

Anhand von Ergebnissen, die durch den Einsatz des NADPH-Oxidase-Inhibitors DPI erzielt wurden, wurde die Bedeutung des *oxidative burst* als Signal bei der Generierung von Resistenzantworten noch hervorgehoben. DPI hemmt in vielen Pflanze/Pathogen-Systemen die Produktion der ROS und nachfolgende Abwehrantworten wie die Phytoalexin-Biosynthese (Murphy und Auh 1996, Jabs *et al.* 1997, Mithoefer 1997, Grant *et al.* 2000). Beispielsweise ist die rezessive *lsd1*-Mutante (*lesion simulating disease resistance*) aus *Arabidopsis* nicht in der Lage, die Expression von Abwehrgenen und den Zelltod in Abwesenheit von Pathogenen zu kontrollieren (Jabs *et al.* 1996). Dies wurde aus der Beobachtung geschlossen, die zeigte, dass eine lokale, exogene Applikation von O_2^- hinreichend für die spontane Entstehung von Läsionen war. Dieser Effekt konnte durch DPI konzentrationsabhängig inhibiert werden. LSD1, ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, ist also in ROS-abhängigen Signalkaskaden involviert, und zwar als negativer Regulator innerhalb der zum Zelltod führenden Signalkette (Dietrich *et al.* 1997).

ROS besitzen neben ihrer zentralen Rolle als Signalstoff auch eine direkte antimikrobielle Wirkung (Peng 1992, Wu *et al.* 1995). Weiterhin ist ihre katalytische Funktion bei der Vernetzung von Strukturproteinen der Zellwand oder von zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen von Bedeutung (Bradley *et al.* 1992, Brisson *et al.* 1994). Die Verstärkung der Zellwand in Folge der Vernetzung führt zu einer erhöhten Resistenz der Zellwand gegenüber den von Pathogenen synthetisierten zellwandabbauenden Enzymen (Brisson *et al.* 1994).

1.3.2.2 ROS beim Wachstum und bei Phytohormon-abhängigen Signalketten

ROS sind, neben ihrer Funktion innerhalb von pflanzlichen Stressreaktionen, auch in Signaltransduktionsprozessen von Phytohormonen und bei vegetativen Entwicklungsprozessen beteiligt.

In Fasern der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) reguliert H_2O_2 beispielsweise die Differenzierung der Sekundärwand, die H_2O_2 -Generierung könnte dabei durch eine GTPase vermittelt werden (Potikha *et al.* 1999). In Mais wurde eine Rolle für ROS in der Blatt-Extension der Elongationszone erkannt (Rodriguez *et al.* 2002). Vor kurzem wurde beschrieben, dass ROS die pflanzliche Zellexpansion über eine Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen reguliert (Foreman *et al.* 2003). Dies wurde anhand der Beobachtung gefolgert, die zeigt, dass die Ca^{2+} -aufnahmedefiziente *rhd2*-Mutante, mit einer nicht-funktionellen NADPH Oxidase (RHD2/Atrboh C), kurze Wurzeln und Wurzelhaare besitzt.

Das Phytohormon ABA induziert die Produktion von ROS und bewirkt dadurch eine Schließung von Stomata (Zhang *et al.* 2001a). Nach externer Applikation von DPI zu Epidermisstreifen kann die ABA-induzierte Generierung von ROS gehemmt werden, was auf eine Beteiligung der NADPH Oxidase hinweist (Zhang *et al.* 2001b). Weiterhin wurde gezeigt, dass die ABA-induzierte Stomabewegung über eine Regulation einwärts-gerichteter Kaliumkanäle durch H_2O_2 abläuft (Zhang *et al.* 2001b), sowie eines H_2O_2 -aktivierten Ca^{2+} -Kanals in der Plasmamembran von Schließzellen (Pei *et al.* 2000). In der Arabidopsis Mutante *ost1* ist der ABA-aktivierte Stomaschluss beeinträchtigt, wird jedoch H_2O_2 oder Calcium appliziert, schließen die Stomata wie in Wildtyp-Pflanzen. Dies deutet darauf hin, dass OST1, eine ABA-aktivierte Protein Kinase, in der Signalkaskade zwischen der ABA-Perzeption und der ROS-Produktion steht (Mustilli *et al.* 2002). Eine neuere Arbeit schlägt auch eine Beteiligung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI₃P) in dieser Signalkette vor (Park *et al.* 2003). APX2, eine ABA-aktivierte cytosolische Ascorbat Peroxidase, könnte die H_2O_2 -Produktion dabei verstärken (Fryer *et al.* 2003).

1.4 Sekundäre Botenstoffe in Signalketten der pflanzlichen Pathogen-Abwehr

Eine Erkennung von Elicitoren während eines Pathogenbefalls ist generell Rezeptorvermittelt und erfolgt entweder im Cytoplasma oder in der Plasmamembran pflanzlicher Zellen (Bonas 1994). Durch die Bindung eines Elicitors an den Rezeptor werden Signaltransduktionsprozesse initiiert, welche die Pathogen-Abwehr und den Zelltod regulieren. Der Zelltod ist Teil einer räumlich begrenzten hypersensitiven Reaktion (*HR*, *hypersensitive response*), die durch die Entwicklung einer systemischen Resistenz (*SAR* für *systemic acquired resistance*) begleitet wird.

In Signalketten der pflanzlichen Pathogen-Abwehr spielen wie schon erwähnt Ca^{2+} (Kap. 1.1), cyclische Nukleotide (Kap. 1.2) und ROS (Kap. 1.3) eine fundamentale Rolle. Parallel zu diesen sekundären Botenstoffen übernehmen noch weitere Signalkomponenten eine Funktion bei der Pathogen-Abwehr. Eine Verbindung zwischen Elicitorrezeptor und nachfolgenden Reaktionen könnten heterotrimere G-Proteine herstellen. Erste Hinweise dafür lieferten transgene Tabakpflanzen, die die katalytische A1-Untereinheit des G-Proteinaktivators Cholera toxin exprimierten oder pharmakologische Untersuchungen mit Effektoren (Mastoparan, GTP γ S) und Inhibitoren (Suramin) (Legendre *et al.* 1992, Takahashi *et al.* 1998; Beffa *et al.* 1995; Xing *et al.* 1997; Rajasekhar *et al.* 1999).

ROS scheinen teilweise synergistisch mit dem Botenstoff NO zu fungieren. In *Arabidopsis* und in Soja-Zellsuspensionskulturen wurde gezeigt, dass NO ein Signalelement bei der Auslösung der Pathogen-Abwehr ist und die Applikation NO-generierender Substanzen eine Potenzierung des ROS-abhängigen Zelltods bewirkt (Delledonne *et al.* 1998). In einer späteren Arbeit wurde demonstriert, dass die HR nur bei einem distinkten Konzentrationsverhältnis von NO und ROS induziert wird (Delledonne *et al.* 2001).

Das Phytohormon Salizylsäure (SA) übernimmt ebenfalls eine Funktion bei Pathogen-induzierten Signalketten (McClung 1997 und Referenzen darin). Ein Modell schlägt vor, dass SA an Catalasen (metabolisieren H_2O_2 zu H_2O und O_2) bindet und dadurch inaktiviert. Dadurch wird der Level an H_2O_2 und anderen ROS erhöht. H_2O_2 selbst stimuliert auch die SA-Produktion (Leon *et al.* 1995). Im Gegenteil dazu wurde aber gezeigt, dass SA die Expression einiger Catalasen induziert, was zu einem Abbau von H_2O_2 führt. Auch in NahG-transgenem Tabak, der keine SA akkumulieren kann, wurde eine erhöhte ROS-Akkumulation nach TMV-(Tabak Mosaik Virus)-Infektion beschrieben (Kiraly *et al.* 2002). SA-Analogone induzieren weiterhin die Expression von PR-Proteinen sowie der Cu,Zn-SOD (Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase). Die Phytohormone Jasmonsäure/Methyljasmonat und Ethylen regulieren synergistisch einen SA-unabhängigen Signalweg bei Abwehrmechanismen gegenüber perithotrophen Pilzen (Thomma *et al.* 1998; McDowell und Dangl 2000).

Pflanzen müssen teilweise mit mehreren Formen von Stress gleichzeitig umgehen, sodass die induzierten Signalketten nebeneinander ablaufen. Bei UV-Licht- und Pathogen-induzierten Signalkaskaden wurden teilweise inverse Effekte auf die Expressionslevel verschiedener regulatorischer Faktoren (CPRFs; *common plant regulatory factors*) beobachtet (Logemann und Hahlbrock 2002), d.h. die Signalketten werden, je nach dem

Maß der Bedrohung durch die jeweilige Stressform, aufeinander abgestimmt, damit ein bestmöglicher Schutz gewährleistet ist.

1.5 Die Signalwirkung von Licht auf Pflanzen

Pflanzen als photoautotrophe Lebewesen benutzen Licht als Energiequelle und als Signal. Die Informationen, die in der Lichtqualität enthalten sind, werden von spezifischen Photorezeptoren empfangen und entwicklungs- und zellspezifisch weiterverarbeitet. Viele Licht-regulierte Prozesse basieren auf der Modulation von Genaktivitäten als Antwort auf eine veränderte Illumination. Die molekulare Basis dieser Genregulation und die involvierten Schritte in dieser oder weiteren Licht-abhängigen Signalketten sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Phytochrom ist das Photopigment, das in vielen photomorphogenetischen Phänomenen involviert ist. In seiner reduzierten Form P_R (R= *red*) absorbiert es rotes (660 nm) Licht, in der durch Licht-Exposition entstandenen Form P_{FR} (FR= *far red*) dunkelrotes (730 nm) Licht. In dem Farn *Adiantum capillus-veneris* existiert ein unkonventioneller Photorezeptor, phy3 (Kawai *et al.* 2003). Er ist eine Chimäre aus Phytochrom und dem Blaulicht-Rezeptor Phototropin.

Blaulicht kontrolliert z.B. photomorphogenetische Abläufe, Chloroplasten- oder Stomabewegung (siehe auch Kap. 1.5.1 und 1.5.2). Als Blaulichtrezeptoren in *Arabidopsis* sind die Cryptochrome und die Phototropine bekannt, mit jeweils zwei Vertretern (cry1 und cry2 (Ahmad und Cashmore 1993, Hoffman *et al.* 1996) bzw. phot1 und phot2 (Briggs *et al.* 2001, Briggs und Christie 2002)). Auch eine Interaktion von Cryptochromen mit Phytochromen wurde gezeigt (Ahmad *et al.* 1998b). Cry1 und cry2 erwiesen sich dabei als Substrate für eine Phosphorylierung durch eine Phytochrom A-assoziierte Kinase-Aktivität.

1.5.1 Blaulicht-induzierte Ca²⁺-Signale

Mit Hilfe von transgenen, Apoaequorin-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen konnten Ca²⁺-Signale als eine Signalkomponente nach Blaulicht-Illumination nachgewiesen werden (Baum *et al.* 1999). In Keimlingen der phot1-5 Mutante waren die Blaulicht-induzierten Ca²⁺-Signale reduziert, was für eine Regulation dieses cytoplasmatischen Ca²⁺-Transienten

durch PHOT1 spricht. Daraus lässt sich schließen, dass Ca^{2+} als sekundärer Botenstoff auch in PHOT1-regulierten Prozessen wie Phototropismus eine Rolle spielt.

Im Folgenden werden die bekannten Blaulicht-Rezeptoren und weitere identifizierte physiologische Effekte nach der Blaulicht-Perzeption näher dargestellt.

1.5.2 Blaulicht-Rezeptoren

Cryptochrome

Die ersten identifizierten Blaulicht-Photorezeptoren waren die Cryptochrome (Ahmad und Cashmore 1993, Hoffman *et al.* 1996). Sie besitzen zwei Chromophore, Pterin und Flavinadenindinukleotid (FAD), (Cashmore *et al.* 1999, Christie und Briggs 2001, Lin *et al.* 1995, Abb. 3). In *Arabidopsis* gibt es zwei Cryptochrome, cry1 und cry2 (54% Ähnlichkeit, Hoffman *et al.* 1996). Die Dissimilariät resultiert u.a. aus einem Unterschied in C-Terminalen Extensionen. Nach der Entdeckung von Cryptochromen in *Arabidopsis* wurden sie auch in anderen Pflanzen und in Tieren (Cashmore *et al.* 1999) nachgewiesen, wo sie eine Funktion im circadianen Rhythmus besitzen. *Arabidopsis* Cryptochrome spielen eine Rolle während der De-Etiolierung und beim Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum (Batschauer 1999, Cashmore *et al.* 1999, Lin 2000, Quail 2002). Während der De-Etiolierung ist cry2 speziell wichtig für niedrige ($1 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) Blaulicht-Intensitäten, cry1 hingegen für höhere ($30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) Blaulicht-Intensitäten (Lin 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu CRY1 die Expression von CRY2 durch Blaulicht in einer Licht-Intensitäts-abhängigen (getestet zwischen $0,8 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ und $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) Weise schnell reprimiert wird, ein molekularer Mechanismus der teilweise erklären könnte, warum CRY2 hauptsächlich unter schwach-Licht-Bedingungen während der frühen Entwicklung von Keimlingen funktioniert (Ahmad *et al.* 1998a, Lin *et al.* 1998). Das Blühen ist durch antagonistische Aktionen von phyB (Phytochrom B) und cry2 reguliert (Guo *et al.* 1998). Cryptochrome wurden sowohl im Licht als auch im Dunkeln im Nukleus von *Arabidopsis* lokalisiert (Cashmore *et al.* 1999, Kleiner *et al.* 1999). Es gibt außerdem Hinweise, dass die Carboxy-terminale Domäne von CRY1 im Licht zum Cytoplasma hin exponiert wird und durch Interaktionen z.B. mit COP1 (*constitutive photomorphogenic*, Wang *et al.* 2001, Yang *et al.* 2001) zelluläre Antworten triggern könnte. Für CRY2 konnte eine Blaulicht-abhängige Phosphorylierung als initiiender Schritt nachfolgender Signalketten nachgewiesen werden (Shalitin *et al.* 2002).

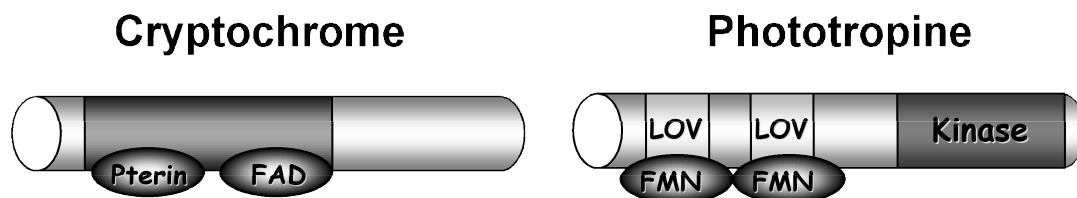


Abb. 3. Pflanzliche Blaulicht-Rezeptoren. Links: Die beiden Vertreter der Cryptochrome, cry1 und cry2, binden zwei Chromophore, Pterin und FAD. Rechts: Phototropine besitzen zwei LOV-Domänen, jede bindet ein Flavinmononukleotid (FMN) als Chromophor. Die C-terminale Seite der Phototropine ist eine Serin/Threonin Kinase. In *Arabidopsis* sind zwei Vertreter bekannt, phot1 und phot2.

Phototropine

Phototropine wurden in Samenpflanzen, Farnen, Moosen (Briggs und Huala 1999, Briggs *et al.* 2001, Briggs und Christie 2002) und sogar in der Grünalge *Chlamydomonas* (Huang *et al.* 2002) gefunden. In *Arabidopsis thaliana* sind zwei Vertreter bekannt, phot1 und phot2. Die C-terminale Seite der Phototropine ist eine Serin/Threonin Kinase, welche die Phosphorylierung von Proteinen an den Aminosäuren Serin und Threonin katalysiert. Die N-terminale Seite besitzt zwei sogenannte LOV-Domänen (Abb. 3). Diese zeigen Homologien zu Domänen aus verschiedensten Vertretern von den *Archaea* bis zu den Säugern. All diese Proteine werden durch Licht, Sauerstoff oder Spannung reguliert und wurden daher LOV-Domänen genannt (für *light*, *oxygen*, *voltage*). Weiterhin wurde gezeigt, dass PHOT1 und PHOT2 jeweils zwei FMN (Flavinmononukleotide) als Chromophor binden.

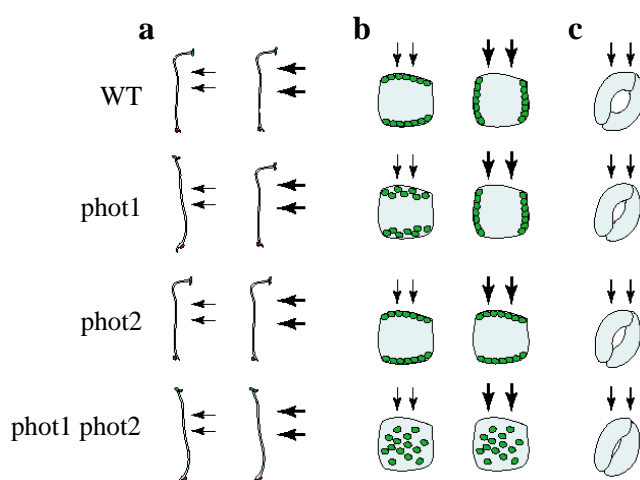


Abb. 4. Blaulicht-induzierte Prozesse in Wildtyp *Arabidopsis*-Pflanzen (WT) und einfach- oder doppel- Phototropin-defizienten Mutanten (*phot1-5*, *phot2-1* und *phot1-5 phot2-1*). (a) Phototropismus in unilateralem Blaulicht hoher und niedriger Intensität. (b) Seitenansicht der Chloroplastenbewegung in Mesophyll-zellen. (c) Öffnungsverhalten der Stomata. Die Dicke der Pfeile korrespondiert mit den relativen Blaulicht Intensitäten, gültig für die gesamte Abbildung. Aus Briggs und Christie 2002.

Eine *phot1*-Mutante (*phot1-5*) verliert die Fähigkeit, das Hypokotyl in Richtung schwachen ($\leq 1 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$) Blaulichtes zu biegen (Abb. 4). Auch die Chloroplasten-

Bewegung und das Öffnen der Stomata ist unter schwachen Blaulicht-Intensitäten beeinträchtigt. Im Gegensatz zu *phot1-5* zeigte eine *phot2*-Mutante bei schwachen Licht-Intensitäten ein normales Verhalten (Sakai *et al.* 2001, Kagawa *et al.* 2001, Jarillo *et al.* 2001). Hier tritt ein Blaulicht-abhängiger Phänotyp unter hohen Licht-Intensitäten (1 – 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) auf. Im Wildtyp vermeiden Mesophyll-Chloroplasten hohe Licht-Intensitäten, indem sie sich an die antiklinalen Wände orientieren, die parallel zur Richtung des Lichts stehen. Dadurch wird einer Beschädigung des Photosyntheseapparates entgegengewirkt (Kagawa *et al.* 2001, Kagawa und Wada 2002, Jarillo *et al.* 2001). Die Doppelmutante *phot1-5 phot2-1* zeigte schließlich Beeinträchtigungen in allen drei Phototropin-abhängigen Prozessen (Phototropismus, Chloroplasten- und Stoma-Bewegung). Zusammengefasst scheinen die Funktionen beider Photorezeptoren partiell zu überlappen (Briggs und Christie 2002).

1.6 Zielsetzung

In der derzeitigen Literatur gibt es Hinweise, dass Calcium-permeable Kanäle in pflanzlichen Zellen sehr bedeutend sind (Kap. 1.1.2). Die physiologische Funktion, die Lokalisation oder Regulation solcher Kanäle in Pflanzen ist noch weitgehend unbekannt. Deswegen war das Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik in Mesophyllzellen die Existenz von Calcium-permeablen Kanälen und weiterführend deren biophysikalischen Merkmale wie Spannungs-Abhängigkeit, Permeabilität, Einzelkanal-Leitfähigkeit und Sensitivität gegenüber Kanalblockern zu zeigen. Darauf aufbauend sollte die physiologische Funktion der Kanäle in Licht- und Redox-abhängigen Signalketten geprüft werden. Durch das Einsetzen verschiedener sekundärer Botenstoffe oder von Enzym-Inhibitoren bzw. durch die Überprüfung von Mutanten sollte die Stellung der Kanäle in der Signalkette aufgedeckt werden.

Die Eigenschaften des putativen pflanzlichen CNG-Kanals CNGC2 sollten als ergänzende Komponente in ein Modell der pflanzlichen Pathogen-Abwehr eingefügt werden. Durch heterologe Expression sollten zwei putativen CNG-Kanäle (CNGC2 und CNBT1) biophysikalisch untersucht werden. Weiterhin sollten Lokalisationsstudien mit GFP-Fusionskonstrukten *in vivo* und *in vitro* durchgeführt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Arbeiten mit Protoplasten und Zellkultur

2.1.1 Pflanzen und Anzuchtbedingungen

Als Wildtyp-Pflanze für die durchgeführten Experimente diente *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Col-0, für *Columbia*, Nottingham Arabidopsis stock centre, Loughborough, UK). Die Mutanten *phot1-5* und *phot1-5 phot2-1* wurden freundlicherweise von Winslow R. Briggs (Stanford, CA, USA) zur Verfügung gestellt. *Cry1-304 cry2-1*-Pflanzen konnten aufgrund der freundlichen Genehmigung von Chentao Lin (Los Angeles, USA) verwendet werden. *dnd1* wurde von A. F. Bent (Madison, USA) zur Verfügung gestellt. Die Apoaequorin-exprimierenden C24-Pflanzen wurden von A. J. Trewavas (Edinburgh, UK) bereitgestellt. Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 8:16 h bei 21:16°C in Pikiererde (Einheitserde Typ P, Patzer GmbH & Co. KG, Sinntal-Jossa, D oder Latterra, Lauterbacher Kultursubstrat, Terreau Horticole, D) angezogen. Als Lichtquelle dienten Osram 25 W Birnen und Philips TL70 Leuchtstoffröhren, welche zusammen eine Photonen-Flussdichte von 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ aufbrachten. Die relative Luftfeuchte betrug 50-60 %.

2.1.1.1 Vorbereitung von Mesophyll-Protoplasten für die *Patch-Clamp*-Technik

Für die Anwendung der *Patch-Clamp*-Technik auf pflanzliche Zellen muss zunächst deren Zellwand entfernt werden. Damit später ein hoher Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Membran ermöglicht wird, muss die Plasmamembran nach dem enzymatischen Zellwandverdau gewaschen werden.

Die Protoplasten-Präparation aus Mesophyllzellen wurde vor jedem Experiment nach einer abgeänderten Methode von Sando und Goto (Sando und Goto 1994) durchgeführt. Hierzu wurden 3-10 Wochen alte Rosettenblätter (2 bis 6 pro Ansatz) nicht-blühender Pflanzen benutzt. Zum enzymatischen Abbau der Zellwand wurde zunächst soweit möglich die untere Blattepidermis mit einer Uhrmacherpinzette in destilliertem Wasser abgezogen und die Blätter in kleine Stücke geschnitten. Die Stücke wurden dann in 2-5 ml Enzymlösung für 50-60 Minuten auf dem Schüttler inkubiert (Raumtemperatur; im Dunklen; ca. 60 rpm). Die Zusammensetzung der Enzymlösung war:

1,00 % (G/V) BSA
0,05 % (G/V) Pectolyase Y-23 (Sigma, St. Louis, MO, USA)
0,50 % (G/V) Cellulase R10 (Yakult Honsha, Tokyo, Japan)
in 0,4 M Mannitol

Die Lösung wurde 10 Minuten bei 3000xg zentrifugiert, um die über die Enzyme eingeführte Stärke zu entfernen, zu 2-5 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Stärkekörner wurden entfernt, damit diese die Protoplasten während des Waschvorganges nicht beschädigen konnten.

Die Protoplastensuspension wurde nun durch Filtration durch zwei Lagen Nylonnetz (200 μm und 50 μm Maschenweite) von unverdauten Geweberesten separiert. Die Nylonnetze wurden vorher mit Waschlösung 1 befeuchtet, um das Auftreten von Scherkräften zu verhindern. Das Filtrat wurde zentrifugiert (4°C , 4 Minuten, 42xg ohne Bremse, Beckmann GS-15R Centrifuge, Beckmann Instruments, Inc., Palo Alto, Ca, USA) und die im Pellet angereicherten Protoplasten einem weiteren Waschschrift unterzogen, wobei das Gesamtvolumen eines Durchlaufs jeweils ca. 15 ml betrug. In den folgenden beiden Waschschriften wurde die Waschlösung 2 eingesetzt, um die Ca^{2+} -Konzentration des Mediums zu erniedrigen. Die Mesophyll-Protoplasten wurden in ca. 400 μl Waschlösung 2 zurückbehalten und abgedunkelt auf Eis oder im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt. Für die *Patch-Clamp*-Experimente wurden abgerundete Protoplasten mit möglichst gleichmäßiger Verteilung der Chloroplasten verwendet, was auf einen vitalen Zustand schließen ließ.

Waschlösung 1: 10 ml 0,4 M Mannitol und 20 ml 0,2 M $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Waschlösung 2: 20 ml 0,4 M Mannitol und 10 ml 0,2 M $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

2.1.2 Arbeiten mit Zellkulturen

Die Kultivierungs- und Transfektions-Arbeiten mit Zellkultur wurden unter einer sterilen Werkbank (NUAIRE, Biological Safety Cabinets ClassII, Zapf Instrumente, Sarstedt, D) durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Puffer sind am Ende des Kapitels vermerkt. Es wurde mit einer *Human Embryonic Kidney-293* (HEK293) Zelllinie (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSM, Braunschweig, D) gearbeitet. Sie wurden für elektrophysiologische Experimente und für Lokalisationsstudien

mit GFP-(*green fluorescence protein*)-Fusionskonstrukten (siehe Anhang und Kap. 2.3 für die Klonierungen) verwendet.

2.1.2.1 Kultivierung und Subkultivierung von HEK293-Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und vollständiger Wasserdampfsättigung der Gasatmosphäre. Die Zellen (1 ml Aliquot) wurden wegen des toxischen Frostschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) schnell aufgetaut (Langzeitlagerung in 70 % DMEM-Medium, 20 % FCS, 10 % DMSO, in flüssigem Stickstoff) und in 5 ml, auf 4°C gekühltes, DMEM-Medium gegeben. Nach Zentrifugation für 3 Minuten bei 400xg (1550 rpm, Beckmann Zentrifuge) und 20°C wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in dem verbliebenen Medium vollständig resuspendiert. Die Zellen wurden dann in 5 ml DMEM-Medium in Zellkulturflaschen (260 ml Zellkulturflaschen, Nalge Nunc International, Dänemark) gegeben und solange weiter kultiviert, bis die Zellen einen konfluenten Zellrasen bildeten, was auf einen vitalen Zustand schließen lässt. Nach 2-3 Tagen wurde dabei ein Teil (ca. 50 %) des verbrauchten Mediums vorsichtig abpipettiert und frisches DMEM-Medium dazugegeben. Danach wurden die Zellen im 3-4 Tage-Rhythmus subkultiviert.

Zum Subkultivieren wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch enzymatische Proteolyse mit 1 ml 1xTrypsin-EDTA (Inkubation für maximal 3 Minuten) von dem Flaschenboden abgelöst. Durch Zugabe von 10 ml Medium wurde die Trypsinbehandlung abgestoppt und durch auf- und abpipettieren konnten die Zellen separiert werden. Nach einem Zentrifugationsschritt (3 min, 400xg, 20°C) wurden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert, in einer Zählkammer konnte die Zellzahl bestimmt werden. Davon wurden 5×10^6 Zellen zur weiteren Kultivierung in Kulturflaschen mit 15 ml Medium pipettiert, für eine anschließende Transfektion wurden sie in *6-well* Platten (Nalge Nunc International, Dänemark) ausgesät (Kap. 2.1.2.2).

2.1.2.2 Transfektion der HEK293-Zellen

Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll von Chen und Okayama 1987.

1. Tag: Aussaat der Zellen

Die Zellen wurden 1 Tag vor der Transfektion in *6-well* Platten ausgesät, dabei wurden $4-5 \times 10^5$ Zellen in 1,8 ml M-10 Medium gegeben. Inkubation über Nacht bei 37°C, 5 % CO₂.

2. Tag: Transfektion der Zellen

Die Zellen sollten ca. 30-50 % konfluent und gut vereinzelt vorliegen. 10-15 µg der DNA wurde mit sterilem H₂O auf ein Volumen von 60 µl gebracht. Danach wurden 20 µl 1 M CaCl₂ zugegeben und mit der Pipette gut durchmischt. Nach Zugabe und gutem Durchmischen von 80 µl 2xBBS wurde mit der Pipette 5-10 mal die Lösung mit Luft durchmischt, um die Bildung der DNA-Komplexe zu unterstützen, die später von den Zellen aufgenommen wurden. Der Ansatz wurde nun 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend konnte der DNA-Mix tropfenweise auf die Zellen gegeben werden. Um eine gleichmäßige Verteilung der DNA zu gewährleisten, wurde die Schale dabei leicht bewegt.

Poly-L-Lysin Beschichtung der Deckgläschen:

Runde Deckgläser wurden mit Ethanol abgeflammt und in *24-well Plates* gelegt. Danach wurden sie mit 200-300 µl Poly-L-Lysin (1:10 verdünnt mit sterilem, diionisiertem H₂O, siehe unten) überschichtet und über Nacht bei RT unter dem sterilen Abzug stehen gelassen. Am 3. Tag wurde dann das Poly-L-Lysin abpipettiert, 2 mal mit PBS gewaschen, mit 100 µl DMEM-Medium überschichtet und so vorbereitet in den Brutschrank gegeben, damit später dann die transfizierten Zellen dazugegeben werden konnten.

3. Tag: Umsetzen der Zellen.

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS, danach einmal mit PBS-EDTA gewaschen (vorsichtig, damit die Zellen nicht abgeschwemmt wurden). Durch Zugabe von 150 µl Trypsin-EDTA wurden die Zellen vom Untergrund abgelöst (Inkubation maximal 3 Minuten), 1,8 ml DMEM-Medium stoppte die Proteolyse ab. Danach konnten die Zellen mit einer 1 ml-Pipette resuspendiert werden. 200-300 µl dieser Zellsuspension wurden dann in die vorbereiteten *24-well Plates* mit den Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen überführt (siehe 2. Tag). Zuletzt wurde das Volumen mit Medium auf 400 µl gebracht. Die Inkubation erfolgte dann im Brutschrank bei 3 oder 5 % CO₂ und 30°C oder 37°C.

4. und 5. Tag: Elektrophysiologische Messung der Zellen.

Für die elektrophysiologische Untersuchung der Zellen wurde zunächst eine optische Kontrolle des Transfektionserfolges durchgeführt. Dieses wurde dadurch ermöglicht, dass eine Kotransfektion (1:10) mit pTracer (einem Expressions-Vektor mit GFP als

Markergen, Invitrogen, D) und dem zu messenden Kanal-Klon durchgeführt worden war (siehe 2. Tag). Auf diese Weise konnten erfolgreich transfizierte Zellen, die das GFP exprimierten, aufgrund ihrer Fluoreszenz identifiziert und gemessen werden.

Die folgenden Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt:

DMEM (Dilbecco's Mod Eagle)-Medium: von Gibco BRL, ergänzt durch
 50 U/ml Penicillin/Streptomycin
 10 % (v/v) FCS

FCS, Fötale Rinder Serum¹, hitzeinaktiviert: von Biochrom, Berlin, D

100 x Penicillin – Streptomycin: von Gibco BRL
 10000 U/ml Penicillin G
 10000 U/ml Streptomycin
 bei –20°C lagern

PBS (*phosphate buffered saline*), pH 7,4/HCl:
 141 mM NaCl
 0,4 mM NaH₂PO₄
 1,6 mM Na₂HPO₄
 4 mM KCl

Poly-L-Lysin Lösung: Mol. Gewicht 70000-150000, Nr. P6282, Sigma
 0,1 % (w/v)

2 x BBS (*BES buffered saline*), pH 6,95-6,96: 50 mM BES
 280 mM NaCl
 1,5 mM Na₂HPO₄

¹ Sollte bei 4°C aufgetaut werden, um die Bildung von Präzipitaten zu vermeiden. Lagertemperatur: –5°C bis –20°C; langfristige Lagerung bei –80°C. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren vermeiden. Hitzeinaktivierung bei 56°C für 30 Minuten unter schütteln. Eingesetzt wird eine Endkonzentration von 10 %.

1 x Trypsin:	von ICN , Biomedicals, Eschwege, D 0,1 % (v/v) Trypsin in EDTA-Lösung bei -20°C lagern, à 10 ml Aliquots
EDTA-Lösung:	0,54 mM EDTA in PBS
CaCl ₂ -Lösung:	1 M CaCl ₂

2.2 Elektrophysiologische Methoden

2.2.1 Patch-Clamp-Technik

Die *Patch-Clamp*-Technik ermöglicht es, elektrische Ströme an Membranen zu messen. Sie erlaubt die direkte Messung der Aktivität individueller membranintegrityaler Kanalproteine in Form von Einzelkanalströmen, sowie von Summenströmen aller in der Zellmembran aktiven Transporter. Der Aufbau des Messplatzes und die *Patch-Clamp*-Ableitungen folgten den Anleitungen von Hamill *et al.* (1981, Hamill *et al.* 1981) und werden nur kurz vorgestellt: Eine Glasmikropipette wird unter optischer Kontrolle (Inverses Mikroskop, Axiovert 35, Zeiss, Jena, D) auf die Zellmembran aufgesetzt. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks in der Pipette wird der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Membran bis in den G Ω -Bereich (sog. „*Gigaseal*“) erhöht.

Ist ein hoher Abdichtwiderstand (bis zu 100 G Ω) erreicht, ist die Pipettenlösung elektrisch gut von der extrazellulären Lösung isoliert (*Cell-attached*-Konfiguration, Abb. 3), da Lipiddoppelschichten für Ionen und polare Moleküle kaum permeabel sind. Dadurch ist die Ableitung von Strömen im pA-Bereich und damit die Beobachtung von Einzelkanalereignissen möglich. Die möglichen Konfigurationen der *Patch-Clamp*-Technik werden im Folgenden beschrieben.

2.2.1.1 Konfigurationen der *Patch-Clamp*-Technik

(i) *Cell-attached*-Konfiguration

In dieser Konfiguration befindet sich der Protoplast nach der Bildung eines *Gigaseals*. Das Cytoplasma bleibt intakt, da die Plasmamembran nicht durchbrochen wird, das heißt alle *Second-Messenger*-Systeme und die intrazellulären Ionenkonzentrationen bleiben weitgehend unbeeinflusst. Dadurch wird ermöglicht, Kanalereignisse aufzuzeichnen, denen

eine cytoplasmatische Signalkette vorausgeht. Jedoch muss bedacht werden, dass, im Vergleich zu Zellen im intakten Gewebe, die Sensitivität gegenüber extern applizierte Stimuli durch die Protoplasten-Isolation reduziert sein kann (Augustynowicz *et al.* 2001).

(ii) *Inside-out*-Konfiguration

Die *Inside-out*-Konfiguration erhält man ausgehend von der *Cell-attached*-Konfiguration, indem die Pipette von der Membran abgezogen wird. Dadurch löst sich ein Membranstück von der Zelle, ohne dass der Abdichtwiderstand abnimmt. Nun ist die intrazelluläre Seite des Membranflecks (*Patch*) zur Badlösung hin exponiert, so dass cytoplasmatische Bestandteile weggewaschen werden und die Badlösung die natürliche Umgebung der Membranproteine ersetzt.

(iii) *Whole-cell*-Konfiguration

In diesem Fall ist die gesamte Membran einer Zelle der elektrischen Ableitung zugänglich. Diese Konfiguration wird durch das Aufbrechen der Membran unter der *Patch*-Pipette durch einen kurzen Unterdruck in der Pipette erreicht, teilweise wurde als Unterstützung ein elektrischer Puls (sog. „Zap“: -600 mV für 100 μ s) während der Saugpulse appliziert. Durch den Austausch des Cytoplasmas gegen die Pipettenlösung wird eine definierte Zusammensetzung der cytoplasmatisch orientierten Membranseite erlaubt.

(iv) *Outside-out*-Konfiguration

Diese Konfiguration wird ausgehend von der *Whole-cell*-Konfiguration durch Abziehen der Pipette erreicht. Die Membran unter der *Patch*-Pipette verbleibt dabei in ihrer ursprünglichen Orientierung.

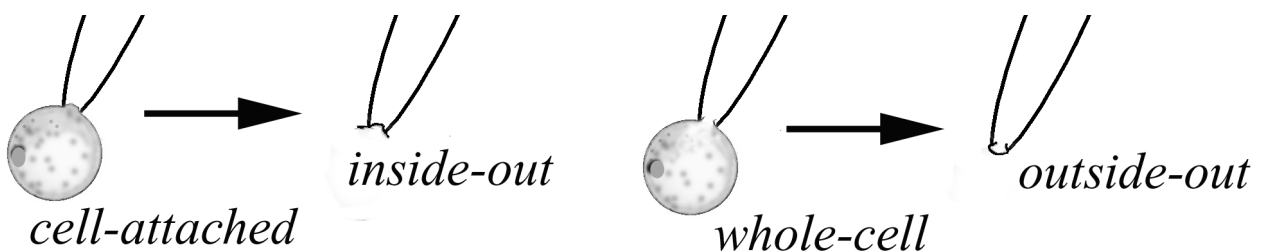


Abb. 5. Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik.

2.2.1.2 Messprinzip

Die Membran kann mit Hilfe eines elektrischen Ersatzschaltbildes dargestellt werden (Abb. 6 a), bei dem ein Widerstand und ein Plattenkondensator parallel geschaltet sind. Die Membrankapazität C_m repräsentiert die etwa 4 nm dicke Lipiddoppelschicht mit einer spezifischen Membrankapazität von ca. $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Hille 2001). Der Membranwiderstand R_m spiegelt die Aktivität der Ionen-durchlässigen integralen Proteine wider.

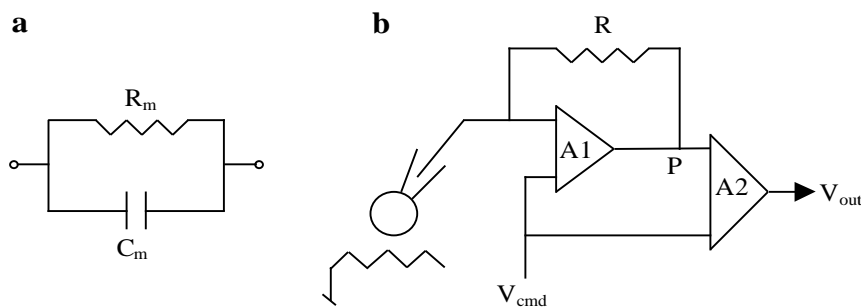


Abb. 6. (a) Elektrisches Ersatzschaltbild einer Membran. (b) Prinzip des Vorverstärkers einer Patch-Clamp-Apparatur (nach Sigworth 1994).

Abbildung 6 b zeigt das Messprinzip eines *Patch-Clamp*-Messplatzes, mit dem gleichzeitig eine konstante Spannung gehalten und Strom gemessen werden kann. Ein negativ rückgekoppelter Operationsverstärker A1 generiert eine Ausgangsspannung, dadurch wird die an den Eingängen anliegenden Spannungen abgeglichen. Der Strom kann jetzt über den Messwiderstand R als Spannungsabfall bestimmt werden. Der Differenzverstärker A2 bildet die Differenz der Spannung zwischen seinen beiden Eingängen (Kommandospannung V_{cmd} und der Spannung am Punkt P). Diese zum Strom proportional verstärkte Spannung V_{out} liegt am Ausgang an, wird weiterverstärkt und gefiltert (mittels eines Verstärker-integrierten 4-Pol-Bessel-Filters bei einem EPC-9 Messplatz oder eines externen 8-Pol-Bessel Filters beim EPC-7 Messplatz). Die Experimente wurden entweder mit einem EPC-7 oder EPC-9 Verstärker (HEKA elektronik, Lambrecht, D) durchgeführt. Die Filterfrequenzen lagen bei 2 kHz, bei Einzelkanal-Messungen wurde mit 1 kHz gefiltert. Die Messdaten wurden mit 2,5-facher Filterfrequenz abgetastet und gespeichert. Als Software für den Pulsgenerator wurde Pulse (HEKA elektronik, Lambrecht, D) eingesetzt. Als Hardware wurde ein Apple Macintosh Power PC 603e/200 verwendet, der über einem 16-bit AD/DA-Wandler mit einem EPC-9 Verstärker verbunden war oder alternativ ein Apple Macintosh Power PC 7100/66, der über einen AD/DA-Wandler mit einem EPC-7 Verstärker verbunden war. Die Strom- und Spannungssignale konnten während der Messung mit einem Software-basierten Oszilloskop und über ein externes

Oszilloskop beobachtet werden (Kikusui COS5020-ST Electronics Corp., J beim EPC-9 Verstärker oder Tektronix TDS 210, Tektronix Inc, USA beim EPC-7 Verstärker).

2.2.1.3 Korrektur von Spannungsfehlern und Kapazitäten

Bei jeder Änderung der Kommandospannung kommt es zu einem Umladen der Pipetten- und Membrankapazität. Dies führt zu schnell ansteigenden und exponentiell abfallenden, kapazitiven Strömen. Die durch das Pipettenglas verursachten Ströme können durch Ummantelung mit einer Silikonschicht (Sylgard) verringert werden, welches die spezifische Glas-Kapazität reduziert.

In der *whole-cell*-Konfiguration, bei der die Membrankapazität über 1 pF liegt, fällt ein Teil der Sollspannung bereits am Serienwiderstand R_s ab, über den die Membrankapazität C_{slow} (C_m) geladen werden muss. Da R_s und der Membranwiderstand R_m in Serie liegen, wird auch eine zu geringe Membranspannung V_m aufgebaut. Dieser Spannungsfehler wurde bei der Datenanalyse von Messungen in der *whole-cell* Konfiguration anhand folgender Gleichung korrigiert (detailliertere Beschreibung z.B. in Armstrong und Chow 1987) :

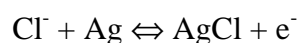
$$V_m = V_{cmd} - R_s \cdot I \quad [1]$$

Auftretende kapazitive Strom-Transienten wurden während der Messung elektronisch kompensiert.

Es muss auch berücksichtigt werden, dass ein großer Zugriffswiderstand die Aufladung der Membran verlangsamt ($\tau = C_{slow} \cdot R_s$) und dadurch bei einer nicht vollständigen elektronischen Kapazitätskompensation die gemessenen Ionenkanal-Ströme von den kapazitiven Transienten überlagert werden. Bei der Datenanalyse wurden deshalb die ersten 20-30 ms nach einem Spannungswechsel nicht berücksichtigt.

2.2.1.4 Vorbereitung der Elektroden und *Patch*-Pipetten

Als Mess- und Referenzelektroden wurden Silber/Silberchlorid-Elektroden verwendet. Zur Herstellung wurde eine Elektrolyse in 0,1 M HCl oder 3 M KCl mit einem Silberdraht durchgeführt, wobei sich an der Anode (Silberdraht) Chlorid abscheidet und an der Kathode Wasserstoff:



Um Änderungen in der Cl^- -Aktivität (effektive Konzentration) an der Referenzelektrode zu verhindern, wurde die Referenzelektrode in einen Polyvinylschlauch eingeführt, der mit einer 3 M KCl-Lösung gefüllt war. Ein Agarpfropfen (3 M KCl, 2 % Agar) in der Schlauchöffnung verhinderte, dass sich die hochkonzentrierte Elektrolytlösung mit der Badlösung vermischte und somit keine *Offset*-Spannung entstehen konnte.

Für die elektrische Überbrückung zwischen Zelle und Messelektrode wurden Glaspipetten hergestellt, die mit Elektrolyt (interne Lösungen, Kap. 2.2.4) gefüllt wurden. Die Pipetten wurden aus Borsilikat Hartglaskapillaren (1,5-1,8 · 70 mm, Kimax - 51, Kimble Products, Vineland, Nj, USA) oder Aluminiumsilikatglaskapillaren ($l = 75$ mm, $\varnothing_a = 1,6$ mm, $\varnothing_i = 1,22$ mm, Hilgenberg, Malsfeld, D) an einem vertikalen Ziehgerät (Narishige, Narishige Scientific Instrument, Tokyo, Japan) zu Mikropipetten ausgezogen. Die Spitzen der Glaspipetten wurden an einer Microforge-Apparatur (Zeiss, ID03, Jena, Germany) mit einer Silikonschicht (Sylgard® 184 silicone elastomer kit, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA) bis nahe an die Pipettenöffnung überzogen. Kurzzeitiges Erhitzen führte zur Aushärtung der Silikonschicht. Die hydrophobe Eigenschaft von Sylgard verhinderte das Benetzen der Glaspipette mit Badlösung und limitierte somit eine wesentliche Rausch-Quelle. Zuletzt wurde der Glasrand der Pipettenöffnung mit Hilfe der Microforge hitzepoliert, um durch die Entgratung eine Penetration der Spitze in die Zelle während der Herstellung eines *Gigaseals* zu verhindern, und um den Öffnungsdurchmesser zu optimieren.

2.2.1.5 Korrektur der Diffusionspotentialdifferenzen

Diffusionspotenzialdifferenzen treten auf, sobald an den Elektroden Lösungen mit unterschiedlichen Ionenverhältnissen und damit unterschiedliche Elektrodenpotentiale vorhanden sind. Zum weiteren entstehen Diffusionspotentialgradienten an der Grenzfläche zwischen verschiedenen Lösungen wie an der Pipettenöffnung oder an der Referenzelektrodenöffnung. Alle auftretenden Potentialdifferenzen wurden nach dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung als *Offset*-Potential elektronisch abgeglichen. Nach dem Aufsetzen der Pipette auf die Membran fällt die Diffusionspotentialdifferenz zwischen Pipettenlösung und Badlösung weg. Die Membranspannung muss daher um diese Differenz (*Liquid Junction Potential*, V_{LJP}) korrigiert werden (Neher 1992).

Diese Grenzflächen-Potentialdifferenz V_{LJP} wurde experimentell bestimmt und die Membranspannung V_m bei der Datenauswertung entsprechend der Gleichung korrigiert:

$$V_m = V_{cmd} - V_{LJP} \quad [2]$$

2.2.1.6 Vorzeichenkonvention

Die Membranspannung V_m wird relativ zu dem extrazellulären Potential ($\psi = 0$ mV) angegeben. Ein Kationeneinstrom in das, oder ein Anionenausstrom aus dem Cytoplasma entspricht dabei einem negativen Strom. In der *whole-cell* Konfiguration entspricht V_{cmd} der Membranspannung V_m , unter Berücksichtigung von R_s (Kap. 2.2.1.3, Gleichung 1). In der *cell-attached* Konfiguration dagegen ist die Spannung, die über der Membran anliegt, von V_{cmd} und dem Membranpotential der intakten Zelle abhängig, welches unbekannt blieb.

2.2.2 Spannungspulsprotokolle

Um die Ausbildung eines hochohmigen Abdichtwiderstandes zu verfolgen, wurde ein relativ zur Kommandospannung definiertes Rechtecksignal (± 40 mV, 20 ms) appliziert. Die entsprechende Stromantwort war proportional dem Abdichtwiderstand und zeigte schnelle kapazitive Transienten. Langsame Transienten treten erst beim Übergang in die *whole-cell* Konfiguration aufgrund der Zunahme der Membrankapazität auf. Nach der Korrektur der Transienten wurden ausgehend von einer Haltespannung verschiedene Spannungspulsprotokolle appliziert.

2.2.2.1 Einfachspannungspulsprotokoll

Ausgehend von einer Haltespannung V_H , wurden verschiedene Testspannungen V_T angelegt, um spannungsabhängige Gleichgewichtszustände der Kanäle zu analysieren (Abb. 7). Die sog. Gleichgewichts-Ströme (I_{ss}) wurden jeweils innerhalb der letzten 50 ms der Testspannungen abgeleitet. Danach erfolgte die Rückkehr zur Haltespannung V_H . Die Haltespannung V_H , der Bereich und die Dauer der Testspannungen V_T wurden den jeweiligen Experimenten angepasst.

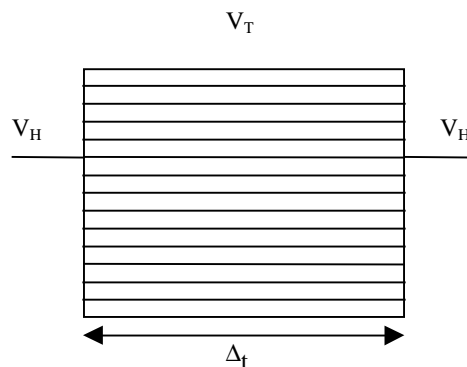


Abb. 7. Einfachspannungspulsprotokoll. V_H = Haltespannung, V_T = Testspannung. Zwischen den einzelnen Pulsen wurde eine Intervallzeit eingefügt, um alle Kanäle vollständig in den Ausgangszustand zu überführen.

2.2.2.2 Rampenprotokoll

Bei einer Spannungsrampe (Abb. 9) wurde nach einer Voraktivierungsperiode die Spannung linear über einen Bereich variiert. Das Haltepotential V_H , die Dauer der Rampe Δt und die Dauer der Vorpulse V_{vp} wurden dem Experiment angepasst.

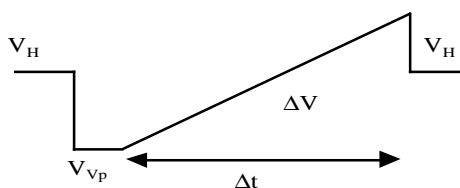


Abb. 9. Rampenprotokoll. Ausgehend von einer Haltespannung V_H wurde die Spannung auf einem Bereich konstant gehalten um zeitabhängige Kanäle zu aktivieren (Vorpuls V_{vp}), anschließend linear in dem Bereich verändert, in dem die Kanäle aktiv waren. Danach erfolgte die Rückkehr zur Haltespannung.

2.2.3 Datenauswertung

Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit dem Programm Pulse-Fit (HEKA elektronik, Lambrecht, D) auf einem PC PentiumII oder Apple PowerBook G4. Die Weiterverarbeitung der Daten wurde mit dem Programm Igor Pro 3.14 Version π oder Igor Pro 4.04 (WaveMetrics, USA) durchgeführt.

2.2.3.1 Auswertung von spannungsabhängigen Strömen anhand der Einfachspannungspulsexperimente

Die spannungsabhängigen Gleichgewichtsströme I_{ss} wurden in einer Zeitspanne von ca. 50 ms am Ende des Testpulses gemittelt.

2.2.3.2 Bestimmung der Umkehrspannung

Diejenige Spannung, bei der kein Netto-Influx oder -Efflux stattfindet, nennt man Umkehrspannung oder Gleichgewichtspotential E_{rev} .

Die quantitative Beziehung zwischen einer Umkehrspannung und den Konzentrations-Verhältnissen der intra- und extrazellulären Ionen an einer selektiven Membran wird in mathematischer Form durch die Nernst-Gleichung beschrieben. Für eine kaliumselektive Membran gilt z.B.:

$$E_{rev} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[K^+]_{au\beta en}}{[K^+]_{innen}} \quad [3]$$

R = Gaskonstante

F = Faradaykonstante

z = Wertigkeit eines Ions

T = absolute Temperatur

Aus der Formel wird ersichtlich, dass das Gleichgewichtspotential linear mit der absoluten Temperatur und logarithmisch mit dem Verhältnis der Ionenkonzentrationen variiert. Eine Membran mit geringer Ionenselektivität ist für mehrere Ionensorten unterschiedlich permeabel. Diese Ionen tragen entsprechend ihrem Permeabilitätskoeffizienten ebenfalls zum Umkehrpotential bei. Das Umkehrpotential ist also ein Mischpotential, das sich aus den unterschiedlichen Gleichgewichtspotentialen der einzelnen beteiligten Ionen ergibt.

In der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (Goldman 1943) werden die Ionen mit ihrer Konzentration und ihrem Permeabilitätskoeffizienten (P_i) berücksichtigt. Für das Umkehrpotential E_{rev} gilt:

$$E_{rev} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{P_K [K^+]_{au\beta en} + P_{Cl^-} [Cl^-]_{innen}}{P_K [K^+]_{innen} + P_{Cl^-} [Cl^-]_{au\beta en}} \quad [4]$$

Die Umkehrspannung für einen Kanal für das Ion i ist gleich der Membranspannung, bei der der Einzelkanalstrom 0 A ist. Die Umkehrpotentiale der Einzelkanäle in den Membran-Patches wurden anhand von Spannungsrampen bestimmt, alternativ durch eine lineare Regression der Einzelkanalamplituden, die gegen die Membranspannung aufgetragen wurde. Die Umkehrspannung makroskopischer Ströme wurde anhand von Spannungsrampen bestimmt. Dabei wurde das Umkehrpotential aus dem Schnittpunkt zweier Strom-

Spannungs-Spuren ermittelt, die einen Kanal im offenen und geschlossenen Zustand repräsentieren.

2.2.3.3 Auswertung der zeitabhängigen Stromzunahme anhand gemittelter Rampen

Für die Bestimmung der zeitabhängigen Aktivierung Calcium-permeabler Kanäle durch Blaublicht oder H₂O₂ wurden mehrere aufeinanderfolgende Spannungsrampen (von -198 mV bis +42 mV in 1s) pro 5 Minuten ab Beginn der Experimente aufgezeichnet. Damit der Aktivierungsstatus der Kanäle genau wiedergegeben werden konnte, wurden 3 bis 10 aufeinanderfolgende Stromspuren gemittelt (siehe auch jeweilige Figurlegenden).

2.2.4 Lösungen

Die Osmolarität der verwendeten Lösungen für die *Patch-Clamp*-Experimente an Mesophyll-Protoplasten wurde auf 400 mosmol/kg mit D-Sorbit eingestellt, für HEK293-Zellen wurden die Lösungen auf 350 mosmol/kg eingestellt. Die Chemikalien für die Lösungen wurden von Sigma (München, D) oder Calbiochem (Karlsruhe, D) bezogen, K252a, DPI (Diphenyliodonium Chlorid) und DIDS (*4,49-diisothiocyano-2,29-disulfonic stilbene*) wurde von Alexis Biochemicals (Grünberg, D), Calmodulin (aus Rinderhirn) und H₂O₂ von Sigma bezogen. Calmodulin81 ist ein Wildtyp-Calmodulin aus Spinat mit einem Cysteinrest an Position 81 des N-Terminus (Schauer-Vukasinovic 1997) und wurde von C. Köhler (AG Neuhaus, Institut für BiologieII, Freiburg, D) bereitgestellt. Die jeweilig verwendeten Konzentrationen an H₂O₂ sind bei den entsprechenden Ergebnissen vermerkt, genauso bei der Zugabe von Inhibitoren oder anderen Substanzen.

Interne Lösungen

Lösung zur Erfassung Calcium/Barium-permeabler Kanäle („interne Standardlösung“):

10 mM Ba-Gluconat ₂	alternativ: 10 mM BaCl ₂
4 mM EGTA	4 mM EGTA
4 mM KCl	10 mM Hepes/Tris pH 7,1
10 mM Hepes/Tris pH 7,1	

Die Sensitivität von Calcium-permeablen Kanälen gegenüber cytosolischem Calcium wurde mit folgender Pipettenlösung geprüft, die 0 oder 10 mM CaCl₂ enthält. Dadurch

wurde eine freie Ca^{2+} -Konzentration von ~ 0 oder $\sim 21 \mu\text{M}$ erhalten. Die Berechnung der freien Ca^{2+} -Konzentration wurde mit dem Programm Calcium.exe Version 2.1 (W.Warchol, Poznan, Polen) durchgeführt.

100 mM K-Gluconat
10 mM EGTA
2 mM MgCl_2
2 mM Mg-ATP
 $\pm 10 \text{ mM CaCl}_2$
10 mM Hepes/Tris pH 7,4

Lösungen zur Erfassung nichtselektiver Kationenkanäle in HEK293-Zellen:

150 mM K-Gluconat
10 mM EGTA
2 mM MgCl_2
1 mM Mg-ATP
50 mM Glucose
10 mM Hepes/Tris pH 7,4
 $\pm 1 \text{ mM cGMP}$

100 mM NaCl
2 mM EGTA
1 mM EDTA
10 mM Hepes/NaOH pH 7,4

externe Lösungen

Lösung zur Erfassung Calcium-permeabler Kanäle („externe Standardlösung“):

40 mM Ca-Gluconat₂
10 mM Mes/Tris pH 5,6

Lösungen zur Erfassung nichtselektiver Kationenkanäle in HEK293-Zellen:

30 mM K-Gluconat
20 mM CaCl_2
10 mM Mes/Tris pH 5,6

30 mM K-Gluconat, oder Na-Gluconat, oder Ca-Gluconat₂
1 mM CaCl₂
10 mM Mes/Tris pH 5,6

2.2.5 Aktivierung der Calcium-permeablen Kanäle durch Blaublicht und H₂O₂

Blaublicht-Behandlung

Für Blaublicht-Experimente wurden die Protoplasten im Dunkeln geerntet, gewaschen und aufbewahrt (Kap. 2.1.1.1), damit vor der experimentellen Bestrahlung mit Blaublicht keine Hintergrund-Ströme auftraten. Der *Seal*-Vorgang wurde in weißem Licht (10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$) welches von der Mikroskoplampe geliefert wurde, durchgeführt. Nach Erreichen der *cell-attached*-Konfiguration wurde das Licht ausgeschaltet und die Hintergrund-Ströme ca. 10 min lang aufgezeichnet. Normalerweise waren keine oder nur geringe Hintergrundströme vorhanden. Für die anschließende Blaublicht-Behandlung wurde eine 75 W Xenon Lampe verwendet. Das Licht wurde durch einen Bandpass-Filter (450-490 nm) des inversen Mikroskops (Zeiss Axiovert 35, Jena, Deutschland) gefiltert und die Photonenfluss-Dichte wurde auf 275 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ mit Hilfe eines Neutralfilters (Schott, Jena, Deutschland) eingestellt. Rotlicht (125 oder 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$) wurde durch die Mikroskop-Lampe mit einem RG630-Filter (Schott) geliefert. Die Photonenfluss-Dichten wurden mit einem Quantum Meter (Li-Cor, Li-250, Deutschland) bestimmt.

Applikation von H₂O₂

Auch für eine nachfolgende Behandlung mit H₂O₂ wurden die Protoplasten geringen Licht-Intensitäten (10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ beim Herstellen der *cell-attached* Konfiguration) ausgesetzt, damit vor dem Experiment keine Calcium-Ströme als Hintergrund vorhanden waren². Die Protoplasten waren zuvor ebenfalls im Dunkeln geerntet, gewaschen und aufbewahrt. H₂O₂ wurde dann direkt in die Badlösung pipettiert, um die gewünschte Endkonzentration zu erreichen (siehe jeweilige Figurlegenden).

² Gilt nur für die Messungen in der *cell-attached* Konfiguration. Als die H₂O₂-Aktivierung der Kanäle in der *outside-out* Konfiguration geprüft wurde, war eine Blaublicht-Aktivierung der Kanäle noch nicht bekannt und somit eine Abdunkelung während der elektrophysiologischen Messungen nicht für notwendig gehalten. Eine Aufbewahrung im Dunkeln, vor Beginn der Messungen, war jedoch gewährleistet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Transformation von kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien

Bei einer Transformation wurden Plasmide in Bakterienzellen eingeschleust, um dann anschließend durch diese vermehrt zu werden.

Zur Transformation des *E. coli*-Stammes MLF' wurden ca. 50 µl kompetenter Bakterien mit 5 µl eines Ligationsansatzes (Kap. 2.3.7) eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (45 s, 42°C) und Abkühlen (2 min, 0°C) wurde der Ansatz nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium (SOB-Medium, von BIO 101, Inc. Carlsbad, CA, USA, 50:1 mit 20 % Glucose verdünnt) eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar mit Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (70 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (Inkubator Typ BE600; Memmert, D).

2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolationsmethode basiert auf einer alkalischen Lyse von Bakterienzellen und einer anschließenden Ausfällung genomischer DNA und Proteine durch eine Erniedrigung des pH-Wertes. Dabei bleibt die DNA im Überstand und die Proteine als Pellet zurück.

Für die Präparation wurde eine Flüssigkultur verwendet, die über Nacht bei 260 rpm und 30°C (Incubator Shaker G25, New Brunswick Scientific CO.INC, Edison, NJ, USA) in LB-Medium gewachsen war. Ein 1,5 ml-Aliquot davon wurde für 30 s bei 10000xg zentrifugiert. Das Pellet aus Bakterien wurde in 0,3 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch die Zugabe von 0,3 ml Puffer P2, leichtem Schütteln und Inkubation bei RT für 2 min entstand ein klares Lysat. Nach der Zugabe von 0,3 ml des Puffers P3 und sofortigem 2-maligem invertieren des Reaktionsgefäßes wurde für 10 min bei RT inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation bei 10000xg für 10 min pelletierte die ausgefallenen Proteine und die genomische DNA. Der klare Überstand enthielt die Plasmid-DNA. Für die Präzipitation der Plasmid-DNA wurden 600 µl Isopropanol hinzupipettiert und nochmals 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 70 % Ethanol gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert. Durch diesen Schritt konnten Salze sowie übriges Isopropanol entfernt werden. Nachdem das Ethanol vollständig entfernt wurde, wurde das Pellet ca. 8 min lang bei 37°C getrocknet, um anschließend in 20-50 µl TE-Puffer oder bidestilliertem Wasser wieder gelöst zu werden. So konnte die Plasmid-DNA bei -20°C aufbewahrt werden.

Die DNA wurde nach der Isolation quantitativ und qualitativ mit Hilfe eines UV-Spektrum-Photometers (RNA/DNA Calculator, GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Amersham Bioscience Europe, Freiburg, D) geprüft. Das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt bei 260 nm, wobei eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm einem Gehalt von 50 µg DNA entspricht. Durch die Messung bei 280 nm wurde die Absorption von Proteinen und Phenolresten bestimmt. Der Quotient der relativen Absorptionen von 260 nm/280 nm sollte bei einer sauberen DNA-Lösung bei ca. 1,8 liegen.

LB (Luria-Bertani) – Nährlösung:	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,0, 50 µg/ml Ampicillin nach dem autoklavieren
P1 (Resuspensions-Puffer):	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg RnaseA
P2 (Lysierungs-Puffer):	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3 (Neutralisations-Puffer):	3,0 M K-Acetat (KHOO ⁻), pH 5,5
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

2.3.3 Fragmentierung der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Weiterverarbeitung der Plasmid-DNA erforderte ein Trennen des Klons von dem Plasmid, damit der Klon z.B. mit einem weiteren DNA-Fragment ligiert oder in einen anderen Vektor eingebracht werden konnte. Dies wurde durch spezifische Restriktionsenzyme bewerkstelligt, die entsprechend dem Protokoll der Hersteller (Gibco BRL, Eggenstein, D; MBI Fermentas, D) eingesetzt wurden. Anschließend wurde Probenpuffer (ca. 1/5 des Reaktionsvolumens) in das Reaktionsgefäß zugegeben und ein Agarosegel damit geladen, dadurch konnte durch Elektrophorese ein positiver Verlauf der enzymatischen Reaktion bestätigt werden (Kap. 2.3.4).

2.3.4 Separation von DNA-Fragmenten durch Elektrophorese

DNA-Moleküle wurden durch Gelelektrophorese der Größe nach getrennt, dabei wurde die Agarosekonzentration im Gel der Größe der zu erwartenden Fragmente angepasst. 0,7 % Agarose für doppelsträngige DNA von 5 bis 60 kb, 1 % Agarose für 0,5 bis 12 kb. Die angepasste Menge Agarose wurde in 1xTBE oder TAE durch Erhitzen gelöst, nach dem

Abkühlen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (interkaliert in die DNA und fluoresziert in UV-Licht) versehen und in eine Gelkammer gegossen. Die DNA-Lösung mit Probenpuffer konnte dann der Elektrophorese unterworfen werden, mit einem dem Gel entsprechenden Laufpuffer (1xTBE oder TAE) und einer Spannung von 5-10 V/cm. Zur Größenbestimmung und Zuordnung der Fragmente wurden Größenstandards mit elektrophoretisiert (z.B. 1 kb Leiter; Gibco BRL). Die Auftrennung wurde in einem ImageMaster (Pharmacia Biotech) mittels UV-Licht geprüft.

50 x TAE-Puffer: 2 M Tris/Essigsäure, pH 8,0, 50 mM EDTA, pH 8,0
10 x TBE-Puffer: 900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH 8,0, EDTA (Na₂-Salz), der pH sollte bei 8,3 liegen.
Probenpuffer: 50 % Glycerin, 7,5 mM EDTA, 0,4 % Xylenxanol, 0,4 % Bromphenolblau

2.3.5 Elution der DNA aus Agarosegel

Für die weitere Verwendung der in einer Elektrophorese aufgetrennten Nukleinsäure-Fragmente mussten diese aus dem Agarosegel eluiert werden. Hierfür wurde das QIAEX II System von QIAGEN (Hilden, D) verwendet. Die DNA-Konzentration wurde nach der Elution mit Hilfe eines UV-Spektrum-Photometers bestimmt.

2.3.6 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Mittels PCR konnten DNA-Fragmente selektiv und exponentiell amplifiziert werden. Dazu wurden synthetische Oligonukleotide aus etwa 14 bis 25 Desoxynukleotiden (sog. Primer) als Startermoleküle verwendet, welche mit Einzelstrang-DNA hybridisierten. Die Einzelstrang-DNA entstand durch eine *Denaturierung* aus doppelsträngiger DNA während eines kurzen Temperaturanstiegs (94°C, meist 5 min). Beim *Annealing* (54°C) werden durch Wasserstoffbrücken-Bindungen die Primer an die einzelsträngigen DNA-*Templates* gebunden. Eine Mg²⁺-abhängige DNA-Polymerase synthetisierte ausgehend von den Primern einen neuen DNA-Strang an die Nukleinsäurematrize (sog. Extension, bei 72°C). Die cyclische Wiederholung (meist 30-40 mal) der einzelnen Reaktionsschritte führte zu einer exponentiell angestiegenen Menge des gewünschten Ausgangsprodukts. Die Menge der DNA-Ausgangsmenge sowie die Parameter und die Dauer der Reaktionsschritte

wurden entsprechend dem Experiment angepasst. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler (GeneAMP, Perkin Elmer) oder einem RoboCycler Gradient 40 (Stratagene) durchgeführt.

Typischer 50 µl Reaktionsansatz:

- 10-100 ng DNA-Template
- 5,0 µl 10 x PCR Puffer
- 2,0 µl dNTPs (5 mM)
- 5,0 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2,0 µl Primer1 (10 µM)
- 2,0 µl Primer2 (10 µM)
- 0,2 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)
- x µl H₂O zum Auffüllen auf 50 µl

2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden 30-50 ng lineare Plasmid-DNA mit einem sechsfachen molaren Überschuss an Fragment-DNA mit 1 µl 5xLigasepuffer und 1 U T4-DNA Ligase bei 16°C für mindestens 12 Stunden inkubiert.

2.3.8 Hergestellte Konstrukte

Die folgende Tabelle zeigt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Konstrukte sowie Angaben über die zur Herstellung verwendeten Komponenten. Die verwendeten Klone der pflanzlichen CNG-Kanäle CNBT1 und CNBT2 wurden freundlicherweise von Patricia Wolff (AG Klaus Palme, Zellbiologie, Freiburg, D) zur Verfügung gestellt. CNGC2 wurde von C. Köhler, AG Neuhaus, Institut für BiologieII, Freiburg, D zur Verfügung gestellt.

Die Marker-Konstrukte für die PIG-(*particle inflow gun*)-Experimente wurden von A. Ichida aus B. Pickard's Labor, Washington Univ., St. Louis, MO; USA, bezogen (pMG.ER.sg für ER; pMG.dpx.sg für Peroxisomen; pMG.rpl.sg für das Cytoplasma).

Konstrukt	Komponenten-Fragmente
CNGC2/pCiNeo ^{a)}	1. pCiNeo; Linker Terminus XbaI; Rechter Terminus NotI 2. PCR-Produkt: CNGC2 aus pTracer (mit Stopp codon) mit 5' XbaI und 3'NotI-Primer
CNGC2-Δ112-EcoRI/pcDNA3.1 ^{a)}	1. CNGC2-Δ112-EcoRI aus CNGC2-Δ112-EcoRI/pcDNA3.1 (hier wurde mittels Mutagenese eine EcoRI Schnittstelle eingefügt) ; Linker Terminus EcoRI site # 1; Rechter Terminus XbaI site # 1 2. pcDNA3.1; Linker Terminus XbaI site # 1; Rechter Terminus EcoRI site # 1
CNGC2 ::EGFP/pcDNA3.1 ^{a)}	1. CNGC2 Volllänge aus CNGC2/pTracer; Linker Terminus HindIII site # 1; Rechter Terminus AflIII site # 1 2. EGFP aus CNGC2-Δ112::EGFP/pcDNA3.1; Linker Terminus AflIII site # 1; Rechter Terminus HindIII site # 1
CNGC2-Δ112::EGFP/pcDNA3.1 ^{a)}	1. CNGC2Δ112-EcoRI/pcDNA3.1-V5-His ; Linker Terminus EcoRI site # 1; Rechter Terminus XbaI site # 1 2. EGFP aus EGFP-N1/pFastBAC; Linker Terminus XbaI site # 1; Rechter Terminus EcoRI site # 1
CNGC2::mGFP4/pPILY ^{b)}	1. CNGC2 aus CNGC2::V5-His/pcDNA3.1 ; Linker Terminus HindIII site # 1; Rechter Terminus Eco47III site # 1 2. mGFP4 aus CNBT2::mGFP4/pcDNA3.1; Linker Terminus Eco47III site # 1; Rechter Terminus HindIII site # 1 3. pPILY (Expressionsvektor)
CNBT1/pcDNA3.1 ^{b)}	Keine Angaben
CNBT1-Δ119/pcDNA3.1 ^{b)}	1. PCR-Produkt: CNBT1-Δ119 2. In pcDNA3.1 aus CNGC2-Δ112-EcoRI/pcDNA3.1 eingebracht, über SpeI-Schnittstellen
CNBT1::smGFP/pA/pCiNeo ^{a)}	1. CNBT1-CATSGFP (aus pUC-Klonierungsvektor) mit XhoI und HindII entfernt, 2. in pBSII (Klonierungsvektor) über XhoI und HindIII eingebracht, 3. mit XhoI und NotI aus pBSII entfernt 4. in pCiNeo (Klonierungsvektor) über XhoI und NotI eingebracht.
CNBT1-Δ119::smGFP/pcDNA3.1 ^{a)}	1. smGFP, aus CNBT1::smGFP/pA/pCiNeo, linker Terminus: NotI site # 1; rechter Terminus HpaI site # 1 2. CNBT1Δ119/pcDNA3.1, linker Terminus: HpaI site # 1; rechter Terminus NotI site # 1
CNBT1::mGFP4/pPILY ^{b)}	1. CNBT1::mGFP4 aus CNBT1::mGFP4/pcDNA3.1; Linker Terminus HindIII site # 1; Rechter Terminus XhoI site # 1 2. pPILY; Linker Terminus XhoI site # 1; Rechter Terminus HindIII site # 1
CNBT2::mGFP4/pPILY ^{b)}	1. mGFP/pPILY aus CNBT1::mGFP4/pPILY; Linker Terminus Eco47III site # 1; Rechter Terminus XmaI site # 1 2. CNBT2 aus CNBT2::mGFP4/pcDNA3.1; Linker Terminus XmaI site # 1; Rechter Terminus Eco47III site # 1

Tabelle 2. Verwendete Konstrukte verschiedener CNG-Kanäle. a) kloniert von Sonja Stölzle; b) kloniert von Uta Schoop / Dirk Becker. Die verwendeten Ausgangs-Komponenten sind teilweise Original-Konstrukte von Patricia Wolff, AG Klaus Palme, Zellbiologie, Freiburg, D (CNBT1, kodierende Sequenz für die PCR) bzw. von C. Köhler, AG Neuhaus, Institut für BiologieII, Freiburg, D, (CNGC2/pTRACER) bzw. davon abgeleitete Konstrukte, kloniert von Uta Schoop / Dirk Becker (CNGC2::V5-His/pcDNA3.1 und CNBT2::mGFP4/pcDNA3.1).

2.4 Histochemische Detektion von reaktiven Sauerstoff-Spezies mit DAB-Färbung

Die DAB-(3,3'-Diaminobenzidin)-Färbung wurden von David Guinot (Julius-von-Sachs-Institut, Würzburg) nach einer modifizierten Methode von Thordal-Christensen 1997 durchgeführt. Blätter von vier Wochen alten Pflanzen wurden zwei Stunden nach Infiltration mit *Pseudomonas syringae* DC 3000 pv. *tomato avrB* (Shane Murray, Univ. of

Edinburgh, Edinburgh, UK) geerntet und für 18 Stunden in 1 mg/ml DAB-HCl im Dunkeln inkubiert. Die Blätter wurden anschließend für 10 Minuten in kochendem Ethanol (97 %) inkubiert. ROS werden als rötlich-braun gefärbte Bereiche sichtbar.

2.5 Luminometrische Messungen mit dem biolumineszente Ca^{2+} -Indikator Aequorin

Aequorin ist ein Fotoprotein aus der Qualle *Aequorea victoria*, mit dessen Hilfe Signalblitze aus blauem Licht produziert werden können. *In vivo* wird dies durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert. Da der Konzentrationsbereich an Ca^{2+} als sekundärer Botenstoff generell in Quallen, Pflanzen und Tieren ähnlich ist (50-500 nM), konnte Aequorin als Ca^{2+} -Indikator auch in Pflanzen herangezogen werden. Das transgene Aequorin codiert Apoaequorin. Das funktionelle Fotoprotein –Aequorin– entstand durch Rekonstitution mit dem Membran-permeablen Kofaktor Coelenterazin (von Biotium, www.biotium.de). Dies geschah durch Inkubation der Probe in einem Ca^{2+} -freien Puffer (Puffer 2) für drei Stunden, RT, im Dunkeln, auf einem Schüttler (ca. 100 rpm).

Der durch Rekonstitution entstandene Aequorin-Komplex besteht aus dem Apoaequorin, molekularem Sauerstoff und Coelenterazin. Werden 3 Ca^{2+} -Ionen an diesen Komplex gebunden, wird Coelenterazin zu Coelenteramid oxidiert, was zur Emission von CO_2 und blauem Licht führt. Die Menge an emittiertem Licht ist eine Funktion der Ca^{2+} -Aktivität und der Menge an rekonstituiertem Aequorin, das unbenutzt bleibt. Die Daten der Photonen-Emission kann in die Ca^{2+} -Konzentrationen im Cytoplasma umgerechnet werden, indem am Ende des Experiments die Probe durch 10 % Ethanol, 1 M CaCl_2 zerstört wird, was zu einer massiven Lumineszenz führt. Dann kann ausgehend von diesem Signal zu jedem Zeitpunkt der Messung zurück integriert werden, um quantitative Werte zu erhalten.

Als Proben wurden isolierte Protoplasten (aus ca. 10-20 Blättern) von 4-8 Wochen alten Apoaequorin-exprimierenden C24 Pflanzen verwendet. Die Protoplastenisolation erfolgte wie in Kap. 2.1.1.1 beschrieben, jedoch wurde als Waschpuffer eine niedrig- Ca^{2+} -Lösung verwendet (zweimal waschen, zunächst mit Puffer 1, dann mit Puffer 2).

Die Probe mit rekonstituierten Protoplasten wurde anschließend in einem Reaktionsgefäß (3,5 ml; 55x12 mm Ø; Sarstedt, D) in das Luminometer (FACT 50; Electron Tubes United,

UK) gestellt. Dann konnten bei kontinuierlicher Aufzeichnung von Messdaten Agonisten (z.B. H₂O₂) in die Probe injiziert werden.

Puffer 1:

2,5 mM Mes/Tris pH 6,0
0,1 mM CaCl₂
400 mosmol/kg mit Mannitol

Puffer 2:

10 mM Mes/Tris pH 6,0
10 mM Glucose
400 mosmol/kg mit Mannitol

H₂O₂-induzierte Ca²⁺-Signale

Die Bedingungen für H₂O₂-Experimente am Luminometer wurden so gewählt, dass sie den Bedingungen, die für die *Patch-Clamp*-Analyse bei H₂O₂-induzierten Calcium-Kanälen verwendet wurden, möglichst nahe kamen: 100 µl der isolierten Protoplasten aus Puffer 2 wurden 10 Minuten vor dem Beginn der Messung zusammen mit 900 µl Ca-Puffer in das 3,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Innerhalb dieser Zeit konnten die Protoplasten im Reaktionsgefäß nach unten sinken, außerdem befanden sie sich wie bei den elektrophysiologischen Experimenten in einer Ca²⁺-Lösung mit pH 5,6. Dann wurden je nach Versuchsreihe, bei kontinuierlicher Datenaufzeichnung, 200 µl Ca-Puffer allein (Kontrolle), oder addiert mit 5 mM H₂O₂ (Endkonzentration in 1,2 ml {= 100 µl Protoplastensuspension + 900 µl Ca-Puffer + 200 µl Ca-Puffer mit H₂O₂}) in die Probe injiziert.

Ca-Puffer:

2 mM Ca-Gluconat₂
10 mM Mes/Tris pH 5,6
400 mosmol/kg mit Mannitol

3. ERGEBNISSE

Für die Untersuchung Calcium-permeabler Kanäle in pflanzlichen Zellen wurden Mesophyllzellen als Modellsystem gewählt. Mesophyllzellen stellen im Gegensatz zu Schließzellen ein bislang noch nicht so häufig genutztes Zellsystem für die elektrophysiologische Untersuchung von Ionenkanälen dar.

In *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen konnten die auswärtsgerichteten K^+ -Kanäle PKC2 und der nichtselektive Kationenkanal PCC1 identifiziert werden, deren Rolle noch unklar ist (Spalding *et al.* 1992). Für einen schwach auswärtsgerichteten K^+ -Kanal, PKC1, wurde vermutet, dass er durch photosynthetisches ATP aktiviert wird (Spalding und Goldsmith 1993). Einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle in Mesophyllzellen wurden bis jetzt noch nicht beschrieben. In Mesophyllzellen von *Pisum sativum* konnten weiterhin lichtaktivierte Cl^- -Kanäle nachgewiesen werden. So wurde gezeigt, dass Licht eine transiente Depolarisation induziert, die teilweise auf eine erhöhte Leitfähigkeit der Plasmamembran für Cl^- zurückzuführen ist (Elzenga und Van Volkenburgh 1997). In Mesophyllzellen von *Vicia faba* konnte eine stimulierende Wirkung von cAMP auf einen auswärtsgerichteten K^+ -Kanal belegt werden (Li *et al.* 1994).

3.1 Charakterisierung von Calcium-permeablen Kanälen in der Plasmamembran von *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen

Mesophyllzellen müssen auf Reize wie Licht und Pathogen-Befall reagieren. Calcium spielt dabei eine wesentliche Rolle als sekundärer Botenstoff, jedoch sind die Messung von Calcium-Strömen in pflanzlichen Zellen bis jetzt auf wenige Arbeiten limitiert (siehe Kap. 1.1.2).

Für die elektrophysiologische Untersuchung der Mesophyllzellen wurden die experimentellen Bedingungen so gewählt, dass die Spannungs-abhängige Leitfähigkeit der Plasmamembran für divalente Kationen bestimmt werden konnte. Die verwendeten Protoplasten waren lichtadaptiert (Tageslicht). Abbildung 10 a zeigt Ca^{2+} -Ströme einer *whole-cell* Ableitung als Antwort auf ein Einfachspannungspulsexperiment in Gegenwart von 10 mM Ba^{2+} in der Pipette (interne Standardlösung) und 40 mM Ca^{2+} (externe Standardlösung, Kap. 2.2.4) in der externen Lösung. Dabei induzierte die Hyper-

polarisation zu Potentialdifferenzen negativ von ca. -100 mV einwärtsgerichtete Ca^{2+} -Ströme (Abb. 10 b).

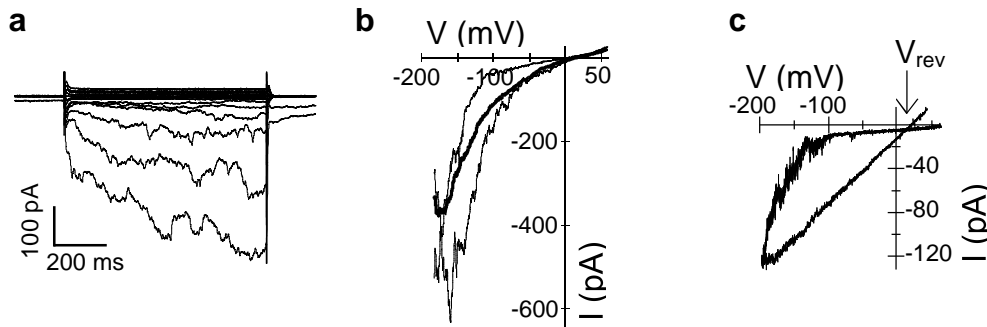


Abb. 10. Hyperpolarisations-aktivierte Einwärtsströme in Arabidopsis Mesophyll-Protooplasten. (a) *Whole-cell*-Ströme als Antwort auf Einzelspannungspulsprotokolle. Die Stromspuren stellen den Mittelwert aus den Antworten auf drei aufeinanderfolgend applizierte Spannungsprotokolle dar. Ausgehend von einem Haltepotential bei -23 mV wurden 800 ms Pulse mit einem 3 s Interval von $+57$ mV bis -183 mV in 20 mV Dekrementen angelegt. (b) Stromantwort derselben Zelle auf Spannungsrampen, die, ausgehend von einer Haltespannung bei -23 mV, von -183 mV bis $+57$ mV in 1 s und einer Intervallzeit von 3 s angelegt wurden. Die dünnen Stromlinien repräsentieren einzelne Rampen und verdeutlichen die Fluktuation des Aktivitätsstatus der Kanäle. Da im Folgenden die Stromamplitude (bei $V = -198$ mV) bzw. der Aktivitätsstatus eine wichtige Rolle spielt, wurden aufeinanderfolgende Rampen gemittelt (dicke Linie). (c) Ströme eines *outside-out Patches* als Antwort auf eine Doppelrampe. Vom Haltepotential bei -38 mV ausgehend wurde eine 3 s Rampe von $+62$ mV bis -198 mV angelegt, gefolgt von einer schnelleren, 1 s andauernden Rampe zurück nach $+42$ mV. Umkehrpotential $V_{\text{rev}} = +15$ mV (Pfeil).

Eine Doppelrampe in Gegenwart der Standardlösungen aktivierte zunächst die Kanäle während der langsamen Hyperpolarisation eines *outside-out patches* (Abb. 10 c). Anschließend wurde die Plasmamembran während einer schnellen 1 s-Rampe depolarisiert, so dass eine Nullstromspannung von $+15$ mV bestimmt werden konnte. Damit lag das Umkehrpotential in der Nähe des Gleichgewichtspotentials für einen für Ca^{2+} - und Ba^{2+} -Ionen permeablen Kanal ($+17,8$ mV).

3.1.1 Untersuchungen zur Permeabilität divalenter Kationen

Unter der Annahme, dass durch Hyperpolarisation ein Kanal aktiviert wurde, der für divalente Kationen permeabel ist, wurde seine Ca^{2+} -Permeabilität durch Variation der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in einem Bereich von 4-40 mM Ca^{2+} geprüft.

Die Umkehrspannungen wurden dabei durch schnelle Rampen (Abb. 11 a, b) in *outside-out Patches* unter biionischen Bedingungen (interne Standardlösung) ermittelt. Gemäß der

Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (Kap. 2.2.3.2, Gleichung 4) änderte sich das Umkehrpotential um 27 mV bei einer zehnfachen Änderung der externen Ca^{2+} -Konzentration, und zeigte die Permeabilität für divalente Kationen unter diesen Bedingungen auf (Abb. 11 c). Anhand der Umkehrpotentiale wurde mit der Gleichung eine relative Permeabilität für Ba^{2+} und Ca^{2+} von $P_{\text{Ba}}:P_{\text{Ca}} = 1,2$ bestimmt.

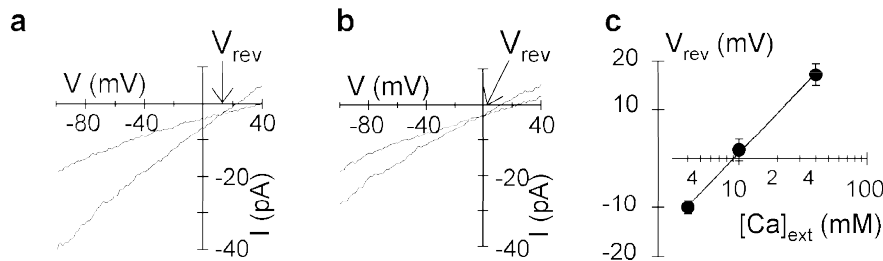


Abb. 11. Goldman-Verhalten der Umkehrspannungen in Ca^{2+} -haltigen Lösungen. Ströme als Antwort auf schnelle Rampen bei *outside-out Patches* in (a) 40 mM Ca^{2+} und (b) 10 mM Ca^{2+} . Die einzelnen Stromspuren repräsentieren den Mittelwert aus 5 Rampen, die, ausgehend von einem Haltepotential bei -38 mV und 200 ms Voraktivierung bei -218 mV, von -218 mV bis $+82$ mV in 80 ms in 3 s Intervallen angelegt wurden. Die Umkehrpotentiale V_{rev} (Pfeile) lagen bei $+15$ mV in 40 mM und 0 mV in 10 mM Ca^{2+} . Für eine bessere Auflösung von V_{rev} wurden die Stromspuren mit 1,0 kHz gefiltert und vergrößert. (c) Umkehrpotentiale der Kationen-Ströme als Funktion der externen Ca^{2+} -Konzentration. Die Standard-Badlösung wurde durch Lösungen mit 10 oder 4 mM Ca-Gluconat₂ ausgetauscht. Die Umkehrpotentiale wurden in, wie in (a) und (b) gezeigte, schnellen Rampen ermittelt.

Entsprechend der geringen Diskriminierung zwischen den beiden divalenten Kationen wurde eine Sequenz an relativen Stromamplituden von Ba^{2+} ($131,8 \pm 20$, $n=7$) > Ca^{2+} (100 , $n=7$) > Mg^{2+} ($84,3 \pm 18$, $n=5$) bestimmt (Abb. 12). Innerhalb der bekannten pflanzlichen Hyperpolarisations-aktivierten, Ca^{2+} -permeablen Kanäle zeigte dieser Kanal aus Mesophyllzellen eine gleichartige Kationen-Selektivität (Hamilton *et al.* 2000, Pei *et al.* 2000, Gelli und Blumwald 1997, Véry und Davies 2000, Kluesener *et al.* 2002).

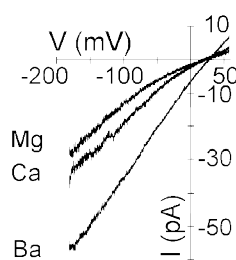


Abb. 12. Stromamplituden bei verschiedenen divalenten Kationen. Makroskopische Ströme eines *outside-out patches* in Standard-Badlösungen mit entweder 40 mM MgCl_2 , 40 mM CaCl_2 , oder 40 mM BaCl_2 als Antwort auf 1 s Spannungsrampen von -183 bis $+57$ mV. Das Haltepotential wurde bei -23 mV angelegt und die Kanäle wurden 50 ms bei -183 mV voraktiviert. Die Spuren repräsentieren den Mittelwert aus 10 aufeinanderfolgenden Rampen.

3.1.2 Blockierung der Calcium-permeablen Kanäle durch externe Lanthanide

Die Ströme zeigten bei Applikation von Lanthaniden eine deutliche Sensitivität sowohl gegenüber Lanthan als auch Gadolinium. Dabei wurde bei externer Applikation von 100 μM Gadolinium (Gd^{3+}) die Stromamplitude um $95,2 \pm 7 \%$ ($n=4$) reduziert, bei 100 μM Lanthan (La^{3+}) um $97,9 \pm 2 \%$ ($n=3$) (Abb. 12b). Dieses Verhalten entspricht der Pharmakologie der in Schließzellen, Tomaten- und Wurzelzellen charakterisierten Hyperpolarisations-abhängigen Ca^{2+} -Kanäle (Hamilton *et al.* 2000, Pei *et al.* 2000, Gelli und Blumwald 1997, Véry und Davies 2000, Kluesener *et al.* 2002).

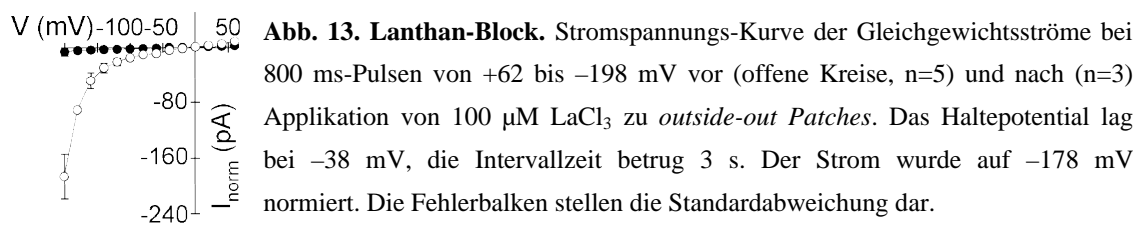


Abb. 13. Lanthan-Block. Stromspannungs-Kurve der Gleichgewichtsströme bei 800 ms-Pulsen von +62 bis -198 mV vor (offene Kreise, $n=5$) und nach ($n=3$) Applikation von 100 μM LaCl_3 zu *outside-out Patches*. Das Haltepotential lag bei -38 mV, die Intervallzeit betrug 3 s. Der Strom wurde auf -178 mV normiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

In der *cell-attached* Konfiguration konnte ebenfalls durch hyperpolarisierende Spannungen eine Kanalaktivität induziert werden. Die Einzelkanalaktivität stieg mit zunehmender Hyperpolarisation an, was sowohl in Spannungspulsen bei kontinuierlich gehaltenen Spannungen (Abb. 14 a), als auch in Spannungsrampen gezeigt werden konnte (Abb. 14 b). Aus dem Strom-Spannungsverhalten der Einzelkanäle konnte eine Leitfähigkeit von $7,2 \pm 1$ pS abgeleitet werden ($n=7$, Abb. 14 c). Wurden der Pipettenlösung 100 μM LaCl_3 zugefügt, waren keine Einzelkanäle dieser Leitfähigkeit zu beobachten, was für eine La^{3+} -Sensitivität dieser Kanäle spricht. Somit zeigte sich hier dasselbe Verhalten wie in den *outside-out*-Messungen.

Basierend auf den ermittelten biophysikalischen Eigenschaften (Blockierbarkeit durch Lanthanide, Permeabilität und Leitfähigkeit) konnte der beschriebene Kanal aus Mesophyll-Protoplasten als Hyperpolarisations-aktivierter, Calcium-permeabler Kationenkanal angesprochen werden.

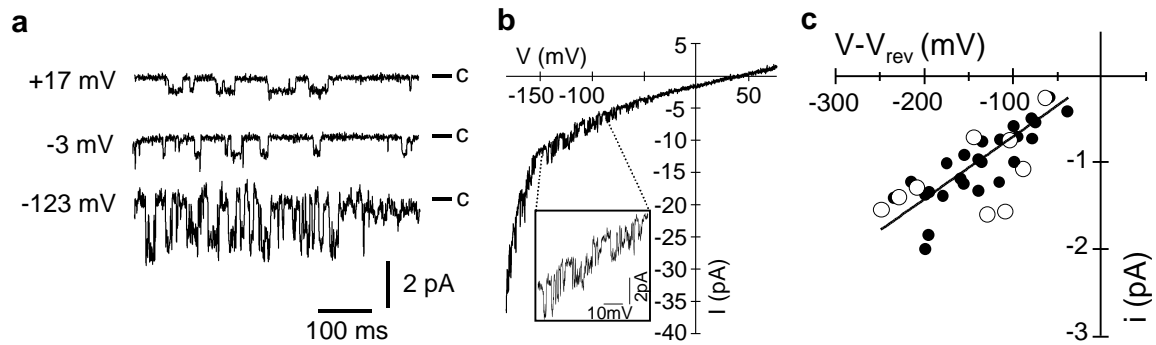


Abb. 14. Einzelkanalaufzeichnungen des Calcium-permeablen Kanals. (a) Einzelkanalfluktuations in einem *cell-attached Patch* unter Standardbedingungen bei den angegebenen Spannungen, ausgehend von einem Haltepotential bei -23 mV. (b) Einzelkanal-Aktivität während einer Spannungsrampe von -183 mV bis $+77$ mV in 1,2 s nach einer Voraktivierungsperiode von 50 ms bei -183 mV. (c) Einzelkanalamplituden mit $7,2 \pm 1$ pS ($n=7$), dargestellt gegen die treibende Kraft ($V-V_{rev}$). Ähnliche Stromamplituden wurden sowohl in Protoplasten, die kontinuierlich in weißem Licht waren (geschlossene Kreise), als auch in dunkeladaptierten Protoplasten mit nachfolgender Blaulicht-Bestrahlung (offene Kreise), beobachtet.

3.2 Aktivierung eines Calcium-permeablen Kanals durch Blaulicht

Mesophyll-Protoplasten, die im Dunkeln gehalten wurden und nur während des *Seal-*Vorgangs mit $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ weißem Licht illuminiert wurden, zeigten keine deutliche Kanalaktivität in *cell-attached* Ableitungen (Abb. 15 a, 0 min). Eine anschließende Bestrahlung mit Blaulicht ($275 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) führte zu einem zeitabhängigen Anstieg an Einwärtsströmen (Abb. 15 b). Dabei waren nach 3-6 Minuten Einzelkanalfluktuations zu beobachten, welche im Minuten-Bereich zunahm und schließlich einen makroskopischen Strom verursachten. Nach 11-16 Minuten deutete sich die Sättigung der Stromzunahme an (Abb. 15 b). Im Gegensatz zur *cell-attached* Konfiguration konnten in der *outside-out* Konfiguration durch Blaulicht keine Hyperpolarisations-aktivierten Ströme induziert werden. Messungen in der *cell-attached* Konfiguration zeichnen sich dadurch aus, dass die biochemischen Abläufe im Cytoplasma intakt bleiben, sodass z.B. der photosynthetische Elektronentransport wie in intakten Blättern ablaufen kann (Goh *et al.* 2002). In anderen Konfigurationen der *Patch-Clamp*-Technik wird das Cytoplasma durch einen definierten Puffer ersetzt, so dass sekundäre Botenstoffe bzw. Faktoren mit regulatorischer Funktion auf Ionenkanäle (z.B. Ca^{2+} , cyclische Nukleotide, ROS; Kap. 1) ausgewaschen werden. Die Ergebnisse deuten somit auf eine Signalkette hin, die auf solche Komponenten angewiesen ist. Theoretisch könnte die Aktivierung auch über eine Blaulicht-induzierte Änderung im Membranpotential ablaufen, dessen Wert in der *cell-*

attached Konfiguration der *Patch-Clamp*-Technik aber nur schwer überprüft werden kann (Miedema und Assmann 1998). Die Analyse verschiedener Blaulicht-Intensitäten ergab, dass die Kanalaktivität dosisabhängig ist. Eine Intensität von $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ war nicht ausreichend für eine Aktivierung, bei $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ zeigte sich eine Einzelkanalaktivität, die sich bei $275 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ noch stärker ausgeprägte (Abb. 15 c). Bei den Strömen nach Illumination mit $275 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ in Abb. 15 c sind Einzelkanal-Fluktuationen und keine makroskopischen Ströme gezeigt, damit ein Vergleich mit den Einzelkanälen bei $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ gemacht werden kann.

Hier sollte jedoch angemerkt werden, dass möglicherweise ein Verlust der Sensitivität gegenüber Blaulicht allein durch die Protoplasten-Isolation entstehen könnte. Es wurde in diesem Zusammenhang beschrieben, dass isolierte Schließzell-Protoplasten im Vergleich zu Schließzellen im intakten Blatt durch eine reduzierte Sensitivität gegenüber Blaulicht charakterisiert sind (Augustynowicz *et al.* 2001).

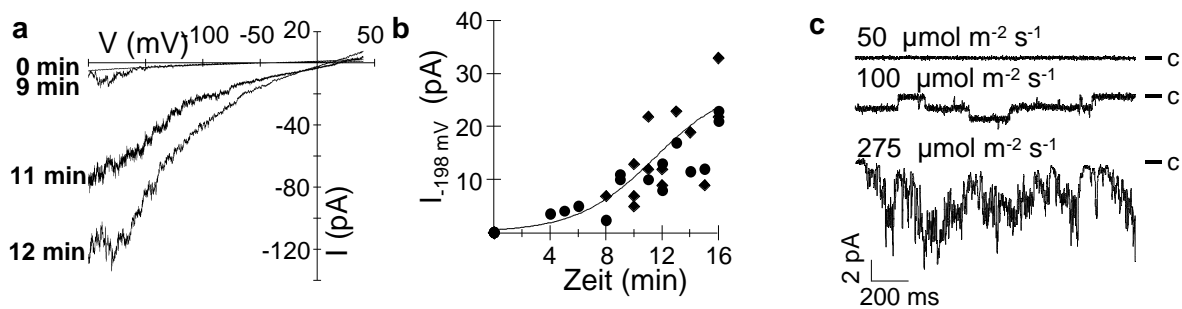


Abb. 15. Blaulicht-Regulation von Ca^{2+} -permeablen Kanälen. (a) Zeitabhängige Kanal-Aktivierung durch Blaulicht. Stromantwort auf 1 s Spannungsrampen von -198 bis $+42$ mV vor und während Illumination mit $275 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blaulicht. Das Haltepotential wurde bei -38 mV angelegt und die Kanäle wurden 50 ms bei -198 mV voraktiviert. Standard Bad- und Pipetten-Lösungen waren mit $0,1$ mM DTT versetzt. (Die Aktivierung der Kanäle wurde in 18 Experimenten mit ($n=4$) und ohne ($n=14$) DTT gleichermaßen beobachtet.). (b) Zeitabhängigkeit der Aktivierung nach Blaulicht-Illumination. Die Ströme wurden mit Rampen wie in (a) gezeigt ermittelt. Die Datenpunkte zeigen Ströme bei -198 mV als Funktion der Zeit nach Beginn der Blaulicht-Illumination. Die Linie repräsentiert einen sigmoidalen Fit der Datenpunkte. Zum Vergleich werden nur Protoplasten mit ähnlich großen Stromamplituden gezeigt (die Ergebnisse aller Zellen werden in Abb. 16 gezeigt) Wildtyp: Punkte und *cry1-304 cry2-1*: Rechtecke. (c) Abhängigkeit der Kanal-Aktivität von der Lichtintensität. Einzelkanalströme wurden bei -198 mV nach 12 min Blaulicht-Bestrahlung (Photonenfluss-Dichte wie angezeigt) aufgezeichnet.

3.2.1 Insensitivität gegenüber DCMU

Um zu überprüfen, ob die Calcium-permeablen Kanäle in photosynthetische Abläufe involviert sind oder eine nachfolgenden Signal-Komponente in der Blaulicht-Perzeption durch Photorezeptoren darstellt (Cashmore *et al.* 1999; Briggs *et al.* 2001), wurden Protoplasten mit Rotlicht illuminiert. Licht-Intensitäten von $125 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ und $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ konnten jedoch keine Kanalaktivität induzieren (Abb. 19). Zum weiteren konnte Blaulicht diesen Kanaltyp auch in Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylurea (DCMU) aktivieren (Abb. 16 a). DCMU entkoppelt den photosynthetischen Elektronentransport, somit kann gefolgert werden, dass die Blaulichtantwort unabhängig vom Photosystem II abläuft. Die Aktivierung durch Blaulicht wurde weiterhin bei der Präsenz eines Anionenkanal-Blockers getestet, da in Mesophyllzellen ein Licht-aktivierter, Cl^- -permeabler Kanal beobachtet wurde (Elzenga und Van Volkenburgh 1997). Abbildung 16 b zeigt, dass die Aktivierung nicht durch den Anionenkanal-Blocker DIDS inhibiert wird, ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich um einen Calcium-permeablen Kanal handelt. Der Blaulicht-aktivierte Kationenkanal konnte auch deswegen eindeutig vom Licht-aktivierten Anionenkanal in Mesophyllzellen unterschieden werden, da dieser sensitiv gegenüber DCMU ist (Elzenga und Van Volkenburgh 1997). Die Spannungsabhängigkeit, La^{3+} -Sensitivität und Einzelkanalleitfähigkeit (offenen Symbole in Abb. 14 c) des Blaulicht-aktivierten Kanals in der *cell-attached* Konfiguration korrespondiert mit den Eigenschaften der Hyperpolarisations-abhängigen, Ca^{2+} -permeablen Kanäle, die in lichtadaptierten Mesophyll-Protoplasten (Abb. 10) und anderen Zelltypen (Hamilton *et al.* 2000, Pei *et al.* 2000, Gelli und Blumwald 1997, Véry und Davies 2000, Kluesener *et al.* 2002) gemessen wurde. Während Blaulicht Protonen-Export in Schließzellen (Kiegle *et al.* 2000), Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle in Hypokotylzellen (Cho und Spalding 1996) und K^+ -Kanäle in Motorzellen (Suh *et al.* 2000) reguliert, scheinen in Mesophyllzellen Ca^{2+} -Kanäle in der Blaulicht-abhängigen Signalkette eine Rolle zu spielen. Da die Chloridkanäle im Hypokotyl über Cryptochrome aktiviert werden und die Blaulicht-abhängige Protonenpumpe wahrscheinlich durch Phototropine reguliert wird (Kinoshita *et al.* 2001), wurden die Calcium-permeablen Kanäle in Mesophyllzellen im nächsten Schritt hinsichtlich ihrer Regulation durch Photorezeptoren untersucht.

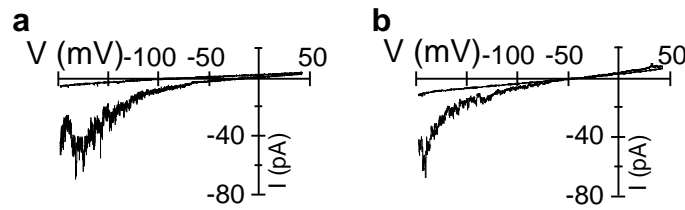


Abb. 16. Insensitivität der Blaulicht-abhängigen Kationenströme gegenüber DCMU und DIDS. Stromantwort repräsentativer Zellen auf Spannungsrampen wie in Abb. 15 a vor und 12-15 Minuten nach Blaulicht-Bestrahlung ($275 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), gemessen im *cell-attached* Modus. Illumination mit Blaulicht aktivierte den Kanal sowohl in (a) $200 \mu\text{M}$ DIDS ($n=4$) als auch in (b) $100 \mu\text{M}$ DCMU ($n=4$).

3.2.2 Blaulicht-aktivierte Calcium-Ströme in Phototropin und Cryptochrom Mutanten

Bei einer Inkubation von Mesophyll-Protoplasten in 200 nM K252a wurde die Blaulicht-Aktivierung der Kanäle unterdrückt (Abb. 17). K252a ist ein Serin/Threonin-Kinase-Inhibitor und könnte demnach die Kinase-Funktion der Phototropine inhibieren. Aufgrund dieser Tatsache wurde spekuliert, dass eine Signalkette an die Blaulicht-Perzeption durch einen Photorezeptor gekoppelt sein könnte. Aus diesem Grund wurden Blaulicht-abhängige Kanalaktivitäten in Mesophyll-Protoplasten aus *Arabidopsis* Wildtyp und Phototropin-Mutanten miteinander verglichen.

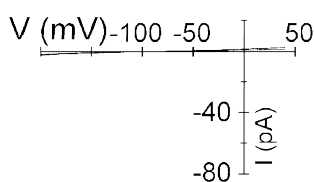


Abb. 17. Sensitivität der Blaulicht-abhängigen Kationenströme gegenüber K252a. (c) Stromantwort einer repräsentativen Zellen auf Spannungsrampen wie in Abb. 15 a vor und 12-15 Minuten nach Blaulicht-Bestrahlung ($275 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Die Stromlinien überdecken sich gegenseitig. Die Protoplasten wurden in 200 nM K252a vorinkubiert, es wurde keine Aktivierung beobachtet ($n=5$).

Die Phototropin-Mutante *phot1-5* besitzt eine reduzierte Akkumulationsfähigkeit der Chloroplasten bei geringen Licht-Intensitäten und ist durch ein Fehlen der Licht-abhängigen Hypokotylkrümmung gekennzeichnet (Abb. 3). Nach Blaulicht-Bestrahlung von Mesophyll-Protoplasten dieser Mutante wurden im Vergleich zum Wildtyp stark verringerte Stromamplituden beobachtet (Abb. 19). Daraufhin wurde die Doppelmutante *phot1-5 phot2-1* in die vergleichenden Untersuchungen einbezogen. Diese ist durch eine Beeinträchtigung der Chloroplastenbewegung, des Phototropismus, der Blaulicht-abhängigen Stomabewegung und Blattexpansion sowie der schnellen Inhibition des Stengelwachstums charakterisiert (Sakai *et al.* 2001, Folta und Spalding 2001, Kinoshita *et*

al. 2001, Suh *et al.* 2000). Weiterhin besitzt die Doppelmutante Rosettenblätter, die an den Rändern nach unten gekrümmt, dem Licht abgewandt, sind (Abb. 18). Gemäß der Hypothese, dass der Calcium-permeable Kanal durch Phototropine kontrolliert wird, konnten in *phot1-5 phot2-1* keine spannungsabhängigen Kationenströme nach Blaulicht-Bestrahlung beobachtet werden (Abb. 19).

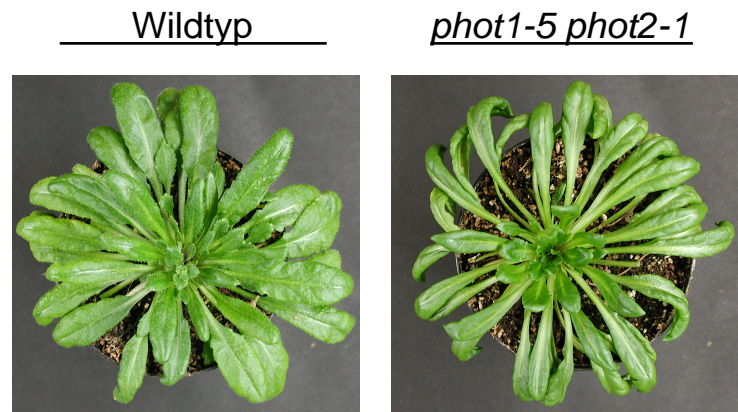


Abb. 18. *phot1-5 phot2-1* hat dem Licht abgewandte, gekrümmte Blätter. Neun Wochen alte Pflanzen vom Wildtyp (links) und von *phot1-5 phot2-1* (rechts). Die Photos wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen (Olympus CAMEDIA C-800-L).

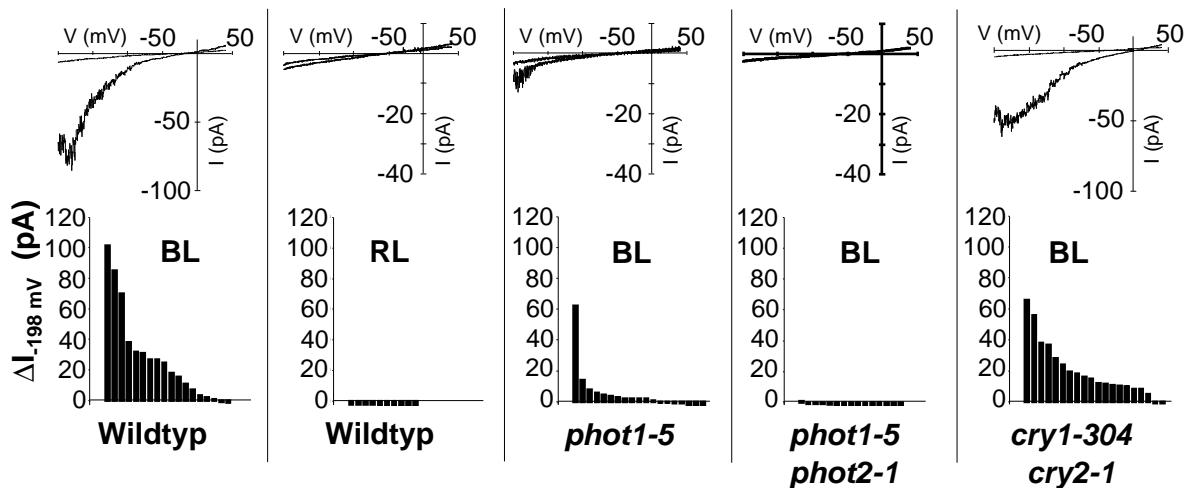


Abb. 19. Licht-induzierte Calcium-permeable Kanäle in Wildtyp und Photorezeptor-Mutanten. *Jeweils obere Abbildungen:* Stromantworten aus *cell-attached* Messungen vor und 12-15 Minuten nach Beginn der Blaulicht-Bestrahlung einzelner Protoplasten auf Spannungsrampen wie in Abb. 15 a beschrieben. *Jeweils untere Abbildungen:* Anstieg der Stromamplitude einzelner Protoplasten nach Blaulicht-Bestrahlung (Balken). Die Werte wurden durch die Differenz der Stromamplitude bei -198 mV vor und 12-15 Minuten nach Beginn der Blaulicht-Illumination erhalten ($\Delta I_{-198\text{mV}} = (I_{-198\text{mV}}(\text{vorher}) - I_{-198\text{mV}}(\text{nacher}))$). Die für die Berechnung herangezogenen Stromamplituden resultieren aus dem Mittelwert der Ströme aus 10 aufeinanderfolgenden Rampen. BL, Blaulicht mit einer Photonenfluss-Dichte von $275 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$; RL, Rotlicht mit $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Vorhergehende Studien zeigten, dass Cryptochrome, die zweite Klasse der pflanzlichen Blaulichtrezeptoren, nicht direkt in Blaulicht-induzierte Ca^{2+} -Signale involviert sind (Baum *et al.* 1999, Guo *et al.* 2001). Die Calcium-permeablen Kanäle in Mesophyllzellen aus der Cryptochrom Doppelmutante *cry1-304 cry 2-1* (Mockler *et al.* 1999) aktivierten nach Blaulichtbehandlung wie im Wildtyp (Abb. 19). Somit kann gefolgert werden, dass gemäß der überlappenden Funktion von PHOT1 und PHOT2 beim Phototropismus, der Chloroplastenbewegung und der Stomabewegung (Briggs und Christie 2002, Sakai *et al.* 2001, Kinoshita *et al.* 2001), beide Photokinase-abhängigen Wege auch hier zusammen wirken, um ein cytoplasmatisches Ca^{2+} -Signal mit Hilfe von spannungsabhängigen Kationenkanälen zu generieren. Der Plasmamembran-Kanal wurde daraufhin PACC, für *phototropin-activated calcium-permeable channel*, genannt.

3.3 Aktivierung eines Calcium-permeablen Kanals durch ROS

Neben Blaulicht können verschiedene andere Stimuli Hyperpolarisations-abhängige, Calcium-permeable Kanäle aktivieren. Kürzlich wurde gezeigt, dass ROS über die Aktivierung von Calcium-permeablen Kanälen in Wurzelhaar-Zellen die Zell-Elongation von Wurzeln reguliert (Foreman *et al.* 2003). Abszisinsäure (ABA; 50 μM) stimuliert über ROS-Produktion als Zwischenschritt einen Calcium-permeablen Kanal in der Plasmamembran von Schließzellen (Pei *et al.* 2000). Hefe- (*Saccharomyces cerevisiae*)-Elicitoren der pflanzlichen Pathogen-Abwehr aktivieren ebenfalls einen Hyperpolarisations-abhängigen, Calcium-permeablen Kanal in Schließzellen (Kluesener *et al.* 2002). Sowohl die ABA-, die ROS- und auch die Elicitor-induzierte Aktivierung in Schließzellen sind NADPH-abhängig. Da in Mesophyllzellen ABA (50 μM) keine stimulierende Wirkung auf Calcium-permeable Kanäle besaß (n=8, Daten nicht gezeigt; überprüft in der *cell-attached* Konfiguration, unter Standardbedingungen), stellte sich die Frage, ob in den Schließ- und Mesophyllzellen zwei verschiedene Kanäle exprimieren. Alternativ könnte durch verschiedene, zellspezifische Signalketten derselbe Kanal angesteuert werden. Im Folgenden wurde daher der in Schließzellen wirksame Kanal-Aktivator H_2O_2 hinsichtlich seiner Wirkung auf Mesophyllzellen geprüft.

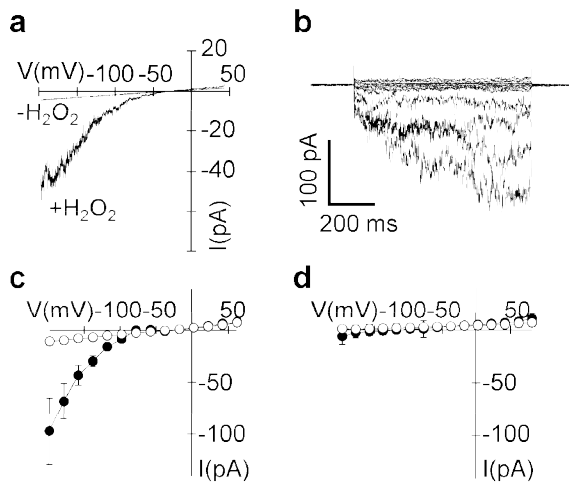
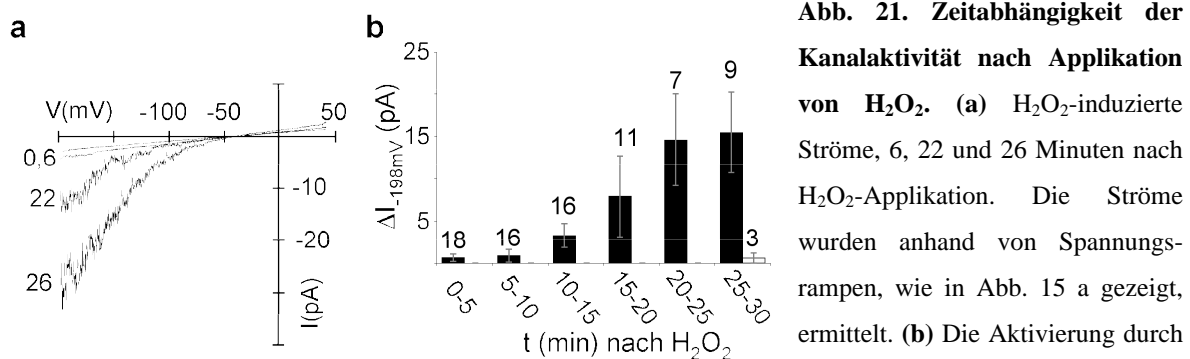


Abb. 20. ROS-induzierter Kationeninflux in Mesophyll-Protoplasten. Messungen in der *cell-attached* Konfiguration mit der Standard-Bad- und Pipettenlösung. **(a)** Strom-Spannungsverhältnis vor und 27 min nach Applikation von 5 mM H_2O_2 in die Badlösung. Protokoll der Spannungsrampen siehe Abb. 15 a. Die Stromspuren stellen den Mittelwert aus 10 aufeinanderfolgenden Rampen dar. **(b)** Stromantwort auf ein Einfachspannungspulsprotokoll derselben Zelle wie in (a) gezeigt, bei $t = 30$ min nach H_2O_2 -Applikation. Ausgehend von einem Haltepotential bei -38 mV wurden 800 ms Testpulse mit einer Intervallzeit von 3 s von -198 mV bis $+62$ mV in 20 mV Inkrementen angelegt. **(c,d)** Gleichgewichtsströme, ermittelt aus Einfachspannungspulsexperimenten wie in (b) gezeigt. Ströme vor (offene Kreise) und 30 min nach Zugabe von 5 mM H_2O_2 (geschlossenen Kreise), $n=5$. $100 \mu M$ $LaCl_3$ in der Pipette **(d)** blockierte die Kanäle ($n=5$). Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

In der *cell-attached* Konfiguration konnten in Gegenwart der Standardlösungen keine Einwärtsströme in dunkeladaptierten Protoplasten gemessen werden (Abb. 20 a, c; vergleiche auch Abb. 15, 0 min). Eine anschließende Zugabe von 5 mM H_2O_2 induzierte jedoch eine Hyperpolarisations-abhängige Kanalaktivität (Abb. 20 a-c). Diese waren wie die Blaulicht-aktivierten Ströme sensitiv gegenüber $LaCl_3$ (Abb. 20 d), ein Hinweis darauf, dass es sich ebenfalls um Kationen- bzw. Calcium-permeable Kanäle handelt. Ein makroskopischer Strom wurde nicht sofort nach Applikation von H_2O_2 aufgezeichnet, die Stromamplitude zeigte vielmehr eine zeitabhängige Zunahme, beginnend nach 5-10 Minuten und mit einer Sättigung nach ca. 25 Minuten (Abb. 21). Bei der Blaulicht-Stimulation erreichte der Aktivierungsverlauf dagegen nach 11-16 Minuten eine Sättigung (Abb. 15).

H_2O_2 hatte demnach sowohl in Mesophyllzellen als auch in Schließzellen (Pei *et al.* 2000) einen stimulierenden Effekt auf Calcium-permeable Kanäle. Der in Schließzellen dem H_2O_2 übergeordnete Regulator, ABA (Pei *et al.* 2000), war demgegenüber in Mesophyllzellen unwirksam, da ABA hier keine Aktivierung induzieren konnte. In diesem Zusammenhang wurde anhand elektrophysiologischer Experimente von Sutton *et al.* (2000) gezeigt, dass für eine Regulation von K^+ -Kanälen in Schließ- und Mesophyllzellen von *Vicia faba* unterschiedliche Signalketten und/oder Rezeptortypen für ABA vorhanden sind (Sutton *et al.* 2000). Dies wurde aus den Beobachtungen geschlossen, die

demonstrierten, dass in *Xenopus* Oocyten injizierte cRNA eines *in vivo* ABA-sensitiven K^+ -Einwärtsgleichrichters (KAT1; Anderson *et al.* 1992) zusammen mit Schließzell-mRNA eine ABA-Inhibierung von KAT1 zuließ. Wurde hingegen KAT1-cRNA zusammen mit Mesophyllzell-mRNA injiziert, wurde keine Inhibierung von KAT1 durch ABA beobachtet. Die durch die mRNA aus Mesophyllzellen codierten Komponenten einer ABA-Signalkette sind somit in ihrer Funktion nicht austauschbar mit den durch Schließzell-mRNA codierten Komponenten. Möglicherweise ist also in Mesophyllzellen eine andere ABA-induzierte Signalkette vorhanden, die eine Aktivierung Hyperpolarisations-abhängiger, Calcium-permeabler Kanäle ausschließt.



H_2O_2 wird ausgedrückt als Stromanstieg während der H_2O_2 -Behandlung ($\Delta I_{-198mV} = (I_{-198mV} \text{ (vorher)} - I_{-198mV} \text{ (nacher)})$). Ein Balken stellt den gemittelten Stromanstieg aller Zellen dar, die eine Aktivierung nach H_2O_2 -Behandlung aufwiesen (18 von 23). Der weiße Balken stellt nicht behandelte Zellen als Kontrolle dar, deren Ströme für 30 min aufgezeichnet wurden (n=3). Die Zahlen über den Balken sind die Anzahl der jeweiligen Datenpunkte. Die Stromamplituden wurden bei -198 mV aus 10 aufeinanderfolgenden Rampen gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Zusammenfassend stellte sich bezüglich Hyperpolarisations-aktivierter, Calcium-permeabler Kanäle folgende Situation dar. Die ROS-Produktion in pflanzlichen Zellen wird u.a. durch ABA (Pei *et al.* 2000), Elicitoren der Pathogenabwehr (Levine *et al.* 1994, Hahlbrock *et al.* 1995) und Blaulicht (Laloraya *et al.* 1999) stimuliert (vergleiche Kap. 1.3). Zudem aktivieren ABA, Elicitoren/Pathogene und Blaulicht Hyperpolarisations-abhängige, Calcium-permeable Kanäle in der Plasmamembran verschiedener Zelltypen (Hamilton *et al.* 2000; Pei *et al.* 2000; Kluesener *et al.* 2002; Gelli *et al.* 1997; Stoelzle *et al.* 2003 bzw. Kap. 3.2), was in Abb. 22 zusammengefasst ist. Als eine wichtige Erkenntnis erschien die Tatsache, dass H_2O_2 Calcium-permeable Kanäle auch in *phot1-5 phot2-1*, die keine Blaulicht-stimulierten Ströme zeigen, aktivierte (Daten nicht gezeigt, n=3). Dies verdeutlichte, dass bei der Blaulicht-induzierten, nicht aber bei der H_2O_2 -induzierten

Kanalaktivität Phototropine eine notwendige Signalkomponente darstellen, schließt aber nicht aus, dass H_2O_2 bei der Blaulicht-induzierten Aktivierung als sekundärer Botenstoff auftritt. Hierbei ist aber anzumerken, dass die Blaulicht-Aktivierung des Kanals schneller abläuft als die H_2O_2 -Aktivierung (vgl. Abb. 15 b und 21 b). Möglicherweise ist dies zurückzuführen auf eine langsame Diffusion von H_2O_2 innerhalb der Badlösung bzw. bis ins Cytoplasma.

Weiterhin hatten 12,5 und 50 μM Diphenyliodonium Chlorid (DPI), das in Schließzellen die ABA-Induktion der Kanäle blockt, keinen Effekt auf die Blaulicht-Stimulation von PACC in Mesophyllzellen (Vorinkubation bis zu 3 h, n=6). Dies deutet, wie auch die Beobachtung, dass ABA keine Calcium-permeablen Kanäle in Mesophyllzellen aktiviert (s.o.), auf eine divergente Signalkette hin. Ob es sich bei den erwähnten beobachteten Kanälen jeweils um denselben Kanal handelt, oder ob ROS jeweils als sekundäre Botenstoffe wirken, ist noch nicht aufgeklärt.

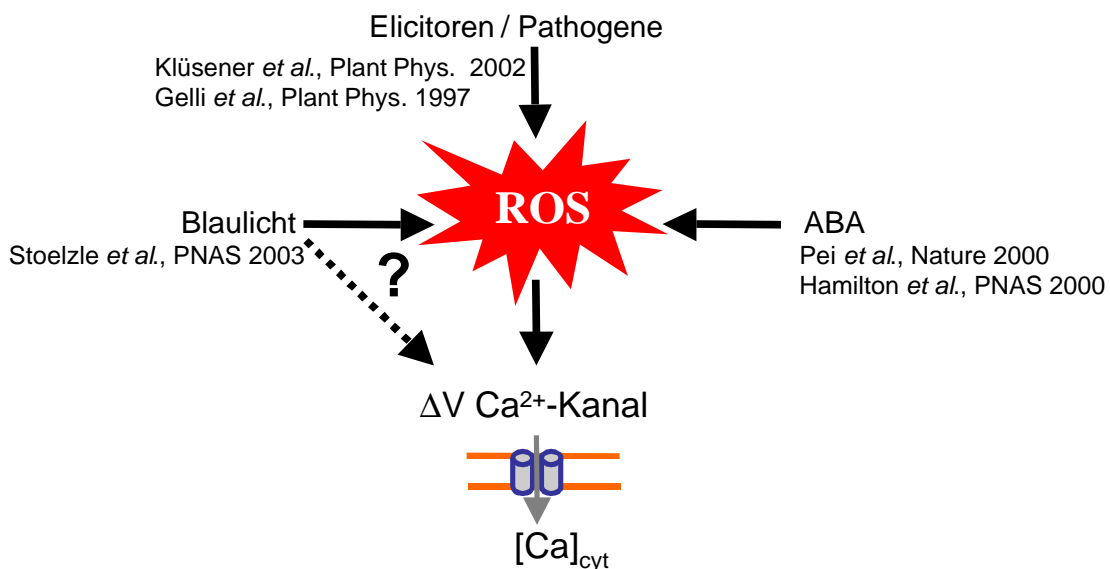


Abb. 22. Konvergenz von Signalwegen in Pflanzen bei Hyperpolarisations-aktivierten, Calcium-permeablen Kanälen auf der Ebene von ROS. ABA, Elicitoren der Pathogen-Abwehr sowie Blaulicht aktivieren Hyperpolarisations-aktivierte, Calcium-permeable Kanäle in Pflanzen. Ob es sich dabei jeweils um denselben spannungsabhängigen (ΔV) Kanal handelt und ob Blaulicht auch über H_2O_2 wirkt, muss noch aufgeklärt werden.

Somit könnte die H_2O_2 -Regulation von spannungsabhängigen, Calcium-permeablen Kanälen einen generellen Mechanismus verschiedener Signalwege und Zelltypen darstellen.

3.3.1 Calcium-permeable Kanäle in der *dnd1*-Mutante

Calcium und ROS spielen eine wichtige Rolle in Abwehrmechanismen und in der systemischen Resistenz (Kap. 1; Abb. 22). Für die Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen ROS / Pathogen-Abwehr und einem Calcium-permeablen Kanal bot sich die *dnd1*-Mutante an, die eine Mutation im CNGC2-Gen hat und daraus Phänotypen bezüglich der Pathogen-Abwehr (Kap. 1.2.3) sowie ein Zwergwuchs (Abb. 23) resultieren. Nach der Isolation von Mesophyll-Protoplasten aus Wildtyp- und *dnd1*-Pflanzen wurde auch auf zellulärer Ebene ein Größenunterschied ersichtlich. Protoplasten aus *dnd1* hatten einen Durchmesser von $18,6 \pm 3 \mu\text{M}$, aus Col-0 einen Durchmesser von $34,9 \pm 7 \mu\text{M}$ ($n=150$, jeweils) (Abb. 23).

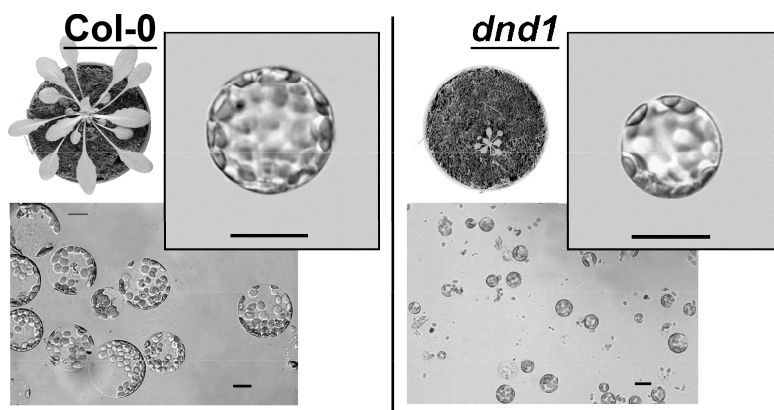


Abb. 23. Der Verlust des pflanzlichen CNG-Kanals CNGC2 bedingt Zwergwuchs. 43 Tage alte Wildtyp (Col-0, links-) und *dnd1*-Pflanzen (rechts) und daraus gewonnene Protoplasten im Vergleich. Die Durchmesser der Mesophyll-Protoplasten lagen bei $34,9 \pm 7 \mu\text{M}$ (Col-0; $n=150$), und $18,6 \pm 3 \mu\text{M}$ (*dnd1*; $n=150$). Fotos

der Protoplasten: Durchlichtaufnahmen an einem inversen Mikroskop (Zeiss Axioskop2 Mot, Zeiss) mit 40-facher Vergrößerung. Die Balken repräsentieren jeweils $20 \mu\text{M}$. Die Fotos der Pflanzen wurden mit einer Digitalkamera (Olympus CAMEDIA C-800-L) gemacht.

CNGC2 wurde aufgrund von elektrophysiologischen Messungen in heterologen Expressionssystemen als cyclisch-Nukleotid-aktivierter, Calcium-permeabler Kanal beschrieben (Leng *et al.* 1999, Leng *et al.* 2002; Kap. 1.2.3). CNGC2 könnte somit den H_2O_2 -aktivierten, Calcium-permeablen Kanal darstellen, da aufgrund seiner Rolle in der Pathogen-Abwehr eine ROS-Abhängigkeit vermutet werden kann.

3.3.2 *dnd1* besitzt eine dem Wildtyp vergleichbare Produktion an ROS

Bevor die Mesophyll-Protoplasten aus *dnd1* hinsichtlich Calcium-permeabler Kanäle untersucht wurden, wurde überprüft, ob sich die ROS-Produktion nach Pathogenbefall (*oxidative burst*, Kap. 1.3) wie im Wildtyp verhält. Abb. 24 a zeigt, dass in Rosettenblättern von *dnd1* wie von Col-0 eine ROS-Akkumulation nach Infiltration von *Pseudomonas syringae* DC 3000 pv. *tomato avrB* (*Pst avrB*) stattfinden konnte. Eine ROS-Generierung wurde sowohl in Col-0 als auch in *dnd1* nur in dem Bereich der Pathogeninjektion detektiert. Das Ergebnis belegte, dass die Mutation in dem CNGC2-Kanalgen die ROS-Produktion bei Pathogenbefall qualitativ nicht beeinträchtigte, eine quantitative Analyse war mit der durchgeführten Methode (*DAB-staining*, Kap. 2.4) jedoch nicht möglich. Der Verlust der hypersensitiven Reaktion in *dnd1* resultiert somit möglicherweise aus einem Schritt in der Signalkette, der nach der ROS-Akkumulation stattfindet, d.h. CNGC2 agiert *downstream* von der ROS-Akkumulation.

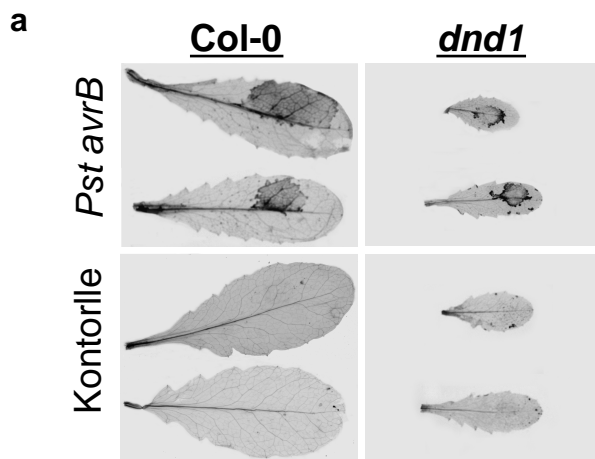


Abb. 24. ROS-Entwicklung nach Pathogen-Infektion. *In situ* Detektion von ROS anhand DAB-Färbung (ab 2-18 h nach Pathogen-Infektion) beim Wildtyp (Col-0) und bei *dnd1*. Die Aufnahmen der Blätter wurden einen Tag nach Inokulation mit *Pst avrB*, oder 10 mM MgSO₄ als Kontrolle, gemacht.

Da aufgrund eines erhöhten SA-Levels in *dnd1* die Möglichkeit bestand, dass H₂O₂-abbauende Enzyme wie Catalasen aktiviert sein könnten (Kap. 1.3), war das Ergebnis ein Hinweis darauf, dass die hohe SA-Konzentration keinen oder einen nicht detektierbaren Einfluss auf die ROS-Produktion besitzt.

3.3.3 *dnd1* ist in der ROS-Aktivierung von Calcium-permeablen Kanälen beeinträchtigt

Im Folgenden wurden *Patch-Clamp*-Analysen an Mesophyll-Protoplasten aus *dnd1* durchgeführt. Unter Standardbedingungen wurde in der *cell-attached* Konfiguration hinsichtlich einer H₂O₂-Aktivierung der Calcium-permeablen Kanäle gesucht. Nach Erreichen der *cell-attached* Konfiguration wurden 5 mM H₂O₂ in die Badlösung mit dunkeladaptierten Protoplasten appliziert. Eine Aktivierung innerhalb von 30 Minuten wie im Wildtyp konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 25). Auch hier wurde überprüft, ob aufgrund des erhöhten SA-Levels bzw. einer putativen Catalase-Aktivität keine Aktivierung beobachtet werden konnte. Die H₂O₂-Konzentration in der Badlösung wurde auf 50 mM erhöht, eine Kanalaktivität wurde hier aber ebenfalls nicht induziert (n=3; Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass der hohe SA-Level nicht, oder nicht alleine, dafür verantwortlich ist, dass die Calcium-permeablen Kanäle nicht stimuliert werden. Diese Überlegung ist übereinstimmend mit dem Befund, dass *dnd1-nahG*-Pflanzen, bei denen der erhöhte SA-Level eliminiert ist, genauso wie *dnd1* keine hypersensitive Reaktion entwickeln und zwergwüchsig bleiben. Das bedeutet, dass CNGC2 die HR und das Wachstum SA-unabhängig oder nur teilweise SA-abhängig reguliert.

Eine Blaulicht-Aktivierung von PACC in *dnd1*-Protoplasten war möglich (Abb. 25 c). Dies zeigte jedoch nicht, ob es (i) unterschiedliche Kanäle sind und möglicherweise der H₂O₂-aktivierte Wildtyp-Kanal CNGC2 ist; oder (ii) ob unterschiedliche Signalketten beteiligt sind, und Wildtyp-CNGC2 innerhalb einer solchen Signalkaskade funktioniert.

Als weitere Arbeitshypothese wurde angenommen, dass der im Wildtyp beobachtete Strom durch CNGC2 vermittelt werden könnte.

Mit *two hybrid assays* wurde eine Calcium-abhängige Calmodulin-Bindung an den C-Terminus von CNGC2 bestimmt (Köhler und Neuhaus 2000). In heterologen Expressionsstudien mit *Xenopus laevis* Oocyten und HEK293-Zellen wurde gezeigt, dass CNGC2 durch cAMP und cGMP aktiviert wird (Leng *et al.* 1999, Leng *et al.* 2002). Aufgrund dieser Anhaltspunkte dienen die nachfolgenden Experimente an WT-Mesophyll-Protoplasten, eine mögliche Regulation der Kanäle durch cyclische Nukleotide bzw. Calmodulin zu erfassen.

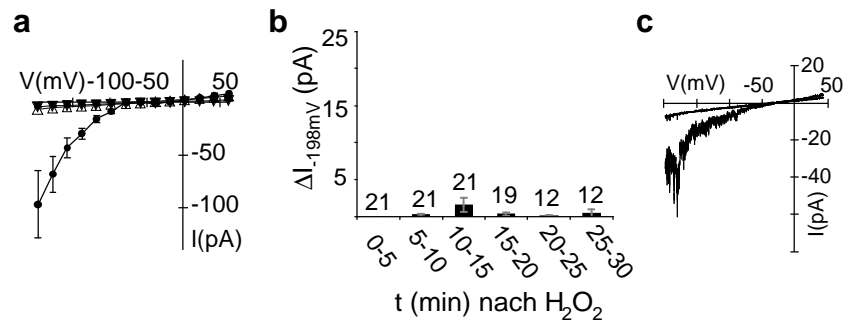


Abb. 25. Die Aktivierung des Ca^{2+} -permeablen Kanals durch H_2O_2 in *dnd1* ist beeinträchtigt. (a) Ströme bei Einzelspannungspulsprotokollen wie in Abb. 20 c beschrieben, vor (offene Dreiecke) und 30 min nach Applikation von 5 mM H_2O_2 (geschlossene Dreiecke), $n=4$. Geschlossene Kreise: Gleichgewichtsströme aus WT wie in Abb. 20 als Vergleich; bei $t=30$ min nach Applikation von 5 mM H_2O_2 . (b) Verhalten der Stromamplituden nach H_2O_2 -Applikation in *dnd1*. Die Daten wurden wie in Abb. 21 b beschrieben erfasst. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar, die Zahlen über den Balken die Anzahl der gemittelten Datenpunkte. (c) Blaulicht-Regulation Calcium-permeabler Kanäle in *dnd1*. Stromantwort auf Spannungsrampen wie in Abb. 15 a vor und 12 Minuten nach kontinuierlicher Blaulicht-Bestrahlung ($275 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Die Stromspuren stellen den Mittelwert aus 5 aufeinanderfolgenden Rampen dar. Eine Aktivierung durch Blaulicht in *dnd1* konnte in allen getesteten Zellen ($n=5$) beobachtet werden.

3.3.4 Regulation der Calcium-permeablen Kanäle durch cytosolische Faktoren

Eine Erhöhung der Konzentration von cyclischen Nukleotiden erforderte eine Inkubation der Protoplasten mit dem cAMP-Konzentrations-erhöhenden Metabolit Forskolin (Kurosaki *et al.* 1993; Moutinho *et al.* 2001) oder die Behandlung mit membran-permeablen cAMP-Derivaten (db-cAMP, für *dibutyryl*-cAMP). In diesen Experimenten, die ebenfalls in der *cell-attached* Konfiguration durchgeführt wurden, konnten jedoch 10 μM Forskolin in der Badlösung (Vorinkubation von 30 min bis 2 h; Abb. 22a) keine Kanalaktivität induzieren. Diese Ergebnisse weichen von denen an *Xenopus* Oocyten ab, bei denen 40 Minuten nach Inkubation in 10 μM db-cAMP ein CNGC2-vermittelter Strom induziert wurde (Leng *et al.* 2002). Eine Applikation von 500 μM db-cAMP ($n=4$, Daten nicht gezeigt) oder 10 μM db-cAMP ($n=1$, Daten nicht gezeigt) in die Badlösung, während kontinuierlicher Datenaufzeichnung, induzierte ebenfalls zu keinem Zeitpunkt eine Kanalaktivität. Cyclische Nukleotide allein scheinen somit nicht ausreichend für eine Kanal-Aktivierung zu sein.

Wurden die Protoplasten in Gegenwart von 200 μM des Calmodulin-Inhibitors W7 (Inkubation ≥ 20 Minuten) untersucht, war die Aktivierung der Kanäle durch H_2O_2 unterdrückt (Abb. 26 b). Es schien also ein Calmodulin-abhängiger Schritt in der Signalkette zur Aktivierung des Calcium-permeablen Kanals zu führen. Zusammen-

genommen deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die ROS- und Spannungs-abhängigen Kanäle durch Calmodulin, nicht aber durch cyclische Nukleotide reguliert werden, d.h. möglicherweise handelt es sich bei dem Hyperpolarisations-abhängigen, Calcium-permeablen Kanal nicht wie angenommen um CNGC2, welcher durch cyclische Nukleotide aktiviert wird (Kap. 1.2.3), sondern um einen Kanal, der durch CNGC2 innerhalb einer ROS- und CaM-abhängigen Signalkette reguliert wird.

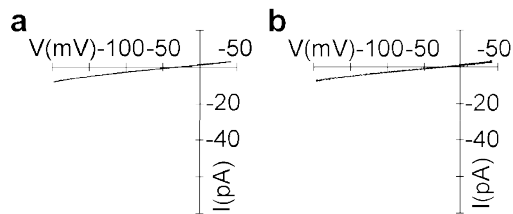


Abb. 26. Auswirkungen von Forskolin und W7. (a) *Cell-attached* Ströme einer repräsentativen Zelle nach einer Stunde Inkubation in 10 μM Forskolin. Keiner der in Forskolin inkubierten Protoplasten zeigte eine Kanalaktivität, getestet wurde dies nach 30 min bis 2 h Inkubation, $n = 3$. (b) Ströme eines repräsentativen Protoplasten nach Inkubation in 200 μM W7, vor und nach Applikation von 5 mM H_2O_2 (die beiden Stromspuren überdecken sich). Die Aktivierung wurde in allen geprüften Zellen inhibiert ($n=6$); W7-Inkubation ≥ 20 Min.

Die Rampen wurden nach dem wie in Abb. 15 a beschriebenen Protokoll durchgeführt.

In den folgenden Untersuchungen wurde die *outside-out* Konfiguration gewählt, um regulatorische Faktoren über die Pipettenlösung einzubringen und ihre Wirkung auf Calcium-permeable Kanäle zu prüfen. Zunächst wurden elektrophysiologische Ableitungen in der *outside-out* Konfiguration mit 40 mM externem Ca^{2+} , 10 mM Ba^{2+} und 5 mM H_2O_2 in der internen Lösung durchgeführt. Die Wildtyp-Protoplasten wurden mindestens 30 min in 5 mM H_2O_2 vorinkubiert, danach konnte wie erwartet direkt nach Erreichen der *outside-out* Konfiguration der Hyperpolarisations-abhängige, Calcium-permeable Kanal beobachtet werden (Abb. 27 a). Dabei wurde ein Umkehrpotential von $17,9 \pm 4$ mV ($n=9$; die Werte wurden aus Rampen wie in Abb. 11 gezeigt ermittelt) bestimmt. Dieser Wert entsprach dem aus Blaulicht-Experimenten gewonnenen (Abb. 11) und belegte die $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$ -Permeabilität des Kanals.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die in der *cell-attached* Konfiguration erzielt wurden, konnten in *dnd1* nach der Vorinkubation in H_2O_2 und mit 5 mM H_2O_2 in der Pipettenlösung ebenfalls Calcium-Ströme beobachtet werden (Abb. 27 b). Möglicherweise könnte eine hohe Konzentration an divalenten Kationen an der cytoplasmatischen Seite (10 mM Ba^{2+}) eine Kanal-Aktivität ermöglicht haben, das weggefallene Membranpotential, welches in der *cell-attached* Konfiguration zusätzlich zur Kommandospannung V_{cmd} über der Membran anliegt (Miedema und Assmann 1998), kann ebenfalls ein Grund sein. Andererseits könnten während des Austausches des Cytoplasmas durch die

Pipettenlösung regulative Komponenten verloren gegangen sein, so dass der Calcium-permeable Kanal hier bei der Präsenz von H_2O_2 aktiv war, bei intaktem Cytoplasma hingegen nicht. Unter der Annahme, dass der Calcium-permeable Kanal nicht CNGC2 ist, könnte eine dieser „regulativen Komponenten“ CNGC2 selbst sein, dessen Funktion es ist, die Calcium-permeablen Kanäle der Plasmamembran zu regulieren.

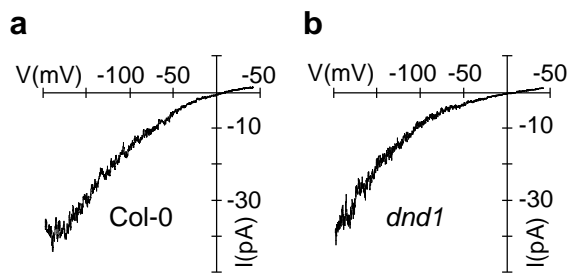


Abb. 27. Calcium-Ströme in *dnd1* und *Col-0* in der *outside-out* Konfiguration. Die Protoplasten wurden in 5 mM H_2O_2 vorinkubiert. Nach dem Membran-Durchbruch wurde der *outside-out* Modus erzielt. Die Spannungsrampen wurden in den Standardlösungen und nach dem Protokoll wie in Abb. 15 a beschrieben durchgeführt, die

Pipetten-Standardlösung war jedoch mit 5 mM H_2O_2 addiert. **(a)** Repräsentativer Strom von *Col-0*. Der Membrandurchbruch wurde 35 min nach Beginn der H_2O_2 -Inkubation erzielt. **(b)** Repräsentativer Strom von *dnd1*. Der Membrandurchbruch wurde 33 min nach Beginn der H_2O_2 -Inkubation erzielt. Die Experimente wurden 4 mal (*dnd1*) bzw. 5 mal (*Col-0*) mit demselben Ergebnis (Beobachtung einer Kanalaktivität) durchgeführt. Die Stromspuren repräsentieren ein Mittel aus 10 aufeinanderfolgenden Rampen.

Damit überprüft werden kann, ob der Calcium-permeable Kanal in der *outside-out* Konfiguration durch H_2O_2 , eventuell direkt, reguliert wird, wurde im Folgenden die Applikation von H_2O_2 erst nach dem Erreichen des *outside-out* Modus durchgeführt, weiterhin wurden die Protoplasten nicht in H_2O_2 vorinkubiert.

Wird der Calcium-permeable Kanal ausschließlich durch eine cytoplasmatische, CNGC2-abhängige Signalkette reguliert, sollte bei der Applikation von H_2O_2 zu Wildtyp-Protoplasten in der *outside-out* Konfiguration der Kanal gar nicht aktivieren, wenn die Protoplasten nicht in H_2O_2 vorinkubiert waren. Die Bad- bzw. Pipettenlösung enthielt wie bei den Experimenten in Abb. 27 40 mM Ca^{2+} bzw. 10 mM Ba^{2+} , jedoch ohne H_2O_2 . Abbildung 28 zeigt das Verhalten der Stromamplituden ($\Delta I_{-198 \text{ mV}}$) in *outside-out-patches* vom Wildtyp und *dnd1*, vor und nach Applikation von 5 mM H_2O_2 in die externe Lösung. Dabei war jeweils eine Zunahme der Stromamplitude zu beobachten. Eine Regulation Calcium-permeabler Kanäle war also auch ohne intaktes Cytoplasma vorhanden. Für die Auswertung einer Zeitabhängigkeit der Stromamplituden (Abb. 28 a oben) wurden wie für die Ermittlung der Stromzunahme bei intaktem Cytoplasma (*cell-attached*, Abb. 20 und 25) die Amplituden in 5-Minuten-Schritten erfasst und gemittelt. Hier konnte im Vergleich zu den Messungen am intakten Protoplasten jedoch keine Aktivierung mit einem

Sättigungsverlauf der Amplituden-Zunahme erkannt werden. Werden die einzelnen Messungen (Abb. 28 a, unten) betrachtet, zeigt sich zwar jeweils ein Amplituden-Anstieg nach H_2O_2 -Behandlung, jedoch keine zeitliche Übereinstimmung innerhalb der einzelnen Messungen. Dies galt gleichermaßen für die Messungen an Col-0 wie auch an *dnd1*. Es wurden nur Membran-Patches verwendet, die vor der H_2O_2 -Behandlung keine oder nur eine sehr geringe Kanalaktivität (Einzelkanal-Fluktuationen) zeigten. Bei Col-0 wiesen nur 4 von 13 Membran-Patches überhaupt keine Aktivität auf, bei *dnd1* waren es 4 von 12. Die Protoplasten waren vor Beginn der elektrophysiologischen Ableitungen im Dunkeln aufbewahrt worden, eine Licht-Aktivierung der Kanäle scheint somit unwahrscheinlich (siehe aber Kap. 2.2.5). Abbildung 28 b zeigt jeweils Stromantworten auf Spannungsrampen vor und nach Applikation von H_2O_2 bei Col-0- und *dnd1*-*outside-out*-Patches.

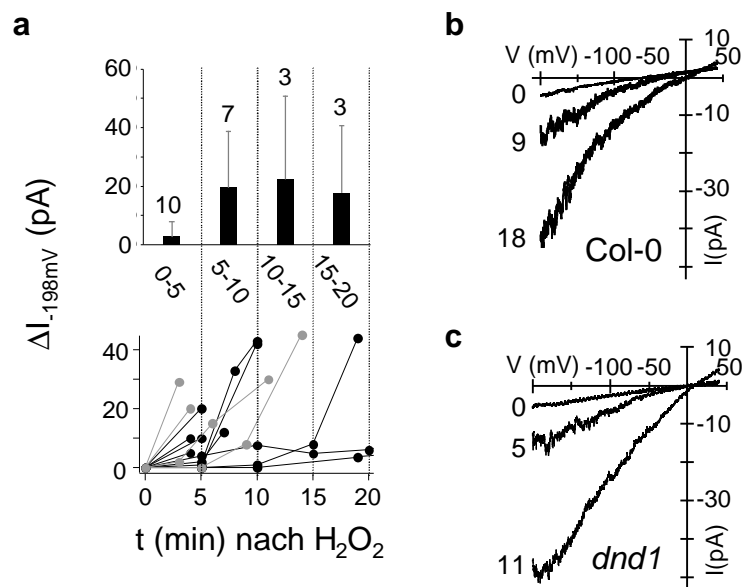


Abb. 28. H_2O_2 -Regulation Calcium-permeabler Ströme in der *outside-out* Konfiguration. (a) Veränderung der Stromamplitude nach Applikation von 5 mM H_2O_2 in die Badlösung (externe Standardlösung). Die interne Lösung enthielt 10 mM Ba^{2+} (interne Standardlösung). Die Aktivierung wird als Stromanstieg während der H_2O_2 -Behandlung ($\Delta I_{-198\text{mV}} = I_{-198\text{mV}}$ (vorher) - $I_{-198\text{mV}}$ (nacher)) dargestellt. Das Balkendiagramm (*oben*) zeigt den Mittelwert aller Datenpunkte von Col-0 (n=10 Zellen) die Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der jeweilig gemittelten Datenpunkte mit Standardabweichungen. Die individuellen Messungen aller *outside-out* Patches sind darunter dargestellt. Die schwarzen Balken und Kurven stellen Col-0 dar, die grauen Kurven stellen *dnd1* dar. (b) Der H_2O_2 -abhängige Stromanstieg wurde anhand von Spannungsrampen ermittelt, wie in Abb. 15 a gezeigt. *Oben*: Rampen vor (0) und 9 bzw. 18 min nach Applikation von 5 mM H_2O_2 zu einem *outside-out* Patch eines Wildtyp-Protoplasten. *Unten*: Aktivierung eines *dnd1* *outside-out* Patches vor (0) und nach 5 bzw. 11 min.

In der *outside-out* Konfiguration verlief somit die Zeitabhängigkeit der Stromzunahme nach H₂O₂-Behandlung nicht synchron innerhalb der einzelnen Membranflecken. Da dies jedoch bei intaktem Cytoplasma schon der Fall war, kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung der Kanäle divergent abläuft. Dass bei Col-0 und bei *nd1* schon vor Applikation von H₂O₂ teilweise Kanalaktivitäten auftraten, kann darauf hindeuten, dass durch den Verlust des Cytoplasmas regulative Komponenten der Kanäle verloren gehen. Weiterhin könnte aus demselben Grund gefolgert werden, dass eine Signalkette für die Aktivierung bei intaktem Cytoplasma verantwortlich ist, die nicht nur an der Plasmamembran abläuft, sondern auf cytoplasmatische Reaktionen angewiesen ist. Die Hypothese, dass CNGC2 als Regulator des Calcium-permeablen Kanals in der Plasmamembran eine Rolle spielt, hielt somit weiterhin bestand. Es ist somit möglich, dass es sich bei CNGC2 um einen Kanal handelt, der in Endomembranen lokalisiert ist, da beim Verlust des Cytoplasmas kein Unterschied zwischen der CNGC2-defizienten Mutante *nd1* und Col-0 bezüglich der Kanalaktivität mit und ohne H₂O₂ zu beobachten war. Um dieser Überlegung auf den Grund zu gehen, wurde ein GFP-Konstrukt von CNGC2 hergestellt, das für eine transiente subzelluläre Lokalisation in pflanzlichen Zellen geeignet war.

3.3.5 Subzelluläre Lokalisation von CNGC2

Ein Fusionskonstrukt der CNGC2-Volllänge mit einem *2x35S*-Promotor (CNGC2::*mGFP4/pPILY*; siehe Kap. 2.3.8 und Anhang) wurde für eine transiente Expression in Zwiebelepidermis-Zellen verwendet. Einen Tag nach der Transformation konnte die Expression des Kanalgens aufgrund der GFP-Fluoreszenz unter einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop (CLSM; LSM5 Pascal Axioskop2 Mot plus; HBO100 Laser; Zeiss) beobachtet werden. Abbildung 29 a zeigt die Expression eines ER-Marker-Konstrukts (*pMG.ER.sg*, Kap. 2.3.8), das nach Expression in Zwiebelepidermen eine Fluoreszenz im ER bewirkte. Mit Hilfe dieses Markers als Vergleichsmöglichkeit wurde das CNGC2-Konstrukt lokalisiert. Zellen, die das CNGC2-Fusionskonstrukt exprimierten, fluoreszierten in ER-ähnlichen Strukturen (Abb. 29 b), d.h. CNGC2 ist möglicherweise im ER lokalisiert³.

³ Bei transienten Expressionen GFP-gelabelter Konstrukte, die eine Fluoreszenz im ER nach sich ziehen, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass aufgrund der Ligation der GFP-codierenden Sequenz an das Kanalgen eine Retardierung des Konstrukts im ER bewirkt wird.

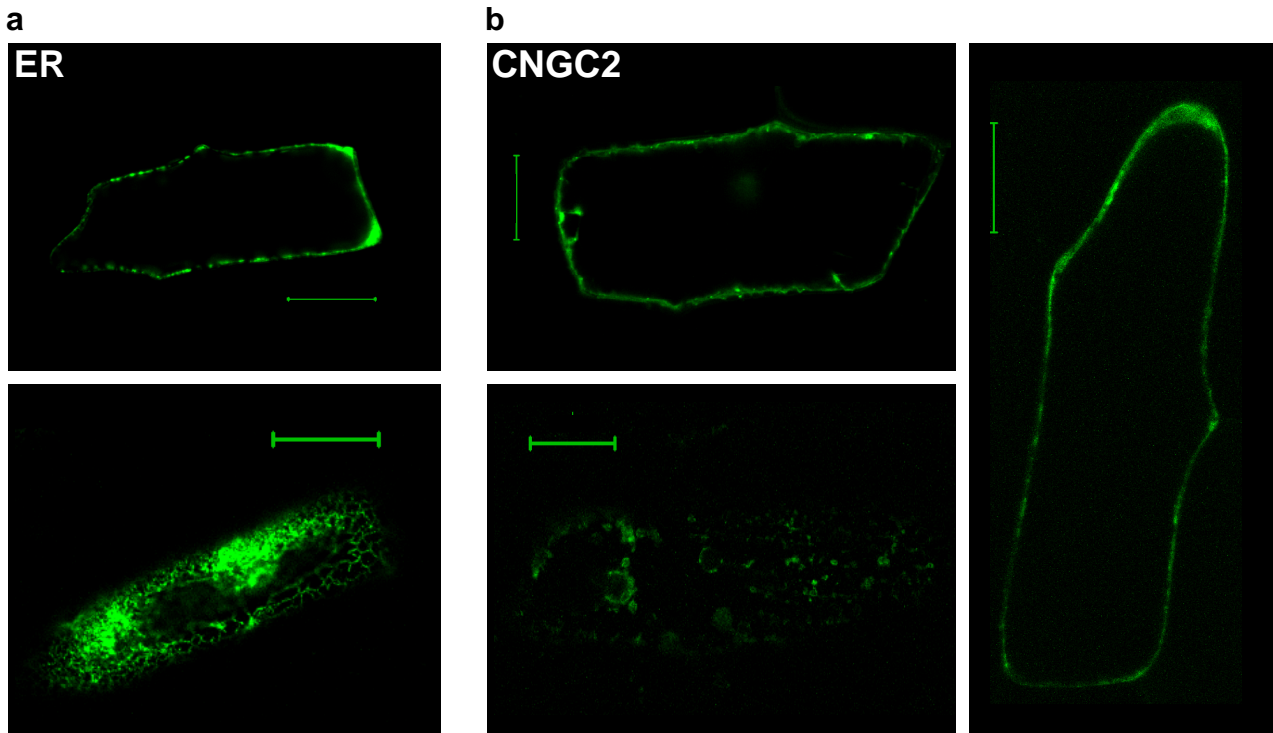


Abb. 29. GFP-Fluoreszenz in Zwiebelepidermis-Zellen. (a) Referenz-Marker (pMG.ER.sg), der im ER (Endoplasmatisches Reticulum) lokalisiert ist. (b) Die Expression des GFP-Fusionskonstrukts mit CNGC2 zeigte eine Fluoreszenz in ER-ähnlichen Strukturen. Fotos: CLSM, 20-fache Vergrößerung x 0,5 Plan-Neofluar, die Balken repräsentieren jeweils 50 μM . Bei den Bildern (a) *unten* und (b) *unten links* handelt es sich nicht wie bei den anderen um einen optischen Schnitt durch die Mitte der Zelle, hier wurde auf eine andere Ebene fokussiert damit ein größerer Bereich an fluoreszierenden Strukturen sichtbar wurde.

Die Erkenntnis, dass CNGC2 im ER lokalisiert sein kann, bestätigt die elektrophysiologischen Daten, da diese durch eine Lokalisation von CNGC2 in Endomembranen erklärt werden können: CNGC2 reguliert innerhalb einer ROS-abhängigen Signalkette die Aktivität des Hyperpolarisations-aktivierten, Ca^{2+} -permeablen Kanals in der Plasmamembran.

In Abb. 30 sind die bisher beschriebenen Daten in einem Modell zusammengefasst:

ROS aktiviert möglicherweise in Abhängigkeit von cyclischen Nukleotiden CNGC2, der in Endomembranen lokalisiert sein könnte. CNGC2 vermittelt anschließend eine cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung. Das cytoplasmatische Ca^{2+} könnte wiederum zusammen mit CaM den Hyperpolarisations-abhängigen, Calcium-permeablen Kanal in der Plasmamembran aktivieren.

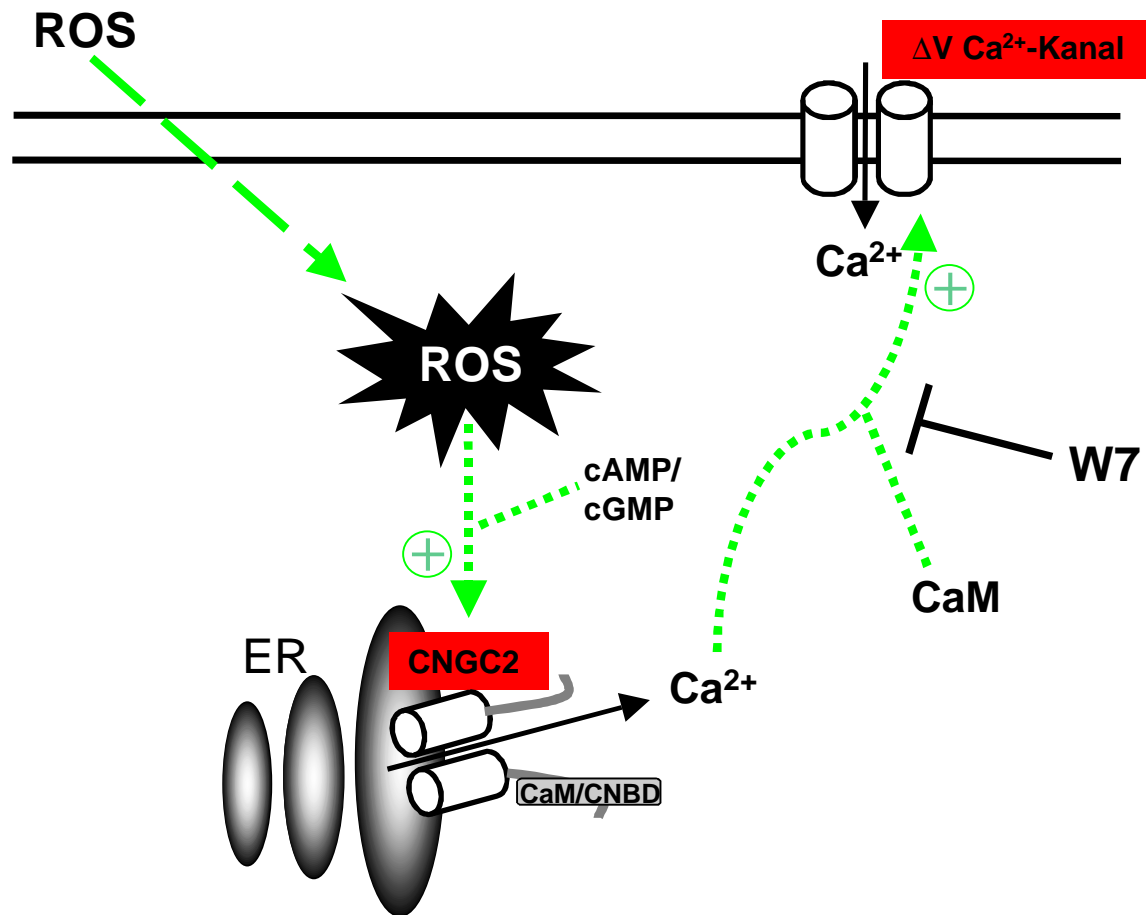


Abb. 30 Möglicher Signalweg zur Regulation Hyperpolarisations-abhängiger, Calcium-permeabler Kanäle in der Plasmamembran von Mesophyllzellen. Eine ROS-Akkumulation induziert cyclisch-Nukleotid-aktivierte, Calcium-permeable CNG2-Kanäle in Endomembranen. Durch die veränderte cytoplasmatische Ca²⁺-Homöostase werden Plasmamembran-lokaliserte Kanäle reguliert. CaM/CNBD, partiell überlappende Bindestellen für Calmodulin und cyclische Nukleotide.

Die weiterführenden Experimente sollten nun aufklären, wie CNGC2 den Calcium-permeablen Kanal in der Plasmamembran regulieren könnte.

3.3.6 Der spannungsabhängige, Calcium-permeable Kanal in der Plasmamembran wird durch Calcium/Calmodulin reguliert

Für die Untersuchung einer möglichen Regulation des Calcium-permeablen Kanals durch CNGC2 wurde systematisch die Zusammensetzung der Pipettenlösung verändert, welche in den folgenden Experimenten das Cytoplasma ersetzte (*outside-out* Konfiguration, Abb. 30). Die Pipettenlösung enthielt (in mM) 100 KGluc, 2 Mg-ATP, 2 MgCl₂, 10 EGTA, pH 7,4, ± 10 CaCl₂, ± 5 µg/ml CaM. Eine mit 10 mM Ca²⁺ eingestellte erhöhte Ca²⁺-Konzentration ($[Ca^{2+}]_{\text{free}} \approx 21 \mu\text{M}$) induzierte keine Kanalaktivität (n = 3, Daten nicht

gezeigt), auch Calmodulin (5 $\mu\text{g/ml}$ CaM81 und/oder CaM aus Rinderhirn; Kap. 2.2.4) alleine konnte keine Kanalaktivität verursachen (Abb. 31 c). Nur 5 $\mu\text{g/ml}$ CaM81 zusammen mit 21 μM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ bewirkte eine Kanalaktivität. Dabei wurde ein Hyperpolarisations-abhängiger Strom sofort nach dem Erreichen der *outside-out* Konfiguration detektiert (Abb. 31 a, b, c). In 3 von 9 *Patches* wurden keine makroskopischen Ströme, sondern nur Einzelkanalfluktuationen beobachtet (Abb. 31 a, b). Die Analyse der Einzelkanalamplitude ergab eine Leitfähigkeit von $11,9 \pm 1$ pS. In den verbleibenden 6 von 9 *Patches* wurde ein makroskopischer Strom abgeleitet (Abb. 30 c). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Calcium-permeable Kanäle in der Plasmamembran durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ reguliert werden. War eine interne Lösung mit 10 μM cAMP und $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} \approx 0$ μM angeboten, wurde kein Hyperpolarisations-abhängiger Strom beobachtet (Abb. 31 c). Auch die Kombination 10 μM cAMP und $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} \approx 21$ μM induzierte keine vergleichbare Kanalaktivität (n=3, Daten nicht gezeigt).

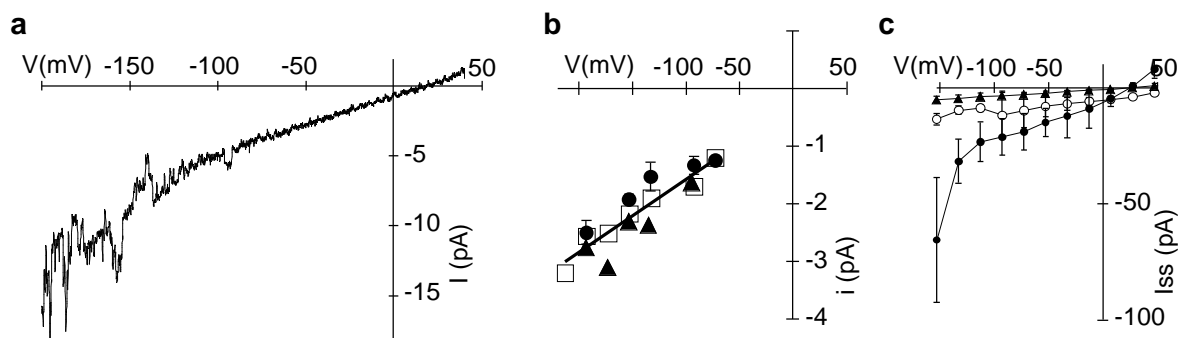


Abb. 31. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ reguliert einen Hyperpolarisations-abhängigen Strom in der Plasmamembran. (a) Einzelkanalfluktuationen eines *outside-out Patches* bei einer 1 s-Spannungsrampe von -193 mV bis 47 mV und einer Voraktivierungszeit von 50 ms bei -193 mV, ausgehend von einem Haltepotential bei -33 mV. Die interne Lösung enthielt (in mM) 100 KGluc, 2 Mg-ATP, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 CaCl₂ ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} \approx 21$ μM), pH $7,4$, 5 $\mu\text{g/ml}$ CaM81. In der Badlösung war die externe Standardlösung (40 CaGluc₂, pH $5,6$) vorhanden. (b) Einzelkanalamplituden mit $11,9 \pm 1$ pS, dargestellt gegen die Spannung. Jedes Symbol repräsentiert die Daten einer Zelle (n=3). Die Linie repräsentiert einen linearen Fit aller Datenpunkte. (c) Gleichgewichtsströme; ausgehend von einem Haltepotential bei -33 mV wurden 800 ms Pulse mit einem 3 s Interval von $+47$ mV bis -153 mV in 20 mV Dekrementen angelegt. *Geschlossene Kreise*: 10 CaCl₂ ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} \approx 21$ μM), 5 $\mu\text{g/ml}$ CaM81 (n=4); *offene Kreise*: 0 CaCl₂ ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} \approx 0$ μM), 5 $\mu\text{g/ml}$ CaM81 (n=6); *Dreiecke*: 0 CaCl₂ ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} \approx 0$ μM), 10 μM cAMP (n=3). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen.

Aus diesen Untersuchungen mit physiologischen Bedingungen an der cytoplasmatischen Membranseite ergab sich, dass eine cytoplasmatische Ca^{2+} -Erhöhung bewirken könnte, dass Hyperpolarisations-abhängige Kanäle aktiviert werden. Für diese Aktivierung war Calmodulin, aber nicht cAMP notwendig. Die Tatsache, dass cAMP hier keine

Kanalaktivität induzierte, wies noch einmal darauf hin, dass der Hyperpolarisations-aktivierte Kanal kein CNG-Kanal ist.

Endogen exprimierte, Calcium-permeable CNG2-Kanäle könnten somit eine cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentrations-Erhöhung bewirken (siehe auch Leng *et al.* 2002), dadurch könnten dann weitere Schritte einer Signalkette induziert werden, inklusive die Aktivierung Calcium-permeabler Kanäle in der Plasmamembran.

Da mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik cytoplasmatische Ca^{2+} -Signale nicht direkt gemessen werden können, wurde auf eine luminometrische Ca^{2+} -Messung mit Hilfe von Apoaequorin-exprimierenden Pflanzen (Kap. 2.5) zurückgegriffen. Aufgrund der Hypothese, dass H_2O_2 mit Hilfe von CNGC2 ein cytoplasmatisches Ca^{2+} -Signal generieren könnte, sollte in einer luminometrischen Ca^{2+} -Messung ein Signal mit H_2O_2 induziert werden können, welches bei $t \leq 5-10$ min detektiert wird. Nach 5-10 min aktiviert der Plasmamembran-lokalisierte Ca^{2+} -permeable Kanal (Kap.3.3, Abb. 21), somit kann nicht mehr unterschieden werden, ob das Signal aus internen Speichern freigesetzt wird, oder ob Ca^{2+} über die Plasmamembran aus dem externen Medium kommt, ein Signal vorher könnte jedoch aus internen Speichern stammen.

3.4 Charakterisierung cytosolischer Ca^{2+} -Signale mit Luminometrie

Die luminometrische Bestimmung cytosolischer Ca^{2+} -Signale mit Hilfe Apoaequorin-exprimierender Pflanzen erlaubte eine nicht-invasive Untersuchung H_2O_2 -induzierter Signalwege (Kap. 2.5). Dadurch sollte eine durch H_2O_2 induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus endogenen Speichern, wie sie aufgrund der bisherigen Daten für wahrscheinlich gehalten wird, bestätigt werden können.

Es wurden *Arabidopsis thaliana* C24-Pflanzen herangezogen, welche das Apoaequorin konstitutiv exprimieren. Abb. 32 zeigt Ca^{2+} -Signale an Mesophyll-Protoplasten von C24-Pflanzen in einer Ca^{2+} -Lösung (Ca-Puffer, mit 2 mM Ca^{2+} ; Kap. 2.5), die mit 5 mM H_2O_2 (schwarze Linie) oder als Kontrolle nur mit Ca-Puffer (hellgraue Linie) behandelt wurden. Während der ersten 20 s nach einer Injektion wurde jeweils ein durch die mechanische Reizung verursachtes Ca^{2+} -Signal detektiert. Die Injektion von 5 mM H_2O_2 (schwarze Linie in Abb. 27) induzierte einen im Vergleich zur Kontrolle (graue Linie in Abb. 27) erhöhten Ca^{2+} -Level, der instantan nach der H_2O_2 -Injektion und nach dem Ca^{2+} -Peak durch die mechanische Reizung beobachtet werden konnte. Es ist unwahrscheinlich, dass er

durch den H_2O_2 -aktivierten Kanal entstand, der in den elektrophysiologischen Messungen beobachtet wurde, da dieser erst nach 5–10 Minuten eine deutliche Aktivierung zeigte (Kap. 3.3; Abb. 21). Es bestand somit die Möglichkeit, dass es sich um Ca^{2+} handelt, welches aus endogenen Speichern freigesetzt wurde. Apoaequorin-exprimierende *nd1*-Pflanzen, die derzeit für zukünftige luminometrische Experimente hergestellt werden, können einen Aufschluss darüber geben, ob der H_2O_2 -induzierte Ca^{2+} -Anstieg durch die Mutation in CNGC2 beeinträchtigt wird.

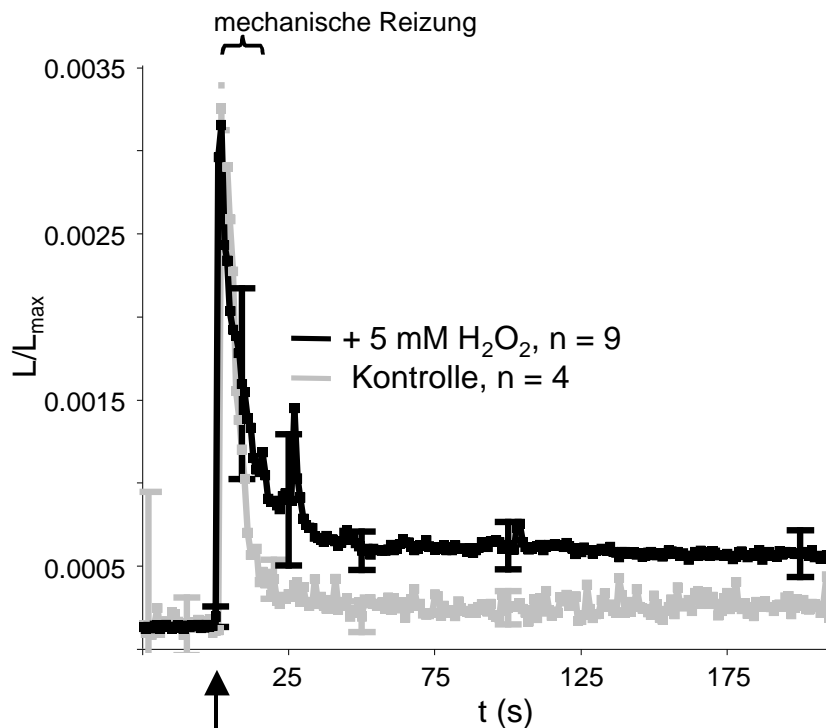


Abb. 32. H_2O_2 -induzierte Ca^{2+} -Signale an C24-Protoplasten. Verwendete Probe / Experiment: 100 μl C24-Mesophyll-Protoplasten (ca. 60 Protoplasten/ μl), 10 Minuten vor Beginn der Messung in 900 μl Ca-Puffer (siehe Kap. 2.5) inkubiert. Nachdem im Luminometer eine konstante Hintergrund-Fluoreszenz der Probe detektiert werden konnte (dieses war meist nach der 10-minütigen Inkubation gewährleistet), wurden 200 μl Ca-Puffer (hellgraue Linie, Kontrolle) bzw. 200 μl Ca-Puffer / 5 mM H_2O_2 (Endkonzentration), (schwarze Linie), in die Probe bei kontinuierlicher Datenaufzeichnung injiziert. Der Pfeil deutet den Zeitpunkt $t = 0$ Minuten der H_2O_2 -Injektionen an, die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Im Folgenden wurde elektrophysiologisch überprüft, ob CNGC2 nach heterologer Expression funktionell nachweisbar ist und durch cyclische Nukleotide aktiviert bzw. Kationen-permeabel ist, wie von Leng *et al.* (2000) beschrieben. Die biophysikalischen Eigenschaften von CNGC2 sollten dann als ergänzende Komponente in ein Modell der pflanzlichen Pathogen-Abwehr eingefügt werden können.

3.5 Heterologe Expression der pflanzlichen CNG-Kanäle CNGC2 und CNBT1

Zur funktionellen Charakterisierung und Überprüfung der Regulation durch cyclische Nukleotide von CNGC2 mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik wurde eine transiente, heterologe Expression der Kanäle in HEK293-Zellen durchgeführt. Parallel hierzu wurde ein weiterer putativer CNG-Kanal elektrophysiologisch untersucht, CNBT1. Zur optischen Identifizierung erfolgreich transfizierter Zellen wurde eine Kotransfektion mit pTracer durchgeführt. Vektorkarten der für die Expression in HEK293-Zellen verwendeten Konstrukte, und Angaben zu den verwendeten molekularbiologischen Methoden bei der Klonierung, siehe Kap. 2.3.8 und Anhang.

3.5.1 CNGC2 war nach heterologer Expression nicht funktionell nachweisbar

Für die heterologe Expression von CNGC2 in HEK293-Zellen wurde zunächst das CNGC2 Gen (C. Köhler, AG Neuhaus, Institut für BiologieII, Freiburg, D) in den Mammalia-Expressionsvektor pCiNeo eingebracht (CNGC2/pCiNeo). Da Leng *et al.* (1999) neben einer Permeabilität von CNGC2 für Calcium auch eine Kaliumpermeabilität vorschlug (Kap. 1.2.3), wurden die elektrophysiologischen Untersuchungen unter Bedingungen durchgeführt, die eine Erfassung der K^+ -Transportkapazität der Membran erlaubte. Die intrazelluläre Lösung enthielt 150 mM K-Gluconat, die extrazelluläre Lösung enthielt 30 mM K-Gluconat. Die interne Lösung war zudem mit 1 mM cGMP addiert. CNGC2-transfizierte HEK293-Zellen zeigten jedoch keine cyclisch-Nukleotid-aktivierten Ströme (Abb. 33). Sowohl in der Kontrolle (pTracer) als auch in den CNGC2-transfizierten HEK293-Zellen konnten nur intrinsische Ströme erfasst werden. D.h. die Ergebnisse von Leng *et al.* (1999), die CNGC2 als cyclisch-Nukleotid-aktivierten, K^+ -permeablen und einwärtsgerichtenden Kanal beschrieben (Kap. 1.2.3 und 3.3.1), wurden in den hier durchgeführten elektrophysiologischen Experimenten nicht bestätigt.

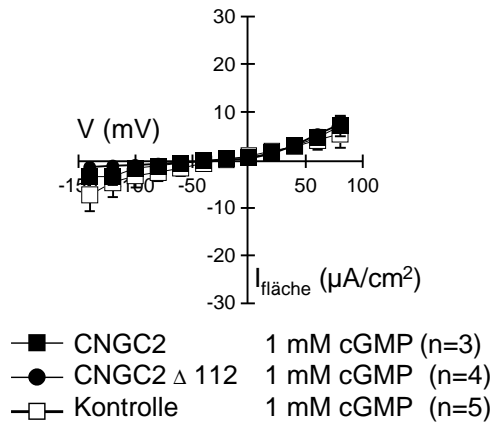


Abb. 33. CNGC2 und CNGC2 Δ 112-transfizierte HEK-293-Zellen zeigen keine cGMP-aktivierten Ströme. Strom-Spannungs-Verhältnis der als Flächenströme berechneten Gleichgewichtsströme in HEK293-Zellen, transfiziert mit pTracer allein (als Kontrolle) und kotransfiziert mit CNGC2 Δ 112 bzw. CNGC2 (Volllänge) und pTracer. Ausgehend von einer Haltespannung bei -36 mV wurden 800 ms-Pulse mit einem 5 s Intervall von $+84$ bis -136 mV in 20 mV Dekrementen angelegt. Die interne Lösung bestand aus (in mM) 150 K-Gluconat, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 1 Mg-ATP, 50 Glucose, pH 7,4, 1 cGMP. Die Bad-Lösung bestand aus 30 K-Gluconat, 1 CaCl₂, pH 5,6. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen.

CNGC2 Δ 112 stellt eine Deletionsmutante dar, d.h. bei CNGC2 wurde ein Bereich des N-Terminus entfernt. Dabei wurden 12,2 kDa (Aminosäuren 1-112) deletiert, welche hydrophilen Bereichen vor der 1. transmembranen Domäne und vor einem weiteren Methionin entsprechen. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt (C. Köhler, persönliche Mitteilung), dass CNGC1 aus *Arabidopsis thaliana*, mit einer berechneten Größe von 83 kDa, in *Western Blots* nur eine Größe von 47 kDa zeigte. In anderen Präparationen waren zwei Banden mit 47 kDa und 72 kDa zu sehen. Der Unterschied des 72 kDa Proteins zu der berechneten Größe kann durch eine anomale Migration des Proteins erklärt werden (Molday und Molday 1987; Connell und Molday 1990). Die Größe des 47 kDa Proteins ist jedoch möglicherweise auf eine posttranslationale, proteolytische Modifikation von CNGC1 zurückzuführen. Das bedeutet, dass CNGC1 *in vivo* eventuell nur nach posttranslationalen Veränderung, d.h. als verkürztes Protein, funktionell in Membranen eingebaut wird. Bei HEK293-Zellen handelt es sich um ein heterologes Expressionssystem, so dass nicht dieselben posttranslationalen Modifikationen wie *in planta* stattfinden. Somit bestand die Möglichkeit, dass durch die artifizielle Deletion kodierender Bereiche die fehlende Modifikation imitiert wurde, um somit einen funktionellen Einbau in die Plasmamembran zu bewirken. Die aus CNGC2 abgeleitete Deletionsmutante (CNGC2- Δ 112/pCDNA3.1) vermittelte jedoch, genauso wie die Volllänge, keine Ströme in Gegenwart von 1 mM cytosolischem cGMP (Abb. 33). Das bedeutete, dass sowohl die Volllänge als auch die N-terminale Deletionsmutante entweder nicht in die Plasmamembran eingebaut werden, oder dass sie zwar in der Plasmamembran lokalisiert, aber nicht funktionell nachweisbar sind. Der Frage, wo die Volllänge und die

Deletionsmutante lokalisiert sind, wurde mit Hilfe von GFP-Fusionskonstrukten nachgegangen. Dadurch konnte parallel zu den elektrophysiologischen Untersuchungen eine Lokalisation der Kanäle im gleichen heterologen System durchgeführt werden. Folgende Konstrukte wurden kloniert (Kap. 2.3.8 und Anhang):

1. CNGC2::EGFP/pCDNA3.1, für die Lokalisation der CNGC2-Volllänge,
2. CNGC2- Δ 112::EGFP/pCDNA3.1, für die Lokalisation der Deletionsmutante.

Die heterologe Expression der GFP-Konstrukte von CNGC2 sowie dessen N-terminale Deletionsmutante zeigten beide keine eindeutige Expression in der Plasmamembran (Daten nicht gezeigt). Dies korreliert mit den elektrophysiologischen Daten und unterstützt die Hypothese, dass CNGC2 entweder nicht in die Plasmamembran transportiert wird, oder dass die Expression dort so gering ist, dass der Kanal nicht nachweisbar ist. Teilweise war eine cytoplasmatische Fluoreszenz auszumachen, teilweise im Cytoplasma und möglicherweise in der Plasmamembran. Auffällig war, dass die fluoreszierenden Zellen keinen vitalen Eindruck machten. Diese Beobachtung wurde auch von den anderen beiden Arbeitsgruppen ({Leng, 2002 #103}; {Balague, 2003 #3103}), die CNGC2 bzw. den ähnlichen CNGC4 (Kap.1.2.3, Abb. 2) heterolog exprimierten, beschrieben. Möglicherweise hat CNGC2 eine toxische Wirkung bei einer Überexpression.

3.5.2 CNBT1 Δ 119 wird funktionell in die Plasmamembran eingebaut

Da CNGC2 weder anhand von Lokalisationsstudien noch elektrophysiologisch in der Plasmamembran von HEK293-Zellen nachweisbar war, wurde ein weiterer putativer pflanzlicher CNG-Kanal, CNBT1, überprüft. Das Kanal-Gen wurde für die heterologe Expression in den Expressionsvektor pcDNA3.1 eingebracht. Parallel zur CNBT1-Volllänge (CNBT1/pcDNA3.1) wurde ebenfalls eine N-terminale Deletionsmutante kloniert (CNBT1 Δ 119/pcDNA3.1). Bei der Volllänge wurden dafür die Aminosäuren 1-119 des N-Terminus deletiert. Die *Patch-Clamp*-Analysen der CNBT1 und CNBT1 Δ 119-exprimierenden HEK-Zellen wurden unter denselben K⁺-Bedingungen wie bei CNGC2 bzw. CNGC2 Δ 112 (Kap. 3.5.1) durchgeführt. Die *whole-cell* Messungen ergaben, dass CNBT1 Δ 119, nicht aber die Volllänge elektrophysiologisch nachweisbar ist. Im Gegensatz zu CNGC2 bewirkte also bei CNBT1 die Deletion des N-Terminus einen funktionellen Einbau in die Plasmamembran. Abb. 34 a zeigt Ganzzell-Ströme einer Kontrollzelle (pTracer, *oben*) und einer mit CNBT1 Δ 119/pcDNA3.1 transfizierten Zelle (*unten*) unter

Verwendung einer internen Lösung, die mit 1 mM cGMP addiert war. Die Kontrollzelle zeigte einen typischen intrinsischen, instantanen K^+ -Auswärtsstrom. Bei CNBT1 Δ 119 war ein größerer, instantaner Ein- und Ausstrom zu beobachten, der in beide Richtungen eine schwache Spannungsabhängigkeit aufwies (Abb. 34 b). Diese Ströme waren jedoch nur in der Präsenz von 1 mM cGMP zu beobachten, ohne cGMP war kein Unterschied zur Kontrolle vorhanden (Abb. 34 b). Dies deutet daraufhin, dass die N-terminale Deletionsmutante von CNBT1 einen funktionellen, cGMP-aktivierten Kanal darstellen könnte. In den mit der Volllänge transfizierten Zellen waren bei 1 mM cytosolischem cGMP neben den intrinsischen Strömen keine weiteren Ströme nachweisbar (Abb. 34 b). Aufgrund der Tatsache, dass die Volllänge von CNBT1 keine messbaren Ströme vermittelte, kann vermutet werden, dass die Deletion des N-terminalen Bereichs notwendig ist, damit das Kanal-Protein in die Plasmamembran von HEK293-Zellen transportiert wird und funktionell eingebaut wird.

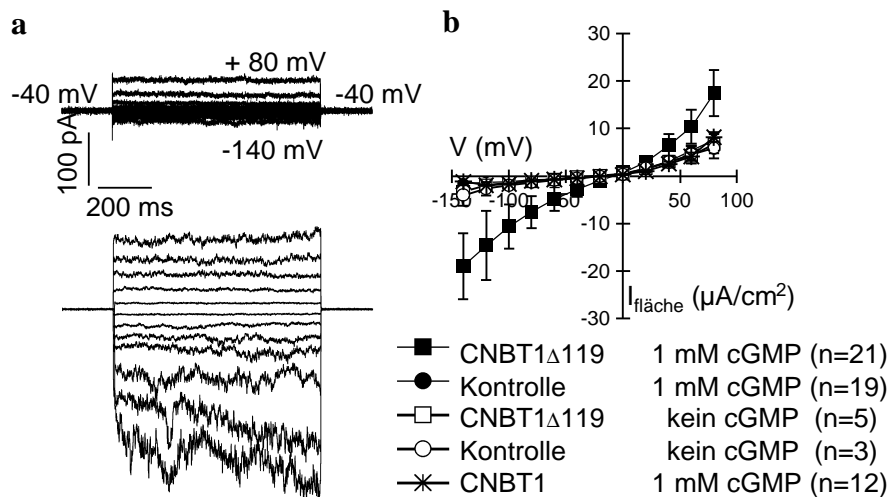


Abb. 34. Instantane Ströme in CNBT1 Δ 119-transfizierten HEK293-Zellen. (a) *Whole-cell* Ströme in HEK293-Zellen, transfiziert mit pTracer als Kontrolle (*oben*) und kotransfiziert mit CNBT1 Δ 119 und pTracer (*unten*). (b) Strom-Spannungs-Verhältnis der Gleichgewichtsströme, berechnet als Flächenströme. Die interne Lösung bestand aus (in mM) 150 K-Gluconat, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 1 Mg-ATP, 50 Glucose, pH 7,4, \pm 1 cGMP. Die Badlösung bestand aus 30 K-Gluconat, 1 CaCl₂, pH 5,6. Zuordnung der Symbole wie angegeben, Pulsprotokoll siehe Abb. 33.

Im Folgenden wurde CNBT1 Δ 119 hinsichtlich seiner Permeabilität für verschiedene monovalente und divalente Kationen untersucht. Die 30 mM K^+ in der externen Lösung wurden dabei durch (jeweils 30 mM) Ca^{2+} oder Na^+ ersetzt. CNBT1 Δ 119-vermittelte

Ströme zeigten dabei jeweils keine Veränderung in der Stromamplitude (Abb. 35 a). Es könnte sich also um einen nicht-selektiven Kanal handeln, was jedoch statistisch und durch eine Berechnung der relativen Permeabilitäten der verschiedenen Kationen noch abgesichert werden muss. Damit eine direkte Aktivierung durch cyclische Nukleotide überprüft werden konnte, wurden Messungen in der sog. *inside-out* Konfiguration durchgeführt. Dieser Modus, bei dem das Cytoplasma zur externen Lösung hin exponiert ist (Kap. 2.2.1.1), erlaubt bei der Applikation von Liganden in die Badlösung die Beobachtung einer ligandenabhängigen Kanalaktivierung. 200 μM cAMP induzierte bei *inside-out Patches* CNBT1 Δ 119-exprimierender Zellen eine Aktivierung sowohl des Ein- als auch des Ausstromes (Abb. 35 b, unten). Die Badlösung enthielt 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1 mM EDTA, pH 7,4, die Pipettenlösung 30 mM K-Gluconat, 1 mM CaCl₂, pH 5,6. In Kontrollzellen war keine Änderung der Stromamplitude sichtbar (Abb. 35 b, oben). Dies deutet auf eine direkte Aktivierung von CNBT1 Δ 119 durch cyclische Nukleotide hin.

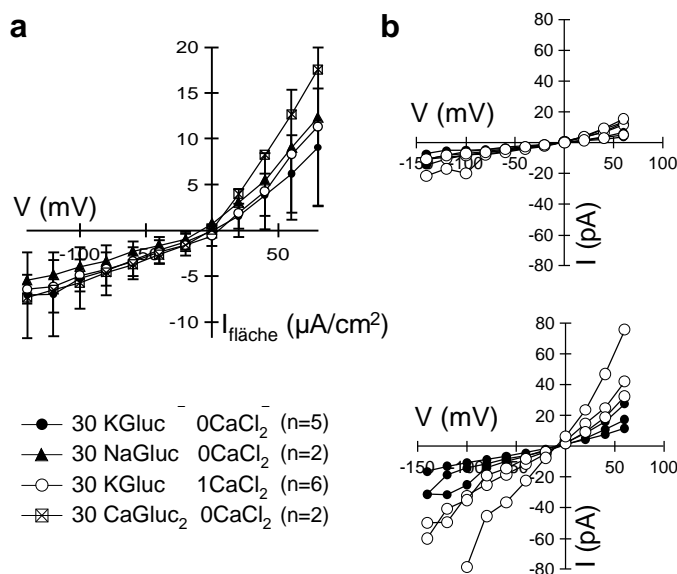


Abb. 35. Der Kanal ist nicht-selektiv und durch cyclische Nukleotide aktiviert. (a)

Gleichgewichtsströme, berechnet als Flächenströme von CNBT1 Δ 119 bei verschiedenen Kationen in der externen Lösung. Interne Lösung (+ 1 mM cGMP) siehe Abb. 34. Die Kationen in der externen Lösung waren wie angedeutet. Spannungspulsprotokoll siehe Abb. 33. (b) *Inside-out* Messungen vor (geschlossene Kreise) und nach (offene Kreise) Applikation von 200 μM cAMP in die Badlösung. *Oben:*

Gleichgewichtsströme aus Kontrollzellen (transfiziert mit pTracer; n = 5) *unten:* Gleichgewichtsströme aus Zellen kotransfiziert mit CNBT1 Δ 119 und pTracer (n = 3, jeweils vor und nach Applikation von cAMP). Die Badlösung bestand aus (in mM) 100 NaCl, 2 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES/NaOH pH 7,4, die Pipettenlösung aus 30 K-Gluconat, 1 CaCl₂, pH 5,6. Ausgehend von einer Haltespannung bei -36 mV wurden 800 ms-Pulse mit einem 5 s Intervall von +64 bis -136 mV in 20 mV Dekrementen angelegt.

Durch eine optische Analyse von GFP-Fusionskonstrukten (CNBT1::smGFP/pA/pCiNeo bzw. CNBT1- Δ 119::smGFP/pCDNA3.1, Kap. 2.3.8; Anhang) an einem *Laser-Scanning-Mikroskop* wurde nun die Lokalisation von CNBT1 bzw. der Deletionsmutante überprüft

(Daten nicht gezeigt). Dabei bestätigte sich in Einklang mit den elektrophysiologischen Daten, dass die Deletionsmutante in der Plasmamembran lokalisiert ist, und dass die Volllänge im Cytoplasma verbleibt.

3.5.3 Subzelluläre Lokalisation der putativen CNG-Kanäle CNBT1 und CNBT2 in pflanzlichen Zellen

Die N-terminale Deletionsmutante von CNBT1 wurde wie beschrieben in HEK293-Zellen elektrophysiologisch nachgewiesen und in der Plasmamembran lokalisiert (Kap. 3.5.2). Nun wurden Zwiebelepidermis-Zellen benutzt, um die subzelluläre Lokalisation der Volllänge innerhalb pflanzlicher Zellen zu prüfen. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob der Kanal *in planta* in der Plasmamembran oder in Endomembranen lokalisiert ist. Neben CNBT1 wurde auch die subzelluläre Lokalisation von CNBT2 überprüft, ein weiterer putativer CNG-Kanal. Die beiden Kanäle gehören einer Gruppe innerhalb der pflanzlichen putativen CNG-Kanäle an, die nur aus diesen beiden Mitgliedern besteht (Maser *et al.* 2001 und Abb. 2). GFP-Fusionskonstrukte von CNBT1 (CNBT1::mGFP4/pPILY) und CNBT2 (CNBT2::mGFP4/pPILY) wurden kloniert und unter Anwendung einer PIG (*particle inflow gun*) transient in Zwiebelepidermis-Zellen exprimiert. Einen Tag nach Transformation der Zwiebelepidermen mit CNBT1 oder CNBT2 konnte eine GFP-Fluoreszenz ausgemacht werden. Die optische Überprüfung zeigte (Abb. 36 links), dass CNBT1 in Endomembranen lokalisiert war. Anhand eines Vergleichs mit Referenz-Markern (Kap. 2.3.8) konnte eine GFP-Fluoreszenz im ER und / oder in Peroxisomen identifiziert werden. CNBT1 stellt nach diesen Erkenntnissen, unter Einbeziehung der elektrophysiologischen Daten (Kap. 3.7.2), einen cyclisch-Nukleotid aktivierten Kanal aus endogenen Membranen dar.

Das CNBT2-Fusionskonstrukt hingegen wies eine GFP-Fluoreszenz in der Plasmamembran auf (Abb. 35 rechts). Der Kanal wird also in die Plasmamembran eingebaut und sollte somit einer elektrophysiologischen Ableitung zugänglich sein. In Arabidopsis Keimlingen wurde mit Hilfe eines *Microarrays* eine erhöhte Expression von CNBT2 nach einer Behandlung mit H₂O₂ gezeigt (Kap. 4.6). Bei CNBT2 ist also eine Rolle in ROS-abhängigen Signalketten wahrscheinlich. Für zukünftige Projekte ist eine Identifizierung CNBT2-exprimierender Zelltypen interessant, da diese dann elektrophysiologisch auf cyclisch-Nukleotid- und H₂O₂-abhängige Ströme hin untersucht werden könnten.

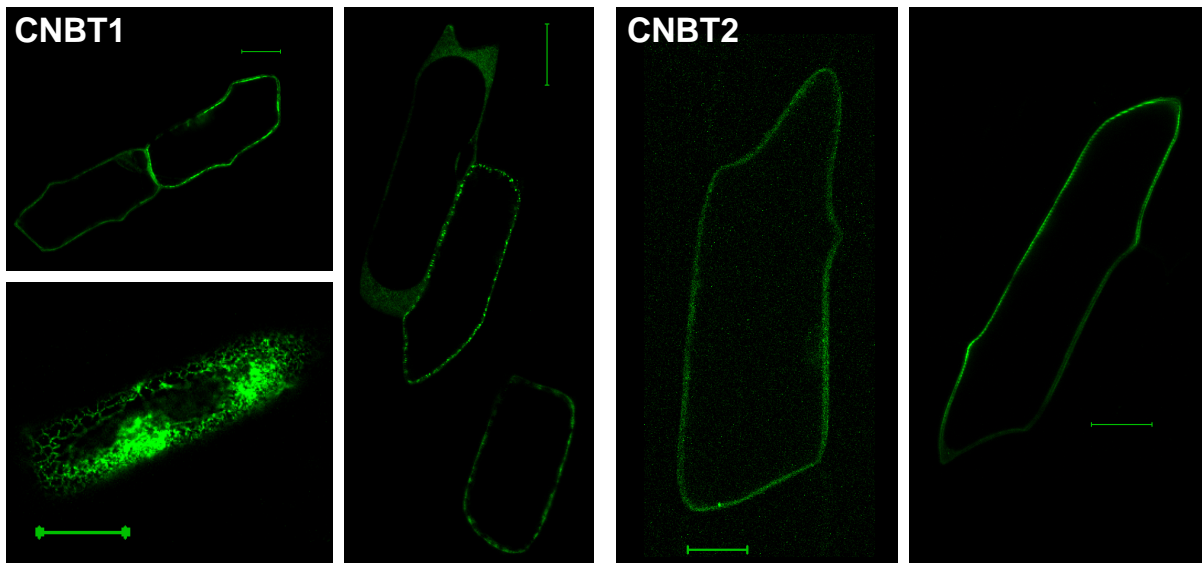


Abb. 36. GFP-Fluoreszenz in Zwiebelepidermis-Zellen nach Transfektion mit einem CNBT1- oder CNBT2-Klon. Expression des GFP-Fusionskonstrukts mit CNBT1 (CNBT1::mGFP4/pPILY; *links*) zeigt eine Fluoreszenz in ER-ähnlichen Strukturen und in Peroxisomen. CNBT2 (CNBT2::mGFP4/pPILY; *rechts*) ist in der Plasmamembran lokalisiert. Fotos: CLSM, 20-fache Vergrößerung x 0,5 Plan-Neofluar oder 40-fache Vergrößerung x 1,2 Wasser C-Apochromat. Die Balken repräsentieren jeweils 50 μ M. Bei der CNBT1::mGFP4 – exprimierenden Zelle unten links handelt es sich nicht wie bei den anderen um einen optischen Schnitt durch die Mitte der Zelle, hier wurde auf eine andere Ebene fokussiert damit ein größerer Bereich an fluoreszierenden Strukturen sichtbar wurde.

4. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Calcium-permeable Kanäle in der Plasmamembran von Mesophyllzellen untersucht. Dabei wurden die abiotischen Reize Licht und H_2O_2 als Regulatoren erkannt und Schritte in der Signalkette, die zur Aktivierung der Kanäle führen, aufgedeckt. Im Folgenden werden zunächst die elektrophysiologischen Eigenschaften von Calcium-permeablen Kanälen in der Plasmamembran dargestellt. Anschließend werden der Einfluss von Licht und H_2O_2 auf die Aktivität der Kanäle diskutiert sowie die physiologische Relevanz der durch diese Reize induzierten Kanal-Aktivität. Die Betrachtung pflanzlicher CNG-Kanäle wird deren mögliche Bedeutung als Kanäle mit regulatorischer Funktion auf die Calcium-Homöostase herausstellen.

4.1 Biophysikalische Eigenschaften Calcium-permeabler Kanäle in der Plasmamembran von Mesophyllzellen

In der Plasmamembran von Mesophyllzellen konnte durch Hyperpolarisation ein Kationen-Einstrom induziert werden, welcher negativ von ca. -100 mV auftrat (Kap. 3.1, Abb. 10). Die Umkehrpotentiale des Kanals ließen eine relative Permeabilität für Ba^{2+} und Ca^{2+} von $P_{\text{Ba}}:P_{\text{Ca}} = 1,2$ erkennen. Die Ca^{2+} -Permeabilität wurde anhand verschiedener Lösungen mit Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen 4 und 40 mM eingehender untersucht (Kap. 3.1.1, Abb. 11). Dabei wurde eine Verschiebung des Umkehrpotentials, wie durch die Goldman-Gleichung für divalente Kationen vorhergesagt (Kap. 2.2.3.2, Gleichung 4), bestätigt. Anhand von *cell-attached* Experimenten mit 10 mM Ba^{2+} in der Pipettenlösung wurde eine Leitfähigkeit des Kanals von $7,2 \pm 1$ pS berechnet. Permeabilitätsstudien verschiedener divalenter Kationen ergab eine Sequenz relativer Stromamplituden von Ba^{2+} ($131,8 \pm 20$) > Ca^{2+} (100) > Mg^{2+} ($84,3 \pm 18$), (Kap. 3.1.1, Abb. 12). Gegenüber Lanthaniden zeigten die Ströme eine hohe Sensitivität. Applikation (100 μM) von Gadolinium (Gd^{3+}) führte zu einer Reduktion der Stromamplitude um $95,2 \pm 7$ %, bei Lanthan (La^{3+}) wurde die Amplitude um $97,9 \pm 2$ % reduziert (Kap. 3.1.2, Abb. 13).

Diese Eigenschaften (Hyperpolarisations-aktiviert, Permeabilität, Blockierbarkeit durch Lanthanide) weisen z.B. eine Übereinstimmung mit den in Schließzellen (Hamilton *et al.* 2000; Pei *et al.* 2000), Zellen aus der Tomate (Gelli und Blumwald 1997) oder

Wurzelhaar-Zellen (Véry und Davies 2000) charakterisierten Calcium-permeablen Kanälen auf. Eine weitere Gemeinsamkeit der Kanäle in Schließzellen und Mesophyllzellen ist die Fluktuation des Stroms, resultierend aus einem Status hoher und niedriger Kanalaktivität (Kap. 3.1, Abb. 10; und Pei *et al.* 2000). Dies deutet entweder auf eine Regulation der Kanäle nicht nur durch Spannung hin, oder auf eine langsame Deaktivierung, die anhand genauer Analysen der Strom-Kinetik charakterisiert werden müsste.

4.1.1 Gene für Calcium-permeable Kanäle pflanzlicher Zellen

Ob es sich bei den Kanälen in den verschiedenen Zelltypen um dasselbe Genprodukt handelt, ist noch nicht geklärt. In *Arabidopsis* konnte bis jetzt noch kein Calcium-Kanal kloniert und nach heterologer Expression elektrophysiologisch charakterisiert werden. Dies wäre eine Möglichkeit, die molekulare Identität der beobachteten Ströme zu klären. Mehrere Gene können jedoch als mögliche Kandidaten für die Kodierung solcher Hyperpolarisations-aktivierter, Calcium-permeabler Kanäle in Betracht gezogen werden: putative CNG-Kanäle, ionotropische Glutamatrezeptoren oder Annexine.

Bei drei CNG-Kanälen gelang bis jetzt eine Lokalisation in der Plasmamembran (*HvCBT1* und *NtCBP4*, beide ein Ortholog zu *AtCNGC1*, s. Schuurink *et al.* 1998; Arazi *et al.* 1999, und *CNBT2*, s. Kap. 1.2.3). Außerdem wird pflanzlichen CNG-Kanälen aufgrund ihrer Porenregion (Abb. 2) und aufgrund von Hinweisen aus elektrophysiologischen Messungen nach heterologer Expression (Leng *et al.* 1999, Leng *et al.* 2002; Balague *et al.* 2003) eine Ca^{2+} -Permeabilität zugeschrieben. Sie stellen somit mögliche Kandidaten für Plasmamembran-lokalisierte, Ca^{2+} -permeable und Hyperpolarisations-aktivierte (Leng *et al.* 1999, Leng *et al.* 2002) Ionenkanäle dar. CNG-Kanälen könnten aufgrund von Phänotyp-Beschreibungen CNG-Kanal-defizienter Mutanten eine Funktion in der Pathogen-Abwehr übernehmen (Yu *et al.* 1998, Clough *et al.* 2000; Balague *et al.* 2003). Da auch cytoplasmatisches Ca^{2+} als sekundärer Botenstoff in Abwehr-Mechanismen eine wichtige Funktion übernimmt (Kap. 1.1), könnten CNG-Kanäle die Rolle der Ca^{2+} -Influx vermittelnden Kanäle übernehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter verschiedenen Bedingungen (mit Forskolin und db-cAMP bei intakten Protoplasten, Abb. 26 und mit cytoplasmatischem cAMP, Abb. 31) geprüft, ob eine Applikation von cyclischen Nukleotiden einen Hyperpolarisations-abhängigen, Ca^{2+} -permeablen Kanal aktiviert, dies

war jedoch nicht der Fall. Somit scheint in Mesophyllzellen, unter den verwendeten Bedingungen, kein cyclisch-Nukleotid-aktivierter Kanal, der einen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Influx vermittelt, nachweisbar zu sein.

Ionotropische Glutamatrezeptoren (iGluR) bilden nicht-selektive, Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle in tierischen Systemen (z.B. Hille 2001). In *Arabidopsis* wurden 20 homologe Genomsequenzen (*AtGLR*), die homolog zu den tierischen iGluR sind, identifiziert (Lacombe *et al.* 2001). Die Porenregionen lassen aufgrund ihres Unterschiedes zu den Porenregionen in tierischen iGluR keine Vorhersagen über die Selektivität zu. *AtGLR3.4* vermittelte nach heterologer Expression in *Xenopus* Oocyten einen Ca^{2+} -Influx, ein weiterer Glutamatrezeptor (*AtGLR2.8*) jedoch nicht. Indirekte, pharmakologische Hinweise schlagen für *AtGLRs* eine Rolle in der Photomorphogenese vor. *Arabidopsis*-Pflanzen, die bei einer Präsenz von 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)dion (DNQX) oder $\text{S}^{(+)}\text{-}\beta\text{-methyl-}\alpha,\beta\text{-Diaminopropionsäure}$ (BMAA), beides Antagonisten von tierischen iGluR, herangezogen werden, zeigen Phänotypen wie die *long-hypocotyl-(hy)*-Mutanten, die in Licht-abhängigen Signaltransduktionsketten beeinträchtigt sind (Brenner *et al.* 2000). Die mögliche Ca^{2+} -Permeabilität, sowie der Hinweis, dass *AtGLRs* in Licht-abhängigen Prozessen, wo Ca^{2+} einen sekundären Botenstoff darstellt (Baum *et al.* 1999; Stoelzle *et al.* 2003 bzw. Kap. 3.2) eine Rolle spielen könnten, stellt sie als mögliche Kandidaten für Hyperpolarisations-aktivierte, Ca^{2+} -permeable Kanäle in der Plasmamembran pflanzlicher Zellen heraus.

Annexine aus Tieren sind Hyperpolarisations-aktivierte, Ca^{2+} -permeable und Lanthan-sensitive Kationenkanäle (Kourie und Wood 2000; Gerke und Moss 2002). In *Arabidopsis* wurden sieben Annexin-Gene identifiziert (*AnnAt1-7*, Clark *et al.* 2001), die hauptsächlich in der Wurzel exprimiert sind. Aufgrund der Möglichkeit, dass die pflanzlichen Annexine Ca^{2+} -permeabel und Lanthan-sensitiv sind, und außerdem in Wurzeln exprimiert sind, wurde vorgeschlagen, dass sie eine Funktion im Ca^{2+} -abhängigen Extensions-Wachstum der Wurzelspitze besitzen. Bei diesen Wachstumsvorgängen wurden ebenfalls Hyperpolarisations-aktivierte, Ca^{2+} -permeable Kanäle beschrieben (Véry und Davies 2000; Kap. 1.1.2). Möglicherweise bilden Annexine in Wurzelzellen und anderen Geweben bzw. Zelltypen Hyperpolarisations-aktivierte, Ca^{2+} -permeable Kanäle.

Zukünftige Studien in heterologen Expressionssystemen sollten die elektrophysiologischen Eigenschaften der putativen Ca^{2+} -permeablen Kanäle herausstellen, die von CNGCs, GLRs und der Annexin-Familie kodiert werden. Anhand dieser Eigenschaften könnten dann ihre *in vivo* charakterisierten Äquivalente identifiziert und Rückschlüsse auf ihrer physiologische Funktion gemacht werden.

4.2 Regulation des Calcium-permeablen Kanals durch Blaulicht

Blaulicht stimulierte Hyperpolarisations-aktivierte, Calcium-permeable Kanäle in Mesophyll-Protoplasten (Kap. 3.2). Der Aktivierungsmechanismus war unabhängig von der Photosynthese und von Cryptochromen, aber abhängig von Photonen-absorbierenden Kinasen, den Phototropinen (Kap. 3.2.1, Kap. 3.2.2). Die Phototropine stellen selber jedoch nicht den Kanal dar (Kap. 1.5.2), sondern transduzieren den Licht-Reiz in chemische Energie anhand eines Phosphorylierungsschrittes mit Hilfe der Kinase-Domäne. Beim menschlichen Photopigment Rhodopsin stellt z.B. ein G-Protein (Transducin) die Verbindung zur nachfolgenden Signalkette dar. Licht-Rezeptoren, bei denen der Rezeptor auch die Funktion eines Transporters übernimmt, sind vor allem aus Bakterien bekannt. Bakteriorhodopsin, eine Licht-getriebene Protonenpumpe aus *Halobacterium halobium* pumpt nach Perzeption eines Photons zwei Protonen auf die extrazelluläre Seite der Membran. Halorhodopsin ist ähnlich dem Bakteriorhodopsin eine Licht-getriebene Chlorid-Pumpe aus Halobakterien. Interessanterweise konnte kürzlich durch Analyse einer cDNA-Bank aus Rispen salzgestresster Reispflanzen ein cDNA-Stück mit 5'-Ähnlichkeit zum Bakteriorhodopsin sequenziert werden (Bennett *et al.* 2002). Aus der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas* ist der Protonen-Kanal Channelrhodopsin-1 bekannt (Nagel *et al.* 2002). Durch einen Einstrom von Ca^{2+} und H^+ wird dabei eine Orientierung im Licht ermöglicht.

Der Phototropin-aktivierte, Calcium-permeable Kanal aus Mesophyllzellen, *PACC*, stellt einen möglichen Kandidaten für die Vermittlung eines Ca^{2+} -Anstiegs während der Chloroplastenbewegung dar. Trotz dem die Blaulicht-Sensitivität von *PACC* in isolierten Mesophyll-Protoplasten ($> 50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) im Vergleich zur Chloroplastenbewegung im intakten Blatt ($1-100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) reduziert ist, kann der Proteinkinase-Inhibitor K252a beide Prozesse inhibieren (Kap. 3.2.2). *phot2-1* ist in der Fähigkeit, unter hohen Licht-Intensitäten eine Vermeidungsreaktion der Chloroplasten durchzuführen, beeinträchtigt (Sakai *et al.* 2001; Kagawa *et al.* 2001; Jarillo *et al.* 2001; (Abb. 4)). Bei schwachen Licht-

Intensitäten war eine normale Chloroplasten-Akkumulation vorhanden. Im Gegensatz dazu ist *phot1-5* bei der Chloroplasten-Akkumulation unter schwachen Blaulicht-Intensitäten beeinträchtigt, bei hohen Licht-Intensitäten war jedoch eine normale Vermeidungsreaktion der Chloroplasten vorhanden. Unter den für die elektrophysiologischen Experimente verwendeten hoch-Licht-Bedingungen ($275 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) für die Aktivierung von *PACC* war jedoch in *phot1-5* schon ein Phänotyp hinsichtlich der Stromamplitude vorhanden, d.h. ob und wie *PACC* in der Chloroplastenbewegung involviert ist, die vom Cytoskelett abhängig ist (Tlalka und Gabrys 1993; Kadota und Wada 1992; Sato *et al.* 2001), oder welche Rolle *PACC* innerhalb der Signalkette vom Photorezeptor bis zur Umsetzung der Bewegung spielt, ist noch unklar.

Ob die geringere Blaulicht-Sensitivität von *PACC*, die in den isolierten Mesophyllzellen, verglichen mit den Licht-Intensitäten, die für die Induktion der Phototropin-abhängigen Chloroplastenbewegung, Phototropismus oder Stomabewegung im intakten Gewebe benötigt wurde, auf eine spezifische Rolle von *PACC* bei Hochlicht-Intensitäten deutet, oder ob dies ein Ergebnis der unterschiedlichen experimentellen Bedingungen bzw. der Protoplasten-Isolation ist, muss in künftigen Experimenten noch geklärt werden. Bei den Untersuchungen der Chloroplastenbewegung im intakten Gewebe wurde beispielsweise neben der lokalen Blaulicht-Bestrahlung (*microbeam*) die gesamte Zelle mit $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Rotlicht bestrahlt, was die Chloroplastenbewegung erhöht (Kagawa und Wada 2000; Sakai *et al.* 2001). Bei den elektrophysiologischen Messungen der *PACC*-vermittelten Ströme wurde hingegen kein Rotlicht im Hintergrund verwendet.

Eine Aktivierung von *PACC* durch Blaulicht konnte nur in der *cell-attached* Konfiguration gemessen werden, was zeigt, dass ein intaktes Cytoplasma notwendig ist. Theoretisch könnte die Aktivierung über eine Hyperpolarisation der Membran ablaufen. In Mesophyllzellen wurde nach Blaulicht-Illumination jedoch eine transiente Depolarisation anstatt einer Hyperpolarisation, beobachtet (M. R. G. Roelfsema, persönliche Mitteilung). Somit ist diese Möglichkeit nicht sehr wahrscheinlich. Da Phototropine, im Gegensatz zu Cryptochromen, die im Nukleus lokalisiert sind, gleichmäßig in der Plasmamembran von Mesophyllzellen lokalisiert sind (Short und Briggs 1994; Sakamoto und Briggs 2002), besteht die Möglichkeit, dass bei Bestrahlung nur spezifisch zum Licht hin ausgerichtete Phototropine, d.h. in der Plasmamembran distinkte Bereiche, stimuliert werden. Nach der Blaulicht-Stimulation der Photorezeptoren könnten dann nur in dem Bereich vorhandene *PAC*-Kanäle induziert werden. Wenn Calcium-permeable Kanäle in der Plasmamembran

öffnen, entsteht eine lokal begrenzte, erhöhte Calcium-Konzentration (Trewavas 1999). Viele Calcium-abhängigen Proteine (Calmodulin und Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase) sind ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert (Collinge und Trewavas 1989) und könnten nach der lokal begrenzten Aktivierung von PAC-Kanälen stimuliert werden. Ein so entstehender zellulärer Gradient an Ca^{2+} bzw. an Calcium-abhängigen Prozessen könnte demnach auch eine Orientierung der Chloroplasten im Raum ermöglichen.

4.2.1 Mögliche Blaulicht-Regulation von Calcium-permeablen Kanälen in anderen Zelltypen

Der Hyperpolarisations-abhängige, Calcium-permeable Kanal in Schließzellen aktiviert nach der Behandlung mit H_2O_2 (Pei *et al.* 2000) und ABA (Hamilton *et al.* 2000), was auf eine Bedeutung im ABA-induzierten Stoma-Schluss hinweist. In Mesophyllzellen konnte keine Zunahme eines Stroms innerhalb von 30 Minuten nach der Applikation von 50 μM ABA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt; n=8). Zum weiteren hatte Diphenyliodonium Chlorid (DPI, inhibiert neben der NADPH Oxidase Flavoproteine und die NO-Synthase) keinen Effekt auf die Aktivierung von PACC in Mesophyll-Protoplasten (Vorinkubation bis zu 3 Stunden, Daten nicht gezeigt; n=6). In Schließzellen hingegen blockt DPI die Induktion der Kationenkanäle durch ABA (Pei *et al.* 2000). Die Feststellung der molekularen Identität der Kanäle (Kap. 4.1.1) wird wie schon erwähnt aufklären, ob derselbe Hyperpolarisations-aktivierte, Calcium-permeable Kanal in verschiedene, zellspezifische Signalketten involviert ist, oder ob Blaulicht-aktivierte PACCs und ABA-abhängige Kanäle verschiedene Mitglieder einer Kationenkanal-Klasse in *Arabidopsis* sind.

Oberflächen-Potential Messungen in *Arabidopsis* Hypokotylen zeigten eine zwei-phasige Antwort des Membranpotentials auf eine Blaulicht-Behandlung. Eine schnelle, transiente Depolarisation wird gefolgt von einer zweiten, langsameren Depolarisation, die ungefähr nach 2 Minuten Illumination beginnt (Folta und Spalding 2001). Interessanterweise fehlen *phot1* und *phot1 cry1* die zweite Depolarisations-Phase und die erste, schnelle Depolarisation ist kleiner. Im Gegensatz dazu sind *cry1 cry2* Pflanzen nur in der schnellen Antwort beeinträchtigt. Das bedeutet, dass Phototropine und Cryptochrome eine Änderung des Membranpotentials induzieren könnten. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Cryptochrome eine schnelle Änderung des Membranpotentials über die Aktivierung von

Anionen-selektiven Kanälen bewirken (Folta und Spalding 2001; Cho und Spalding 1996; Parks *et al.* 2001). Im Gegensatz hierzu scheint die langsame Depolarisation allein abhängig von Phototropinen zu sein (Folta und Spalding 2001). Ca^{2+} -Messungen im Hypokotyl zeigten ein Blaulicht-induziertes Ca^{2+} -Signal mit einem Maximum zwischen 3 und 12 Minuten (Babourina *et al.* 2002). Ein weiterer Hinweis auf die Rolle von Ca^{2+} -Signalen im Phototropin-regulierten Hypokotyl-Wachstum war, dass das Ca^{2+} -Signal in *phot1* weitgehend verschwunden ist (Babourina *et al.* 2002). Diese Blaulicht-Aktivierung im Hypokotyl war, parallel zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in *phot1 phot2* Pflanzen gar nicht mehr vorhanden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Kanäle ähnlich wie *PACC* in diesem Gewebe vorhanden sind und in Phototropin-abhängige Ca^{2+} -Signale, langsame Membran-Depolarisation und Wachstums-Inhibition involviert sein könnten.

4.3 Regulation des Calcium-permeablen Kanals durch H_2O_2

Eine erhöhte Produktion an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) wie H_2O_2 kann Zellen zerstören, ROS können aber auch als Signale in Stress-Antworten und Signalketten in der Pathogen-Abwehr wirken (Kap. 1.3). H_2O_2 aktivierte in Mesophyllzellen einen Hyperpolarisations-abhängigen, Calcium-permeablen Kanal (Kap. 3.3). Die Kanalaktivierung erreichte bei Messungen am intakten Protoplasten nach ca. 25 Minuten eine Sättigung (Kap. 3.3; Abb. 21). Die Ströme wiesen genauso wie die Blaulicht-aktivierten Ströme eine Sensitivität gegenüber Lanthan auf (Abb. 20 d). Eine Regulierung der Calcium-permeablen Kanäle mit dem Phytohormon ABA, das eine H_2O_2 -Produktion induziert, traf hier im Gegensatz zu Schließzellen nicht zu (siehe auch Kap. 4.2.1). Somit scheint in Mesophyllzellen und Schließzellen eine unterschiedliche ABA-abhängige Signalkette zu existieren. Andererseits könnte es sich bei dem H_2O_2 -aktivierten Kanal in Schließzellen (Pei *et al.* 2000) aber um einen anderen Calcium-permeablen Kanal mit den gleichen elektrophysiologischen Charakteristika handeln. Da H_2O_2 in verschiedenen Signalketten eine Rolle spielt (Kap. 3.3, Abb. 22 und Kap. 1.3), ist eine zell- und reaktionsspezifische Aktion von H_2O_2 sehr wahrscheinlich. Analog hierzu sind die Ergebnisse, dass in Schließ- und Mesophyllzellen unterschiedliche, durch ABA induzierte, Signalketten und / oder Rezeptortypen vorhanden sind, durch die K^+ -Kanäle reguliert werden (Sutton *et al.* 2000, siehe auch Kap. 3.3).

4.3.1 In *dnd1* ist die H₂O₂-Aktivierung der Kanäle beeinträchtigt

Die *dnd1*-Mutante besitzt einen nicht-funktionellen pflanzlichen CNG-Kanal, CNGC2. Neben den schon beschriebenen Phänotypen wie Zwergwachstum, erhöhtem Salizylsäure (SA)-Wert und Verlust der hypersensitiven Reaktion (Clough *et al.* 2000; Kap. 1.2.3 und Abb. 23), wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Mesophyll-Protoplasten in *dnd1* kleiner als im Wildtyp sind. Es ist demnach wahrscheinlich, dass das Zwergwachstum auf kleinere Zellen zurückzuführen ist und nicht etwa auf eine reduzierte Zellzahl (Abb. 23). Weiterhin konnte dargestellt werden, dass in *dnd1* eine ROS-Produktion nach Pathogenbefall möglich ist (Kap. 3.3.2; Abb. 24). Eine solche massive ROS-Entstehung stellt einen wichtigen Schritt innerhalb der hypersensitiven Reaktion dar. Der Verlust der hypersensitiven Reaktion liegt also nicht an einer beeinträchtigten ROS-Generierung. Die elektrophysiologische Untersuchung der Mesophyll-Protoplasten aus *dnd1* zeigte, dass bei intaktem Cytoplasma die H₂O₂-Aktivierung der Hyperpolarisations-abhängigen, Calcium-permeablen Kanäle beeinträchtigt ist (Kap. 3.3.3; Abb. 25 a, b). Der Zusammenhang zwischen dem beobachteten Calcium-permeablen Kanal und der Pathogen-Abwehr schien aufgrund dieser Ergebnisse wahrscheinlich. Die Tatsache, dass nach Vorinkubation in H₂O₂, aber beim Verlust des intakten Cytoplasmas, in der Kanal-defizienten Mutante *dnd1* Kanalaktivität aufgezeichnet werden konnte (Kap. 3.3.4 Abb. 27), deutete darauf hin, dass CNGC2 nicht den beobachteten Kanal repräsentierte. Durch den mutierten CNGC2-Kanal könnten H₂O₂-abbauende Prozesse in *dnd1* konstitutiv aktiv sein, und somit nur in der *cell-attached* Konfiguration, bei intaktem Cytoplasma, die Aktivierung des Calcium-permeablen Kanals inhibieren. Bei den Untersuchungen in der *outside-out* Konfiguration, ohne eine Behandlung mit H₂O₂, wurde sowohl in *dnd1* als auch in Col-0 teilweise eine Aktivität des Calcium-permeablen Kanals beobachtet (Kap. 3.3.4). Eine Erklärung hierfür wäre, dass in dieser Konfiguration noch cytoplasmatische Metabolite vorhanden sind, die eine Kanalaktivität induzieren (z.B. Ca/CaM, Kap. 3.3.6). Dafür spricht auch die im Verlauf dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass in der *outside-out* Konfiguration teilweise der Energie-Metabolit ATP vorhanden war. Die Präsenz von ATP wird durch die Aktivität der H⁺-ATPase (Becker *et al.* 1993) indiziert, da diese H⁺-Ionen nur unter ATP-Metabolisierung pumpen kann. Bei Verwendung von 0,5 U Hexokinase an der cytoplasmatischen Membranseite wurde kein durch die H⁺-ATPase vermittelter H⁺-Ausstrom aufgezeichnet (Abb. 42). Hexokinase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Phosphorylierung von hauptsächlich Glucose zu Glucose-6-Phosphat und

ADP. Daraus kann geschlossen werden, dass neben ATP auch andere cytosolische Metabolite mit einer regulatorischen Funktion auf Membranproteine in der *outside-out* Konfiguration vorhanden sein könnten.

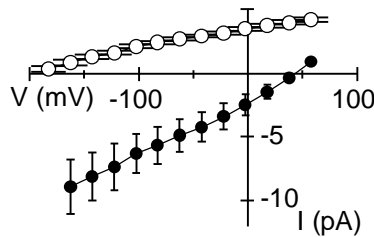


Abb. 36. Die H^+ -ATPase ist bei nicht-intaktem Cytoplasma aktiv. Ströme von *outside-out-Patches* aus Mesophyll-Protoplasten mit (geschlossene Kreise; $n = 3$) und ohne (offene Kreise; $n = 6$) dem ATP-abbauenden Enzym Hexokinase. Cytoplasmatisch wurde die Standardlösung mit 10 mM BaGluc₂ \pm 0,5 U Hexokinase, 1 mM MgCl₂ und 5 mM Glucose verwendet. Extern war die Standardlösung mit 40 mM CaGluc₂ vorhanden.

Bei elektrophysiologischen Messungen in der *outside-out* Konfiguration, und zwar bei *Patches*, die ohne H₂O₂-Behandlung keine bzw. eine nur geringe Aktivität des Calcium-permeablen Kanals hatten, wurde nach der Applikation von H₂O₂ die Kanal-Aktivität induziert bzw. eine schon vorhandene Aktivität erhöht (Kap. 3.3.4; Abb. 28). Innerhalb der einzelnen Messungen wurde jedoch keine zeitabhängige Zunahme der Stromamplitude bzw. ein Sättigungsverlauf der Amplituden-Zunahme beobachtet, wie es bei den *cell-attached* Experimenten der Fall war (Kap. 3.3, Abb. 21). Das bedeutet, H₂O₂ reguliert, möglicherweise direkt durch die oxidierende Eigenschaft, den Calcium-permeablen Kanal in der Plasmamembran. Bei einer direkten Regulation hätte aber auch in *dnd1*, bei intaktem Cytoplasma, ein Ca²⁺-Influx beobachtet werden müssen, wenn CNGC2 nicht dieser Calcium-permeable Kanal ist, da H₂O₂ in das Cytoplasma diffundiert und somit auch in dieser Konfiguration direkt auf die Kanäle wirken kann. Das bedeutet, dass entweder in intakten *dnd1*-Protoplasten H₂O₂-regulierende Komponenten vorhanden sind, oder negative Regulatoren, die den Calcium-permeablen Kanal inhibieren. In der *outside-out* Konfiguration könnte andererseits aber auch die hohe Konzentration an divalenten Kationen (10 mM Ba²⁺) auf der cytoplasmatischen Seite der Membran die Kanalaktivität beeinflussen und dadurch eine Aktivierung ermöglichen.

Die *dnd1*-Mutation beeinflusst zelluläre Abläufe, welche die SA-Produktion regulieren (Kap. 1.2.3 und Clough *et al.* 2000). Der Zwergwuchs und der Verlust der hypersensitiven Reaktion wird jedoch nur teilweise durch den erhöhten SA-Level verursacht. SA kann durch Induktion der Expression von Catalasen oder Ascorbat-Peroxidasen den Schutz einer Zelle gegen ROS bewirken (Kap. 1.4). In den durchgeführten *Patch-Clamp*-Analysen an intakten *dnd1*-Protoplasten konnte jedoch auch nach Applikation von 50 mM H₂O₂ keine

Kanalaktivität induziert werden (Kap. 3.3.3). Dies spricht dafür, dass SA und die dadurch induzierten Abwehrmechanismen, die eine ROS-Akkumulation verhindern, nicht, oder nicht alleine für die Tatsache verantwortlich sind, dass keine Kanalaktivität induziert werden konnte. Andererseits könnten durch den mutierten CNG2-Kanal in *dnd1* andere Mechanismen, die in der Pathogen-Abwehr keine direkte Rolle spielen, beeinträchtigt sein. Eine durch die Mutation veränderte Balance in der Ionen-Homöostase einer Zelle könnte weiterreichende, indirekte Folgen, z.B. auf die Pathogen-Abwehr haben. In verschiedenen pflanzlichen Zellen wurde beispielsweise gezeigt, dass eine veränderte cytoplasmatische H^+ -Konzentration Auswirkungen auf den Zelltod besitzt (Vander Heiden *et al.* 2000). Wie auch immer die Beziehung zwischen CNGC2 und dem H_2O_2 -aktivierten Kanal ist, direkt über Ca^{2+} oder indirekt, ändert nichts an der Tatsache, dass in der *dnd1*-Mutante die Aktivierung Calcium-permeabler Kanäle beeinträchtigt war. Eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase aufgrund des defekten CNG-Kanals könnte einen oder mehrere der beobachteten Phänotypen verursachen. Dass CNGC2 prinzipiell für eine Pathogen-Abwehr essentiell ist, scheint nicht der Fall zu sein, da die Mutante Abwehr-Prozesse und sogar eine erhöhte Resistenz zeigt (Clough *et al.* 2000). Weitere der 20 putativen CNG-Kanäle in *Arabidopsis*, wie z.B. CNGC4 (Balague *et al.* 2003), könnten ebenfalls als Regulatoren innerhalb von Signalketten bei Pathogen-induzierten Mechanismen wirken.

4.3.2 Vermittlung der H_2O_2 -Aktivierung durch cytosolische Komponenten

An intakten Mesophyll-Protoplasten von *dnd1*-Pflanzen induzierte Blaulicht, aber nicht H_2O_2 , eine Kanalaktivität wie im Wildtyp. Unter der Annahme, dass es sich bei dem H_2O_2 -aktivierten und dem Blaulicht-aktivierten Kanal um denselben Kanal handelt, ergibt sich, dass CNGC2 in der Signalkette vor dem Hyperpolarisations-abhängigen, Calcium-permeablen Kanal steht. Das bedeutet, CNGC2 reguliert den Calcium-permeablen Kanal in der Plasmamembran. Die Regulation geht möglicherweise über einen CaM-abhängigen Schritt, da bei intakten Protoplasten der CaM-Inhibitor W7 die H_2O_2 -Stimulation der Kanäle inhibierte (Kap. 3.3.4, Abb. 26). Eine Beteiligung von CDPK's (*calmodulin-like domain protein kinases*) ist ebenfalls möglich, da W7 auf diese Enzymfamilie ebenfalls eine inhibierende Wirkung haben kann (Sangwan *et al.* 2002). Außerdem wurde eine Funktion von CDPK's in allen Ca^{2+} -abhängigen Signalketten vorgeschlagen (Harmon *et al.* 2000). W7 könnte ebenfalls Ca/CaM-abhängige NAD Kinasen (z.B. Lee *et al.* 1997) oder Ca/CaM-abhängige Proteinphosphatasen (Kudla *et al.* 1999) inhibieren.

In elektrophysiologischen Ableitungen, bei denen das Cytoplasma durch eine Lösung ersetzt wurde, die mit 21 μM Ca^{2+} und 5 $\mu\text{g/ml}$ CaM supplementiert war, konnte eine Kanal-Aktivität in der Plasmamembran beobachtet werden (Kap. 3.3.6; Abb. 31). Da es sich bei dem Strom wahrscheinlich um einen Ca^{2+} -Influx handelte, da in der externen Lösung 40 mM Ca-Gluc₂ angeboten war, und aufgrund der Hyperpolarisations-Abhängigkeit, könnte es sich um den Hyperpolarisations-aktivierten, Calcium-permeablen Kanal handeln. Durch Ca^{2+} oder CaM alleine wurde keine Aktivierung erzielt. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Kanal durch Ca^{2+} /CaM aktiviert wird und dass die Inhibierung durch W7 bei intakten Protoplasten möglicherweise auf eine CaM-Inhibition zurückzuführen ist. Diese wird in nachfolgenden Experimenten noch genauer überprüft werden, indem die mit 21 μM Ca^{2+} und CaM supplementierte Pipettenlösung auch in Gegenwart von W7 in die vergleichenden Untersuchungen mit einbezogen wird.

Regulatorische Verknüpfungen zweier Calcium-permeabler Kanäle sind bis jetzt nur aus dem tierischen Bereich gut dokumentiert, bei pflanzlichen Zellen gibt es Hinweise darauf (Kap. 1.1.2). Ein weit verbreiteter Mechanismus nicht-erregbarer Säuger-Zellen ist der sog. *kapazitive (store operated) Ca²⁺-Influx*, bei dem durch eine Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran geöffnet werden (Kap. 1.1.1). Durch diesen Ca^{2+} -Influx (I_{CRAC} , Kap. 1.1.1) in die Zelle wird die freie, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht (Glitsch *et al.* 2002). Der Ca^{2+} -Einstrom wird in vielen Zelltypen durch einwärtsgerichtete Ca^{2+} -Kanäle (*store operated channels*, SOC) vermittelt (Hoth und Penner 1992; Parekh und Penner 1997). Mitochondrien stellen ebenso einen wichtigen endogenen Ca^{2+} -Speicher dar. Mitochondrien können nach einer Stimulation der Zelle Ca^{2+} schnell aufnehmen und anschließend langsam wieder ins Cytosol zurück lassen (Glitsch *et al.* 2002). Auch die Ca^{2+} -Kanäle in Mitochondrien regulieren die Aktivierung und Inaktivierung von SOC-Kanälen.

Ob CNGC2 in pflanzlichen Zellen eine ähnliche Rolle spielen könnte, d.h. CNGC2 reguliert den Calcium-permeablen Kanal in der Plasmamembran, ist aufgrund der in dieser Arbeit erbrachten Daten nicht belegt, ist aber eine mögliche Erklärung. Die optische Lokalisation anhand der GFP-Fusionskonstrukte deutet auf seine Expression im ER hin. Das ER könnte auch in pflanzlichen Zellen neben der Vakuole (Muir und Sanders 1996, 1997; Schumaker und Sze 1987; Allen *et al.* 1995) einen Ca^{2+} -Speicher darstellen (Muir und Sanders 1997), und demnach möglicherweise das H_2O_2 -induzierte, luminometrisch bestimmte Ca^{2+} -Signal vermittelt haben können (Kap. 3.4). Die Ca^{2+} -Aufnahme endogener

Ca²⁺-Speicher im tierischen System spielt eine Rolle beim Zelltod, der Apoptose (Glitsch *et al.* 2002). Beispielsweise induziert die Ca²⁺-Aufnahme von Mitochondrien einen großen, nicht-selektiven Kanal (PT Pore, für *permeability transition pore*), dessen Öffnen durch verschiedene Faktoren wie Ca²⁺ oder ROS reguliert wird. Durch diese Pore wird Cytochrom C, ein Apoptose-induzierender Faktor, ins Cytosol entlassen. Es gibt Hinweise, dass solche Zusammenhänge zwischen Ca²⁺-permeablen Kanälen in Endomembranen und der Plasmamembran, Zelltod, Cytochrom C und cytoplasmatischer Ca²⁺-Homöostase auch in pflanzlichen Zellen eine Rolle spielen (Lam *et al.* 2001; Jones 2000). Das mlo Gen aus der Gerste ist beispielsweise bei Resistenzmechanismen gegenüber Mehltau-Pilzen beteiligt, besteht aus sieben transmembranen Helices, einem extrazellulären N-Terminus und interagiert mit Ca/CaM. Der Verlust von mlo führt zu spontanen HR-ähnlichen Läsionen, MLO könnte somit als negativer Regulator beim Zelltod innerhalb der HR fungieren, d.h. MLO schwächt Abwehrreaktionen ab (Kim *et al.* 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass MLO den durch einen pathogenen Pilz verursachten *oxidative burst* in Mesophyllzellen kontrolliert, und dass MLO die Blatt-Seneszenz verlangsamt (Piffanelli *et al.* 2002). Dieses Protein stellt also ein mögliches Plasmamembran-lokalisiertes Ziel einer Ca/CaM-abhängigen Signalkette bei der Pathogen-Abwehr dar. Ca²⁺ und ROS-regulierte, (Véry und Davies 2000; Foreman *et al.* 2003; Kap. 1.1.2) Hyperpolarisations-aktivierte Ca²⁺-Kanäle wurden in Wurzelzellen charakterisiert, unterliegen also möglicherweise ebenfalls der Regulation durch cytoplasmatisches Calcium und/oder weiteren Signalkomponenten innerhalb von Abwehrmechanismen. Hier sind dieselben Zusammenhänge vorhanden wie in dem Modell, welches eine CNGC2-vermittelte Regulation des Plasmamembran-Kanals vorschlägt (Abb. 38).

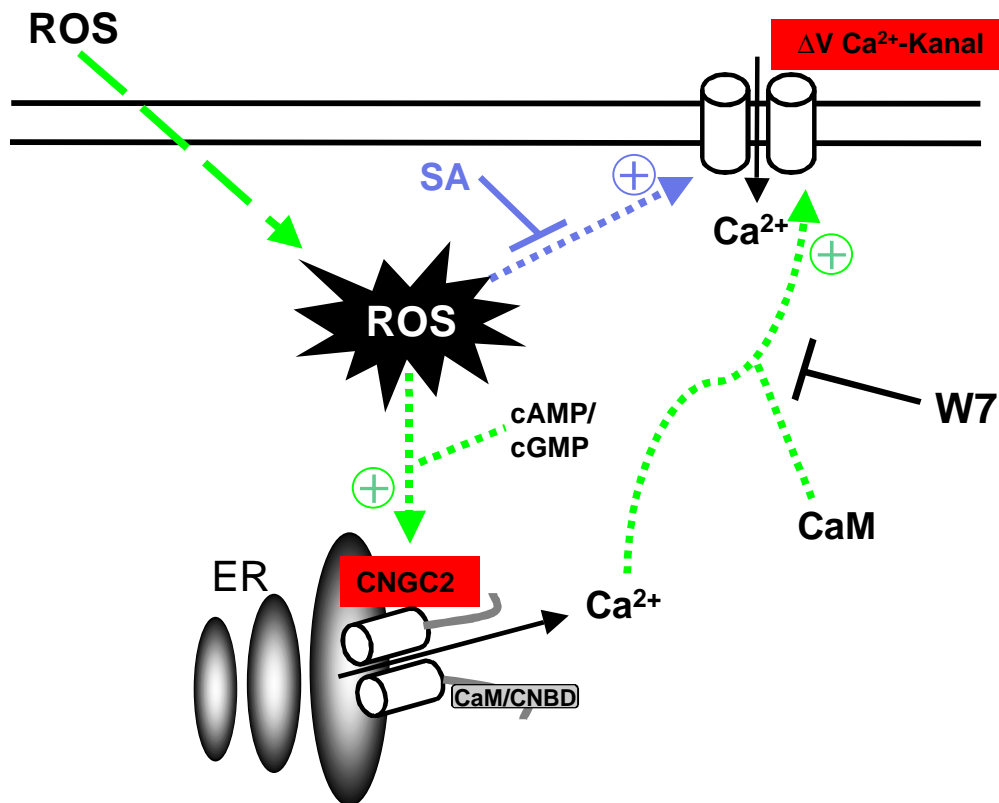


Abb. 38. Modell zur CNGC2-vermittelten Regulation Calcium-permeabler Kanäle in der Plasmamembran: Calcium release activated currents (I_{CRAC}) in Mesophyll-Protoplasten. ROS könnte, zusammen mit Hilfe von cyclischen Nucleotiden, endogen exprimierte CNGC2-Kanäle aktivieren. Weiterhin könnte CNGC2 Ca^{2+} ins Cytoplasma entlassen, welches zusammen mit CaM den Calcium-permeablen Kanal in der Plasmamembran aktiviert (Diese mögliche Signalkette wird durch die *grünen Pfeile* angedeutet). Dafür sprechen folgende Daten (genauer dazu, und Referenzen, siehe Text):

- Plasmamembran-Kanäle konnten nicht durch cycl. Nucleotide aktiviert werden, sowohl im *outside-out* Modus (d.h. der PM-Kanal ist nicht CNGC2), als auch im *cell-attached* Modus (d.h. cycl. Nucleotide alleine bewirken keine Aktivierung, sondern möglicherweise nur zusammen mit ROS).
- Der Unterschied (bzgl. H_2O_2 -induzierter Kanal-Aktivierung) zwischen *dnd1* und Wildtyp wurde nur bei intaktem Cytoplasma beobachtet.
- Eine Inhibierung im *cell-attached* Modus durch W7 ist möglich.
- CNGC2-GFP-Fusionskonstrukte sind möglicherweise im ER lokalisiert.
- CNGC2 ist Ca^{2+} -permeabel.
- Ca/CaM aktiviert Hyperpolarisations-abhängige Kanäle in der Plasmamembran.

Alternativ ist auch folgende Signalkette möglich (*blaue Pfeile*): Eine cytoplasmatische SA-Konzentration, die normalerweise durch CNGC2 reguliert werden könnte und deshalb in der *dnd1*-Mutante erhöht ist, könnte Auswirkungen auf Plasmamembran-Proteine haben. Somit könnte eine erhöhte SA-Konzentration eine Kanal-Aktivierung verhindern. Dagegen spricht aber:

- Eine H_2O_2 -Erhöhung bei intakten *dnd1*-Protoplasten auf 50 mM induzierte ebenfalls keine Ströme, d.h. SA und H_2O_2 wirken wahrscheinlich nicht direkt kompetitiv, eventuell wirkt SA aber zusammen mit unbekanntem Komponenten und verhindert somit eine Aktivierung.
- *dnd1/nahG*-Pflanzen können ebenso wie *dnd1* keine HR machen und bleiben zwergwüchsig, d.h. der Phänotyp wird nicht alleine durch hohe SA-Konzentrationen bewirkt.
- In *dnd1* ist eine Blaulicht-Aktivierung Calcium-permeabler Kanäle möglich, d.h. cytosolische Komponenten (z.B. SA) alleine verhindern nicht die Induktion eines Ca^{2+} -Influx.

4.6 Putative CNG-Kanäle in Pflanzen

In *Arabidopsis thaliana* wurden 20 putative CNG-Kanäle sequenziert und deren Homologie untereinander festgestellt (Kap. 1.2.3, Abb. 2). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Phänotypen der Mutanten *dnd1* bzw. *hlm1* durch Mutationen in den putativen CNG-Kanälen CNGC2 bzw. CNGC4 verursacht werden (Clough *et al.* 2000, Balague *et al.* 2003). Die Mutanten besitzen eine konstitutive Expression von Abwehr-Genen, erhöhte Salizylsäure-Werte, eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen sowie eine beeinträchtigte hypersensitive Reaktion. Eine funktionelle heterologe Expression der putativen CNG-Kanäle war bis jetzt nur teilweise möglich. Einige Daten bei CNGC2 deuten auf ihre Eigenschaft als K^+ -permeable Kanäle hin (Leng *et al.* 1999). Spätere Arbeiten schlugen vor, dass es sich um Kanäle, die für divalente Kationen permeabel sind, handelt (Sunkar *et al.* 2000, Leng *et al.* 2002). CNGC4 ist für K^+ und Na^+ permeabel (Balague *et al.* 2003). Es konnten jeweils nur wenige elektrophysiologische Aufzeichnungen in den heterologen Zellsystemen (*Xenopus laevis* Oocyten und HEK293-Zellen) durchgeführt werden. Die Autoren sehen die Ursache in einem niedrigen Expressions-Level, einer schnellen Inaktivierung oder einer toxischen Wirkung der Kanäle auf die Zellen. Auch die Bemühungen im Rahmen dieser Arbeit, CNGC2 funktionell zu exprimieren und biophysikalisch zu charakterisieren, waren problematisch, d.h. CNGC2-vermittelte Ströme konnten elektrophysiologisch nicht nachgewiesen werden (Kap. 3.5.1, Abb. 33). Auch die Deletion des N-Terminus, die eine mögliche posttranslationale Modifikation imitieren könnte, bewirkte keine elektrophysiologisch nachweisbare Funktionalität des Kanals. Die heterologe Expression der GFP-Konstrukte von CNGC2 und CNGC2 Δ 112 bestätigte, dass kein, oder nur teilweise ein Einbau in die Plasmamembran stattfindet (Kap. 3.5.1). Die Expression eines GFP-Konstrukts in pflanzlichen Zellen deutet auf eine Lokalisation von CNGC2 in Endomembranen hin, möglicherweise im ER (Kap. 3.3.5, Abb. 29). CNGC2 und CNGC4 weisen eine große Homologie untereinander auf, sie gehören zu einer Untergruppe, die nur aus diesen beiden Kanälen besteht (Maser *et al.* 2001 und Kap. 1.2.3, Abb. 2). Aufgrund ihrer Bedeutung in Signalketten der Pathogen-Abwehr (Kap. 3.3.1; Kap. 3.3.3; Kap. 4.3.1; Clough *et al.* 2000, Balague *et al.* 2003), ist die zukünftige Bemühung um eine eindeutige biophysikalische Charakterisierung sowie eine genauere Untersuchung ihrer physiologischen Funktionen unerlässlich.

Über einen weiteren putativen CNG-Kanal, CNBT1, ist bis auf die gezeigte elektrophysiologische Charakterisierung in HEK293-Zellen (Kap. 3.5.2), noch nichts bekannt. CNBT1 Δ 119 erwies sich als cyclisch-Nukleotid-aktivierter, Kationen-permeabler Kanal. Er vermittelte instantane Einwärts- und Auswärtsströme mit einer schwachen Spannung-Abhängigkeit. Die Lokalisationsstudien in HEK293-Zellen bestätigten, in Übereinstimmung mit den elektrophysiologischen Daten, die Lokalisation der N-terminalen Deletionsmutante in der Plasmamembran, die Volllänge hingegen bleibt im Cytosol (Kap. 3.5.2). Eine subzelluläre Lokalisation in pflanzlichen Zellen zeigte, dass der Kanal entweder ins ER und / oder in Peroxisomen eingebaut wird (Kap. 3.5.3). Untersuchungen hinsichtlich von Unterschieden in den elektrischen Eigenschaften der Plasmamembran von CNBT1-exprimierenden Protoplasten werden Aufschlüsse über eine mögliche regulatorische Funktion dieses Kanaltyps auf Kanäle in der Plasmamembran geben.

Untersuchungen der Genexpression von putativen CNG-Kanälen werden ebenfalls aufschlussreich über deren physiologischen Funktion sein. Eine Überprüfung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit und ohne H₂O₂-Behandlung ergab eine Regulation von CNGC11 und CNBT2 nach H₂O₂-Behandlung (Abb. 38, Daten aus Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre microarray database, <http://nasc.nott.ac.uk>; Experiment von M. Rentel, eingereicht am 16.10.2002). Interessanterweise konnte für CNBT2 eine Lokalisation in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Kap. 3.5.3). Alle anderen im *Microarray* getesteten CNG-Kanäle wiesen keine signifikante Änderung im Expressionslevel auf.

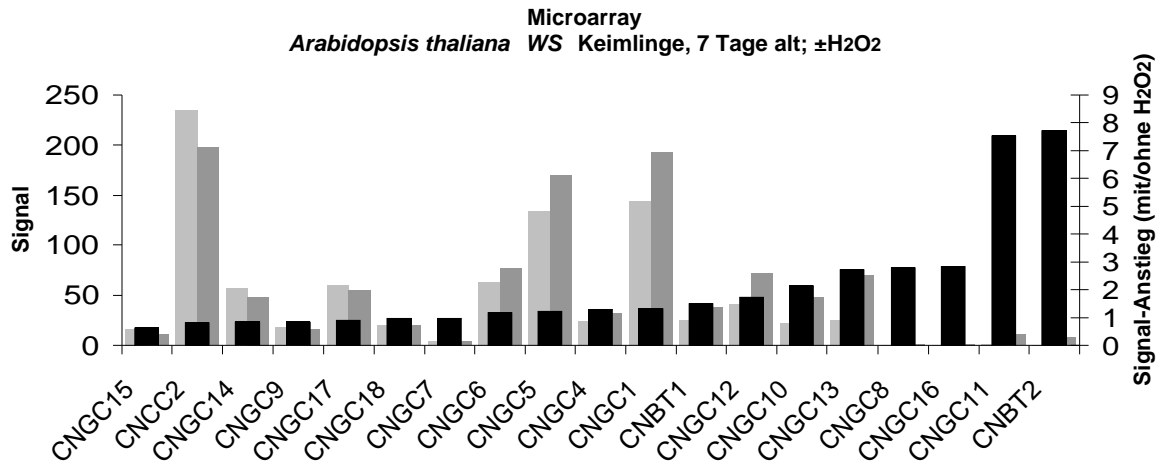


Abb. 38. H₂O₂-Regulation der Genexpression von CNG-Kanälen. Es wurden 7 Tage alte Keimlinge des Ökotyps *Wassilewskija* von *Arabidopsis thaliana* geprüft. Hellgraue Balken: Signale ohne H₂O₂-Behandlung; dunkelgraue Balken: Signale nach Applikation von 10 mM H₂O₂; schwarze Balken: Verhältnis der Signale mit / ohne H₂O₂-Behandlung (rechte Achse).

Die Bedeutung einer H₂O₂-Regulation der Expressionslevel von CNGC11 und CNBT2 muss in weiteren physiologischen Experimenten überprüft werden. Speziell die weitere Untersuchung an CNBT2 scheint interessant, da dessen Expression durch H₂O₂ reguliert und der Kanal in der Plasmamembran lokalisiert ist, und somit einer elektro-physiologischen Ableitung zugänglich ist.

4.7 Ausblick

Einige der frühesten Ereignisse während biotischer oder abiotischer Reize und Stress ist ein cytoplasmatischer Ca^{2+} -Anstieg. Aufgrund der Erkenntnis, dass Plasmamembran-lokalisierte, Calcium-permeable Kanäle in Pflanzen eine Rolle in Signalketten nach Blaulicht-Perzeption sowie bei der Pathogen-Abwehr spielen, ist eine Grundlage geschaffen worden, weitere Funktionen sowie die Regulation der Kanäle durch sekundäre Botenstoffe zu erforschen. Putative pflanzliche CNG-Kanäle werden durch verschiedene experimentelle Ansätze wie heterologe Expression oder Überprüfung der Mutanten besser verstanden werden. Durch Lokalisationsstudien mit Antikörpern gegen putative CNG-Kanäle werden diese Gruppe in ein ganzheitliches Modell integriert werden können, welches die mögliche Rolle dieser Kanäle als Regulatoren der cytoplasmatischen Ionen-Homöostase beschreibt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Ziel:

Calcium ist in vielen Signalkaskaden ein wichtiger sekundärer Botenstoff. Trotz verschiedener Hinweise auf die Existenz von Calcium-permeablen Kanälen in Pflanzen konnten bisher nur wenige elektrophysiologisch nachgewiesen werden (Kap. 1.1.2). Das Ziel der Arbeit war es, Calcium-permeable Kanäle in Mesophyllzellen elektrophysiologisch zu charakterisieren und ihre Rolle in Blaulicht- und ROS-abhängigen Signalketten zu studieren.

Ergebnisse:

1. Mesophyllzellen von *Arabidopsis thaliana* sind mit Hyperpolarisations-abhängigen, Calcium-permeablen Kanälen ausgestattet. In Ca^{2+} -haltigen Lösungen folgte die Nullstromspannung der Nernst-Spannung mit 27 mV bei einer zehnfachen Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration. Die Sequenz an relativen Stromamplituden ergab Ba^{2+} ($131,8 \pm 20$) > Ca^{2+} (100) > Mg^{2+} ($84,3 \pm 18$). Der makroskopische Strom wurde auf der Basis einer $7,2 \pm 1$ pS-Leitfähigkeit bei einer Pipettenlösung mit 10 mM Ba^{2+} in der *cell-attached* Konfiguration gebildet. Die Kanäle waren sensitiv gegenüber Lanthan und Gadolinium, wobei die Stromamplitude bei 100 μM Lanthan um $97,2 \pm 7$ % und bei 100 μM Gadolinium um $95,2 \pm 7$ % reduziert wurde.
2. Blaulicht induzierte den Hyperpolarisations-abhängigen, Calcium-permeablen Kanal in dunkeladaptierten, intakten Mesophyll-Protoplasten. Die Aktivierung war zeitabhängig und der Stromanstieg erreichte eine Sättigung nach 11-16 Minuten. Weiterhin wurde bestimmt, dass eine Kanalaktivität erst bei einer Intensität an Blaulicht $> 50 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^1$ induziert wird. Aufgrund der Tatsache, dass der photosynthetische Elektronentransport-Entkoppler DCMU die Aktivierung nicht verhinderte, konnte eine Beteiligung des Photosyntheseapparates ausgeschlossen werden. Eine Inhibierung der Aktivierung nach Inkubation mit dem Kinase-Inhibitor K252a war ein erster Hinweis für die Beteiligung von Phototropinen als relevante Blaulicht-Rezeptoren, da Phototropine eine Kinase-Funktion besitzen. Diese Hypothese bestätigte sich nach Überprüfung der Phototropin-*knockout*-

Mutanten *phot1-5* und *phot1-5 phot2-1*. Da die Aktivierung in *phot1-5* reduziert war und in *phot1-5 phot2-1* keine Aktivierung der Kanäle durch Blaulicht mehr möglich war, konnte auf eine überlappende Funktion beider Photorezeptoren bezüglich der Aktivierung von Calcium-permeablen Kanälen geschlossen werden. Dagegen konnte eine Beteiligung weiterer Blaulicht-Rezeptoren, der Cryptochrome, ausgeschlossen werden.

3. Neben Blaulicht aktivierten auch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) Hyperpolarisation-abhängige, Calcium-permeable Kanäle. Protoplasten mit intaktem Cytoplasma (*cell-attached* Konfiguration) zeigten nach Applikation von 5 mM H₂O₂ eine zeitabhängige Aktivierung der Lanthan-sensitiven Kanäle. Eine Sättigung des Stromanstiegs wurde nach ca. 25 Minuten erreicht. Neben dem Wildtyp (Col-0) wurde die Mutante *dnd1* hinsichtlich Calcium-permeabler Kanäle überprüft. Sie besitzt einen nicht-funktionellen putativen cyclisch-Nukleotid-aktivierten Kanal, CNGC2, und zeigt Phänotypen bei der Pathogenabwehr. Eine histochemische DAB-Färbung ergab, dass *dnd1* eine dem Wildtyp vergleichbare ROS-Produktion nach Inokulation mit avirulenten *Pseudomonas syringae* DC 3000 pv. *tomato avrB* besitzt. Da eine ROS- bzw. H₂O₂-Produktion, ein wichtiger initiiender Schritt bei Abwehrmechanismen, in der Mutante nicht beeinträchtigt war, wurde überprüft, ob ROS-aktivierte, Calcium-permeable Kanäle in *dnd1* beobachtet werden konnten. Nach Applikation von 5 mM H₂O₂ zu intakten Protoplasten wurde keine dem Wildtyp vergleichbare Aktivierung Calcium-permeabler Kanäle festgestellt. Daraufhin konnte spekuliert werden, dass CNGC2 im Wildtyp den Calcium-permeablen Kanal repräsentiert. Eine Blaulicht-Aktivierung der Calcium-permeablen Kanäle in der Kanal-Mutante war jedoch möglich, was die Frage aufkommen ließ, ob es sich um verschiedene Kanäle mit denselben elektrophysiologischen Charakteristika handelt, oder ob es sich bei dem H₂O₂-aktivierten und dem Blaulicht-aktivierten Kanal um denselben Kanal handelt, der durch verschiedene Signalketten angeschaltet wird. Cyclische Nukleotide (cAMP) konnten die Kanäle in Wildtyp-Protoplasten nicht aktivieren, was dagegen sprach, dass es sich um CNGC2 handelte. Bei einem Verlust des intakten Cytoplasmas (*outside-out* Konfiguration) wurde jedoch eine Aktivität der Kanäle sowohl im Wildtyp als auch in *dnd1* beobachtet. Die Applikation von 5 mM H₂O₂ in dieser Konfiguration bewirkte auch jeweils einen Anstieg der Stromamplitude,

d.h. H_2O_2 kann, möglicherweise aufgrund einer veränderten bzw. fehlenden Komposition an H_2O_2 -regulierenden, cytoplasmatischen Komponenten, die Kanalaktivität regulieren. Daraufhin wurde gefolgert, dass CNGC2 nicht den beobachteten Calcium-permeablen Kanal repräsentiert und dass CNGC2 in der Signalkette vor der Aktivierung der Hyperpolarisation-abhängigen, Calcium-permeablen Kanäle stehen muss. Eine Inhibierung der H_2O_2 -aktivierten Ströme durch den Calmodulin-Inhibitor W7 wies auf eine Beteiligung eines Calmodulin-abhängigen Schritts in der Signalkette hin.

Untersuchungen des Calcium-permeablen Kanals in der *outside-out* Konfiguration mit einer dem Cytoplasma ähnlichen internen Lösung ergab, dass eine Kanalaktivität durch eine erhöhte Calcium-Konzentration (21 μM) bei Vorhandensein von Calmodulin induziert werden konnte. Cyclische Nukleotide aktivierten wie erwartet keine Hyperpolarisation-abhängigen, Calcium-permeablen Kanäle. Dies deutete darauf hin, dass CNGC2 die Calcium-permeablen Kanäle über einen Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Schritt in einer H_2O_2 -induzierten Signalkette regulieren könnte.

Lokalisationsstudien mit einem GFP-CNGC2-Fusionskonstrukt (CNGC2::mGFP4/pPILY) zeigten, dass der Kanal *in vivo* im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sein könnte. Dies bestätigte die Hypothese, dass CNGC2 nicht den Calcium-permeablen Kanal in der Plasmamembran repräsentiert und dass der Verlust der Kanalaktivität in *dnd1* in einer beeinträchtigten Signalkette zu suchen ist. Die Expression geeigneter GFP-Konstrukte in einem heterologen Zellsystem (HEK-Zellen) bestätigte ebenfalls, dass sowohl die Volllänge als auch eine N-Terminale Deletionsmutante von CNGC2 (CNGC2::EGFP/pcDNA3.1 bzw. CNGC2- Δ 112::EGFP/pcDNA3.1) nicht in die Plasmamembran eingebaut wird und demnach elektrophysiologisch in dieser Zelllinie nicht nachweisbar war.

4. Mit einem Luminometer wurden Ca^{2+} -Messungen an Protoplasten-Suspensionen von Apoaequorin-exprimierenden C24-Pflanzen durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurde ein ROS-aktiviertes Ca^{2+} -Signal beobachtet. Nach Injektion von 5 mM H_2O_2 wurde dabei in rekonstituierten C24-Mesophyll-Protoplasten ein im Vergleich zur Kontrolle instantan erhöhter Ca^{2+} -Level detektiert.

5. Die elektrophysiologische Untersuchung des putativen pflanzlichen CNG-Kanals CNBT1 in HEK-Zellen ergab, dass eine N-Terminale Deletionsmutante, nicht aber die Volllänge des Kanals funktionell ist (CNBT1/pA/pCiNeo bzw. CNBT1- Δ 119/pcDNA3.1). CNBT1 Δ 119 vermittelte instantane, Kationen-selektive und cyclisch-Nukleotid-abhängige Ein- und Auswärtsströme mit schwacher Spannungsabhängigkeit. Die Volllänge war elektrophysiologisch nicht nachweisbar. Die daraus resultierende Vermutung, dass die Deletionsmutante in der Plasmamembran funktionell eingebaut wird, nicht aber die Volllänge, konnten durch Lokalisationsstudien anhand von GFP-Konstrukten (CNBT1::smGFP/pA/pCiNeo bzw. CNBT1- Δ 119::smGFP/pcDNA3.1) in demselben heterologen Zellsystem bestätigt werden. In pflanzlichen Zellen zeigte die subzelluläre Lokalisation der Volllänge (CNBT1::mGFP4/pPILY) eine Expression in Endomembranen. CNBT1 könnte demnach in *Arabidopsis thaliana* ein endogen lokalisierter, cyclisch Nukleotid-aktivierter, nicht-selektiver Kationenkanal sein.

Summary

Background and objective:

Calcium is an important second messenger in many signaling cascades. Despite of several hints for the existence of calcium-permeable channels in plants, only few have been characterized electrophysiologically so far. This thesis aimed to characterize calcium-permeable channels in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells and to examine their physiological role and regulation in blue-light and ROS-dependent signaling cascades.

Results:

1. Hyperpolarisation-dependent, calcium-permeable channels have been found in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells. In Ca^{2+} -containing solutions, the reversal potential shifted 27 mV with a tenfold increase of the Ca^{2+} -concentration. The relative sequence of permeability was Ba^{2+} ($131,8 \pm 20$) > Ca^{2+} (100) > Mg^{2+} ($84,3 \pm 18$). The macroscopic current in the cell-attached configuration was based on a $7,2 \pm 1$ pS-conductance with 10 mM Ba^{2+} in the pipette solution. The channels were sensitive to lanthanum and gadolinium. Current amplitudes decreased $97,2 \pm 7$ % after application of 100 μM La^{3+} and $95,2 \pm 7$ % after application of 100 μM Gd^{3+} .
2. Blue-light (450-490 nm) induced hyperpolarisation-dependent, calcium-permeable channels in dark-adapted mesophyll-protoplasts with intact cytoplasm. The current increase was time-dependent and saturated after 11-16 minutes. Examining the dose dependence of channel activation revealed that $> 50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$ blue-light induces channel activity. Photosynthesis was shown to be not involved in the signaling cascade since the photosynthetic electron-transport inhibitor DCMU did not inhibit channel activation. The inhibition of channel activation with the kinase inhibitor K252a pointed to the involvement of phototropins. This hypothesis proved to be true when the phototropin knockout mutants *phot1-5* and *phot1-5 phot2-1* were examined. In *phot1-5*, the activation was clearly reduced and in *phot1-5 phot2-1* no blue-light activation was observed anymore. Furthermore, this pointed to an overlapping function of both photoreceptors. The involvement of cryptochromes, further blue-light receptors, could be expected.

3. Beside blue-light, also reactive oxygen species (ROS) were shown to activate calcium-permeable channels in intact mesophyll protoplasts. After application of 5 mM H₂O₂, lanthanum-sensitive channels showed a time-dependent current increase with a saturation after approx. 25 minutes. Beside wildtype-plants (Col-0), also the mutant *dnd1* has been tested. *dnd1* is characterized by a truncated protein of a putative cyclic-nucleotide-gated channel, CNGC2. The plants are dwarfed in stature, have an elevated level of salicylic acid and exhibit a resistance against a variety of virulent bacterial, fungal and viral pathogens without developing a hypersensitive response. After inoculation of leaves with *Pseudomonas syringae* DC 3000 pv. *tomato avrB*, *dnd1* showed a production of ROS like the wildtype. In contrast, an activation of calcium-permeable channels by ROS was not observed. A blue-light-dependent activation of calcium-permeable channels was still possible. This raised the question if blue-light and H₂O₂ activate the same channel via different signaling cascades or if there are two calcium-permeable channels. Cyclic nucleotides alone did not activate the channels, pointing to the possibility that CNGC2 does not represent the calcium-permeable channel. Furthermore, when the intact cytoplasm was lost (outside-out configuration), H₂O₂-induced channel activity was also observed in *dnd1*, possibly due to the loss of a composition of regulating compounds in the cytoplasm. Therefore it was concluded that CNGC2 does not represent the observed calcium-permeable channel and that CNGC2 is placed upstream of the activation of these channels. An inhibition of the H₂O₂-induced channel activation by the calmodulin (CaM) inhibitor W7 pointed to the involvement of a CaM-dependent step in the signaling cascade.

When the cytoplasm was replaced with a pipette solution containing an elevated level of Ca²⁺ (21 μM) and CaM, channel activity was induced. Ca²⁺, cyclic nucleotides or CaM alone did not have this effect. This pointed to the possibility, that CNGC2 might activate calcium-permeable channels via a Ca²⁺/CaM-dependent signaling pathway.

Subcellular localisation studies with a GFP-fusionconstruct (CNGC2::mGFP4/pPILY) revealed that CNGC2 might be located in the endoplasmatic reticulum. This reinforced the hypothesis that CNGC2 does not represent the calcium-permeable channel in the plasma membrane and that the loss of channel activity in *dnd1* is due to an impaired signaling cascade. Also the expression of GFP-labeled CNGC2 in a heterologous system (HEK293 cells) showed that neither the full-

length nor a mutant containing a partly deletion of the N-terminal end (CNGC2::EGFP/pcDNA3.1 or CNGC2- Δ 112::EGFP/pcDNA3.1) is transported to the plasma membrane. Therefore no electrophysiological characterization of CNGC2 in this cell line was possible.

4. Ca^{2+} -measurements with mesophyll protoplasts of apoaequorin-expressing C24-plants showed an instantaneous increased calcium-level after injection of H_2O_2 to mesophyll-protoplasts.
5. The electrophysiological examination of the putative plant CNG-channel CNBT1 in HEK293 cells revealed that an N-terminal deletion mutant (CNBT1- Δ 119::smGFP/pcDNA3.1), but not the full-length (CNBT1::smGFP /pA/pCiNeo), is functional in electrophysiological experiments. CNBT1 Δ 119-transfected cells show instantaneous, cation-selective and cyclic nucleotide activated inward and outward currents with a weak voltage-dependence. The full-length could not be detected electrophysiologically. Corresponding GFP-fusions (CNBT1::smGFP /pA/pCiNeo or CNBT1- Δ 119::smGFP/pcDNA3.1) confirmed the results. The CNBT1 Δ 119::GFP-fusion construct showed fluorescence in the plasmamembrane of HEK293 cells, whereas the full-length showed a fluorescence in the cytoplasm. Subcellular localisation studies of the full-length channel (CNBT1::mGFP4/pPILY) *in vivo* revealed the expression of CNBT1 in endomembranes.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmad, M., and A. R. Cashmore. 1993.** HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366: 162-6.
- Ahmad, M., J. A. Jarillo, and A. R. Cashmore. 1998a.** Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* 10: 197-207.
- Ahmad, M., J. A. Jarillo, O. Smirnova, and A. R. Cashmore. 1998b.** The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Mol Cell* 1: 939-48.
- Allen, G. J., and D. Sanders. 1994.** Two voltage-gated, calcium release channels coreside in the vacuolar membrane of broad bean guard cells. *Plant Cell* 6: 685-694.
- Allen, G. J., and D. Sanders. 1997.** Vacuolar ion channels in plants. *Advances in Botanical Research* 25: 217-252.
- Allen, G. J., S. R. Muir, and D. Sanders. 1995.** Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* 268: 735-7.
- Anderson, J. A., S. S. Huprikar, L. V. Kochian, W. J. Lucas, and R. F. Gaber. 1992.** Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3736-40.
- Antoine, A. F., J. E. Faure, S. Cordeiro, C. Dumas, M. Rougier, and J. A. Feijo. 2000.** A calcium influx is triggered and propagates in the zygote as a wavefront during in vitro fertilization of flowering plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10643-8.
- Arazi, T., B. Kaplan, and H. Fromm. 2000.** A high-affinity calmodulin-binding site in a tobacco plasma-membrane channel protein coincides with a characteristic element of cyclic nucleotide-binding domains. *Plant Mol Biol* 42: 591-601.
- Arazi, T., R. Sunkar, B. Kaplan, and H. Fromm. 1999.** A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J* 20: 171-82.
- Armstrong, C. M., and R. H. Chow. 1987.** Supercharging: a method for improving patch-clamp performance. *Biophys J* 52: 133-6.
- Asada, K. 1999.** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 50: 601-639.
- Augustynowicz, J., M. Lekka, K. Burda, and H. Gabrys. 2001.** Correlation between chloroplast motility and elastic properties of tobacco mesophyll protoplasts. *Acta Physiologiae Plantarum* 23: 291-302.
- Babourina, O., I. Newman, and S. Shabala. 2002.** Blue light-induced kinetics of H⁺ and Ca²⁺ fluxes in etiolated wild-type and phototropin-mutant *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2433-2438.
- Balague, C., B. Lin, C. Alcon, G. Flottes, S. Malmstrom, C. Kohler, G. Neuhaus, G. Pelletier, F. Gaymard, and D. Roby. 2003.** HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell*: tpc.006999.
- Batschauer, A. 1999.** Light perception in higher plants. *Cell Mol Life Sci* 55: 153-66.
- Baum, G., J. C. Long, G. I. Jenkins, and A. J. Trewavas. 1999.** Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13554-9.
- Baumann, A., S. Frings, M. Godde, R. Seifert, and U. B. Kaupp. 1994.** Primary structure and functional expression of a *Drosophila* cyclic nucleotide-gated channel present in eyes and antennae. *EMBO* 13: 5040-5050.

- Becker, D., C. Zeilinger, G. Lohse, H. Depta, and R. Hedrich. 1993.** Identification and biochemical characterization of the plasma-membrane proton ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 190: 44-50.
- Beffa, R., M. Szell, P. Meuwly, A. Pay, R. Vogeli-Lange, J. P. Metraux, G. Neuhaus, F. Meins, Jr., and F. Nagy. 1995.** Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *Embo J* 14: 5753-61.
- Bennett, J. A., K.; Lafitte, R.; Wen, J.; Rudd, S.; Bruskiewich, R. M.; 2002.** IRRI Drought Stress Panicle cDNA Library.
- Biel, M., X. Zong, M. Distler, E. Bosse, N. Klugbauer, M. Murakami, V. Flockerzi, and F. Hofmann. 1994.** Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3505-9.
- Bindschedler, L. V. M., F.; Gardner, S. L.; Gerrish, C.; Davies, D. R.; Bolwell, G. P. 2001.** Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺. *New Phytol* 151: 185-194.
- Blaustein, M. P., and W. J. Lederer. 1999.** Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79: 763-854.
- Blume, B., T. Nurnberger, N. Nass, and D. Scheel. 2000.** Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12: 1425-40.
- Bolwell, G. P. 1992.** A role for phosphorylation in the down-regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension-cultured cells of French bean. *Phytochemistry* 31: 4081-4086.
- Bolwell, G. P. 1995.** Cyclic AMP, the reluctant messenger in plants. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 492-495.
- Bolwell, G. P., L. V. Bindschedler, K. A. Blee, V. S. Butt, D. R. Davies, S. L. Gardner, C. Gerrish, and F. Minibayeva. 2002.** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* 53: 1367-76.
- Bonas, U. 1994.** hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 192: 79-98.
- Boominathan, R., and P. M. Doran. 2003.** Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *J Biotechnol* 101: 131-46.
- Bowler, C., H. Yamagata, G. Neuhaus, and N. H. Chua. 1994a.** Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev* 8: 2188-202.
- Bowler, C., G. Neuhaus, H. Yamagata, and N. H. Chua. 1994b.** Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* 77: 73-81.
- Bradley, D. J., P. Kjellbom, and C. J. Lamb. 1992.** Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70: 21-30.
- Brenner, E. D., N. Martinez-Barboza, A. P. Clark, Q. S. Liang, D. W. Stevenson, and G. M. Coruzzi. 2000.** *Arabidopsis* mutants resistant to S⁽⁺⁾-beta-methyl-alpha, beta-diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist. *Plant Physiol* 124: 1615-24.
- Briggs, W. R., and E. Huala. 1999.** Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 33-62.
- Briggs, W. R., and J. M. Christie. 2002.** Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* 7: 204-10.
- Briggs, W. R., J. M. Christie, and M. Salomon. 2001a.** Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxid Redox Signal* 3: 775-88.

- Briggs, W. R., C. F. Beck, A. R. Cashmore, J. M. Christie, J. Hughes, J. A. Jarillo, T. Kagawa, H. Kanegae, E. Liscum, A. Nagatani, K. Okada, M. Salomon, W. Rudiger, T. Sakai, M. Takano, M. Wada, and J. C. Watson. 2001b.** The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* 13: 993-997.
- Brisson, L. F., R. Tenhaken, and C. Lamb. 1994.** Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *Plant Cell* 6: 1703-1712.
- Bruggemann, A., L. A. Pardo, W. Stuhmer, and O. Pongs. 1993.** Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K^+ and Ca^{2+} and modulated by cAMP. *Nature* 365: 445-8.
- Carafoli, E., and T. Stauffer. 1994.** The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol* 25: 312-24.
- Cashmore, A. R., J. A. Jarillo, Y. J. Wu, and D. Liu. 1999.** Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760-765.
- Chen, C., and H. Okayama. 1987.** High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7: 2745-52.
- Cho, M. H., and E. P. Spalding. 1996.** An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8134-8.
- Christie, J. M., and W. R. Briggs. 2001.** Blue light sensing in higher plants. *J Biol Chem* 276: 11457-60.
- Clark, G. B., A. Sessions, D. J. Eastburn, and S. J. Roux. 2001.** Differential expression of members of the annexin multigene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 1072-84.
- Clarke, A., R. Desikan, R. D. Hurst, J. T. Hancock, and S. J. Neill. 2000.** NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* 24: 667-77.
- Clough, S. J., K. A. Fengler, I. C. Yu, B. Lippok, R. K. Smith, Jr., and A. F. Bent. 2000.** The *Arabidopsis* dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9323-8.
- Collinge, M., and A. J. Trewavas. 1989.** The location of calmodulin in the pea plasma membrane. *J Biol Chem* 264: 8865-72.
- Connell, G. J., and R. S. Molday. 1990.** Molecular cloning, primary structure, and orientation of the vertebrate photoreceptor cell protein peripherin in the rod outer segment disk membrane. *Biochemistry* 29: 4691-8.
- Cooke, C. J. 1994.** Evidence that cyclic AMP is involved in the hypersensitive response of *Medicago sativa* to a fungal elicitor. *Phytochemistry* 35: 889-895.
- Coronado, R., J. Morrisette, M. Sukhareva, and D. M. Vaughan. 1994.** Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 266: C1485-504.
- 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: 143-153.
- Cousson, A., and A. Vavasseur. 1998.** Putative involvement of cytosolic Ca^{2+} and GTP-binding proteins in cyclic-GMP-mediated induction of stomatal opening by auxin in *Commelina communis* L. *Planta* (Berlin) 206: 308-314.
- D'Souza, C. A., and J. Heitman. 2001.** Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol Rev* 25: 349-64.
- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranova, M. Van Montagu, D. Inze, and F. Van Breusegem. 2000.** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57: 779-95.
- Delledonne, M., Y. Xia, R. A. Dixon, and C. Lamb. 1998.** Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-8.

- Delledonne, M., J. Zeier, A. Marocco, and C. Lamb. 2001.** Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13454-9.
- Demidchik, V. D., R. J.; Tester, M. 2002.** Nonselective Cation Channels In Plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 67-107.
- Dennison, K. L., and E. P. Spalding. 2000.** Glutamate-gated calcium fluxes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124: 1511-4.
- Dietrich, R. A., M. H. Richberg, R. Schmidt, C. Dean, and J. L. Dangl. 1997.** A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88: 685-94.
- Ding, J. P., and B. G. Pickard. 1993.** Modulation of mechanosensitive calcium-selective cation channels by temperature. *Plant J* 3: 713-20.
- Distler, M., M. Biel, V. Flockerzi, and F. Hofmann. 1994.** Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology* 33: 1275-82.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 1998.** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.
- Durner, J., D. Wendehenne, and D. F. Klessig. 1998.** Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10328-33.
- Duval, F. D., M. Renard, M. Jaquinod, V. Biou, F. Montrichard, and D. Macherel. 2002.** Differential expression and functional analysis of three calmodulin isoforms in germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds. *Plant J* 32: 481-93.
- Dzeja, C., V. Hagen, U. B. Kaupp, and S. Frings. 1999.** Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *Embo J* 18: 131-44.
- Ebel, J. 1998.** Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *Bioessays* 20: 569-76.
- Elzenga, J.-T.-M., and V.-E. Van. 1997.** Characterization of a light-controlled anion channel in the plasma membrane of mesophyll cells of pea. *Plant-Physiology* 113: 1419-1426.
- Elzenga, J. T., and E. Van volkenburgh. 1997.** Kinetics of Ca²⁺- and ATP-dependent, voltage-controlled anion conductance in the plasma membrane of mesophyll cells of *Pisum sativum*. *Planta* 201: 415-23.
- Evenas, J., A. Malmendal, and S. Forsen. 1998.** Calcium. *Current Opinion in Chemical Biology* 2: 293-302.
- Folta, K. M., and E. P. Spalding. 2001.** Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant J* 26: 471-8.
- Foreman, J., V. Demidchik, J. H. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M. A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J. D. Jones, J. M. Davies, and L. Dolan. 2003.** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-6.
- Franklin-Tong, V. E., B. K. Drobak, A. C. Allan, P. Watkins, and A. J. Trewavas. 1996.** Growth of Pollen Tubes of *Papaver rhoeas* Is Regulated by a Slow-Moving Calcium Wave Propagated by Inositol 1,4,5-Trisphosphate. *Plant Cell* 8: 1305-1321.
- Franzini-Armstrong, C., and F. Protasi. 1997.** Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev* 77: 699-729.
- Fricker, M. D., S. Gilroy, N. D. Read, and A. J. Trewavas. 1991.** Visualisation and measurement of the calcium message in guard cells. *Symp Soc Exp Biol* 45: 177-90.

- Frings, S., R. Seifert, M. Godde, and U. B. Kaupp. 1995.** Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15: 169-179.
- Fryer, M. J., L. Ball, K. Oxborough, S. Karpinski, P. M. Mullineaux, and N. R. Baker. 2003.** Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves. *Plant J* 33: 691-705.
- Furuichi, T., K. Kohda, A. Miyawaki, and K. Mikoshiba. 1994.** Intracellular channels. *Curr Opin Neurobiol* 4: 294-303.
- Galione, A., H. C. Lee, and W. B. Busa. 1991.** Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* 253: 1143-6.
- Galvan, D. L., E. Borrego-Diaz, P. J. Perez, and G. A. Mignery. 1999.** Subunit oligomerization, and topology of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 274: 29483-92.
- Gelli, A., and E. Blumwald. 1993.** Calcium Retrieval from Vacuolar Pools (Characterization of a Vacuolar Calcium Channel). *Plant Physiol* 102: 1139-1146.
- Gelli, A., and E. Blumwald. 1997.** Hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channels in the plasma membrane of tomato cells. *J Membr Biol* 155: 35-45.
- Gelli, A., V. J. Higgins, and E. Blumwald. 1997.** Activation of plant plasma membrane Ca²⁺-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant-Physiology* 113: 269-279.
- Genazzani, A. A., and R. A. Billington. 2002.** NAADP: an atypical Ca²⁺-release messenger? *Trends Pharmacol Sci* 23: 165-7.
- Gerke, V., and S. E. Moss. 2002.** Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82: 331-71.
- Glitsch, M. D., D. Bakowski, and A. B. Parekh. 2002.** Store-operated Ca²⁺ entry depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake. *EMBO J.* 21: 6744-6754.
- Goh, C. H., P. Dietrich, R. Steinmeyer, U. Schreiber, H. G. Nam, and R. Hedrich. 2002.** Parallel recordings of photosynthetic electron transport and K⁺-channel activity in single guard cells. *Plant J* 32: 623-630.
- Goldman, D. E. 1943.** Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27: 37-60.
- Grant, J. J., and G. J. Loake. 2000.** Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* 124: 21-9.
- Grant, M., I. Brown, S. Adams, M. Knight, A. Ainslie, and J. Mansfield. 2000.** The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J* 23: 441-50.
- Guern, J. F., H. Mathieu, Y.; Kurkdijan, A.;. 1991.** Regulation of intracellular pH in plant cells. *Int. Rev. Cyt.* 127: 111-173.
- Guo, H., H. Yang, T. C. Mockler, and C. Lin. 1998.** Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279: 1360-3.
- Guo, H., T. Mockler, H. Duong, and C. Lin. 2001.** SUB1, an *Arabidopsis* Ca²⁺-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* 291: 487-90.
- Hahlbrock, K., D. Scheel, E. Logemann, T. Nurnberger, M. Parniske, S. Reinold, W. R. Sacks, and E. Schmelzer. 1995.** Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4150-7.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981.** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100.

- Hamilton, D. W., A. Hills, B. Köhler, and M. R. Blatt. 2000.** Ca^{2+} channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4967-4972.
- Hancock, J. T., R. Desikan, and S. J. Neill. 2001.** Hydrogen peroxide and nitric oxide in plant defence: Revealing potential targets for oxidative stress tolerance? *Biofactors* 15: 99-101.
- Harmon, A. C., H. W. Jarrett, and M. J. Cormier. 1984.** An enzymatic assay for calmodulins based on plant NAD kinase activity. *Anal Biochem* 141: 168-78.
- Harmon, A. C., M. Gribskov, and J. F. Harper. 2000.** CDPKs - a kinase for every Ca^{2+} signal? *Trends Plant Sci* 5: 154-9.
- Harper, J. F. 2001.** Dissecting calcium oscillators in plant cells. *Trends Plant Sci* 6: 395-7.
- Hedrich, R., and P. Dietrich. 1996.** Plant K^+ channels: similarity and diversity. *Bot. Acta* 109: 94-101.
- Hedrich, R., S. Hoth, D. Becker, I. Dreyer, and P. Dietrich. 1998.** On the structure and function of plant K^+ channels, pp. 35-45. *In* F. Lo Schiavo, R. L. Last, G. Morelli and N. V. Reikhel [eds.], NATO ASI Series. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hedrich, R., H. Barbier-Brygoo, H. Felle, U. I. Flügge, U. Lüttge, F. J. M. Maathuis, S. Marx, H. B. A. Prins, K. Raschke, H. Schnabl, I. Schroeder Julian, I. Struve, L. Taiz, and P. Zeiger. 1988.** General mechanisms for solute transport across the tonoplast of plant vacuoles: a patch clamp survey of ion channels and proton pumps. *Bot. Acta* 101: 7-13.
- Hille, B. 2001.** Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Hirschi, K. D., R. G. Zhen, K. W. Cunningham, P. A. Rea, and G. R. Fink. 1996.** CAX1, an $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8782-6.
- Hockberger, P. E., T. A. Skimina, V. E. Centonze, C. Lavin, S. Chu, S. Dadras, J. K. Reddy, and J. G. White. 1999.** Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H_2O_2 in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6255-60.
- Hoffman, P. D., A. Batschauer, and J. B. Hays. 1996.** PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol Gen Genet* 253: 259-65.
- Hoshi, T. 1995.** Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors. *J Gen Physiol* 105: 309-28.
- Hoth, M., and R. Penner. 1992.** Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355: 353-6.
- Huang, K., T. Merkle, and C. F. Beck. 2002.** Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* gene that encodes a putative blue-light photoreceptor of the phototropin family. *Physiol Plant* 115: 613-622.
- Hussain, A., and G. Inesi. 1999.** Involvement of Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases in cell function and the cellular consequences of their inhibition. *J Membr Biol* 172: 91-9.
- Ichikawa, T., Y. Suzuki, I. Czaja, C. Schommer, A. Lessnick, J. Schell, and R. Walden. 1997.** Identification and role of adenylyl cyclase in auxin signalling in higher plants. *Nature* 390: 698-701.
- Jabs, T., R. A. Dietrich, and J. L. Dangl. 1996.** Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273: 1853-6.
- Jabs, T., M. Tschoepe, C. Colling, K. Hahlbrock, and D. Scheel. 1997.** Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4800-4805.

- Jarillo, J. A., H. Gabrys, J. Capel, J. M. Alonso, J. R. Ecker, and A. R. Cashmore. 2001.** Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410: 952-954.
- Johannes, E., and D. Sanders. 1995.** Lumenal calcium modulates unitary conductance and gating of a plant vacuolar calcium release channel. *J Membr Biol* 146: 211-24.
- Johannes, E., J. M. Brosnan, and D. Sanders. 1992.** Parallel pathways for intracellular Ca^{2+} release from the vacuole of higher plants. *The Plant Journal* 2: 97-102.
- Johannes, E., G. Allen, and D. Sanders. 1994.** Voltage-gated Ca^{2+} release channels in vacuolar membranes from beet storage roots and guard cells. *Symp Soc Exp Biol* 48: 113-22.
- Jones, A. 2000.** Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci* 5: 225-30.
- Kadota, A., and M. Wada. 1992.** Photoorientation of chloroplasts in protonemal cells of the fern *Adiantum* as analyzed by use of a video-tracking system. *Bot. Mag. Tokyo* 105.
- Kagawa, T., and M. Wada. 2000.** Blue light-induced chloroplast relocation in *Arabidopsis thaliana* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Cell Physiol* 41: 84-93.
- Kagawa, T., and M. Wada. 2002.** Blue Light-Induced Chloroplast Relocation. *Plant Cell Physiol* 43: 367-371.
- Kagawa, T., T. Sakai, N. Suetsugu, K. Oikawa, S. Ishiguro, T. Kato, S. Tabata, K. Okada, and M. Wada. 2001.** *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291: 2138-2141.
- Kaupp, U. B. 1995.** Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 5: 434-42.
- Kaupp, U. B., T. Niidome, T. Tanabe, S. Terada, W. Bönigk, W. Stühmer, N. J. Cook, K. Kangawa, H. Matsuo, T. Hirose, T. Miyata, and S. Numa. 1989.** Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* 342: 762-766.
- Kawai, H., T. Kanegae, S. Christensen, T. Kiyosue, Y. Sato, T. Imaizumi, A. Kadota, and M. Wada. 2003.** Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature* 421: 287-90.
- Keller, T., H. G. Damude, D. Werner, P. Doerner, R. A. Dixon, and C. Lamb. 1998.** A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca^{2+} binding motifs. *Plant Cell* 10: 255-66.
- Kiegle, E., M. Gilliam, J. Haseloff, and M. Tester. 2000.** Hyperpolarisation-activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J* 21: 225-9.
- Kim, M. C., R. Panstruga, C. Elliott, J. Muller, A. Devoto, H. W. Yoon, H. C. Park, M. J. Cho, and P. Schulze-Lefert. 2002.** Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416: 447-51.
- 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: 656-60.
- Kiraly, Z., B. Barna, A. Kecskes, and J. Fodor. 2002.** Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by TMV. *Free Radic Res* 36: 981-91.
- Kleiner, O., S. Kircher, K. Harter, and A. Batschauer. 1999.** Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J* 19: 289-96.
- Kluesener, B., and E. W. Weiler. 1999.** A calcium-selective channel from root-tip endomembranes of garden cress. *Plant-Physiology (Rockville)* 119: 1399-1405.
- Kluesener, B., G. Boheim, and E. W. Weiler. 1997.** Modulation of the ER Ca^{2+} channel BCC1 from tendrils of *Bryonia dioica* by divalent cations, protons and H_2O_2 . *FEBS Lett* 407: 230-4.

- Kluesener, B., G. Boheim, H. Liss, J. Engelberth, and E. W. Weiler. 1995.** Gadolinium-sensitive, voltage-dependent calcium release channels in the endoplasmic reticulum of a higher plant mechanoreceptor organ. *Embo J* 14: 2708-14.
- Kluesener, 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: 2152-2163.
- Kohler, C., T. Merkle, D. Roby, and G. Neuhaus. 2001.** Developmentally regulated expression of a cyclic nucleotide-gated ion channel from *Arabidopsis* indicates its involvement in programmed cell death. *Planta* 213: 327-32.
- Köhler, C., and G. Neuhaus. 1998.** Cloning and partial characterization of two putative cyclic nucleotide-regulated ion channels from *Arabidopsis thaliana*, designated CNGC1 (Y16327) and CNGC2 (Y16328). *Plant Physiol.* 116: 1604.
- Köhler, C., and G. Neuhaus. 2000.** Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana*. *Febs Lett* 471: 133-6.
- Köhler, C., T. Merkle, and G. Neuhaus. 1999.** Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 18: 97-104.
- Kourie, J. I., and H. B. Wood. 2000.** Biophysical and molecular properties of annexin-formed channels. *Prog Biophys Mol Biol* 73: 91-134.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4718-23.
- Kurosaki, F., H. Kaburaki, and A. Nishi. 1993.** Synthesis and degradation of cyclic AMP in cultured carrot cells treated with forskolin. *Arch Biochem Biophys* 303: 177-9.
- Lacombe, B., D. Becker, R. Hedrich, R. DeSalle, M. Hollmann, J. M. Kwak, J. I. Schroeder, N. Le Novere, H. G. Nam, E. P. Spalding, M. Tester, F. J. Turano, J. Chiu, and G. Coruzzi. 2001.** The identity of plant glutamate receptors. *Science* 292: 1486-7.
- Laloraya, M. M., K. Chandra-kuntal, G. P. Kumar, and M. Laloraya. 1999.** Active oxygen species in blue light mediated signal transduction in coleoptile tips. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 293-8.
- Lam, E., D. Pontier, and O. del Pozo. 1999.** Die and let live - programmed cell death in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2: 502-7.
- Lam, E., N. Kato, and M. Lawton. 2001.** Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-53.
- Lamb, C., and R.-A. Dixon. 1997.** The oxidative burst in plant disease resistance, pp. 251-275. *In* Jones-R-L [ed.], *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. Annu. Rev. Inc.*, Palo Alto.
- Leckie, C. P., M. R. McAinsh, G. J. Allen, D. Sanders, and A. M. Hetherington. 1998.** Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15837-42.
- Lee, N., C. A. D'Souza, and J. W. Kronstad. 2003.** Of Smuts, Blasts, Mildews, and Blights: cAMP Signaling in Phytopathogenic Fungi. *Annu Rev Phytopathol.*
- Lee, S. H., H. Y. Seo, J. C. Kim, W. D. Heo, W. S. Chung, K. J. Lee, M. C. Kim, Y. H. Cheong, J. Y. Choi, C. O. Lim, and M. J. Cho. 1997.** Differential activation of NAD kinase by plant calmodulin isoforms. The critical role of domain I. *J Biol Chem* 272: 9252-9.
- Legare, M. E. 1998.** Analysis of Pb²⁺ entry into cultured astroglia. *Toxicol. Sci.* 46: 90-100.

- Legendre, L., P. F. Heinstejn, and P. S. Low. 1992.** Evidence For Participation of Gtp-Binding Proteins in Elicitation of the Rapid Oxidative Burst in Cultured Soybean Cells. *J Biol Chem* 267: 20140-20147.
- Leng, Q., R. W. Mercier, W. Yao, and G. A. Berkowitz. 1999.** Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol* 121: 753-61.
- Leng, Q., R. W. Mercier, B. G. Hua, H. Fromm, and G. A. Berkowitz. 2002.** Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol* 128: 400-10.
- Leon, J., M. A. Lawton, and I. Raskin. 1995.** Hydrogen Peroxide Stimulates Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol* 108: 1673-1678.
- Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon, and C. Lamb. 1994.** H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-93.
- Li, W., S. Luan, S. L. Schreiber, and S. M. Assmann. 1994.** Cyclic AMP stimulates K⁺ channel activity in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Plant Physiol* 106: 957-61.
- Lin, C. 2000.** Plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* 5: 337-42.
- Lin, C., H. Yang, H. Guo, T. Mockler, J. Chen, and A. R. Cashmore. 1998.** Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2686-90.
- Lin, C., D. E. Robertson, M. Ahmad, A. A. Raibekas, M. S. Jorns, P. L. Dutton, and A. R. Cashmore. 1995.** Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. *Science* 269: 968-70.
- Logemann, E., and K. Hahlbrock. 2002.** Crosstalk among stress responses in plants: pathogen defense overrides UV protection through an inversely regulated ACE/ACE type of light-responsive gene promoter unit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2428-32.
- Ludidi, N., and C. Gehring. 2003.** Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278: 6490-4.
- Maathuis, F. J., and D. Sanders. 2001.** Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol* 127: 1617-25.
- Maser, P., S. Thomine, J. I. Schroeder, J. M. Ward, K. Hirschi, H. Sze, I. N. Talke, A. Amtmann, F. J. 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 Physiol* 126: 1646-67.
- McClung, C. R. 1997.** Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radic Biol Med* 23: 489-96.
- McDowell, J. M., and J. L. Dangel. 2000.** Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci* 25: 79-82.
- Meissner, G. 1994.** Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* 56: 485-508.
- Miedema, H., and S. M. Assmann. 1998.** The calculation of intracellular ion concentrations and membrane potential from cell-attached and excised patch measurements. Cytosolic K⁺ concentration and membrane potential in *Vicia faba* guard cells. *J Membr Biol* 166: 101-10.
- Misquitta, C. M., D. P. Mack, and A. K. Grover. 1999.** Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium* 25: 277-90.
- Mithoefer, A. D., A.; Fromholdt, D.; Ebel, J. 1997.** Involvement of a NAD(P)H oxidase in the elicitor inducible oxidative burst of soybean. *Phytochemistry* 45: 1101-1107.
- Mittler, R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-10.

- Mockler, T. C., H. Guo, H. Yang, H. Duong, and C. Lin. 1999.** Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* 126: 2073-2082.
- Molday, R. S., and L. L. Molday. 1987.** Differences in the protein composition of bovine retinal rod outer segment disk and plasma membranes isolated by a ricin-gold-dextran density perturbation method. *J Cell Biol* 105: 2589-601.
- Moutinho, A., P. J. Hussey, A. J. Trewavas, and R. Malho. 2001.** cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10481-6.
- Muir, S. R., and D. Sanders. 1996.** Pharmacology of Ca²⁺ release from red beet microsomes suggests the presence of ryanodine receptor homologs in higher plants. *FEBS Lett* 395: 39-42.
- Muir, S. R., and D. Sanders. 1997.** Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiol* 114: 1511-21.
- Munne-Bosch, S., and L. Alegre. 2000.** Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210: 925-31.
- Murphy, T. M., and C. K. Auh. 1996.** The Superoxide Synthases of Plasma Membrane Preparations from Cultured Rose Cells. *Plant Physiol* 110: 621-629.
- 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: 3089-3099.
- Nagel, G., D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg, and P. Hegemann. 2002.** Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. *Science* 296: 2395-2398.
- Navazio, L., M. A. Bewell, A. Siddiqua, G. D. Dickinson, A. Galione, and D. Sanders. 2000.** Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8693-8.
- Neher, E. 1992.** Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207: 123-31.
- Neuhaus, G., C. Bowler, K. Hiratsuka, H. Yamagata, and N. H. Chua. 1997.** Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *Embo J* 16: 2554-64.
- Newton, R. P. R., L.; Witters, E.; Van Onckelen, H.; 1999.** Cyclic Nucleotides in higher plants: The enduring paradox. *New Phytol* 143: 427-455.
- Ng, C. K., K. Carr, M. R. McAinsh, B. Powell, and A. M. Hetherington. 2001.** Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410: 596-9.
- Niebel, A., F. Gressent, J. J. Bono, R. Ranjeva, and J. Cullimore. 1999.** Recent advances in the study of nod factor perception and signal transduction. *Biochimie* 81: 669-74.
- Nishiyama, Y., H. Yamamoto, S. I. Allakhverdiev, M. Inaba, A. Yokota, and N. Murata. 2001.** Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *Embo J* 20: 5587-94.
- Niyogi, K. K. 2000.** Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 3: 455-60.
- Nurnberger, T., and D. Scheel. 2001.** Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* 6: 372-9.
- Parekh, A. B., and R. Penner. 1997.** Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77: 901-30.

- Park, K.-Y., J.-Y. Jung, J. Park, J.-U. Hwang, Y.-W. Kim, I. Hwang, and Y. Lee. 2003.** A Role for Phosphatidylinositol 3-Phosphate in Abscisic Acid-Induced Reactive Oxygen Species Generation in Guard Cells. *Plant Physiol.* 132: 92-98.
- Parks, B. M., K. M. Folta, and E. P. Spalding. 2001.** Photocontrol of stem growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 436-440.
- Patel, S., G. C. Churchill, and A. Galione. 2001.** Coordination of Ca²⁺ signalling by NAADP. *Trends Biochem Sci* 26: 482-9.
- 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: 731-4.
- Peng, M. K., J. J. 1992.** Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82: 696-699.
- Penniston, J. T. E., A. J. 1998.** Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Membr Biol* 165: 101-109.
- Penson, S. P., R. C. Schuurink, A. Fath, F. Gubler, J. V. Jacobsen, and R. L. Jones. 1996.** cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell* 8: 2325-2333.
- Perera, I. Y., I. Heilmann, S. C. Chang, W. F. Boss, and P. B. Kaufman. 2001.** A role for inositol 1,4,5-trisphosphate in gravitropic signaling and the retention of cold-perceived gravistimulation of oat shoot pulvini. *Plant Physiol* 125: 1499-507.
- Pharmawati, M., T. Billington, and C. A. Gehring. 1998.** Stomatal guard cell responses to kinetin and natriuretic peptides are cGMP-dependent. *Cell Mol Life Sci* 54: 272-6.
- Pharmawati, M., M. M. Maryani, T. Nikolakopoulos, C. A. Gehring, and H. R. Irving. 2001.** Cyclic GMP modulates stomatal opening induced by natriuretic peptides and immunoreactive analogues. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 385-394.
- Piffanelli, P., F. Zhou, C. Casais, J. Orme, B. Jarosch, U. Schaffrath, N. C. Collins, R. Panstruga, and P. Schulze-Lefert. 2002.** The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol* 129: 1076-85.
- Pineros, M., and M. Tester. 1995.** Characterization of a voltage-dependent Ca²⁺-selective channel from wheat roots. *Planta Heidelberg* 195: 478-488.
- Pineros, M., and M. Tester. 1997.** Calcium channels in higher plant cells: Selectivity, regulation and pharmacology. *Journal-of-Experimental-Botany* 48: 551-577.
- Ping, Z., I. Yabe, and S. Muto. 1992.** Voltage-dependent Ca²⁺ channels in the plasma membrane and the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1112: 287-90.
- Potikha, T. S., C. C. Collins, D. I. Johnson, D. P. Delmer, and A. Levine. 1999.** The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiol* 119: 849-58.
- Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe, and J. Meldolesi. 1994.** Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74: 595-636.
- Quail, P. H. 2002.** Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 85-93.
- Rajasekhar, V. K., C. Lamb, and R. A. Dixon. 1999.** Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. *Plant Physiol* 120: 1137-46.
- Roberts, D. M. T., S.-D. 2002.** Voltage-dependent cation channels permeable to NH₄⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the symbiosome membrane of the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Phys.* 128: 370-378.
- Rodriguez, A. A., K. A. Grunberg, and E. L. Taleisnik. 2002.** Reactive Oxygen Species in the Elongation Zone of Maize Leaves Are Necessary for Leaf Extension. *Plant Physiol.* 129: 1627-1632.

- Rudd, J. J. F.-T., V. E. 2001.** Unraveling response-specificity in Ca²⁺ signalling pathways in plant cells. *New Phytol* 151: 7-33.
- Sakai, T., T. Kagawa, M. Kasahara, T. E. Swartz, J. M. Christie, W. R. Briggs, M. Wada, and K. Okada. 2001.** *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6969-74.
- Sakamoto, K., and W. R. Briggs. 2002.** Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1. *Plant Cell* 14: 1723-1735.
- Sanders, D., C. Brownlee, and J. F. Harper. 1999.** Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706.
- Sanders, D., J. Pelloux, C. Brownlee, and J. F. Harper. 2002.** Calcium at the Crossroads of Signaling. *Plant Cell* 14: S401-417.
- Sando, S., and N. Goto. 1994.** A novel method for regenerating plants from mesophyll protoplasts of *Arabidopsis thaliana* line WS. *Plant Cell Reports* 14: 75-80.
- Sangwan, V., B. L. Orvar, J. Beyerly, H. Hirt, and R. S. Dhindsa. 2002.** Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J* 31: 629-38.
- Sato, Y., M. Wada, and A. Kadota. 2001.** Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differentially controlled by phytochrome and a blue light receptor. *Journal of Cell Science* 114: 269-279.
- Schauer-Vukasinovic, V. C., L.; Daunert, S.; 1997.** Rational Design of a Calcium Sensing System based on Induced Conformational Changes of Calmodulin. *J Am Chem Soc* 119: 11102-11103.
- Schumaker, K. S., and H. Sze. 1987.** Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca²⁺ from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *J Biol Chem* 262: 3944-6.
- Schuurink, R. C., S. F. Shartzer, A. Fath, and R. L. Jones. 1998.** Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1944-1949.
- Sesti, F., E. Eismann, U. B. Kaupp, M. Nizzari, and V. Torre. 1995.** The multi-ion nature of the cGMP-gated channel from vertebrate rods. *J. Physiol.* 487: 17-36.
- Shalitin, D., H. Yang, T. C. Mockler, M. Maymon, H. Guo, G. C. Whitelam, and C. Lin. 2002.** Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* 417: 763-7.
- Short, T. W., and W. R. Briggs. 1994.** The transduction of blue light signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 143-171.
- Sigworth, F. J. 1994.** Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 27: 1-40.
- Spalding, E.-P., C.-L. Slayman, M.-H.-M. Goldsmith, D. Gradmann, and A. Bertl. 1992.** Ion Channels in *Arabidopsis* Plasma Membrane: Transport Characteristics and Involvement in Light-Induced Voltage Changes. *Plant Physiol* 99: 96-102.
- Spalding, E. P., and M. H. M. Goldsmith. 1993.** Activation of K⁺ channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* by ATP produced photosynthetically. *Plant J.* 5: 477-484.
- Stoelzle, S., T. Kagawa, M. Wada, R. Hedrich, and P. Dietrich. 2003.** Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *PNAS*: 0333408100.
- Strigrow, F., and B. E. Ehrlich. 1996.** Ligand-gated calcium channels inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 8: 490-5.
- Suh, S., N. Moran, and Y. Lee. 2000.** Blue light activates potassium-efflux channels in flexor cells from *Samanea saman* motor organs via two mechanisms. *Plant Physiol* 123: 833-43.

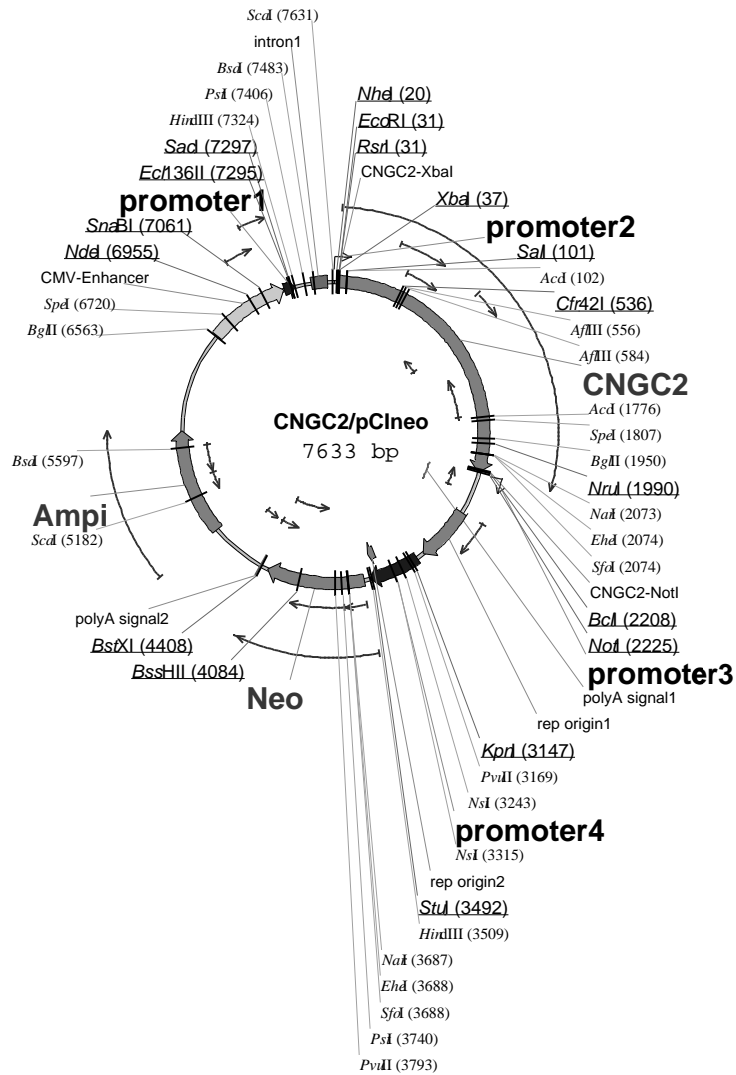
- Sun, L., O. A. Adebajo, A. Koval, H. K. Anandatheerthavarada, J. Iqbal, X. Y. Wu, B. S. Moonga, X. B. Wu, G. Biswas, P. J. Bevis, M. Kumegawa, S. Epstein, C. L. Huang, N. G. Avadhani, E. Abe, and M. Zaidi. 2002.** A novel mechanism for coupling cellular intermediary metabolism to cytosolic Ca^{2+} signaling via CD38/ADP-ribosyl cyclase, a putative intracellular NAD^+ sensor. *Faseb J* 16: 302-14.
- Sunkar, R., B. Kaplan, N. Bouche, T. Arazi, D. Dolev, I. N. Talke, F. J. Maathuis, D. Sanders, D. Bouchez, and H. Fromm. 2000.** Expression of a truncated tobacco *NtCBP4* channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* CNGC1 gene confer Pb^{2+} tolerance. *Plant J* 24: 533-42.
- Sutton, F., S. S. Paul, X. Q. Wang, and S. M. Assmann. 2000.** Distinct abscisic acid signaling pathways for modulation of guard cell versus mesophyll cell potassium channels revealed by expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Physiol* 124: 223-30.
- Takahashi, K., M. Isobe, and S. Muto. 1998.** Mastoparan induces an increase in cytosolic calcium ion concentration and subsequent activation of protein kinases in tobacco suspension culture cells. *Biochim Biophys Acta* 1401: 339-46.
- Tavernier, E., D. Wendehenne, J. P. Blein, and A. Pugin. 1995.** Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiol* 109: 1025-1031.
- Taylor, C. W. 1998.** Inositol trisphosphate receptors: Ca^{2+} -modulated intracellular Ca^{2+} channels. *Biochim Biophys Acta* 1436: 19-33.
- Thion, L., C. Mazars, P. Thuleau, A. Graziana, M. Rossignol, M. Moreau, and R. Ranjeva. 1996.** Activation of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels by disruption of microtubules in carrot cells. *FEBS Lett* 393: 13-8.
- Thion, L., C. Mazars, P. Nacry, D. Bouchez, M. Moreau, R. Ranjeva, and P. Thuleau. 1998.** Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a longer half-life in ton 2 mutant cells affected in the organization of cortical microtubules. *Plant J* 13: 603-10.
- Thomma, B., K. Eggermont, I. Penninckx, B. Mauch-Mani, R. Vogelsang, B. P. A. Cammue, and W. F. Broekaert. 1998.** Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15107-11.
- Thordal-Christensen, H. Z., Z.; Wei, Y.; Collinge, D. B. 1997.** Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *plant j* 11: 1187-1194.
- Thuleau, P., M. Moreau, J. I. Schroeder, and R. Ranjeva. 1994a.** Recruitment of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels in carrot cells. *Embo J* 13: 5843-7.
- Thuleau, P., J. M. Ward, R. Ranjeva, and J. I. Schroeder. 1994b.** Voltage-dependent calcium-permeable channels in the plasma membrane of a higher plant cell. *Embo J* 13: 2970-5.
- Tlalka, M., and H. Gabrys. 1993.** Influence of calcium on blue-light induced chloroplast movement in *Lemna triscula* L. *Planta* 189: 491-498.
- Torres, M. A., H. Onouchi, S. Hamada, C. Machida, K. E. Hammond-Kosack, and J. D. Jones. 1998.** Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J* 14: 365-70.
- Trewavas, A. 1999.** Le calcium, C'est la vie: calcium makes waves. *Plant Physiol* 120: 1-6.
- Van Breusegem, F. V., E.; Dat, J.F.; Inze, D.; 2001.** The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 131: 405-414.

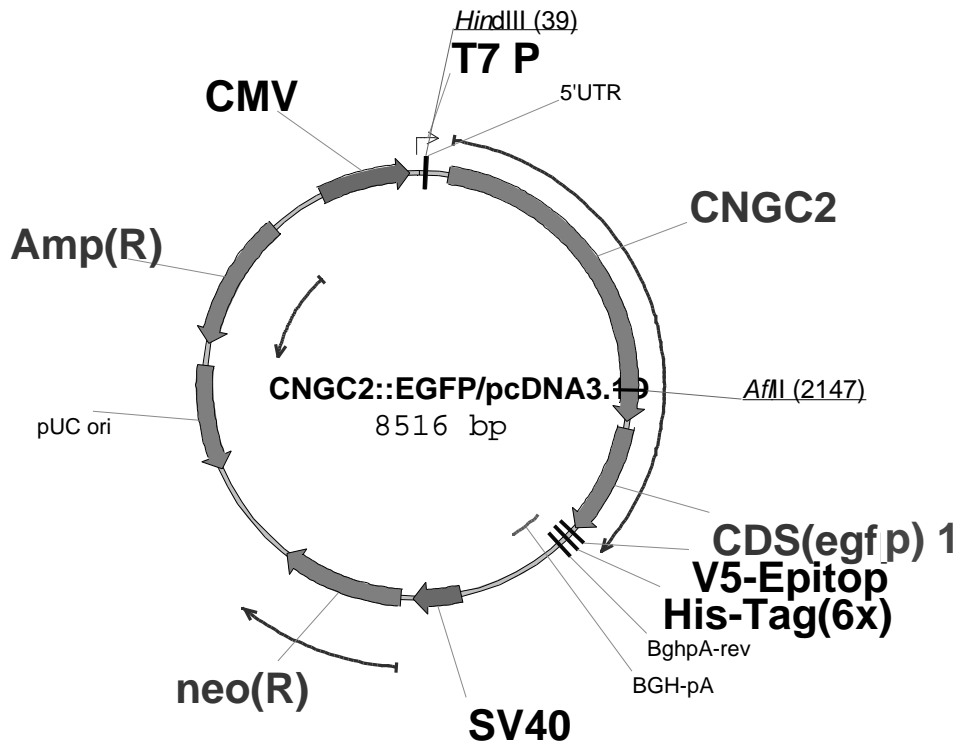
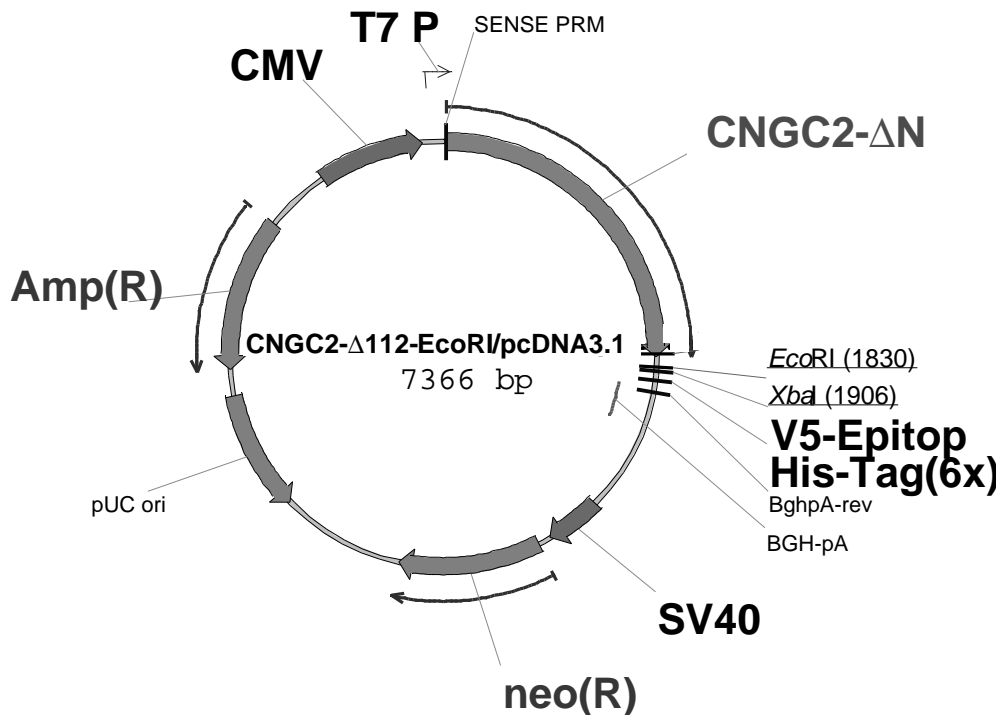
- Vander Heiden, M. G., N. S. Chandel, X. X. Li, P. T. Schumacker, M. Colombini, and C. B. Thompson. 2000.** Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4666-71.
- Véry, A. A., and J. M. Davies. 2000.** Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9801-9806.
- Wainger, B. J., M. DeGennaro, B. Santoro, S. A. Siegelbaum, and G. R. Tibbs. 2001.** Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411: 805-10.
- Walton, T. J., C. J. Cooke, R. P. Newton, and C. J. Smith. 1993.** Evidence that generation of inositol 1,4,5-trisphosphate and hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate are rapid responses following addition of fungal elicitor which induces phytoalexin synthesis in lucerne (*Medicago sativa*) suspension culture cells. *Cell Signal* 5: 345-56.
- Wang, H., L. G. Ma, J. M. Li, H. Y. Zhao, and X. W. Deng. 2001.** Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* 294: 154-8.
- Ward, J.-M., Z.-M. Pei, and J.-I. Schroeder. 1995.** Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant-Cell* 7: 833-844.
- Warmke, J. W., and B. Ganetzky. 1994.** A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3438-42.
- Weyand, I., M. Godde, S. Frings, J. Weiner, F. Müller, W. Altenhofen, H. Hatt, and U. B. Kaupp. 1994.** Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* 368: 859-861.
- White, P. J. 2000.** Calcium channels in higher plants. *Biochim Biophys Acta* 1465: 171-89.
- White, P. J. B., H. C.; Demidchik, V.; Nichols, C.; Davies, J. M. 2002.** Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim Biophys Acta* 1564: 299-309.
- Wickman, K. D., and D. E. Clapham. 1995.** G-protein regulation of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 5: 278-85.
- Willekens, H., S. Chamnongpol, M. Davey, M. Schraudner, C. Langebartels, M. Van Montagu, D. Inze, and W. Van Camp. 1997.** Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *Embo J* 16: 4806-16.
- Wu, G., B. J. Shortt, E. B. Lawrence, E. B. Levine, K. C. Fitzsimmons, and D. M. Shah. 1995.** Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7: 1357-68.
- Wu, Y., K. Hiratsuka, G. Neuhaus, and N. H. Chua. 1996.** Calcium and cGMP target distinct phytochrome-responsive elements. *Plant J.* 10: 1149-54.
- Wu, Y., J. Kuzma, E. Marechal, R. Graeff, H. C. Lee, R. Foster, and N. H. Chua. 1997.** Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278: 2126-30.
- Wu, Z., F. Liang, B. Hong, J. C. Young, M. R. Sussman, J. F. Harper, and H. Sze. 2002.** An endoplasmic reticulum-bound Ca²⁺/Mn²⁺ pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn²⁺ stress. *Plant Physiol* 130: 128-37.
- Xing, T., V. J. Higgins, and E. Blumwald. 1997.** Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell* 9: 249-59.
- Xing, T., X. J. Wang, K. Malik, and B. L. Miki. 2001.** Ectopic expression of an *Arabidopsis* calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 1261-4.
- Yang, H. Q., R. H. Tang, and A. R. Cashmore. 2001.** The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* 13: 2573-87.

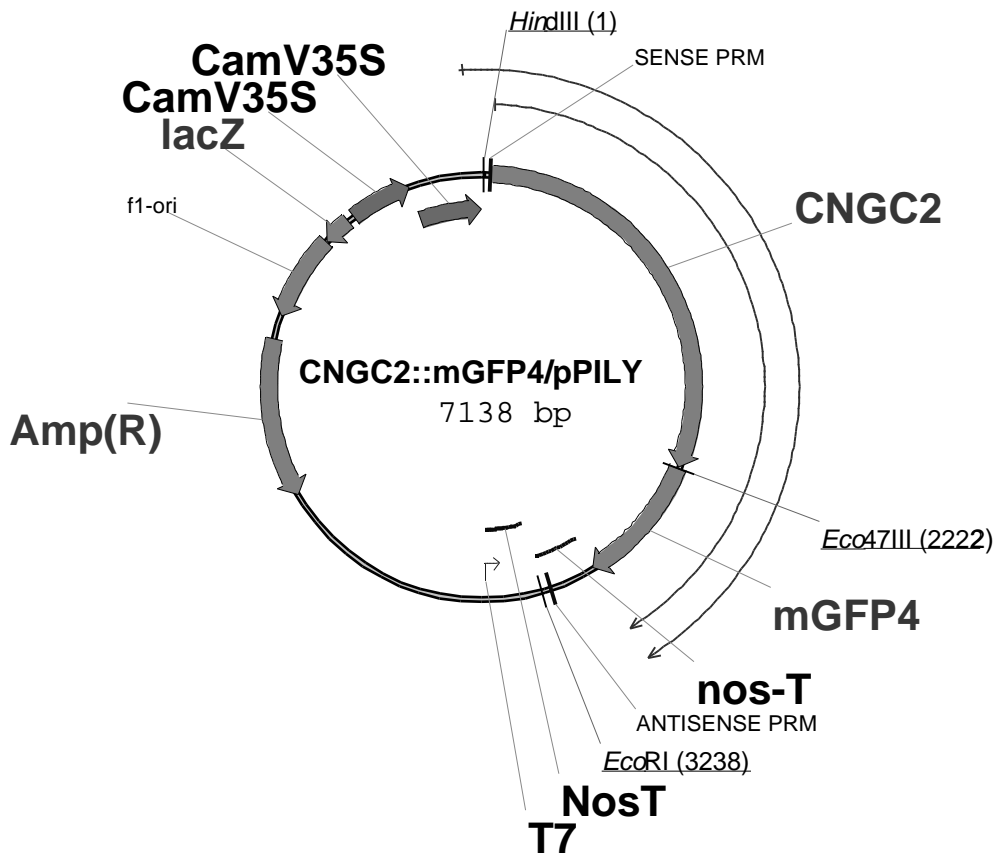
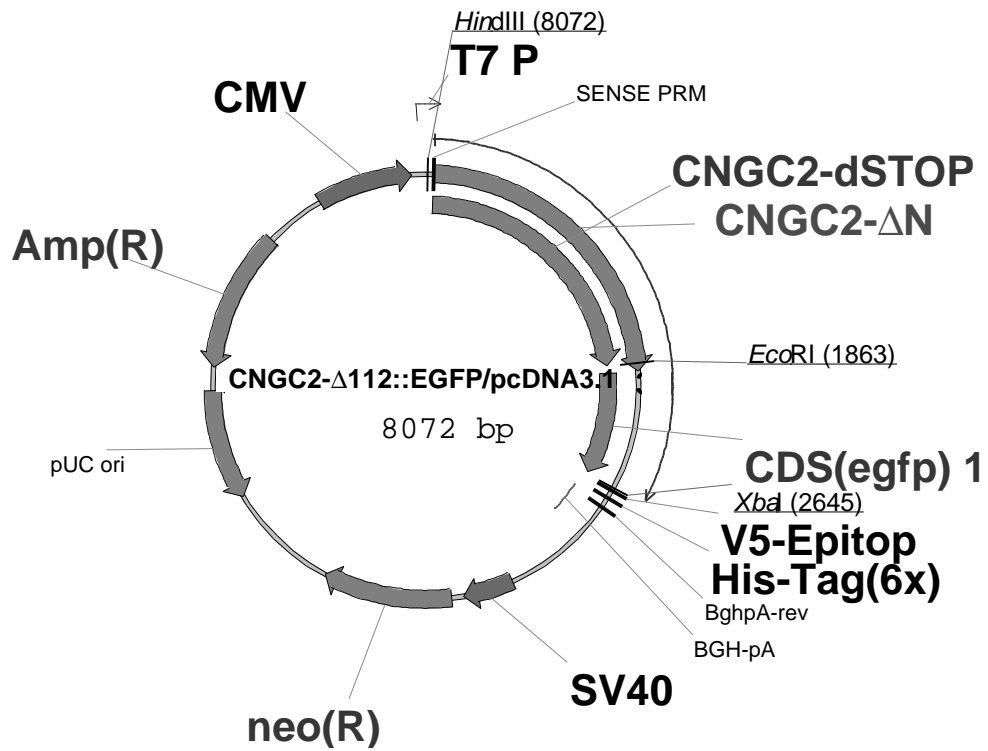
- Yu, I. C., J. Parker, and A. F. Bent. 1998.** Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* dnd1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7819-24.
- Zamponi, G. W., and T. P. Snutch. 1998.** Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr Opin Neurobiol* 8: 351-6.
- Zhang, X., L. Zhang, F. Dong, J. Gao, D. W. Galbraith, and C. P. Song. 2001a.** Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol* 126: 1438-48.
- Zhang, X., Y. C. Miao, G. Y. An, Y. Zhou, Z. P. Shanguan, J. F. Gao, and C. P. Song. 2001b.** K⁺ channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in *Vicia* guard cells. *Cell Res* 11: 195-202.
- Zimmermann, A. 1995.** Cyclic nucleotide gated channels. *Current Opinion in Neurobiology* 5: 296-303.
- Zimmermann, S., T. Nurnberger, J. M. Frachisse, W. Wirtz, J. Guern, R. Hedrich, and D. Scheel. 1997.** Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2751-2755.
- Zufall, F., G. M. Shepherd, and C. J. Barnstable. 1997.** Cyclic nucleotide gated channels as regulators of CNS development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 7: 404-12.

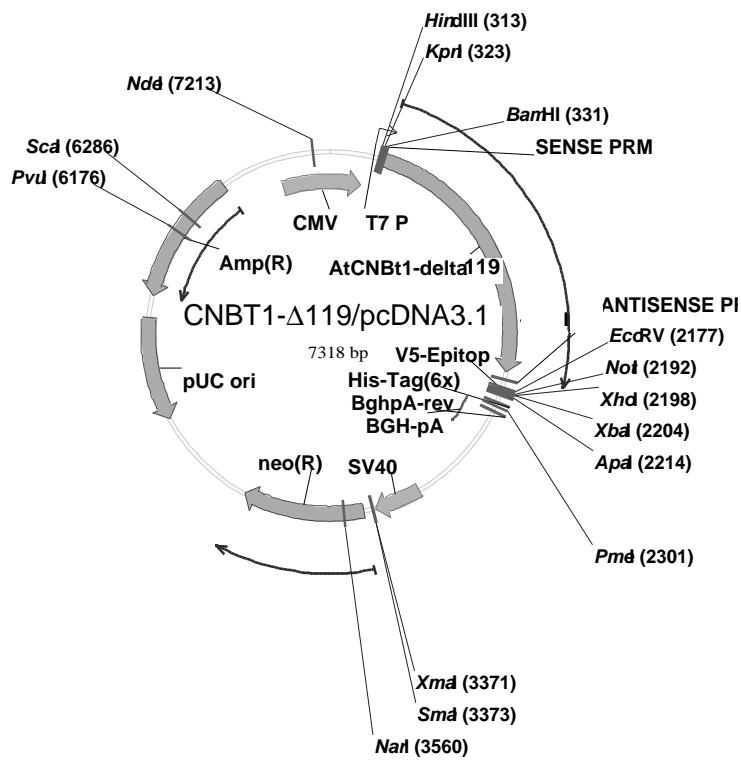
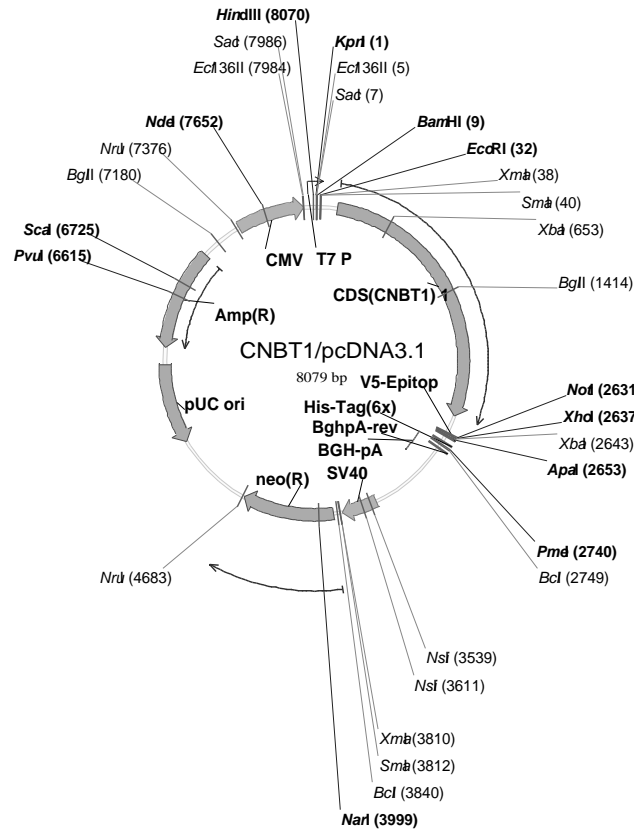
7. Anhang

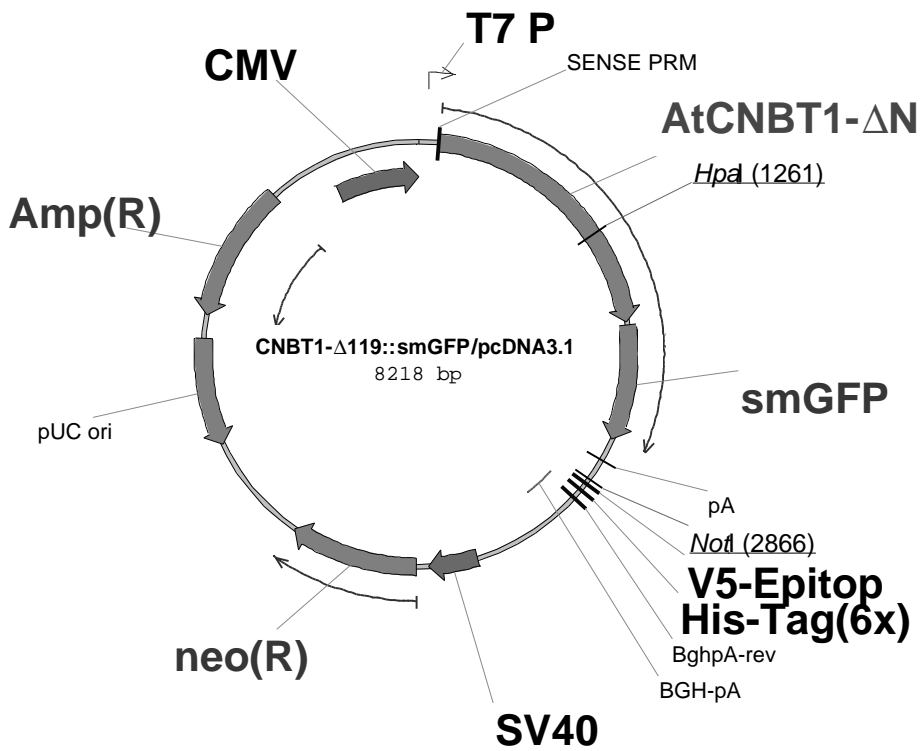
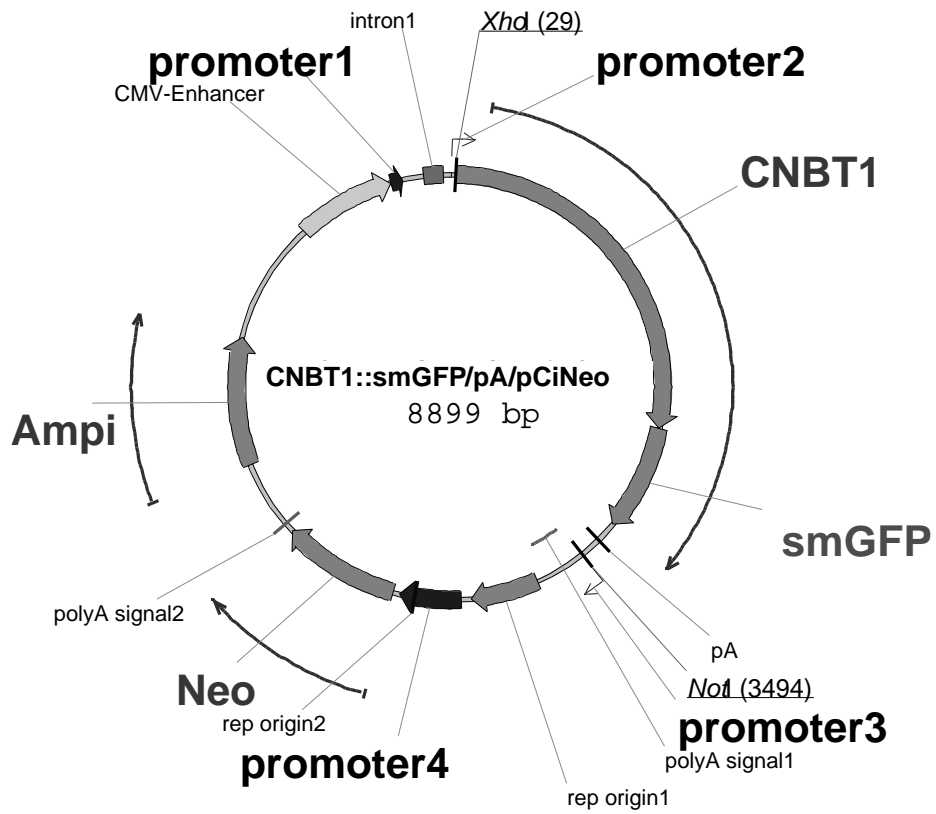
Fusionskonstrukte

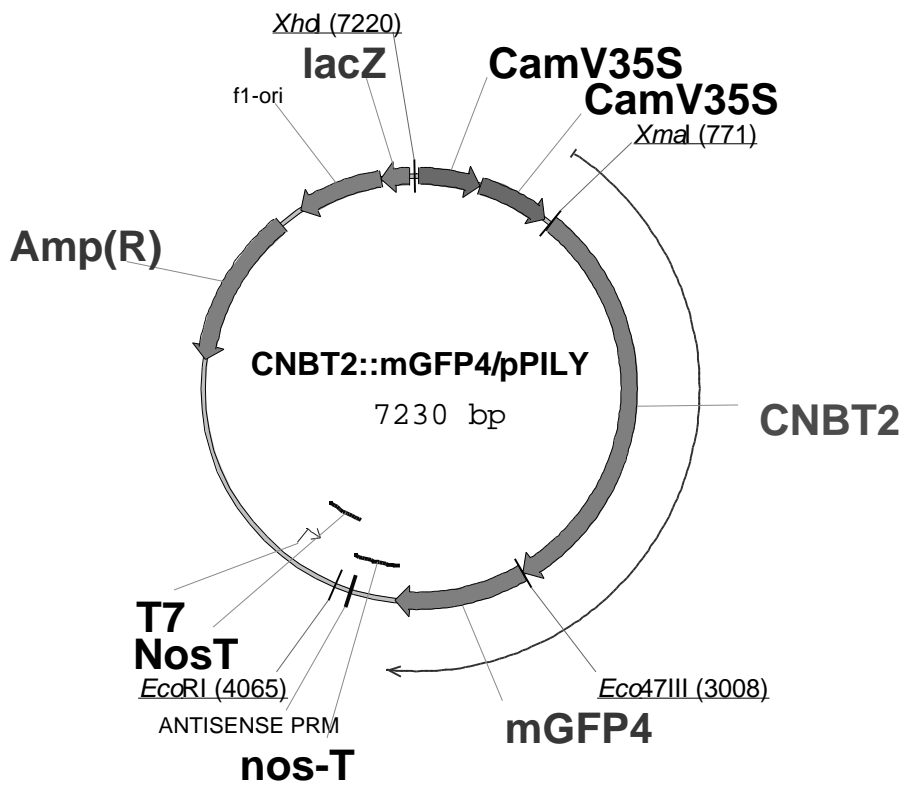
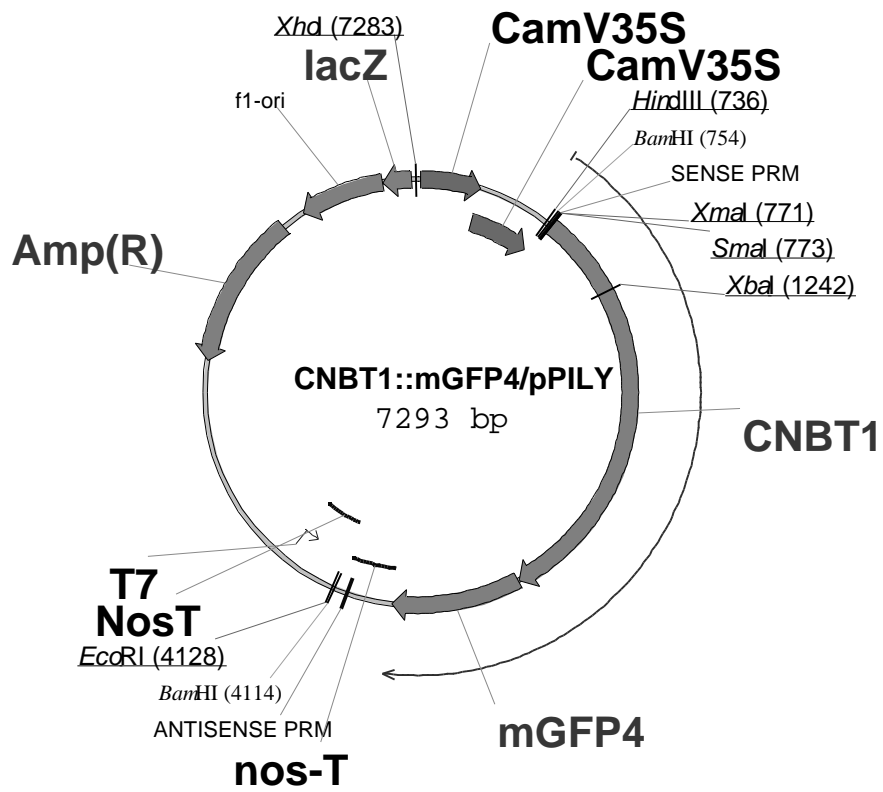












Abkürzungen und Symbole:

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Fläche
ABA	Abszissinsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
BES	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
BMAA	S ⁽⁺⁾ -β-methyl-α,β-Diaminopropionsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
C	Kapazität
ca.	circa
cADPR	cyclische <u>ADP</u> Ribose
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDPK	<i>calmodulin-like domain protein kinase</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNBD	<i>cyclic nucleotide binding domain</i>
CNGC	<i>cyclic nucleotide gated channel</i>
CICR	<i>calcium-induced calcium release</i>
cDNA	copy-Desoxyribonucleinsäure
C _m	Membrankapazität
C _p	Pipettenkapazität
e ₀	Elementarladung
DMEM	Dilbecco's Mod Eagle Medium
DCMU	<i>dichlorophenyldimethyl urea</i>
d.h.	das heißt
DIDS	<i>4,49-diisothiocyano-2,29-disulfonic stilbene</i>

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNQX	6,7-dinotroquinoxaline-2,3(1H,4H)dione
DPI	Diphenyliodonium Chlorid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N´tetraessigsäure
ER	<u>Endoplasmatisches Retikulum</u>
(E)GFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
F	Faraday Konstante ($9,6485 \times 10^4$ C/mol)
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfon-Säure
<i>Hv</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
InsP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
InsP ₃ R	Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptoren
i	Einzelkanalstrom
I	elektrischer Strom
I _{ss}	Gleichgewichts- (<i>steady state</i>) Strom
LB	Luria-Bertani
LOCs	<i>ligand-operated channels</i> ,
µA	Mikroampère
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
M	Molar
mM	Millimolar
Mes	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
ml	Milliliter
NAADP	Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotidphosphat
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD	optische Dichte
pA	Picoampère

PACC	<i>phototropin-activated calcium-permeable channel</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMCA	Plasmamembran Ca^{2+} -Pumpe
PM	Plasmamembran
R	Gaskonstante (1,987 cal/mol x K)
ROCs	<i>receptor-operated channels</i>
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies, <i>reactive oxygen species</i>
RyR	Ryanodin Rezeptoren
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	<i>sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases</i>
sog.	sogenannt(e)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T	Absolute Temperatur (Kelvin) = 273,15 + T (°Celsius)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
V	Spannung
VOCs	<i>voltage-operated Ca^{2+} channels</i>
Vol	Volumeneinheit(en)
W7	(N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalensulfamid Hydrochlorid)
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
z	Wertigkeit eines Ions

Publikationen:

Stoelzle, S., Kagawa, T., Wada, Hedrich, R., Dietrich, P. (2003) Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. PNAS, 4. Februar, Vol.100, Nr. 3, 1456-1461

Dietrich, P., Stoelzle, S., Roelfsema, M. R. G., Hedrich, R. Activation of Ca²⁺-permeable channels by reactive oxygen species is impaired in *dnd1*, a pathogen *Arabidopsis* mutant. In Vorbereitung.

Orale Präsentationen:

Biowissenschaftliches Seminar des Julius-von-Sachs-Instituts, Würzburg, WS 2002/03. Blue light activated calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells.

Rhein-Main-Botaniker-Kolloquium, Heidelberg 2002. Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway.

International Graduate Program, Plant Responses to Physical, Chemical And Biotic Constraints, Retzbach, 1999. How do ion channels relate to light- and Ca²⁺-dependent signalling?

Posterpräsentationen:

Deutsche Botaniker Tagung, Freiburg i. Br. 2002. Blue light activated calcium channels in *Arabidopsis*.

Deutsche Botaniker Tagung, Jena. 2000. Posterpräsentation und Kurzvortrag: *Patch-Clamp*-Analyse der Spannungs- und Ligandenabhängigkeit von Ionenkanälen in der Mesophyllzell-Plasmamembran von *Arabidopsis thaliana*.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sonja Stölzle
Geburtsdatum	18. August 1975
Geburtsort	Memmingen, Deutschland
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1982-1986	Theodor-Heuss-Grundschule in Memmingen
1986-1995	Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium (Bernhard-Strigel-Gymnasium) in Memmingen, Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
April 1992	Besuch der Skyline Highschool, Idaho Falls, Idaho, USA im Rahmen eines Austauschprogrammes

Hochschulstudium

1995-1997	Grundstudium der Biologie an der Universität Ulm, Vordiplom
August 1998	Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, bei Prof. Dr. R. Huber
November 1998	Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, bei Prof. Dr. D. Oesterheldt
1997-1999	Studium der Biologie (Diplom) an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg mit dem Schwerpunkt Pflanzenphysiologie und den Nebenfächern Biochemie und Pharmazeutische Biologie
1999/2000	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzen- physiologie und Biophysik bei Prof. Dr. R. Hedrich, Julius- von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg

Februar 2000

ab Mai 2000

Thema: *Patch-Clamp*-Analyse zur Spannungs- und Ligandenabhängigkeit von Ionenkanälen in der Plasmamembran von Mesophyllzellen aus *Arabidopsis thaliana*.

Diplom-Studienabschluß, Gesamtnote: sehr gut

Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotionsstudium am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik bei Prof. Dr. R. Hedrich, Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg. Thema: Licht- und Redoxregulation von Calcium-permeablen Kanälen in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen.

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 gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Memmingen, Juni 2003

.....