

LICHTGESTEUERTE MANIPULATION
ZENTRALER SECOND MESSENGER
IN PFLANZEN



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von:

CHRISTOPH STANGL

Geboren in Schweinfurt

Würzburg, 2012

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: _____

Erster Gutachter: Prof. Dr. Georg Nagel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Datum des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Lichtaktivierbare Ionenkanäle aus <i>C. reinhardtii</i>	- 1 -
1.2	Eine lichtaktivierbare Adenylatcyclase aus <i>E. gracilis</i>	- 4 -
1.3	Eine weitere lichtaktivierbare Adenylatcyclase aus <i>Beggiatoa spec.</i>	- 6 -
1.4	Cyclische Nucleotide als Second Messenger	- 8 -
1.4.1	Cyclisches Adenosinmonophosphat in Pflanzen	- 11 -
1.4.2	Cyclisches Guanosenmonophosphat in Pflanzen	- 13 -
1.5	Calcium als pflanzlicher Second Messenger	- 16 -
1.6	Photorezeption in Pflanzen	- 20 -
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	- 22 -

2	MATERIAL UND METHODEN	- 24 -
2.1	Bakterien.....	- 24 -
2.1.1	Verwendete Laborstämme.....	- 24 -
2.1.2	Übernachtulturen.....	- 25 -
2.1.3	Selektion und Kultur auf Agarplatten.....	- 26 -
2.1.4	Permanent-Kryokulturen.....	- 26 -
2.2	Pflanzen.....	- 27 -
2.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- 27 -
2.2.2	<i>Nicotiana spec.</i>	- 28 -
2.2.3	Anzucht in Gewächshaus und Klimakammer.....	- 29 -
2.2.4	Anzucht auf Vermiculit.....	- 30 -
2.2.5	<i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkultur.....	- 30 -
2.2.6	Isolation der Protoplasten.....	- 31 -
2.3	Oozyten.....	- 34 -
2.3.1	Das Expressionssystem.....	- 34 -
2.3.2	Gewinnung der Oocyten.....	- 34 -
2.3.3	RNA-Mikroinjektion.....	- 35 -
2.3.4	Heterologe Proteinexpression.....	- 36 -
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	- 37 -
2.4.1	Methoden DNA.....	- 37 -
2.4.2	Methoden RNA.....	- 48 -
2.4.3	Transformation.....	- 50 -
2.4.4	Transfektion.....	- 51 -
2.5	Elektrophysiologische Methoden.....	- 58 -
2.5.1	Konventionen.....	- 58 -

2.5.2	Messelektroden	- 58 -
2.5.3	Datenerfassung	- 59 -
2.5.4	Einstichmessungen	- 60 -
2.5.5	Patch-Clamp	- 63 -
2.6	Immunologische Methoden.....	- 67 -
2.6.1	ELISA - Quantifikation cyclischer Nucleotide.....	- 67 -
2.7	Luminometrischer Calcium-Nachweis	- 70 -
2.7.1	Prinzip der Lumineszenzmessung	- 70 -
2.8	Fluoreszenzmikroskopie	- 72 -
2.8.1	Confocale Lasermikroskopie	- 72 -
2.8.2	Epifluoreszenzaufnahmen.....	- 72 -
2.9	Belichtungsparameter	- 73 -
2.10	Klonierungen	- 74 -
2.10.1	Die Channelrhodopsin-2-Varianten C128A und C128T	- 74 -
2.10.2	Klonierung der lichtaktivierbaren Adenylatcyclase aus <i>Beggiatoa</i> ..	- 75 -
2.10.3	Mutation zur lichtaktivierbaren Guanylatcyclase	- 79 -
2.10.4	Das Fusionskonstrukt CNGA2_2A_EuPAC	- 80 -

3	ERGEBNISSE	- 83 -
3.1	Funktionelle Charakterisierung von Channelrhodopsin in Pflanzen	- 83 -
3.1.1	Transiente Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i>	- 83 -
3.1.2	Elektrophysiologische Funktionsbestätigung in Pflanzenzellen	- 85 -
3.1.3	Funktion ohne die Zugabe von Retinal.....	- 92 -
3.2	Transiente Expression lichtaktivierbarer Nucleotidcyclasen	- 94 -
3.2.1	Expression von <i>bPAC::YFP</i> und <i>bPGC::YFP</i> in <i>A. thaliana</i>	- 94 -
3.2.2	Quantifikation cyclischer Nucleotide durch ELISA.....	- 97 -
3.2.3	Umsatzraten von <i>bPAC::YFP</i> und <i>bPGC::YFP</i> in Oocyten	- 100 -
3.3	Expression lichtaktivierter Nucleotidcyclasen in Pollen	- 103 -
3.3.1	Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum.....	- 103 -
3.4	Stabil transgene <i>A. thaliana</i> Pflanzen	- 106 -
3.4.1	Induzierbare Expression lichtaktivierbarer Nucleotidcyclasen	- 106 -
3.4.2	Lichtinduzierte cAMP-Produktion	- 113 -
3.4.3	Lichtinduzierte cGMP-Produktion	- 120 -
3.4.4	Konstitutive Expression.....	- 122 -
3.4.5	Verzögerung der Samenkeimung	- 123 -
3.4.6	Manipulation cytoplasmatischer Calciumkonzentrationen.....	- 128 -
3.5	Stabil transgene <i>A. thaliana</i> Zellkulturen	- 140 -
3.6	Indirekt lichtaktivierbare Ionenkanäle – ein alternativer Ansatz.....	- 143 -
3.6.1	<i>CNGA2_2A_EuPAC</i>	- 143 -

4	DISKUSSION	- 148 -
4.1	Channelrhodopsin <i>In Planta</i>	- 148 -
4.1.1	Einsatz der Channelrhodopsin-Varianten C128A und C128T	- 148 -
4.1.2	Retinalsupplementierung und Proteinexpression	- 150 -
4.1.3	Eingeschränkte Funktion in Pflanzenzellen.....	- 152 -
4.1.4	Strategiewechsel	- 154 -
4.2	Transiente Expression lichtaktivierter Nucleotidcyclasen in Pflanzen..	- 159 -
4.2.1	Quantifikation cyclischer Nucleotide	- 159 -
4.2.2	Expression in Pollen von <i>N. SR-1</i>	- 160 -
4.3	Stabil transgene Pflanzenlinien	- 165 -
4.3.1	Expression lichtaktivierter Nucleotidcyclasen in Pflanzen	- 165 -
4.3.2	Konstitutive Expression	- 168 -
4.3.3	Eingeschränkte Samenkeimung	- 169 -
4.3.4	Hinweise auf pflanzenendogene Phosphodiesterasen	- 171 -
4.3.5	Lichtinduzierbare Calciumoszillationen in Pflanzenzellen	- 174 -
4.3.6	Umsatzrate der lichtaktivierten Guanylatcyclase	- 183 -
4.4	Stabil transgene <i>A. thaliana</i> Zellkultur	- 184 -
4.5	Das Fusionskonstrukt CNGA2_2A_EuPAC	- 185 -
4.5.1	Expression in Oocyten	- 185 -
4.5.2	Expression in Pflanzen	- 188 -
5	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	- 189 -

6	ANHANG	- 193 -
6.1	Literaturverzeichnis	- 193 -
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	- 208 -
6.3	Tabellenverzeichnis	- 211 -
6.4	Puffer und Lösungen.....	- 212 -
6.4.1	Wasser.....	- 212 -
6.4.2	Puffer und Lösungen.....	- 213 -
6.4.3	Kulturmedien	- 218 -
6.4.4	Enzymlösungen.....	- 221 -
6.4.5	Probenpuffer	- 223 -
6.4.6	Verwendete Antibiotika.....	- 224 -
6.5	Chemikalien	- 225 -
6.6	Sequenzdaten	- 227 -
6.6.1	Das Fusionsprotein <i>bPAC::YFP</i>	- 227 -
6.6.2	Das Fusionskonstrukt <i>CNGA2_2A_EuPAC</i>	- 229 -
6.6.3	Übersicht der erstellten Konstrukte	- 232 -
6.6.4	Primer	- 233 -
6.7	Abkürzungsverzeichnis	- 234 -
6.8	Curriculum Vitae	- 239 -
7	DANKSAGUNG	- 240 -
8	ERKLÄRUNG	- 241 -

1 EINLEITUNG

1.1 Lichtaktivierbare Ionenkanäle aus *C. reinhardtii*

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein fakultativ autotropher Flagellat aus der Familie der Chlamydomonadaceae. Die nahezu kugelförmigen Algenzellen mit einem Durchmesser von 10-20µm können Energie sowohl katabol durch den Abbau einfacher Kohlenstoffverbindungen, als auch anabol über Photosyntheseprozesse gewinnen (Levine et al., 1960). Hierfür finden sich Mitochondrien und Chloroplasten im Zellkörper. Die lichtorientierte Fortbewegung von *C. reinhardtii* erfolgt durch eine asynchron schlagende Bewegung zweier polarer Geißeln. Zur Bestimmung der Lichteinfallrichtung dient der orange-gelbe Augenfleck (*eyespot*), eine funktionelle Aggregation photoaktiver Ionenkanäle, welche von einer lichtreflektierenden, carotinoideichen Zellschicht umgeben ist (Sager und Palade, 1957). Durch eine rotierende Schwimmbewegung und dadurch auftretende alternierende Belichtungsintensitäten im eyespot können Licht-Gradienten wahrgenommen werden, was die phototaktischen Bewegungen der Alge ermöglicht (Foster und Smyth, 1980; Kateriya et al., 2004; Schmidt et al., 2006).

Das Interesse am molekularen Mechanismus der Lichtperzeption dieser Alge führte Anfang des Jahrhunderts zur Entdeckung und funktionellen Erstbeschreibung des direkt durch Licht aktivierbaren Protonenkanals Channelrhodopsin-1 (ChR1, Nagel et al., 2002) und in direkter Folge des ebenfalls lichtaktivierbaren, kationenselektiven Kanals Channelrhodopsin-2 (ChR2, Nagel et al., 2003).

Die Leitfähigkeit beider Kanäle wird über Licht einer Wellenlänge von ca. 500nm (ChR1) bzw. ca. 460nm (ChR2) induziert, was zunächst zur Konformationsänderung des über eine Schiff'sche Base an Position K257 gebundenen Kofaktors *All-Trans-Retinal* zu *13-Cis-Retinal* führt. Diese Konformationsisomerisierung im Chromophor und damit induzierte Ladungsverschiebung im Protein führt zur Öffnung der Pore und ermöglicht die Passage von Protonen; bei Channelrhodopsin-2 entstehen hierbei zudem lichtinduziert weitere Leitfähigkeiten für mono- und divalente Kationen (Nagel et al., 2003).

Diese beiden lichtaktivierten Ionenkanäle und die daraus durch gezielte Mutationen abgeleiteten Varianten finden aktuell in zahlreichen neurobiologischen Arbeiten Anwendung. So konnten beispielsweise Channelrhodopsin-transfizierte Nervenzellen durch Bestrahlung mit blauem Licht depolarisiert- und auf diese Weise nichtinvasiv Aktionspotentiale ausgelöst werden (Boyden et al., 2005; Gottschalk et al., 2005; Schroll et al., 2006; Zhang et al., 2006; Han et al., 2007; Zhang et al., 2007; Bernstein et al., 2008; Douglass et al., 2008). Auf diese Weise lassen sich sowohl grundlegende neuronale Verschaltungsmuster untersuchen (Gottschalk et al., 2005, Schroll et al., 2006; Wang et al., 2007), als auch medizinisch relevante Therapieansätze ableiten (Wassle et al., 2010; Horsager et al., 2011). Die Entdeckung dieser lichtaktivierten Proteine eröffnete gleichermaßen eine neue und schnell an Zuwachs gewinnende Sparte der Biologie, die sogenannte *Optogenetik*, welche aktuell mit der Weiterentwicklung und Neuentdeckung lichtgesteuerter Kanäle und Enzyme an Bedeutung, nicht nur in der Grundlagenforschung, gewinnt.

Das Hauptaugenmerk sämtlicher Arbeiten zu diesem Thema jedoch lag und liegt bis dato im tierischen System. Auch in Pflanzenzellen sind Calciumoszillationen und -signaturen (1.5) beschrieben worden, welchen ein eindeutiger Signal- und Informationscharakter zugesprochen wird (McAinsh et al., 1995; Cessna et al., 2001; Evans et al., 2001).

Dies wirft die interessante Fragestellung nach der heterologen Expression der beschriebenen lichtaktivierten Ionenkanäle und die damit verbundenen nicht-invasiven Manipulations- und Interaktionsmöglichkeiten in pflanzlichen Zellen auf (s. 1.7). Aufgrund der für Channelrhodopsin-2 beschriebenen Leitfähigkeit für Calcium (Nagel et al., 2003; Caldwell et al., 2008) wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals versucht, lichtinduzierte Calciumoszillationen sowie Membranpotentialänderungen durch applizierte Belichtungsmuster reproduzierbar in Channelrhodopsin-transfizierten Pflanzenzellen zu generieren.

1.2 Eine lichtaktivierbare Adenylatcyclase aus *E. gracilis*

Die Süßwasseralge *Euglena gracilis* gehört zur Familie *Euglenales* und zählt zu den frühesten und einfachsten eukaryontischen Protisten, die im Laufe der Evolution entstanden sind. *E. gracilis* ernährt sich wie *C. reinhardtii* fakultativ autotroph. In Abwesenheit einer adäquaten Lichtquelle wird die Energiegewinnung durch oxidative Decarboxylierung einfacher Kohlenstoffquellen wie Butyrat, Pyruvat, oder α -Ketoglutarat ermöglicht. Komplexere Kohlenstoffquellen wie etwa Glucose können nicht metabolisiert werden (Cramer und Myers, 1952). Ist jedoch eine qualitativ und quantitativ ausreichende Lichtquelle vorhanden, kann *E. gracilis* Bereiche erhöhter Lichteinstrahlung aktiv aufsuchen, um Energie photosynthetisch zu gewinnen. Hierzu finden sich mehrere Chloroplasten, sowie eine Geißel am vorderen Ende des etwa 50 μ m langen und 10 μ m dicken Zellkorpus. Die Lichtperzeption erfolgt ähnlich wie bei *C. reinhardtii* durch einen Augenfleck (s. 1.1), der hier auch als Stigma bezeichnet wird. Auch diese Algen können die Lichteinfallrichtung durch die beim Schwimmen stattfindende Rotation um die Längsachse wahrnehmen, da reflektierende Zellschichten einfallendes Licht je nach Position zur Lichtquelle abschwächen oder verstärken (Batra und Tollin, 1964).

Im Jahr 2002 konnten aus diesem Organismus die ersten lichtaktivierbaren Adenylatcyclasen (Photoactivated Adenylyl Cyclase, *EuPAC α* und *EuPAC β*) isoliert und *in vitro* charakterisiert werden (Iseki et al., 2002). Im Allgemeinen sind Nucleotidcyclasen Enzyme, die aus Nucleotidtriphosphaten (NTPs) cyclische Nucleotidmonophosphate (cNMPs, Abbildung 1.1) generieren können. Natürlicherweise spielen die in *E. gracilis* gefundenen, lichtaktivierten Adenylatcyclasen eine zentrale Rolle in der Phototaxis dieser Alge. Durch RNAi-Experimente konnte gezeigt werden, dass sowohl positive als auch negative Phototaxis nach Unterdrückung der PAC-Expression gestört ist (Ntefidou et al., 2003). Das funktionsfähige Protein besteht aus einem Homodimer zweier *EuPAC α* - (112kDa) beziehungsweise zweier *EuPAC β* - (94kDa) Untereinheiten.

Jedes der Monomere besteht aus zwei Flavin-Bindedomänen (F-1 und F-2) und zwei Cyclase-Domänen (C-1 und C-2). Durch Mutationsversuche konnte gezeigt werden, dass es zur intermolekularen, antiparallelen (*Head-to-tail*) Aggregation zweier *EuPAC α* (bzw. *EuPAC β*) Monomere kommen muss, in dem sich jeweils die C-1 und C-2 Domänen gegenüberliegen und auf diese Weise ein katalytisches Zentrum bilden (Looser et al., 2009). Ist eine solche funktionelle Dimerisierung zur Ausbildung des katalytisch aktiven Zentrums einer Nucleotidcyclase notwendig, spricht man von *Typ III* Cyclasen, einer Klasse der folglich sowohl *EuPAC α* als auch *EuPAC β* angehören.

Nach heterologer Expression dieser Cyclase in Oocyten von *X. laevis* und anschließender Belichtung mit blauem Licht (380-480nm) konnte sowohl eine Erhöhung der cytoplasmatischen cAMP-Konzentration, als auch eine erhöhte Leitfähigkeit der jeweils koexprimierten, cAMP-aktivierten Kanäle CFTR und CNGA2 gezeigt werden (Schroder-Lang et al., 2007). Des Weiteren konnte nach Expression von *EuPAC α* in der Fruchtfliege *D. melanogaster* das gezeigte Putzverhalten durch Belichtung mit blauem Licht unterbrochen werden. Nach Ende des Lichtpulses wurde das Putzen wieder gestartet (Schroder-Lang et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fusionskonstrukt aus der lichtaktivierten Adenylatcyclase *EuPAC α* und einer Version des cAMP-aktivierten Kationenkanals CNGA2 (C460W/E583M, nach Rich et al., 2001) aus dem olfaktorischen Epithel von *R. norvegicus* erstellt, um so über eine indirekt erzielte Lichtaktivierbarkeit dieses Kanals ein neuartiges optogenetisches Werkzeug zu erzeugen (2.10.4.1).

1.3 Eine weitere lichtaktivierbare Adenylatcyclase aus *Beggiatoa spec.*

Vertreter der Gattung *Beggiatoa spec.* zählen zu den Proteobakterien innerhalb der Ordnung Thiotrichales, deren bevorzugte natürliche Habitats schwefelreiche marine Sedimente sind. In dieser benthischen Nische bilden sich regelrechte Matten der farblosen Prokaryonten (Jørgensen und Revsbech, 1983), die durch die Oxidation von Sulfid durch Sauerstoff unter Lichtbedingungen und Nitrat aus endogenen Nitratspeichern unter Dunkelbedingungen Energie gewinnen können (Hinck et al., 2007). Sie stellen damit wichtige Nitrat- und Schwefelfixierende Instanzen in diesen marinen Habitats dar (Sweerts et al., 1990).

Die Annahme lichtaktivierter Enzyme und Proteine lag und liegt hier besonders nahe, da bereits in den frühen neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts photophobische Bewegungen dieser Bakterien auf die Folge von Belichtung -besonders jedoch nach Applikation von Blaulicht- bei diesem Organismus beschrieben wurden (Nelson und Castenholz, 1982). So konnte im Jahr 2010/2011 die Gegenwart von einer weiteren Adenylatcyclase gezeigt werden, welche wie die oben beschriebene *EuPAC α* aus *Euglena* in der Lage ist, nach Aktivierung durch blaues Licht aus dem Substrat ATP cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP) zu generieren (Ryu et al., 2010; Stierl et al., 2011). In Ryu et al., 2010 wird diese Cyclase als BlaC (Blue Light Activated Adenylyl Cyclase) bezeichnet, in Stierl et al., 2011 sowie in der vorliegenden Arbeit wird dasselbe Enzym hingegen durchgängig als *bPAC* (*Beggiatoa* Photoactivated Adenylyl Cyclase) bezeichnet. Auch bei dieser Cyclase kann aufgrund der Sequenz davon ausgegangen werden, dass es zur funktionellen *Head-to-tail* Homodimerisierung des Proteins kommt, welches jeweils aus einer Cyclase-Domäne und einer BLUF-Domäne (Blue Light Receptor Using FAD-Flavin-Adenin Dinukleotid) besteht.

Es handelt sich in diesem Fall ebenfalls um eine *Typ III* Cyclase, welche mit insgesamt 350 Aminosäuren deutlich kleiner ist als die oben beschriebene *EuPAC α* (1019 Aminosäuren), aber nach Belichtung eine deutlich länger anhaltende Aktivität zeigt (Stierl et al., 2011).

In unzähligen zellulären Regulationsprozessen in verschiedenen Phylen spielt cAMP eine zentrale Rolle als Second Messenger (1.4), womit eine nicht-invasive Manipulationsmöglichkeit der cytoplasmatischen cAMP-Konzentration durch diese Proteine von größtem wissenschaftlichen Interesse ist. Im tierischen System wurden nach heterologer Expression dieses Proteins sowohl die lichtinduzierte Erhöhung der cytoplasmatischen cAMP-Konzentration, als auch die erfolgreiche Aktivierung cAMP-aktivierter Ionenkanäle elektrophysiologisch gezeigt (Stierl et al., 2011). Durch gezielte Mutationen in der Substratbindetasche von *bPAC* (=BlaC) konnte eine lichtaktivierbare Guanylatcyclase (=BlgC, Blue Light activated Guanylyl Cyclase) konstruiert werden (Ryu et al., 2010). Nach Einfügen der Mutationen K197E, D265K und T267G in der Aminosäuresequenz von *bPAC* (=BlaC) konnte die enzymatische Substrat- und Produktspezifität dahingehend verschoben werden, dass nach Belichtung mit blauem Licht die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus dem Edukt GTP katalysiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde die dadurch erhaltene lichtaktivierte Guanylatcyclase (=BlgC) konsistent als *bPGC* bezeichnet.

Somit steht ein weiteres optogenetisches Werkzeug zur nicht-invasiven Manipulation cytoplasmatischer cGMP-Konzentrationen zur Verfügung. Um ein besseres Verständnis der Rolle von cAMP und cGMP als Second Messenger in pflanzlichen Systemen (1.4.1, 1.4.2, s. 1.7) zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Gene für beide lichtaktivierbaren Nucleotidcyclasen (*bPAC* und *bPGC*) sowohl transient als auch stabil in den pflanzlichen Modellorganismus *A. thaliana* und transient in Blätter und Pollen von *N. benthamiana* bzw. *N. SR-1* transfiziert (2.4.4).

1.4 Cyclische Nucleotide als Second Messenger

In nahezu allen eukaryontischen und vielen prokaryontischen Organismen spielen cyclische Nucleotide eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion. Erstmals wurde cAMP als physiologisch relevante Substanz im Jahre 1958 in der Hundeleber identifiziert (Rall und Sutherland, 1958) und schon bald darauf die Funktion als Second Messenger bestätigt (Robison et al., 1967).

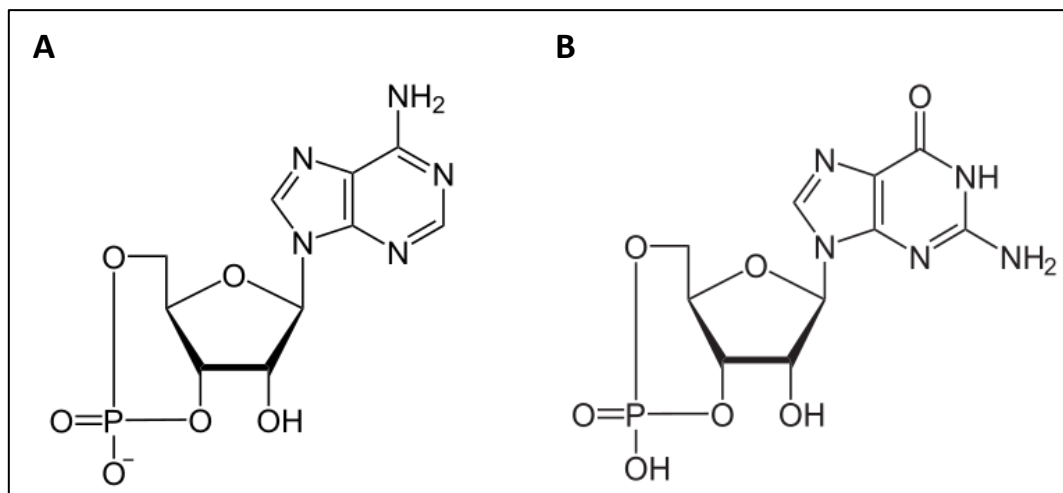


Abbildung 1.1 Struktur cyclischer Nucleotidmonophosphate. **A:** cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). **B:** cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP).

Gebildet wird cAMP von Adenylatcyclasen (Enzyme aus der Gruppe der Lyasen) aus dem Edukt ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat (Sutherland et al., 1962). Analog wird cGMP durch Guanylatcyclasen unter Abspaltung von Pyrophosphat aus GTP gebildet.

Regulative Antagonisten der Cyclasen sind Phosphodiesterasen, welche die gebildeten cNMPs zu NMPs hydrolysieren. Durch die Regulation der cNMP-Konzentration kann so die Funktion cyclischer Nucleotide als Second Messenger strikt kontrolliert werden (Butcher und Sutherland, 1962).

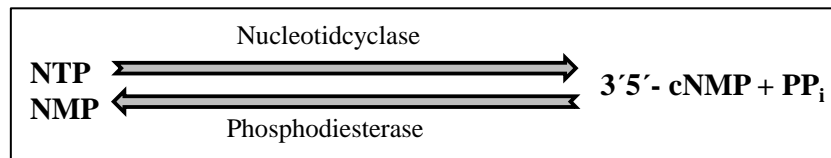


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung von Synthese und Degradation cyclischer Nucleotide. NTP: Nucleotidtriphosphat; cNMP: cyclisches Nucleotidmonophosphat; PP_i: Pyrophosphat; NMP: Nucleotidmonophosphat.

In tierischen Zellen ist cAMP unter anderem direkter Aktivator von Proteinkinasen des Typs A (PKA), welche wiederum durch Proteinphosphorylierungen unterschiedliche regulative Funktionen erfüllen. Durch Bindung von zwei cAMP-Molekülen an die regulatorische R-Domäne der PKA kommt es zu deren Dissoziation und somit zur Freisetzung und Aktivierung der katalytischen Untereinheit.

Diese Untereinheit bewirkt die Phosphorylierung umliegender Proteine mit entsprechenden Serin- oder Threonin-Phosphorylierungsstellen (Builder et al., 1979; Rannels und Corbin, 1980). Auf diese Weise wird zum Beispiel der (bei der rezessiv vererbten Krankheit *Cystische Fibrose* defekte) Chloridkanal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) aktiviert, wodurch es zum Chlorideflux aus der Zelle kommt (Hwang et al., 1994).

Es sind auch Ionenkanäle beschrieben, die direkt durch die Bindung von cAMP oder cGMP reguliert werden. So sind in tierischen Zellen CNG-Kanäle (Cyclic Nucleotide Gated Channels) in olfaktorischen und optischen Sinnesepithelien verantwortlich für Reizperzeption bzw. Interpretation (Cook et al., 1987; Hanke et al., 1988; Zufall et al., 1991).

Ferner ist die cytoplasmatische cAMP-Konzentration maßgeblich beteiligt an der Zusammensetzung des Hormonhaushaltes in der Zelle. Um nur die bekanntesten Vertreter zu nennen, werden die Hormone Glucagon, Histamin, Serotonin, Insulin und Acetylcholin über den cAMP-Spiegel reguliert. Weiterhin werden diverse Enzyme des Glucose-Metabolismus und der Steroidhormon-Synthese direkt durch cAMP gesteuert (Übersicht in Robison et al., 1968). Zudem ist bekannt, dass auch die Expression von Genen in Abhängigkeit von cAMP reguliert werden kann. So ist cAMP nach Bindung an *CRE* (cAMP Responsive Element) zusammen mit *CREB* (CRE-Binding Protein) als funktioneller Transkriptionsfaktor in der Lage, adaptive Genexpression zu induzieren (Montminy et al., 1987).

Auch cGMP ist ein wichtiger Second Messenger. Bei der optischen Reiztransduktion in der tierischen Retina beispielsweise liegt cGMP vor dem Lichtreiz in photorezeptiven Zellen in relativ hoher Konzentration vor und hält cGMP-abhängige Kationenkanäle im ständig offenen Zustand. Bei Belichtung dieser Zellen kommt es zunächst zur Erregung des vertebraten Rhodopsins (welches sich strukturell und funktionell stark vom mikrobiellen Rhodopsin unterscheidet), was zur Aktivierung von Transducin führt. Transducin löst eine Blockade der cGMP-Phosphodiesterase, wodurch cGMP schnell zu GMP hydrolysiert wird. In der Folge sinkt die cytoplasmatische cGMP-Konzentration und die cGMP-abhängigen Kanäle schließen. Es kommt zur Hyperpolarisation der Zelle und damit zur Reizerzeugung. (Übersicht in Baylor, 1987). Eine weitere Aufzählung der zahlreichen regulativen Funktionen cyclischer Nucleotide in tierischen Systemen würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit thematisch verfehlen. Im folgenden Abschnitt soll daher auf die Rolle von cNMPs im Reich der Pflanzen eingegangen werden.

1.4.1 Cyclisches Adenosinmonophosphat in Pflanzen

Die Rolle von cAMP im Pflanzenreich wird bereits lange und kontrovers diskutiert. Ende der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurden in pflanzlichen Geweben verschiedener Pflanzenarten vergleichsweise niedrige cAMP-Konzentrationen ($<0,5\text{pmol/g FW}$) bestimmt. Vergleicht man diese Konzentrationen mit jenen tierischer Zellen, die bis zu drei Größenordnungen darüber liegen können, scheint eine regulative Funktion in Pflanzenzellen zunächst unwahrscheinlich (Spiteri et al., 1989). Heute jedoch sprechen trotz der gemessenen geringen Konzentrationen von cAMP in pflanzlichen Extrakten eine Reihe von Daten und Hinweisen für dessen Funktion als pflanzlicher Second Messenger.

Es konnten sowohl Nucleotidcyclasen als auch Phosphodiesterasen in Pflanzen identifiziert werden (Ashton und Polya, 1975; Brown et al., 1979; Carricarte et al., 1988; Pacini et al., 1993; Ludidi und Gehring, 2003; Witters et al., 2004), was notwendige Voraussetzung für eine Regulation der Konzentration cyclischer Nucleotide ist (Abbildung 1.2). Durch den Einsatz chromatographischer Analysemethoden sank die Nachweisgrenze für cyclische Nucleotide selbst auf etwa 25fmol, womit sowohl cAMP als auch cGMP direkt in pflanzlichem Gewebe nachweisbar wurden (Witters et al., 1996; Ehsan et al., 1998). Im Falle von *N. benthamiana* konnte beispielsweise eine cAMP-Konzentration von 2,8 ($\pm 0,15$) pmol/g Blatt bestimmt werden (Witters et al., 1996).

Auch eine Reihe funktioneller Daten weisen auf eine regulative Funktion von cAMP hin. Beispielsweise sind in *A. thaliana* 20 Mitglieder pflanzlicher CNG-Kanäle beschrieben worden (Übersicht in Kaplan et al., 2007; Dietrich et al., 2010), welche Bindestellen für cyclische Nucleotide aufweisen. In DEVC-Messungen an Oocyten von *X. laevis* sowie in Patch-Clamp-Messungen an *HEK293*-Zellen konnte die cAMP-abhängige Aktivierung von *AtCNGC2* in heterologen Expressionssystemen gezeigt werden (Leng et al., 1999). Demnach ist *AtCNGC2* ein cAMP-aktivierter, einwärtsrektifizierender Kationenkanal.

Des Weiteren wurden an Protoplasten von *Vicia Faba* durch Patch-Clamp-Messungen Kaliumausströme in direkter Abhängigkeit von der vorliegenden cAMP-Konzentration gemessen (Li et al., 1994). Auch weisen einige der in *A. thaliana* vorkommenden pflanzlichen einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle (der *KAT*- und *AKT*- Familie) sowie die auswärtsgerichtenden Kanäle *AtGORK* und *AtSKOR*, putative cAMP- bzw. cGMP- (1.4.2) Bindestellen auf (Sentenac et al., 1992; Übersicht in Kaplan, 2007).

Neben den beschriebenen funktionellen Daten cNMP-aktivierter Ionenkanäle lassen sich auch physiologisch relevante Beobachtungen aufführen. So konnte gezeigt werden, dass die Richtung des Wachstums von Pollenschläuchen aus *A. umbellatus* von einem lateral applizierten (dibutyryl-) cAMP-Gradienten beeinflusst wurde; die Pollenschläuche wuchsen in Richtung zunehmender cAMP-Konzentration (Moutinho et al., 2001). In der gleichen Arbeit wurde durch Einsatz eines cAMP-Farbstoffes gezeigt, dass der cAMP-Spiegel nach der Zugabe von Forskolin (ein Stimulator endogener Adenylatcyclasen) und die damit transient hervorgerufene cAMP-Erhöhung bereits nach einer Dauer von etwa sechzig Sekunden das Ursprungsniveau von cyclischem Adenosinmonophosphat eingestellt wurde. Dies deutet auf die Gegenwart und Aktivität von Phosphodiesterasen hin (Moutinho et al., 2001).

Auch in Wurzeln scheinen cyclische Nucleotide eine wichtige regulative Funktion zu haben (s. 1.4.2). So konnten an Patch-Clamp-Messungen an Wurzelprotoplasten gezeigt werden, dass die Applikation von cAMP zur schnellen Schließung endogener Natriumkanäle führt (Maathuis und Sanders, 2001). Nicht zuletzt ist bei der pflanzlichen Pathogenantwort eine zentrale Funktion von cAMP anzunehmen. Beispielsweise konnte nach der Zugabe von dibutyryl-cAMP zu *P. vulgaris* ein apoplastischer Anstieg von ROS (Reactive Oxygen Species) um das Dreifache beobachtet werden, ein Effekt, der nach Inhibierung endogener Calciumkanäle durch Verapamil ausblieb. Die Zugabe von Forskolin verstärkte hingegen die ROS-Antwort (Bindschedler et al., 2001). Dies legt die Vermutung eines cAMP-aktivierten Calciumkanals am Beginn des *oxidative burst*, einer initialen Reaktion der pflanzlichen Immunantwort nahe.

1.4.2 Cyclisches Guanosinmonophosphat in Pflanzen

Auch cGMP ist sehr wahrscheinlich wichtiger pflanzlicher Second Messenger. Im Jahr 2002 wurde erstmals eine Guanylatcyclase (*AtGC1*) in *A. thaliana* identifiziert (Ludidi und Gehring, 2003). Viele funktionelle Daten sprechen zudem für eine zentrale regulative Funktion von cGMP in Pflanzenzellen. So konnte an Oocyten von *X. laevis* nach heterologer Expression gezeigt werden, dass die pflanzlichen Kalium-einwärtsgerichtenden Kanäle *AtAKT1* und *AtKAT1* direkt durch cGMP beeinflusst werden, in dem das Aktivierungspotential weiter ins Negative verschoben wurde (Hoshi et al., 1995; Gaymard et al., 1996). In *P. nil* ist weiterhin auf biochemischer Ebene eine pflanzliche Proteinkinase beschrieben worden, welche in ihrer Aktivität durch cGMP reguliert wird (Smidt-Jaworska et al., 2003). In *O. Sativa* und *A. thaliana* gibt es zudem ebenfalls zahlreiche bioinformatische Hinweise auf putative Proteinkinasen, welche cNMP-Bindedomänen aufweisen (Krupa et al., 2006). cGMP spielt auch in elementaren metabolischen Synthesekaskaden der Pflanzen eine entscheidende Rolle. So konnte in *G. max* die Induktion der Expression verschiedener an der Biosynthese der Flavonoide beteiligter Enzyme nach der Zugabe von 8-Brom-cGMP (ein membranpermeables cGMP-Derivat) gezeigt werden, welche jedoch nicht durch die Zugabe von 8-Brom-cAMP induziert wurden (Suita et al., 2009). Auch die Synthese der Anthocyane, welche bei der Lichtinterpretation durch die Phytochrome eine wichtige Rolle spielen, wird durch eine konzertierte Wirkung von Calcium und cGMP reguliert (Bowler et al., 1994).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass cyclische Nucleotide in der Signaltransduktion und -interpretation *downstream* diverser Phytohormone aktiv sind. Es konnte beispielsweise gezeigt werden dass das Pflanzenhormon Gibberellinsäure (GA) den Gehalt an cGMP in der Aleuronschicht von *H. vulgare* erhöhte, woraufhin die Expression des Enzyms α -Amylase gesteigert wurde. Nach Zugabe von LY83583, einem generellen Inhibitor von Guanylatcyclasen, kam es weder zur Erhöhung des cGMP-Spiegels, noch zur Expressionssteigerung der α -Amylase.

Durch die weitere Gabe von membranpermeablem cGMP konnte der inhibitorische Effekt von LY83583 aufgehoben und die α -Amylase-Expression wieder gesteigert werden. Das Phytohormon Abscissinsäure (ABA) führte nicht zu einer erhöhten cGMP-Konzentration, was die Spezifität in dieser Signaltransduktion unterstreicht (Penson et al., 1996). Des Weiteren konnte bei der Samenkeimung von *A. thaliana* (welche in der Pflanze natürlicherweise ebenfalls über das Phytohormon GA gesteuert wird) sowohl durch die Gabe von membranpermeablen cGMP, als auch durch die Hemmung der Phosphodiesterasen eine erhöhte Samenkeimungsrate erreicht werden. Im Gegenzug hierzu wurde die Keimungsrate bei Unterbindung der GA-Synthese durch Paclobutrazol herabgesetzt (Teng et al., 2010).

Auch die Funktion eines pflanzlichen Transkriptionsfaktors und damit das Potential eines genetischen Regulators wurde cGMP zugeschrieben. So wird nach Zugabe von membranpermeablen Butyryl-cGMP zu Wurzeln von *A. thaliana* die Expressionssteigerung von knapp 60 Genen beschrieben (Bastian et al., 2010). Eine Vielzahl an Genen, deren Rolle bei Ionenhomöostase, Pathogenabwehr und anderer physiologisch wichtiger Prozesse bekannt ist, finden sich darunter (Übersicht in Maathuis, 2006). Auf die unmittelbare Folge von osmotischem Stress konnte eine schnelle Erhöhung der cytoplasmatischen cGMP-Konzentration in *A. thaliana*-Keimlingen gezeigt werden. Es wurden hier zwei voneinander unabhängige cGMP-Signalwege postuliert, von denen einer rein osmotisch und calciumunabhängig ist, der andere durch eine hohe Natriumchlorid-Konzentration aktiviert wird und calciumabhängig ist (Donaldson et al., 2004). Konsistent konnte bereits 2001 gezeigt werden, dass Natriumkanäle in der Wurzel von *A. thaliana* durch cyclische Nucleotide aktiviert werden, was eine erhöhte Salztoleranz zur Folge hat (Maathuis und Sanders, 2001). Auch Li und Mitarbeiter konnten 2011 eine erhöhte Salzstress-Toleranz nach Zugabe von membranpermeablem cGMP nachweisen (Li et al., 2011). Als mittelfristige Anpassung an Salzstress kann die beobachtete verstärkte Expression cNMP-aktivierter Kationenkanäle aus *A. thaliana* dienen, (CNGCs, KAT, AKT, SKOR) und damit eine cGMP-abhängige Regulation der Ionenhomöostase erklären (Maathuis, 2006).

Auch biopathogener Stress führt zur Erhöhung des zellulären cGMP-Spiegels. In Folge einer *Pseudomonas syringae* Infektion kam es zu einer transienten, etwa fünffach überhöhten cytoplasmatischen cGMP-Konzentration (etwa 1pmol cGMP/g FW), wobei die Menge an freiem cGMP mit der Virulenz der eingesetzten Stämme korrelierte (Meier et al., 2009).

1.5 Calcium als pflanzlicher Second Messenger

In nahezu allen bekannten Lebensformen ist die Bedeutung von Calcium als Second Messenger heute unumstritten. Auch in Pflanzen hat Calcium eine wichtige Funktion als zentraler Botenstoff in unterschiedlichen Signaltransduktions-Kaskaden (McAinsh et al., 1995; Cessna et al., 2001; Rudd und Franklin-Tong, 2001; Sanders et al., 2002; Hetherington und Brownlee, 2004; Sanders et al., 2005). Die Änderung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration ist sowohl ein früh auftretendes Ereignis welches auf biotische und abiotische, pathogene und symbiontische Interaktionen folgt, als auch Induktor für eine jeweilige, auf den Reiz hochspezifische zelluläre Antwort. Prinzipiell ist ein auf Calcium basierendes Signaltransduktions-System angewiesen auf Generation, Regulation und Interpretation transienter und variierender cytoplasmatischer Calciumkonzentrationen (Übersicht in Hetherington und Brownlee, 2004).

Zunächst sind für Ausbildung und Modulation einer spezifischen Calciumsignatur Mechanismen zur schnellen Erhöhung des freien cytoplasmatischen Calciums notwendig. Hierzu finden sich eine Reihe hochregulierter, calciumpermeabler Ionenkanäle. Zu den wichtigsten membranständigen Ionenkanälen zählen Vertreter der CNGC-Familie (Cyclic Nucleotide Gated Channels), der GLR-Familie (Glutamate-Like-Receptors) und der TPC-Familie (Two Pore Calcium Channel) (Übersicht in Hetherington und Brownlee, 2004). Es finden sich auch CNGC-Kanäle, die sowohl Bindestellen für Calmodulin als auch für cyclische Nucleotide aufweisen und damit sowohl cNMP- (s.1.4) als auch calciumbasierte Informationen interpretieren, eventuell sogar integrieren können (Talke et al., 2003). Auch die GLRs stellen eine Gruppe nichtselektiver pflanzlicher Calciumkanäle (NSCCs) dar (Demidchik et al., 2002), welche ihre Leitfähigkeit für Calcium durch die Bindung einer Aminosäure erlangen.

Plasmamembranständige Calciumkanäle lassen sich formal weiterhin in drei Hauptkategorien einteilen: Mechanosensitive Calcium Kanäle (MCCs), depolarisationsaktivierte Calciumkanäle (DACCs) und hyperpolarisationsaktivierte Calciumkanäle (HACCs) (Übersicht in McAinsh und Pittmann, 2009).

Neben diesen ausschließlich in der Zellmembran lokalisierten, calciumpermeablen Kanälen gibt es eine Reihe endomembranständiger Calciumkanäle, die zur Freisetzung von Calcium aus zellinternen Calciumspeichern ins Cytoplasma aktiviert und genutzt werden können. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist der vakuoläre SV- (Slow Vacuolar) Kanal, der sowohl über cytoplasmatisches Calcium als auch über das Membranpotential reguliert wird und bereits 1978 erstbeschrieben wurde (Hedrich und Neher, 1978). Das codierende Gen für diesen Kanal wurde erst im Jahr 2005 in TPC-1 über *knock-out*-Studien identifiziert (Peiter et al., 2005). Dieser Kanal weist zwei Calciumbindestellen auf (EF-Hands) und ist damit in der Lage zur schnellen Erhöhung der zellulären Calciumkonzentration beizutragen. Diese sogenannte CICR-Kopplung (Calcium Induced Calcium Release) ermöglicht durch einen *feed-forward*-Prozess (einer positiven Rückkopplung) einen schnellen Anstieg der freien Calciumkonzentration (Ward und Schroder, 1994; Bewell et al., 1999).

Die weiter beschriebene Regulation dieses Kanals über den pH-Wert (Schulzlessdorf und Hedrich, 1995) ermöglicht die Integration weiterer an seiner Steuerung beteiligter Parameter, beispielsweise der Alkalisierung des Cytoplasmas als Folge einer erhöhten Abscissinsäurekonzentration. Die Erhöhung von Abscissinsäurekonzentration (ABA) ist wiederum die Folge von Trockenstress und führt zum schnellen Schließen der Stomata. Die schnellen charakteristischen Calciumoszillationen, welche beim Schließen der Stomata beobachtet worden sind (Allen et al., 1999; Evans et al., 2001; Allen et al., 2001), lassen sich hervorragend in dieses Modell einfügen.

Um nun eine erhöhte Calciumkonzentration in ein bestimmtes Calciummuster und damit in eine Information zu übersetzen, gibt es zahlreiche antagonistische Kanäle und Pumpen, die einer erhöhten Calciumkonzentration entgegenwirken, indem sie Calcium -wiederum strikt reguliert- schnell aus dem Cytoplasma abtransportieren.

Zu nennen sind hier vor allem Calcium-ATPasen, die unter ATP-Verbrauch Calcium entweder in die Vakuole oder über die Plasmamembran aktiv aus dem Cytoplasma pumpen. Calcium-ATPasen werden entsprechend ihrer tierischen Homologien in Familien der Typ IIA- (ER-type, lokalisiert im endoplasmatischen Reticulum) und IIB- (ACA, Autoinhibited Calcium-ATPasen, plasmamembranständig) ATPasen eingeteilt, die wiederum jeweils mehrere Vertreter aufweisen (Liang et al., 1997; Ferrol und Bennett 1996; Geisler et al., 2000; Ordenes et al., 2002).

Des Weiteren finden sich vor allem bei höheren Pflanzen H^+/Ca^{++} Antiporter, die einen Protonengradienten nutzen, um Calcium im Austausch gegen den chemischen Gradienten zu transportieren (Cheng et al., 2003). Auch diese Ionenkanäle und Transporter werden neben weiteren konzertierten Regulationsmechanismen durch Calcium (bzw. Calmodulin) in ihrer Aktivität reguliert (Curran et al., 2000). Die Aktivität von ATPasen des Typs IIB beispielsweise kann durch CDPK-Phosphorylierung (Calcineurin Dependend Protein Kinase) negativ reguliert werden. (Hwang et al., 2000).

Auf diese Weise werden transiente Calciummuster und -oszillationen erzeugt, die durch unterschiedliche Dauer, Frequenz und Amplitude spezifische Informationen codieren und weitergegeben können (Übersicht in Hetherington und Brownlee, 2004; McAinsh und Pittmann, 2009).

Die Interpretation dieser komplex generierten Calciuminformation erfolgt schließlich durch eine Reihe von Proteinen, deren Aktivität durch die Gegenwart von Calcium reguliert wird. Typischerweise handelt es sich hierbei zusammenfassend um Calmodulin, CBLs (Calcineurin-B-like Proteins) calmodulinbindende Proteine und calciumabhängige Proteinkinasen (CDPKs) (Luan et al., 2002; Cheng et al., 2002; Reddy et al., 2002; Zhang et al., 2003). Die Interpretation der generierten Calciummuster durch CDPKs beispielsweise erfolgt, indem die Kinasen, in Abhängigkeit von der gegebenen Calmodulin-Aktivität unterschiedlich stark autophosphorylieren.

Je nach auftretender Frequenz der Calciumoszillation ändert sich also mit der Zahl der zeitgleich aktiven Phosphorylierungsstellen die Aktivität der CaM-Kinase und damit das Potential, Proteine *downstream* calciumabhängig zu phosphorylieren (De Koninck et al., 1998).

Die in unterschiedlicher Form beobachteten Calciumsignaturen scheinen für eine Vielzahl von Informationen zu stehen. So konnte gezeigt werden, dass Calciumoszillationen in Abhängigkeit von Frequenz und Amplitude zu Veränderungen der Öffnungsweite der Stomata führten. (McAinsh, 1995, Allen et al., 1999, Allen et al., 2001, Evans et al., 2001). Auch an der Spitze von Pollenschläuchen ist eine periodische Calciumoszillation in direktem Zusammenhang mit dessen Wachstum beobachtet worden (Holdaway-Clarke et al., 1997; Frietsch et al., 2007). Des Weiteren werden Salzstress, osmotischer Stress und Kälte ebenfalls über transiente Calciummuster vermittelt (Cessna et al., 2001). Wie bereits in 1.4.2 erwähnt, ist Calcium auch in der Signaltransduktion bei der Pathogenabwehr ein zentraler Second Messenger. Durch Erhöhung des Calciumspiegels kommt es unter anderem zur ROS-Produktion und damit zur Einleitung der hypersensitive response (Clough et al., 2000; Bindschedler et al., 2001).

1.6 Photorezeption in Pflanzen

Pflanzen sind in der Lage elektromagnetische Wellen im Bereich des sichtbaren Lichtes (etwa 400-700nm) und darüber hinaus neben der photosynthetischen Nutzung auch für die Steuerung und Koordination onthogenetischer, circadianer und circa-annualer Prozesse zu verwenden. Um mögliche Überschneidungen oder Interaktionen der generierten transgenen Pflanzen, welche die blaulichtaktivierten Proteine Channelrhodopsin sowie *bPAC::YFP* bzw. *bPGC::YFP* exprimieren zu verstehen, sollen die Hauptvertreter der in den Pflanzen vorkommenden photorezeptiven Proteine erwähnt werden. Zu nennen sind die Hauptfamilien der Phototropine und Cryptochrome, welche beide im UV-A und blauen Wellenlängenbereich absorbieren und die der Phytochrome, welche im roten bzw. infraroten Wellenlängenbereich aktiviert werden. Des Weiteren werden UV-B-Rezeptoren diskutiert. Auch wurden erste Hinweise für die Lichtperzeption in diesem Wellenlängenbereich (280-315nm) beschrieben (Rizzini et al., 2011), jedoch ist die molekulare Funktionsweise dieser Rezeptorproteine bis dato nicht vollständig aufgeklärt.

In *A. thaliana* sind fünf verschiedene Phytochrome beschrieben (PHY A-E). Sie bestehen aus je zwei dimerisierenden 125kDa Polypeptiden und dem funktionellen Chromophor Phytochromobilin (Gyula et al., 2003). Phytochrome können prinzipiell in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Die inaktive Konformation, in der alle Phytochrome unter kompletter Dunkelheit oder Dunkelrotbedingungen vorliegen, hat ihr Absorptionsmaximum bei etwa 660nm und wird daher als *Pr*-Konformaton (Phytochrome-red) bezeichnet. In der zweiten Konformation, der *Pfr*-Konformation (Phytochrome far-red), welche durch Belichtung mit hellrotem Licht gebildet wird, liegt das Absorptionsmaximum bei 730nm. In dieser Konfiguration kommt die Phosphorylierungsaktivität dieser *Ser/Thr*-Kinase zum Tragen und übernimmt die Koordination diverser photomorphogenetischer Prozesse. So werden Samenkeimung und die Ausbildung des Blütenstandes durch die Phytochrom-Aktivität gesteuert (Reed et al., 1994).

Cryptochrome wurden erstmals in *A. thaliana* entdeckt (Ahmad und Cashmore, 1993), wurden aber ebenso in Tieren und Bakterien gefunden. Sie sind unter anderem verantwortlich für die Steuerung circadiankoordinierter Prozesse und werden durch UV-A und blaues Licht (315-500nm) aktiviert (Cashmore et al., 1999). In *A. thaliana* sind zwei Vertreter der Cryptochrome beschrieben (CRY1 und CRY2). Diese binden die beiden Chromophore Pterin und FAD (Flavine Adenine Dinucleotide) und zählen damit zu den Flavoproteinen. Sowohl CRY-1 als auch CRY-2 sind verantwortlich für die Steuerung und Regulation der Ausbildung des Hypokotyls. Die Überexpression von Cryptochrom beispielsweise führte zur Ausbildung auffällig kleiner Keimlinge und zudem zu einer verstärkten Akkumulation von Anthocyanen (Lin et al., 1996; Ahmad et al., 1998; Cashmore et al., 1998).

Die zweite Klasse blaulichtaktivierter Proteine in Pflanzen bilden die Phototropine, Rezeptorkinasen, aus deren Familie ebenfalls zwei Vertreter in *A. thaliana* beschrieben sind (PHOT1 und PHOT2). Phototropine wurden bereits 1988 als 120kD große, membranständige Proteine identifiziert, welche durch blaues Licht phosphoryliert werden (Gallagher et al., 1988). Es handelt sich bei diesen Flavoproteinen, wie bei den Phytochromen, um autophosphorylierende *Ser/Thr*-Kinasen, die zwei LOV-Domänen zur Bindung des Chromophors FMN (Flavin Mono Nucleotid) aufweisen. Bei Belichtung kommt es zu einem intramolekularen Photocyclus, bei dem nach der Umlagerung von FMN eine Autophosphorylierung des Proteins ermöglicht wird (Briggs et al., 2002). Phototropine steuern, wie der Name impliziert, den Phototropismus, also die Ausrichtung einer Pflanze hin zur Lichtquelle (Sakai et al., 2001). Dies geschieht, indem auf der lichtabgewandten Seite der Koleoptile Phototropin-gesteuert das Wachstumshormon Auxin (Indolessigsäure, IAA) akkumuliert wird. Durch die erhöhte unilaterale Auxin-Konzentration kommt es zur einseitigen Wachstumsverschiebung und damit zum gekrümmten, lichtorientierten Wachstum. Weiterhin wird die Bewegung von Chloroplasten (Jarillo et al., 2001), sowie die Öffnung der Stomata über Phototropine gesteuert (Sakai et al., 2001).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Wie in den vorangegangenen Seiten ersichtlich wurde, gibt es großes wissenschaftliches Interesse am grundlegenden Verständnis der Funktions- und Interaktionsweise pflanzlicher Second Messenger. Viele Arbeiten zum Thema der Reizverarbeitung in Pflanzen zeigen die zentrale Funktion von Calcium als Second Messenger in diversen Signaltransduktions-Kaskaden. So sind Calciumoszillationen oder transiente Calciumelevationen in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Stomaschluss, der pflanzlichen Pathogeninteraktion, aber auch bei symbiontischen oder abiotischen Interaktionen beobachtet und beschrieben worden (Knight et al., 1991; Blume et al., 2000; Cessna et al., 2001; Moscatiello et al., 2009). Auch über die Funktion von cyclischen Nucleotiden als pflanzliche Second Messenger gibt es eine Reihe pharmakologischer und funktioneller Studien, welche cAMP und vor allem cGMP eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion beimessen (Penson et al., 1996; Moutinho et al., 2001; Maathuis, 2006; 1.4.1, 1.4.2). Die Gegenwart cNMP-aktivierbarer Kationenkanäle und deren wichtige Funktion beispielsweise bei der Pathogen-Abwehr (Clough et al., 2000; Bindschedler et al., 2001) legt verstärkt eine Annahme der Funktion cyclischer Nucleotide als Second Messenger nahe. Jedoch ist diese Rolle aufgrund der vergleichsweise niedrigen nachgewiesenen Konzentrationen cyclischer Nucleotide in Pflanzen (Spiteri et al., 1989; Witters et al., 1996) zweifelhaft und wird anhaltend kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte zur weiteren Aufklärung der Funktion und gegebenenfalls Interaktion dieser Second Messenger in Pflanzen beigetragen werden. Anders als in vielen vorangegangenen Arbeiten zu diesem Thema sollten die genannten Signalmoleküle während einer Interaktion nicht nur beobachtet und nachgewiesen, sondern nicht-invasiv und aktiv manipuliert werden. Durch eine induzierte, transiente Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration bzw. der Erzeugung von Calciumoszillationen sollten *downstream* dieser Signatur stattfindende Prozesse sowohl beobachtet, als auch aktiv manipuliert werden.

Um dieses Ziel zu erreichen sollte zunächst der aus *C. reinhardtii* stammende lichtaktivierte und calciumpermeable Kationenkanal Channelrhodopsin-2 (Nagel et al., 2003, s. 1.1) in Pflanzenzellen exprimiert werden, um durch periodische Lichtsignale oszillierende Calciumsignaturen zu induzieren.

Zudem sollte auch das Membranpotential durch Lichtmuster manipuliert werden, um auch *downstream* dieser Regelgröße ablaufende Prozesse zu untersuchen und nicht-invasiv zu manipulieren.

Um die Rolle cyclischer Nucleotide in der pflanzlichen Signaltransduktion weiter aufzuklären, sollte zudem die lichtaktivierte Adenylatcyclase *bPAC* aus *Beggiatoa spec.* (=BlaC, Ryu et al., 2010; Stierl et al., 2011), sowie eine daraus abgeleitete, ebenfalls lichtaktivierte Guanylatcyclase *bPGC* (=BlgC nach Ryu et al., 2010) transient und stabil in pflanzliche Systeme eingebracht und funktionell charakterisiert werden. Auch hier war es erklärte Absicht, die cytoplasmatische Konzentration von cAMP bzw. cGMP nicht-invasiv durch Blaulichtaktivierung der jeweiligen Cyclasen zu erhöhen.

Durch die Verwendung von lichtaktivierbaren Ionenkanälen und Enzymen sollte in der vorliegenden Arbeit erstmals ein *optogenetischer* Ansatz in Pflanzenzellen zur nicht-invasiven Manipulation des Membranpotentials und/oder der Konzentrationen (putativ-) wichtiger Second Messenger durchgeführt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterien

2.1.1 Verwendete Laborstämme

2.1.1.1 *Escherichia coli*

In dieser Arbeit wurden Bakterien der kompetenten Laborstämme *Escherichia coli* *Xll Blue MRF'* und *Escherichia coli* *DH5 α* verwendet, um modifizierte DNA *in vivo* zu amplifizieren. Die kompetenten Zellen dieser Stämme wurden zu 50 μ l Aliquots bei -80°C gelagert (*NUAIRE Ultralow-freezer*, Integra Bioscience GmbH) und nach der Heat-Shock Transformation (2.4.3.1) in antibiotikahaltigem LB- (Luria-Broth) Medium (6.4.3.1) bzw. auf LB-Agarplatten (6.4.3.5) kultiviert.

2.1.1.2 *Agrobacterium Tumefaciens*

Zur stabilen Transfektion von Pflanzen (2.4.4.1) und Zellkulturen (2.4.4.2) wurden die Konstrukte in den binären Pflanzentransfektionsvektoren (2.10.2.3, 2.10.3.2) durch Elektroporation (2.4.3.2) in den Laborstamm des Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* *GV-3101* eingebracht.

Elektrokompetente Bakterien dieses Stammes wurden ebenfalls in 50µl Aliquots bei -80°C gelagert (*NUAIRE Ultralow-freezer*, Integra Bioscience GmbH) und nach der Transformation in antibiotikahaltigem YEB-Medium (6.4.3.2), beziehungsweise auf YEB-Selektions-Agarplatten (6.4.3.6) bei 28°C kultiviert (*Innova 4250 Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific).

2.1.2 Übernachtskulturen

Für die Anzucht der Bakterien in Übernachtskulturen wurden 5-8ml frisches LB-Medium (*E. coli*, 6.4.3.1) bzw. 15ml YEB-Medium (*A. tumefaciens*, 6.4.3.2) mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum (6.4.6) in Falcon Röhrchen abgefüllt. Mit autoklavierten Pipettenspitzen wurden einzelne Klone von der Selektions-Agarplatte (2.1.3) aufgenommen und die Flüssigkultur durch Überführen der Spitze in das entsprechende Medium angeimpft. Zur Auffrischungs-Überimpfung auf Agarplatten befindlicher Ausstrichkulturen wurde eine Metallimpföse verwendet, welche durch Ausglühen über der Bunsenbrennerflamme sterilisiert wurde, um den Abstrich von der Agarplatte in das frische Nährmedium zu überführen. Auch ältere Flüssigkulturen wurden verjüngt, indem einige Tropfen der älteren Kultur in frisches Medium überführt wurden. Je nach Bedarf wurden Übernachtskulturen auch in 500ml-Schikanekolben angezogen. Die frisch angeimpften Bakterienkulturen wurden 12-18 Stunden bei 37°C (*E. coli*) bzw. 36-48 Stunden bei 28°C (*A. tumefaciens*) und unter ständigem Schütteln (*New Brunswick Scientific, G25, Incubator, Shaker*, New Brunswick Scientific, *Innova 4250, Incubator Shaker* New Brunswick Scientific) inkubiert.

2.1.3 Selektion und Kultur auf Agarplatten

Zur Selektion transformierter Bakterien (2.4.3.1, 2.4.3.2) wurden *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* Zellen mit autoklavierten Pipettenspitzen auf LB-Agarplatten bzw. YEB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (6.4.6) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C (*E. coli*) im Temperaturschrank (*Memmert BE600*) bzw. für 48 Stunden bei 28°C (*A. tumefaciens*) (*Innova 4250, Incubator Shaker* New Brunswick Scientific) inkubiert. Alle Kolonien der gewachsenen Klone tragen das über Transformation eingebrachte Plasmid, welches ihnen die Resistenz gegen das im Agar befindliche Selektionsantibiotikum verleiht. Entsprechende Kolonien wurden mit autoklavierten Pipettenspitzen in frisches Flüssigmedium (LB-Medium bzw. YEB-Medium) überführt und als Übernachtkulturen (2.1.2) angezogen. Auch zur mittelfristigen Konservierung der als positiv identifizierten Bakterienklone wurden Agar-Sicherungsplatten erstellt und bis zu zwei Monate bei 4°C gelagert.

2.1.4 Permanent-Kryokulturen

Von Bakterienklonen, die das durch Sequenzierung (2.4.1.9) überprüfte und in der Sequenz bestätigte Plasmid trugen, wurden zum Teil Permanentkulturen (Glycerin-Kryokulturen) angesetzt. Hierzu wurden etwa 300µl einer frischen Übernachtkultur (2.1.2) mit 300µl Glycerin (60% in dH₂O) durch vortexen homogen gemischt, sofort in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bei -80°C (*NUAIRE Ultralow-freezer*, Integra Bioscience GmbH) aufbewahrt. Durch Abnehmen und Überführen kleiner Mengen dieser und bereits bestehender Kryokulturen in frisches Medium können und konnten jederzeit frische Kulturen (2.1.2) angesetzt werden.

2.2 Pflanzen

2.2.1 *Arabidopsis thaliana*

In der vorliegenden Arbeit wurde der pflanzliche Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* herangezogen, um nach transienter Transfektion von Protoplasten (Yoo et al., 2007; s. 2.4.4.4) erstmalig die Funktion und Aktivität der lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC* und *bPGC* (=BlaC bzw. BlgC, Ryu et al., 2010; Stierl et al., 2011) in Pflanzenzellen zu zeigen. Zudem wurden auf der Grundlage von *A. thaliana Col-0* Aequorin (nach Knight et al., 1991) zwei stabil transgene Pflanzenlinien (2.4.4.1) generiert.

A. thaliana gehört zur Familie der Brassicaceae und findet seit der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts vielfach Verwendung als pflanzlicher Modellorganismus für höhere Pflanzen (Meinke et al., 1998), da sich eine sehr kurze Generationszeit von etwa sechs bis acht Wochen und einfache anspruchslose Anzucht für laborbiologische Untersuchungen als vorteilhaft erweisen. Die am häufigsten verwendeten Ökotypen dieser Gattung sind *Columbia (Col-0)* und *Landsbergis erectis*, welche als genetische und molekularbiologische Standards anerkannt sind (Meinke et al., 1998). Das etwa 125kb große Genom trägt rund 25500 Gene und ist auf fünf Chromosomen verteilt. Seit Anfang dieses Jahrhunderts ist das gesamte Genom dieser Pflanze nach vollständiger Sequenzierung bekannt (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Neben der Kenntnis des Genoms ist die Verfügbarkeit eines großen und wachsenden Mutanten-Spektrums ein weiterer Grund für die Verwendung dieser Pflanze. So lassen sich gewonnene Erkenntnisse sinnvoll in bestehende Modelle integrieren. Durch die einfache Transfektions-Möglichkeit von Protoplasten durch die Verwendung von Polyethylenglycol (Yoo et al., 2007; 2.4.4.4) lassen sich zudem relativ schnell transient transgene Zellen erzeugen, welche für viele biologisch relevante Fragestellungen adäquat und ausreichend sind.

Auch die Generation von stabil transgenen Pflanzenlinien ist durch die etablierte Methode des *floral dipping* (Clough und Bent, 1998; 2.4.4.1) verhältnismäßig einfach zu realisieren. In der vorliegenden Arbeit wurden *A. thaliana* des Ökotyps *Columbia* verwendet, welche z.T. das Gen für das Calciumreporterprotein Aequorin konstitutiv exprimierten (nach Knight et al., 1991; Diese Pflanzen wurden vor der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit von Dr. Petra Dietrich erstellt, s. 2.4.4.1), um nach der Zweit-Transfektion mit den lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC* und *bPGC* stabil zweifach transgene (2.4.4.1) Pflanzenlinien zu erzeugen. Dies ermöglichte die Messung von lichtinduzierten Calciumsignalen und -oszillationen am Luminometer, was zentraler Gegenstand der Fragestellung dieser Arbeit war (s. 1.7).

2.2.2 *Nicotiana spec.*

Pflanzen der Gattung *Nicotiana spec.* eignen sich hervorragend für die Untersuchung laborbiologischer Fragestellungen, da diese Pflanzen ebenfalls eine kurze Generationszeit aufweisen und sehr schnell an Biomasse gewinnen. Durch die Möglichkeit, die Blätter dieser Pflanzen relativ schnell und einfach durch Infiltration (2.4.4.3) zu transfizieren, stellen diese Pflanzen einen geeigneten pflanzlichen Organismus zur transient-heterologen Proteinexpression dar. *Nicotiana benthamiana* wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Channelrhodopsinvarianten C128A und C128T transient zu exprimieren und erstmals funktionell in Pflanzenzellen zu untersuchen. Nach Infiltration der Blätter (2.4.4.3) und anschließender Protoplastierung (2.2.6) wurden Patch-Clamp-Messungen an epidermalen Protoplasten (2.5.5.1) durchgeführt, um die Funktion dieser lichtaktivierten Kationenkanäle (1.1) in Pflanzenzellen zu zeigen. Auch Einstichmessungen (2.5.4.1) zur Bestätigung einer lichtinduzierten Manipulation des Membranpotentials (3.1.2.1) wurden an infiltrierten Blattscheiben von *N. benthamiana* durchgeführt.

Zudem wurden Pollen aus *Nicotiana SR-1* herangezogen, um diese transient ballistisch mit den lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* zu transfizieren (2.4.4.5) und die Auswirkungen aktiver Nucleotidcyclasen bzw. erhöhter cNMP-Konzentrationen auf das Pollenschlauchwachstum zu untersuchen.

2.2.3 Anzucht in Gewächshaus und Klimakammer

Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen (*A. thaliana*, Ökotyp *Columbia* und deren transformierte Linien und *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana SR-1*, 2.2.1, 2.2.2) wurden in den Gewächshäusern des Institutes bei einer Temperatur von 16-22°C angezogen. Unter Kurztagesbedingungen (8-20 Uhr), bzw. Langtagesbedingungen (6-22 Uhr) wurden die Pflanzen mit Licht einer Belichtungsintensität von etwa 40kLux bestrahlt (2.9), die restliche Zeit wurden die Kammern durch Schwarze Folie bzw. vollautomatische Deckelung verdunkelt. Die Anzucht der Pflanzen fand auf Pflanz- und Pikiererde (*Substrat-1*, Klasmann-Deilmann GMBH) statt. Während der Sommermonate und bei hohen Außentemperaturen wurden die Pflanzen des Weiteren in Klimakammern angezogen. (Belichtung 8-20 Uhr, 16-22°C). Die Pflanzen der stabil transformierten Linie *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* wurden ausschließlich in der Klimakammer herangezogen. Die Belichtungsintensitäten sind in 2.9 angegeben. Während der Östrogeninduktion (3.4.1) wurden die Pflanzen im Labor unter dem Abzug gehalten und mit einer Lichtbank (bestehend aus drei Pflanzen-Wachstums-Neonröhren (*L-18W/77*, Osram) und drei handelsüblichen Neon-Leuchtstoffröhren) belichtet (Belichtungsdauer: 8-18 Uhr, Raumtemperatur).

2.2.4 Anzucht auf Vermiculit

Um die Induktion der *bPAC::YFP*-Expression an Wurzeln von *A. thaliana* zu untersuchen, wurden die Pflanzen der stabil transgenen Linie *bPAC::YFP* nach der Keimung auf der MS-Agarplatte (2.4.4.1) auf Vermiculit pikiert. Nach der Induktion der Expression von *bPAC::YFP* durch Gießen mit östrogenhaltigem Wasser (10 μ M) konnten die Pflanzen einfach aus dem lockeren Substrat entnommen- und die Expression in den Wurzeln fluoreszenzmikroskopisch untersucht und dokumentiert werden. Während ihres Wachstums auf Vermiculit befanden sich die Pflanzen in einem Phytotron unter konstanten Wachstumsbedingungen (Belichtung 8-18 Uhr, s. 2.9, 22°C, Eigenbau der Werkstatt Botanik-I des Julius-von-Sachs Institutes der Universität Würzburg).

2.2.5 *Arabidopsis thaliana* Zellkultur

Bei der Generierung einer stabil transgenen, *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* exprimierenden Zellkulturlinie (2.4.4.2) wurde eine bestehende Zellkulturlinie *A. thaliana Col-0* Aequorin als Grundlage für die Zweit-Transfektion herangezogen. Die heterotrophen Kulturen wurden im Schüttler (*CH 4103*, Infors, Switzerland) in HaM-Medium (6.4.3.3) in 250ml Erlenmeyerkolben unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur angezogen. Dem Medium wurde Hygromycin (6.4.6) zugesetzt, um bakterielle Kontamination der Pflanzenzellen zu unterdrücken und den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten. Die Zellen befanden sich während des Wachstums unter diffusem Raumlicht. Zum wöchentlichen Umsetzen der Zellen wurde der gesamte Überstand der Kultur abgenommen und den im Kolben verbleibenden, klumpig wachsenden Zellagglomeraten etwa 50ml frisches HaM-Medium (6.4.3.3) zugegeben. Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der Zellkultur fanden unter der Sterilbank statt.

Die Versuche zur Bestätigung von Expression und Funktion der lichtaktivierten Nucleotidcyclasen in den beiden stabil transgenen Zellkulturen (3.5) wurden mit dem abgenommenen Zellüberstand durchgeführt, in dem sich freie und einzelne Zellen befanden. Zur Induktion der Proteinexpression der lichtaktivierten Proteine *bPAC::YFP* bzw. *bPGC::YFP* wurde zweimalig Östrogen in der Konzentration 10µM zugegeben und die Zellen bis zur Probenentnahme in absoluter Dunkelheit und unter Schütteln bei Raumtemperatur in Styroporboxen gehalten.

Um die Zellkulturen über einen längeren Zeitraum (ohne die aktive Durchführung von Versuchsreihen) am Leben zu erhalten, bzw. um Sicherungskclone anzulegen, wurden Kallus-Kulturen angesetzt. Hierzu wurden die Zellen auf HaM-Phytigel Platten (6.4.3.7) ausgestrichen und die sich bildenden Kalli im Zeitraum von etwa drei bis vier Wochen umgesetzt. Zur Überführung und Verjüngung der Kallus-Kulturen wurde eine Spatelspitze eines alten Kallus auf eine frische HaM-Phytigelplatte überführt. Das Wachstum der Kalli fand in kompletter Dunkelheit bei Raumtemperatur statt. Durch Überführen dieser Kalluskulturen in HaM-Flüssigmedium konnten jederzeit neue Flüssigkulturen angesetzt werden.

2.2.6 Isolation der Protoplasten

In dieser Arbeit wurden Protoplasten von *A. thaliana* (Ecotypen *Columbia*, z.T. mit konstitutiv exprimierten Aequorin unter der Kontrolle des 35S-CaMV Promotors, 2.2.1) isoliert, um diese durch PEG-Transfektion (Poly Ethylen Glycol) transient zu transfizieren (Yoo et al, 2.4.4.4). Hierzu wurden je nach Bedarf und Ansatzgröße 15-30 Blätter drei bis sechs Wochen alter Pflanzen mit einer scharfen Rasierklinge abgetrennt und auf einer Glasplatte in dünne Streifen von etwa 0,5-1mm Breite geschnitten. Die Blattstreifen wurden anschließend direkt in eine Petrischale (92mm, Sarsted) mit der entsprechenden Enzymlösung (6.4.4) überführt und 15-30 Minuten abgedunkelt unter Evakuierung infiltriert.

Nach Entnahme aus dem Exsikkator wurde die Petrischale mit den Blattstreifen für etwa drei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem schwenken (*Polymax 1040* Heidolph, 20-30rpm) inkubiert, um Zellwand und extrazelluläre Matrix der Pflanzenzellen enzymatisch zu verdauen und die Protoplasten freizusetzen. Anschließend wurden die Protoplasten über ein Nylon-Filternetz einer Maschengröße von 50µm in ein frisches 50ml-Falcon-Röhrchen überführt, um restliche unverdaute Zellwandbestandteile abzutrennen.

Die filtrierte Enzymlösung mit den Protoplasten wurde mit W-5-Lösung (6.4.2.7) auf ein Volumen von 50ml aufgefüllt und abzentrifugiert (100g / 2min / RT). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Protoplastenpellet in 3-5ml W-5-Lösung aufgenommen, durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert und für mindestens 30 Minuten auf Eis gehalten, bevor mit der Transformation (2.4.4.4) begonnen wurde. Eine deutliche höhere Transformationseffizienz ergab sich, wenn die Protoplasten erst am nächsten Morgen transformiert wurden, die Protoplasten also über Nacht in W-5-Lösung gehalten wurden und bei Raumtemperatur vom Zellwandverdau regenerieren konnten.

Des Weiteren wurden Protoplasten von *N. benthamiana* aus infiltrierte Blattscheiben (2.4.4.3) gewonnen, um Patch-Clamp-Messungen (2.5.5) zur Funktionsbestätigung der Channelrhodopsin-2-Varianten C128A::YFP und C128T::YFP an epidermalen Protoplasten durchzuführen. Hierzu wurden infiltrierte Bereiche der *N. benthamiana*-Blätter mit einer scharfen Rasierklinge ausgeschnitten und ebenfalls in etwa 0,5-1mm breite Streifen geschnitten. Diese Blattstreifen wurden in kleine Petrischalen (*NuncionTM Δsurface* 35mm, NUNC) mit der entsprechenden Enzymlösung (6.4.4.3) überführt und ebenfalls im Exsikkator unter Evakuierung infiltrierte. Der Verdau der Protoplasten wurde in diesem Fall über Nacht durchgeführt, um die Protoplasten gesichert zellwandfrei für Patch-Clamp-Messungen nutzen zu können. Für die Messung von Channelrhodopsin-Strömen wurde direkt zum Verdau *All-Trans* Retinal (100µM) zugegeben. Am Tag der Messung wurde etwa drei bis vier Stunden vor der Messung nochmals frisches Retinal zugegeben. Die Protoplasten wurden nach dem Verdau abzentrifugiert (300g / 1min / RT) und in der entsprechenden Messlösung resuspendiert.

Der Waschvorgang in der Messlösung wurde mindestens zweimal wiederholt, um restliche Verunreinigungen aus dem enzymatischen Verdau zu entfernen. Die Protoplasten wurden bis zur Messung in der entsprechenden Messlösung in 15ml Falcon-Röhrchen mit Alufolie abgedunkelt und auf Eis aufbewahrt.

2.3 Oozyten

2.3.1 Das Expressionssystem

Oocyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* eignen sich hervorragend zur heterologen Expression und somit zu elektrophysiologischer sowie biochemischer Charakterisierung zellfremder Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Oocyten verwendet, um nach der Injektion von RNA (2.3.3) die generelle Funktion der Fusionsproteine *bPAC::YFP*, *bPAC::tdimer2RFP* (2.10.2.1) und *bPGC::YFP* zu verifizieren sowie das Fusionskonstrukt *CNGA2_2A_EuPAC* (2.10.4) elektrophysiologisch zu untersuchen. Des Weiteren wurden ELISA Messungen (2.6.1) zur Bestimmung und zum Vergleich der cAMP- bzw. cGMP-Konzentrationen nach Expression und Belichtung sämtlicher erstellten Konstrukte nach der Expression in Oocyten im Homogenisatüberstand durchgeführt.

2.3.2 Gewinnung der Oocyten

Gewonnen wurden die Oocyten aus Laborfröschen (*Xenopus laevis*), die in institutseigenen Aquarien bei einer Wassertemperatur von 20-22°C gehalten wurden. Die Betäubung der Frösche zur operativen Entnahme der Zellen erfolgte durch Überführung des Frosches in *Tricainlösung* (3-Aminobenzoessäure-Ethylester, 0,75g/l H₂O) für 30 Minuten. Zur Entnahme der Oocyten wurde die Bauchdecke des auf Eis liegenden Frosches mit einer Operationsschere geöffnet und mit einer Pinzette ein- oder mehrere Ovarlappen herausgezogen. Die Schnitte durch Bauchhaut und darunter liegendes Muskelgewebe wurden nach der Entnahme der Oocyten getrennt mit einem resorbierbaren Operationsfaden vernäht. Die Ovarlappen wurden in isoosmotische, calciumhaltige ND-96 Lösung (6.4.2.6) überführt und zunächst unter dem Binokular mit handelsüblichen Uhrmacherpinzetten in kleine Stücke zu etwa 10-20 Zellen zerrissen.

Durch Zugabe des Enzyms Collagenase (0,12mg/ml in calciumfreier ND 96, 6.4.2.6) wurde restliches Bindegewebe und Follikelzellen enzymatisch verdaut. Der Verdau des Ovargewebes fand für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken statt. Nach dem Collagenaseverdau wurden die vereinzelt Oocyten wieder in calciumhaltige ND-96 Lösung überführt, gewaschen und anschließend bis zur Injektion bei 16°C gelagert.

2.3.3 RNA-Mikroinjektion

Zunächst wurde die zu injizierende mRNA (2.4.2.1) mit der Injektionsvorrichtung „*Drummond Nanoinject*“ in die mit Mineralöl gefüllte Glaskapillare (3.5“ Drummond II 3000-203-G/X) aufgenommen. Die Glaskapillare wurde zuvor mit einem induktiven Elektroden-Puller (*pc-10* Narishige Instruments, Japan) in zwei Zügen (80,3 / 58,1) gezogen. Um die Oocytenmembran bei der Injektion nicht unnötig zu verletzen, wurde die Öffnung an der Spitze der Injektionskapillare möglichst klein gehalten (Durchmesser max. 30µm). Die in der Injektionskammer liegenden Oocyten wurden nun mit Hilfe eines mechanischen Mikromanipulators (Narishige Instruments, Japan) mit der Kapillare angestochen und über das Injektionssystem *Drummond Nanoinject* definierte Volumina an mRNA (4,6–50nl) in das Cytoplasma der Oocyten injiziert. Nach der Injektion wurden die Oocyten in ND-96 (6.4.2.6) überführt.

2.3.4 Heterologe Proteinexpression

Nach der Injektion der mRNA in Oocyten von *X. laevis* (2.3.3) wurden diese in calciumhaltige ND-96 (6.4.2.6) überführt und für die Zeit der Proteinexpression im Temperaturschrank (*Liebherr Viothek*) bei 16°C-18°C in kleinen Petrischalen (*NUNC, NunctionTM Δsurface*) gelagert. Der calciumhaltigen ND-96-Lösung wurde des Weiteren das Antibiotikum Gentamycin (6.4.6) zugesetzt, um bakterielle Kontamination der Zellen während der Expressionsdauer zu unterdrücken. Die Expression der Proteine wurde für mindestens 48 Stunden, meistens jedoch für drei Tage gewährt. Da in dieser Arbeit ausschließlich lichtaktivierte Proteine untersucht wurden, befanden die Zellen sich während der Expression lichtgeschützt in Karton- oder Kunststoffboxen. Im Falle der Expression von Channelrhodopsin-2 bzw. darauf basierender Mutationsvarianten wurde des Weiteren direkt nach der Injektion *All-Trans*-Retinal in der Endkonzentration 10μM zugegeben.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Methoden DNA

2.4.1.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Mittels PCR (Mullis et al., 1986) werden *In vitro* DNA-Fragmente amplifiziert. Dies geschieht, indem drei bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufende Reaktionsschritte zyklisch wiederholt werden (Tabelle 2.1). Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird durch die Wahl der verwendeten Primer (Oligo-Desoxyribonucleotide) definiert. Zunächst wird der Reaktionsansatz in der Denaturierungsphase erhitzt, was zur Auftrennung der doppelhelikalen DNA-Struktur und zur Bildung von DNA-Einzelsträngen führt. Die maximal zu wählende Denaturierungstemperatur und -dauer hängt hierbei von der thermischen Stabilität der verwendeten Polymerase ab und liegt meist zwischen 95°C und 98°C. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Polymerase *PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes) verwendet. In der folgenden Annealingphase binden die Primer an den komplementären, dem zu amplifizierenden Fragment flankierenden Matrizensequenzen. Die Temperatur der Annealingphase ist abhängig von Geometrie und Länge der eingesetzten Primer und lag zwischen 50°C und 70°C. In der Elongationsphase wird die Temperatur auf 72°C bzw. dem Aktivitätsoptimum der verwendeten Polymerase, erhöht. Ausgehend von den Primern synthetisiert die Polymerase neue DNA, indem dNTPs komplementär zum Template-Einzelstrang der Matrize eingebaut und verknüpft werden. Die Länge des neu entstehenden DNA-Stranges wird (ab der dritten Elongationsphase) vom *sense*-Primer in 5′–3′ Richtung und vom *antisense*-Primer in 3′–5′ Richtung begrenzt. Durch die Wiederholung dieser drei temperaturgesteuerten Reaktionsschritte wird das gewünschte DNA-Fragment innerhalb kurzer Zeit exponentiell amplifiziert.

Durch gezielte Konstruktion der Primer wurden Restriktionsschnittstellen (2.4.1.3) an Anfang und Ende des amplifizierten Fragmentes *in frame* eingefügt, und für die durchgeführten Klonierungen (2.10) verwendet. Die Reaktionsansätze wurden in sterilen, dünnwandigen 200µl PCR-Reaktionsgefäßen (Fermentas) auf Eis pipettiert. Die Reaktionen erfolgten im PCR-Cycler *Pico Thermocycler* (Thermo Scientific).

Tabelle 2.1 Standard Reaktionsansatz einer PCR (50µl)

5x Phusion Polymerasepuffer HF	10µl
dNTP-Mix (10mM)	1µl
primer forward / reverse (10µM)	Je 2µl
template DNA	50-200ng
Phusion™ Polymerase	1µl (2 units)
HPLC-H ₂ O	add 50µl

Tabelle 2.2 Exemplarisches Programm des PCR-Cyclers *PICO Thermocycler*

Schritt (Anzahl Zyklen)	Temperatur / °C	Zeit / Sekunden
Initiale Denaturierung (1)	98	120
Denaturierung (max. 35)	98	20
Annealing (max. 35)	50 – 70	30
Elongation (max. 35)	72	30 / 1000bp
Finale Extension (1)	72	600

2.4.1.2 Site-directed Mutagenesis

Bei der *site-directed mutagenesis* (Carter, 1986) werden synthetische Oligonucleotide einer Länge von bis zu 40 Basenpaaren (bp) verwendet, welche in ihrer Basenfolge die Zielmutation tragen. Diese Primer binden beidseitig auf der zu mutierenden Sequenz des Ursprungsvektors. Ausgehend von der Primerbinderegion generiert die Polymerase überlappende, antikomplementäre und lineare DNA-Fragmente, welche die gewünschte Mutation tragen. Im Gegensatz zur PCR (2.4.1.1) findet die Amplifikation nicht exponentiell, sondern linear statt, da die im Überschuss zugegebenen Primer in jedem Zyklus an die ursprüngliche Template-DNA anlagern müssen, damit neue DNA gebildet werden kann. Nach der Mutagenese wurde der ursprüngliche Template-Vektor mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut (2.4.1.3), welches selektiv methylierte DNA des *in vivo* entstandenen Ursprungsvektors schneidet. *In vitro* generierte und daher nicht methylierte DNA der Mutagenese-Reaktion wird nicht verdaut und kann nach diesem Selektionsprozess in kompetente Zellen transformiert (2.4.3.1) werden. In den Bakterienzellen kommt es zum Ringschluss der linearen DNA Fragmente, ein Prozess, der als bakterielles *nicking* bezeichnet wird und nötig für die Replikation des Plasmides ist.

Tabelle 2.3 Standardansatz einer *site directed mutagenesis* (50µl)

5x Phusion Polymerasepuffer HF	10µl
dNTP-Mix (10mM)	1µl
Primer forward/reverse (10µM)	Je 1µl
Template DNA	50-200ng
Phusion™ Polymerase	1µl (2 units)
HPLC-H ₂ O	add 50µl

Tabelle 2.4 Programm des PCR-Cyclers *Pico Thermocycler* für die *site-directed mutagenesis*

Schritt (Anzahl Zyklen)	Temperatur / °C	Zeit / Sekunden
initiale Denaturierung (1)	98	120
Denaturierung (21)	98	20
Annealing (21)	54	30
Elongation (21)	72	30 / 1000bp
Finale Extension (1)	72	600

2.4.1.3 Restriktionsverdau

In einem Restriktionsverdau werden Endonucleasen verwendet, um doppelsträngige DNA selektiv und ortsspezifisch zu schneiden. Endonucleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs und erkennen palindromisch auftretende DNA-Sequenzen. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen innerhalb- oder in unmittelbarer definierter Umgebung dieser Sequenzen. Restriktionsenzyme können je nach Typ glatte Schnittstellen (*blunt*), oder Schnittstellen mit 3'- bzw. 5'-Überhängen (*sticky*) generieren. Methylierungssensitive Endonucleasen (z.B. *DpnI*) schneiden ausschließlich *in vivo* entstandene, methylierte DNA und werden bei der *site directed mutagenesis* (2.4.1.2) verwendet, um das Template-Plasmid vor der Transformation von Bakterienzellen (2.4.3.1) aus dem Reaktionsansatz zu entfernen.

Des Weiteren wurden asymmetrische Restriktionsverdau durchgeführt, um Gegenwart und Orientierung eines Inserts nach einer Ligationsreaktion (2.4.1.8) im entsprechenden Vektor zu überprüfen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der durch die Nucleasen generierten DNA-Fragmente (2.4.1.4) und Interpretation des charakteristischen Bandenmuster konnte auf die Orientierung des Inserts im Plasmid geschlossen werden.

Tabelle 2.5 Standardansatz Restriktionsverdau (50µl)

DNA	0,5-10µg
10x Reaktionspuffer	5µl
Restriktionsenzym	5-10 Units (0,5-1µl)
ddH ₂ O	Ad 50µl

2.4.1.4 DNA-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können in Agarosegelen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Sowohl DNA als auch RNA sind aufgrund von Phosphatgruppen zwischen ihren Desoxyribose- bzw. Ribose-Einheiten negativ geladen. Durch die in der Elektrophoresekammer angelegte Spannung von 80–100V und das dadurch entstehende elektrische Feld werden Nukleinsäuren deshalb von der Kathode angezogen und durch die Agarosegel-Matrix bewegt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe beruht auf der Interaktion der unterschiedlich langen Nucleinsäuren mit den Hydroxylgruppen des Polysaccharids Agarose. Gelelektrophoretische Auftrennung wurde verwendet, um Größe, Integrität oder das Vorhandensein eines bestimmten DNA-Fragmentes zu überprüfen. Zur Herstellung eines n%igen Gels wurden n g Agarose (Peqlab) in n*100 ml TAE (Tris Acetat EDTA, 6.4.2.1) unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf etwa 60°C der DNA-Farbstoff *GelGreen* (Biotium inc.) in der Konzentration (50µl/1l TAE) zugesetzt.

Das Gel wurde in eine Kunststoffform (Gel-Schlitten) mit entsprechendem Geltaschen-Kamm gegossen und nach vollständigem Erkalten in die mit 1xTAE Puffer (6.4.2.1) gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die zu analysierende DNA wurde mit Probenpuffer (6.4.5.1) versetzt und nach entfernen des Kammes luftblasenfrei in die Taschen des Gels geladen. Je nach Agarosekonzentration, angelegter Spannung und erwarteter Fragment-Größe wurde die DNA im Gel für 30-90 Minuten aufgetrennt. Die Dokumentation der Gele nach der Auftrennung erfolgte mit dem UV-Imaging-System „*Intas UV Imager*“ (Intas Science Imaging GmbH).

2.4.1.5 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel

Nach elektrophoretischer Auftrennung (2.4.1.4) wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen für weitere Klonierungsschritte (Ligation, 2.4.1.8, PCR, 2.4.1.1) ausgeschnitten und aufgereinigt. Hierzu wurden entsprechende Banden zunächst auf einem Visualisierungstisch (*Dark Reader*, Clare Chemical Research, MoBiTech) identifiziert, mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem Kit *Qiagen QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Zur Elution der DNA von den Säulen des Kits wurde sowohl der im Kit beiliegende Puffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) als auch HPLC-H₂O (6.4.1.2) verwendet.

2.4.1.6 Plasmidisolation

Zur Isolation plasmidärer DNA aus *E. coli* wurde die „*Ten Minute Plasmid Mini Prep*“ verwendet. Sie basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Von frisch angesetzten Übernachtskulturen (2.1.2) wurden 1,5ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation pelletiert (20800g / 60s / RT).

Der Überstand wurde bis auf etwa 50µl verworfen und die Bakterien durch vortexen resuspendiert. Durch Zugabe von 300µl TENS-Lysispuffer (6.4.2.3) und Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellwände der Bakterien lysiert. Um Proteine und genomische DNA zu fällen, wurden 150µl Natriumacetat (3M, pH 5.2) zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (20800g / 15min / RT) wurde der Überstand in 600µl Isopropanol überführt und plasmidäre DNA mindestens 20 Minuten bei -20°C gefällt.

Nach erneuter Zentrifugation (20800g / >60 min / 4°C) und anschließendem Absaugen des Isopropanolüberstandes wurde das Pellet mit 500µl 70% Ethanol (in H₂O) gewaschen. Nach Entfernen des Ethanol-Überstandes wurde die plasmidäre DNA vollständig bei 37°C im Heizblock (*Giant QBT, Eppendorf Thermoshaker Ts100*) getrocknet und anschließend in 50µl TE-Puffer (6.4.2.4) oder HPLC-H₂O (6.4.1.2) aufgenommen. Des Weiteren wurde DNA nach Amplifikation in *E. coli* (2.1.1.1) über die kommerziellen DNA-Isolations-Kits (*QIAGEN Plasmid Mini Kit (100)*, *QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (100)* Qiagen) nach Herstellerangaben gewonnen. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde photometrisch bestimmt (2.4.1.10) sowie die Integrität und Größe der Plasmide nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.4.1.4) kontrolliert.

2.4.1.7 Phenol-Chloroform Aufreinigung von DNA

Um DNA aufzureinigen bzw. aufzukonzentrieren, wurde diese zunächst mit HPLC-Wasser (6.4.1.2) auf ein Endvolumen von 150µl aufgefüllt und mit ebenfalls 150µl Phenol/Chloroform (49,5% Chloroform, 49,5% Phenol, 1% Isoamylalkohol Applichem) versetzt. Nach gründlichem Vortexen und Zentrifugation (20800g / 15min / RT) wurde die sich im wässrigen Überstand befindliche DNA abgenommen, mit 25µl Natriumacetat (3M, pH5,2) sowie 300µl Isopropanol versetzt und anschließend mindestens eine Stunde bei -20°C gefällt. Danach wurde die DNA durch Zentrifugation (20800g / 90-120min / 4°C) pelletiert.

Nach Absaugen des Überstandes und Waschen des Pellets mit 500µl 70% Ethanol (in H₂O) wurde die DNA bei 37°C vollständig getrocknet und in 20µl HPLC-H₂O (6.4.1.2) aufgenommen.

2.4.1.8 DNA-Ligation

In einer Ligrationsreaktion (Tabelle 2.6) kommt es zur enzymatischen (*T4 DNA Ligase*, MBI Fermentas) Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Posphat - und der 3'-Hydroxygruppe zweier doppelsträngigen DNA-Fragmente, deren endständige, einzelsträngige Überhänge durch den Einsatz aufeinander abgestimmter Restriktionsenzyme (2.4.1.3) komplementär zueinander sind. Die Ligrationsreaktion wurde entweder bei 16°C über Nacht im Temperaturschrank (Memmert) oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor der Ligation von Vektor und Insert wurden Endonucleasen des vorangegangenen Restriktionsverdaus (2.4.1.3) entweder durch Aufreinigung (2.4.1.5, 2.4.1.7) aus dem Reaktionsansatz entfernt, oder nach Herstellerangaben durch Hitzedenaturierung inaktiviert. Wurde die Linearisierung des Vektors und der Verdau des Inserts mit demselben Restriktionsenzym durchgeführt, so wurden die 5'-Enden des Vektors enzymatisch dephosphoryliert, um eine Religation des leeren Vektors zu verhindern. Zur Dephosphorylierung wurde das Enzym SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) verwendet. Vor der Ligrationsreaktion wurde die SAP inaktiviert, indem der Ansatz für nach Herstellerangaben fünf Minuten auf 75°C erhitzt wurde. Für die Ligrationsreaktion wurden Vektor- und Insert-DNA im molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:7 eingesetzt.

Tabelle 2.6 Standardansatz Ligationsreaktion (10µl)

10x T4 DNA Ligase Puffer	1µl
DNA (Vektor/Rezipient)	0,1µg – 0,5µg
DNA (Insert/Donor)	Molar: Insert / Vektor = 3/1 - 7/1
T4 DNA Ligase	1Unit (1µl)
HPLC-H ₂ O	Ad 10µl

2.4.1.9 Sequenzierung

Durch die Sequenzierungsreaktion kann die Nucleotidsequenz von DNA bestimmt und überprüft werden. Ausgehend von einem Sequenzierungsprimer konnte DNA einer Länge von bis zu 1200bp (1,2kb) sequenziert werden. Bei größeren Fragmenten wurden weitere Primer verwendet, die im Abstand von ca. 500-700bp auf der Sequenz banden. Die erhaltenen Sequenzen, bzw. überlappenden Teilsequenzen wurden bioinformatisch kontrolliert (*Vector NTI*, Invitrogen). Die Sequenzierungen zur Überprüfung der in dieser Arbeit generierten DNA fanden sowohl durch das hauseigene Sequenzierungslabor statt (*Applied Biosystems ABI Prism 3100-avant genetic analyzer*, Hitachi), als auch über Auftragssequenzierungen, welche von der Firma GATC (GATC Biotech AG, Konstanz) durchgeführt wurden.

2.4.1.10 Quantifizierung von Nucleinsäuren

Die Konzentration von Nucleinsäuren (sowohl von DNA als auch von RNA) wurde photometrisch (*Nanophotometer Implen; Nanodrop2000 Thermo Scientific*) bestimmt. Hierbei wurde die Extinktion der Proben bei einer Anregungswellenlänge von 280nm (DNA) bzw. 260nm (RNA) gemessen, was der Anregungswellenlänge der Desoxyribonucleotide (DNA) bzw. Ribonucleotide (RNA) entspricht. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz kann aus der Extinktion der Probe direkt die Konzentration der DNA bzw. der RNA ermittelt werden.

2.4.1.11 Das Gateway-System

Das *Gateway*[®] Klonierungssystem (*Gateway*[®] *cloning*, Invitrogen) wurde verwendet, um Channelrhodopsin-2 C128A und C128T sowie *bPAC::YFP* in den binären Pflanzentransformationsvektor *pMDC-32* einzubringen (2.10.1.2, 2.10.2.3). Hierzu wurde zunächst ein sog. *Entry*-Vektor erzeugt, in welchen das zu klonierende Gen durch klassische Restriktion (2.4.1.3) und Ligation (2.4.1.8) eingefügt wurde. In diesem *Entry*-Vektor (in der vorliegenden Arbeit: pENTR-MCS) finden sich zudem die Sequenzen *attL1* und *attL2*, welche das zu klonierende Gen flankieren. Im sog. *Destination* Vektor (Ziel-Vektor der Klonierung, in dieser Arbeit *pMDC-32*) finden sich zu den *attL1/attL2* Sequenzen aus dem *Entry*-Vektor kompatible *attR1* bzw. *attR2* Sequenzen, welche ein Lethalgen (*ccdB*) flankieren. In der *LR*-Klonierungsreaktion wird das Insert aus dem *Entry*-Klon ausgeschnitten und direkt dem *Destination* Vektor verbunden. Bei dieser Reaktion gibt es (theoretisch) keine falsch positiven Klonierungsprodukte, da die Orientierung des Inserts im Vektor zum Einen durch die spezifischen *attL1-attR1* bzw. *attL2-attR2* Verknüpfung festgelegt wird und zum Anderen nicht reagierender *Destination*-Vektor durch Expression des *ccdB* Gens (ein Toxin, welches die DNA-Topoisomerase-II inhibiert) zum Absterben entsprechender Klone führt. Bakterien, die bei der Transformation (2.4.3.1) den ursprünglichen *Entry*-Vektor aufnehmen, können aufgrund eines Antibiotikawechsels (in dieser Arbeit von Kanamycin im *Entry* Vektor auf Ampicilin im *Destination* Vektor) nicht wachsen. Ein weiterer Vorteil dieses Systems liegt darin, dass ein Gen ausgehend von einem einmalig erstellten *Entry*-Klon in jeweils nur einem einzigen Reaktionsschritt in alle *Gateway*[®]-kompatiblen Vektorsysteme eingefügt werden kann.

2.4.1.12 Das USER System

Bei der USERTM Klonierung (Uracil Specific Excision Reagent, Geu-flores et al., 2007; New England Biolabs Inc.) werden PCR-Primer so entworfen, dass nach der PCR (2.4.1.1) spezifische USER-Überhänge (5'-GGCTTAAU-3' am 5'- Ende bzw. 5'-GGTTTAAU-3' am 3'- Ende) am Amplifikat entstehen. Die USER Klonierungsmethode setzt zudem eine Präparation der Zielvektoren voraus, in der eine entsprechende USER-Kassette eingefügt werden muss (Übersicht der Vektorpräparation in: Geu Flores et al., 2007). Für die USER-Reaktion (bei dem Vektor und Insert durch das USER-Enzym verbunden werden) wurde der Reaktionsansatz (Tabelle 2.7) zunächst für 30 Minuten bei 37°C und anschließend 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Direkt im Anschluss wurde das entstandene Plasmid in *E. coli* (2.1.1.1) transformiert (2.4.3.1).

Tabelle 2.7 Standardansatz USER Reaktion (10µl)

USER PCR- Produkt	1µl (etwa 1µg/µl)
USER Vektor (pUBQ-10)	1µl (etwa 1µg/ µl)
TE oder EB(10mMTris-Cl, pH 8,5)	7µl
USER Enzym Mix	1µl

2.4.2 Methoden RNA

2.4.2.1 *In vitro* Transkription

Bei der In-Vitro-Transkription (IVT) wird cDNA *in vitro* in mRNA umgeschrieben. Hierbei werden von RNA-Polymerasen Ribonukleotidpolymere komplementär zum codogenen Strang des zuvor linearisierten DNA-Vektors synthetisiert. Es entsteht somit die einzelsträngige mRNA, welche durch Mikroinjektion (2.3.3) in das Expressionssystem Oocyte (2.3.1) eingebracht werden kann. Zunächst wurde hierzu der verwendete Vektor pGemHE hinter der poly-A-Site und der kodierenden Sequenz des jeweiligen Genes durch Restriktion (*NheI*) linearisiert (2.4.1.3). Um die Linearisierungsreaktion zu stoppen und gleichzeitig sämtliche im Ansatz vorhandenen Proteinkomponenten zu denaturieren, wurde der Ansatz anschließend mit 1/20 Volumen (2,5 µl) Proteinase K und ebenfalls 1/20 Volumen (2,5 µl) 10% SDS versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend aufgereinigt (2.4.1.7). Alternativ wurde linearisierte DNA auch über das Säulensystem des *Qiagen PCR purification kit* aufgereinigt (Qiagen, 2.4.1.5). Bevor die In Vitro-Transkription mit dem Kit (*Amplipac MaxTM T7-High-Yield Message Maker Kit, Epicentre Biotechnologies*) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde, wurde die Integrität der Template-DNA auf einem 1%igen Agarosegel überprüft (2.4.1.4), sowie deren Konzentration photometrisch bestimmt (2.4.1.10). Das Template für die IVT wurde, wenn dies sequenzbedingt fordernd war, auch über PCR (2.4.1.1) amplifiziert, wobei sowohl die T7-Promotorsequenz als auch die Poly-A-site innerhalb des PCR-Amplifikates lagen. Die Transkriptionsreaktion wurde 90 Minuten bei 37°C durchgeführt und die synthetisierte RNA anschließend durch Zugabe von 20µl Ammoniumacetat über Nacht, bei -20°C gefällt. Der Ansatz wurde anschließend zentrifugiert (20800g / 2h / 4°C), das Pellet mit 500µl kaltem 70%igem Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen und bei 37°C vollständig getrocknet.

Die RNA wurde anschließend in 20µl DEPC-Wasser (6.4.1.1) aufgenommen, die Konzentration photometrisch bestimmt (2.4.1.10) und auf einem RNA-Gel (2.4.2.2) auf ihre Integrität überprüft. Die RNA wurde aliquotiert und bis zur Injektion (2.3.3) bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.8 Standardansatz einer In-Vitro-Transkription des Amplicap Max™ IVT Kits (*Epicentre Biotechnologies*)

linearisierte DNA	1µg in max. 6µl
10x Reaktionspuffer	2µl
Cap-NTP Mix	8µl
DTT	2µl
RNAse-Inhibitor	0,5µl
Amplicap T7 enzyme mix	1,5µl – 2µl
DEPC-H ₂ O	add 20µl

2.4.2.2 RNA-Gelelektrophorese

Entsprechend der DNA-Gelelektrophorese (2.4.1.4) kann auch RNA ihrer Größe nach gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Für ein einprozentiges RNA-Agarosegel wurden 0,25g Agarose (Peq-Gold) in 20,5ml MEN- Puffer (6.4.2.2) aufgenommen und durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Erkaltung dieser Lösung auf ca. 60°C wurden dem Gel der RNA-Farbstoff *Gel Red* (Biotium inc., Hayward, California) und 4,5ml Formaldehyd (37%) zugegeben. Vor der Auftrennung wurden je 0,5-1µg RNA mit 3µl DEPC-H₂O und 4µl 2xRNA-Probenpuffer (6.4.5.2) versetzt und für 10 Minuten auf 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA zu lösen. Die Proben wurden nach dem Abkühlen in die Taschen des Agarose-Formaldehyd-Gels geladen und durch Anlegen einer Spannung von etwa 80V im Gel aufgetrennt. Die RNA wurde mit dem UV-Imaging System (*Intas UV Imager*) auf Quantität und Integrität überprüft.

2.4.3 Transformation

2.4.3.1 Transformation von *E. coli* (Heat Shock Transformation)

In dieser Arbeit wurde *E. coli* ausschließlich nach der *heat-shock*-Methode transformiert (Bergmans et al., 1981). Hierzu wurden die kompetenten Zellen (2.1.1.1) zunächst auf Eis aufgetaut und mit maximal 5µl plasmidärer DNA aus dem Ligationsansatz (2.4.1.8) versetzt. Zellen und DNA wurden gut vermischt und für 30 Minuten auf Eis gehalten, um DNA auf der Zelloberfläche zu präzipitieren. Die Zellen wurden anschließend direkt aus dem Eis für 45 Sekunden in ein Wasserbad (42°C) überführt. In dieser Zeit nehmen die Zellen in Gegenwart divalenter Kationen (Calciumphosphat) plasmidäre DNA vereinfacht auf. Die transformierten Bakterienzellen wurden anschließend mit 250µl SOC-Medium (6.4.3.4) versetzt und 30-60 Minuten bei 37°C unter Schütteln (*Eppendorf Thermoshaker TS100*) angezogen. Danach wurden Zellen pelletiert (12000g / 60s / RT) und nach Verwerfen des Überstandes in etwa 50µl des verbleibenden SOC-Mediums resuspendiert. Diese „Erholungsphase“ im SOC-Medium wurde nur bei Klonierungen unter der Selektion der Antibiotika Spectinomycin und Kanamycin durchgeführt; Bei Klonierungen unter der Selektion Ampicilin ist dies nicht nötig und die Zellen wurden direkt nach dem Hitzeschock mit autoklavierten Pipettenspitzen auf LB-Amp Selektionsagarplatten ausgestrichen (6.4.3.5).

2.4.3.2 Transformation von *A. tumefaciens* (Elektroporation)

Bakterien des Stammes *A. tumefaciens* (2.1.1.2) wurden verwendet, um zum Einen Pflanzenteile transient durch Infiltration zu transformieren (2.4.4.3), zum Anderen, um *A. thaliana* Zellkulturen und Pflanzen stabil zu transformieren (2.4.3). Die Agrobakterien selbst wurden durch Elektroporation transformiert.

Hierzu wurden 5ml einer Übernachtskultur (2.1.1.2) zu je 1ml in 1.5ml Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert. Nach Zentrifugation (16000rpm / 60s / RT) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in ddH₂O aufgenommen. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (16000rpm / 60s / RT), um Reste des Kulturmediums aus der Zellsuspension zu entfernen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt fünfmal wiederholt, bevor die Zellen in 100µl dH₂O aufgenommen wurden. Die fünf Ansätze wurden vereint und die Zellen dann zu je 45µl in 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Transformation auf Eis gehalten. Die ebenfalls auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvetten wurden anschließend mit den Zellen sowie 0,1-1µg säulengereinigter DNA (2.4.1.5) versetzt. Bei der Elektroporation (*Elektroporator 2510*, Eppendorf) wurden zwei kurze Spannungspulse einer Feldstärke von 1250V/mm angelegt, um die DNA durch transiente Membrandisintegration in die Zellen einzubringen. Die transformierten Zellen wurden im direkten Anschluss in 350µl SOC-Medium (6.4.3.4) aufgenommen und 60 Minuten bei 28°C unter Schütteln (500rpm, *Eppendorf Thermoshaker Ts100*, Eppendorf) angezogen. Die transformierten Agrobakterien wurden anschließend auf YEB-Selektions-Agarplatten (6.4.3.6) ausgestrichen und 48 Stunden bei 28°C inkubiert (2.1.3).

2.4.4 Transfektion

2.4.4.1 Stabile Transfektion von A. thaliana Col-0 (floral dipping)

Die stabile Transfektion von *A. thaliana Col-0* und *A. thaliana Col-0* Aequorin erfolgte nach der Methode des *floral dipping* (Clough und Bent, 1998). Für die Transfektion wurden blühende Pflanzen im Alter von acht bis zehn Wochen verwendet, welche wie in 2.2.3 beschrieben angezogen wurden.

Bei der Auswahl der Pflanzen wurde darauf geachtet, dass diese sich gerade im ersten Blütenaustrieb befanden, fertige Blüten oder Schoten wurden vor dem Tauchvorgang vollständig entfernt. Zunächst wurden etwa 20ml einer frischen Übernachtskultur transgener Agrobakterien (2.4.3.2) in 50ml-Falcons angezogen (2.1.1.2). Zur Herstellung der Tauchlösung wurde die komplette Agrobakterien-Übernachtskultur in einem 1l-Becherglas mit Wasser auf ein Volumen von 500ml aufgefüllt und 25g Saccharose, sowie 100µl Silvet L77 (Hehle Seeds, Texas USA) zur Verbesserung der Benetzungseigenschaften zugegeben. Die Blütenstände der Pflanzen wurden komplett in diese Lösung eingetaucht und durch Hin- und Herbewegen vollständig mit der Agrobakterien-Lösung benetzt. Anschließend wurden die Pflanzen in mit Zellstofftüchern ausgelegte Pflanzschalen gelegt und mit einem durchsichtigen PVC-Deckel abgedeckt. Die Pflanzen wurden für 24 Stunden in Dunkelheit gehalten und anschließend zurück ins Gewächshaus gestellt. Der Tauchvorgang wurde an denselben Pflanzen drei bis vier Tage nach dem ersten Tauchgang wiederholt. Etwa eine Woche später bildeten sich die ersten Schoten. Sobald diese ausgewachsen waren, wurden die gesamten Blütenstände in Papiertüten eingeführt und so an der Pflanze fixiert, dass keine Samen aus der Tüte herausfallen konnten. Unter regelmäßigem Gießen wurden die Pflanzen ein bis zwei Wochen weiter unter Langtag-Bedingungen (2.2.3) angezogen, um alle Schoten vollständig ausreifen zu lassen. Die Pflanzen wurden danach nicht mehr gegossen, um die Reifung und Trocknung der Samen für etwa sechs Wochen an der Pflanze zu erreichen.

Nach dieser Zeit wurden die transgenen Samen durch Ausstreichen des in der Sammeltüte befindlichen Blütenstandes geerntet und mit einem Sieb (Ausschlussgröße 200µm) restliche Bestandteile des Blütenstandes entfernt. Die Samen wurden dann zunächst für sechs bis acht Wochen bei 4°C gelagert, um die Reifung der Samen (Stratifikation) zu induzieren.

Anschließend wurden die Samen sterilisiert. Hierzu wurden diese unter der Sterilbank in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und in 2ml 90% Ethanol (in dH₂O) aufgenommen und 20 Minuten im Überkopfschüttler (Hartenstein Laborversand) gewaschen.

Nach der Sedimentation der Samen wurde das überstehende Ethanol abgenommen und die Samen in 1ml Natrium-Hypochlorid/TritonX100 (6%) aufgenommen und erneut für 10 Minuten im Überkopfschüttler gespült. Nach der Zugabe von 1ml dH₂O und Sedimentation wurde der Überstand abgenommen, die Samen mindestens fünfmal in 1ml dH₂O gewaschen und zum Trocknen auf sterilem Filterpapier vereinzelt aufgelegt. Die Samen wurden dann entweder direkt auf MS-Agarplatten unter Selektionsantibiotikum (6.4.3.7) ausgesät, oder für eine spätere Aussaat bei 4°C aufbewahrt. Die direkte Aussaat der Samen auf MS-Agarplatten erfolgte unter der Sterilbank, indem die Samen entweder durch ausstreuen, oder einzeln mit Pipettenspitzen auf MS-Agar überführt wurden. Anschließend wurden die Platten zunächst zwei Tage bei 4°C gelagert und dann hochkant in einem Phytotron (Eigenbau der Werkstatt Botanik-I des Julius-von-Sachs-Institutes der Universität Würzburg) gehalten, bis die entstehenden Pflanzen nach etwa drei Wochen kleine Blätter einer Länge von etwa 0,5-1cm hatten. In diesem Zustand wurden die Pflanzen auf Erde pikiert (*Substrat-1, Klasmann-Deilmann GMBH*). Die Pflanzen wurden in der ersten Woche mit einer Plastikhaube abgedeckt und anschließend in der Klimakammer unter Kurztagbedingungen (2.2.3) angezogen.

2.4.4.2 Stabile Transfektion der *A. thaliana Col-0* Zellkultur

In dieser Arbeit wurden stabil transgene *A. thaliana Col-0* Zellkulturen generiert, welche die lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* bzw. *bPGC::YFP* unter der Kontrolle eines östrogeninduzierbaren Glucocorticoidpromotors (2.10.3.2) exprimierten. Zudem exprimierten diese Zellen bereits das Calciumreporterprotein Aequorin konstitutiv unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors. Für die Transfektion wurde die Zellkultur zunächst im normalen Turnus umgesetzt (2.2.5) und nach drei Tagen für die Transfektion herangezogen. Die transgenen Agrobakterien (2.4.3.2) wurden zuvor über 48 Stunden in Übernachtskulturen (2.1.2) herangezogen. Um die Agrobakterien zu waschen wurden diese abzentrifugiert und in antibiotikafreiem HaM-Medium (6.4.3.3) aufgenommen.

Um die Zellkultur zu transformieren wurden 100µl der Agrobakterien zu 4ml Zellkultur in einer 100mm Petrischale gegeben. Diese Petrischale wurde für 48 Stunden unter Dunkelheit gehalten, während die Agrobakterieninfektion stattfand. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen durch Zugabe von 10ml HaM-Medium (6.4.3.3) vom Schalenboden abgelöst, in ein 50ml Erlenmeyer-Kolben überführt und fünfmal mit je 10ml HaM-Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (400g / 1 min / RT), in 3-4ml HaM-Medium aufgenommen und auf Phytigel Selektionsplatten (6.4.3.7) ausplattiert. Überstehendes Medium wurde wieder abgenommen und die Platten bei Raumtemperatur und Dunkelheit gehalten, um das Wachstum und die Selektion der entstehenden Kalli zu gewährleisten. Um aus den sich bildenden Kalli eine Flüssigkultur zu generieren, wurden diese im Alter von etwa zwei Wochen in 10ml HaM-Medium überführt und unter Selektion und ständigem Schwenken inkubiert. Nach etwa einer Woche wurde diese neue Kultur mit HaM-Medium auf ein Gesamtvolumen von 50ml aufgefüllt.

2.4.4.3 Transiente Transfektion (Infiltration)

Blätter und Blattsegmente von *N. benthamiana* (2.2.2) wurden in dieser Arbeit über Infiltration transient transfiziert, um zum Einen die Channelrhodopsin-2::YFP-Varianten C128A und C128T durch Patch-Clamp-Messungen (2.5.5.1) an epidermalen Protoplasten zu charakterisieren und zum Andern die Expression und Funktion der YFP-Fusionskonstrukte *bPAC::YFP/pER-8*, *bPAC::YFP/pMDC32* und *bPAC::YFP/pSAT2191* transient zu überprüfen. Hierzu wurden zunächst transformierte Agrobakterien (2.4.3.2), sowie der Agrobakterienstamm *19K*, in 15-20ml YEB-Medium in 50ml-Falcon-Röhrchen über Nacht bei 28°C angezogen (2.1.1.2). Die Co-Transfektion mit dem Agrobakterienstamm *19K* führte zur Unterdrückung pflanzenendogener *silencing*-Prozesse und somit insgesamt zur Verbesserung der Proteinexpression eingebrachter Gene.

Die Zellen aus den Übernackulturen wurden zunächst pelletiert (2500g / 10min / RT) in je 5ml acetosyringonhaltigem *Agromix*-Puffer (6.4.2.9) resuspendiert und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde zu den transformierten Agrobakterien je 1/6 Volumen aus dem parallel angezogenen Stamm *19K* zugegeben. Die Bakterienzellen wurden mit *Agromix*-Puffer auf eine optische Dichte von etwa eins verdünnt und in einer 1ml Einwegspritze aufgenommen. *N. benthamiana* Pflanzen im Alter von etwa vier Wochen wurden in Plastikwannen gestellt und die Öffnung der Spritze abdichtend auf der Blattunterseite aufgesetzt. Durch vorsichtiges, langsames Drücken wurde die Agrobaktériensuspension durch die Spaltöffnungen in das Blatt infiltriert. Die Pflanzen wurden anschließend zurück ins Gewächshaus (2.2.3) gestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Blätter der infiltrierten Pflanzen nicht gegenseitig berühren konnten. Die transiente Expression der Proteine in den infiltrierten Blattregionen war nach drei bis vier Tagen am höchsten, weshalb Patch-Clamp- und Einstichmessungen (2.5.4.1, 2.5.5) nach dieser Zeit durchgeführt wurden.

2.4.4.4 Transiente Transfektion von Protoplasten (PEG)

Die transiente Transfektion der Protoplasten erfolgte durch PEG (Polyethylenglycol) Lipofektion (Yoo et al., 2007). Nachdem sich die Protoplasten vom Protoplastierungsverdau (2.2.6) auf Eis erholt hatten, was an der perfekt runden Form unter dem Mikroskop erkennbar war, wurde der Überstand nach kurzer Zentrifugation (100g / 60s / RT) abgenommen und das Pellet in MMG-Lösung (6.4.2.8) vorsichtig durch schwenken resuspendiert, so dass sich etwa eine Zelldichte von $8-10 \times 10^5$ Protoplasten/ml MMG ergab. 200µl dieser Protoplastensuspension wurden anschließend in 13ml Rundbodenröhrchen (*Sarsted*) überführt und mit 15-20µg gereinigter DNA (2.4.1.7) versetzt. Durch gleichmäßiges und vorsichtiges Schwenken wurden Protoplasten und DNA homogen gemischt. Anschließend wurden 220µl PEG-Lösung (6.4.2.10) zugegeben und die Rundbodenröhrchen erneut solange vorsichtig geschwenkt, bis sich eine homogene Suspension ergab.

Die PEG-Transfektionsreaktion wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt und durch die Zugabe von 880µl W-5 Lösung (6.4.2.7) abgestoppt. Durch anschließende Zentrifugation (100g / 1min / RT) wurden die transfizierten Protoplasten auf dem runden Boden der Reaktionsgefäße pelletiert. Der Überstand wurde mit der Pipette abgenommen, die Protoplasten in 2ml frischer W-5 Lösung (6.4.2.7) aufgenommen und in 35mm Petrischalen überführt (*NuncionTM Δsurface* NUNC). Die Expression der Proteine fand anschließend 24-48 Stunden bei Raumtemperatur in lichtgeschützten Pappschachteln statt.

2.4.4.5 Transiente Transfektion von Pollen (PIG)

Um zu untersuchen, ob eine transiente Expression von *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* in Pollen bzw. auswachsenden Pollenschläuchen von *Nicotiana SR-1* (2.2.2) zu einem evidenten Phänotyp führt, wurden diese transient durch die PIG (Particle Inflow Gun) ballistisch transfiziert (Finer et al., 1992). Zunächst wurden hierfür die Gene der jeweiligen Cyclasen unter die Kontrolle des in Pollen hochaktiven Ubiquitin Promotors (*Ubi*, Christensen und Quail, 1996) im Vektor pUBQ-10 gebracht (2.10.2.4). Für die ballistische Transformation von Pollen durch PIG wurden zunächst Carrierpartikel für die Beschichtung mit DNA vorbereitet. Hierzu wurden 50µg Wolframpartikel (1,1µm *Tungsten M-17*, Biorad) abgewogen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 500µl Ethanol (100%) zugegeben und die Partikel nach gründlichem Vortexen zentrifugiert (16000g / 2 min / RT). Nach kompletter Entfernung des Ethanol-Überstandes und Trocknung des Pellets wurde dieses HPLC-Wasser auf eine Konzentration von 50µg/ml eingestellt. Zu 50µl dieser Wolframlösung wurden 10µg der für die Transfektion aufgereinigten DNA (2.4.1.5, 2.4.1.7) gegeben und durch vortexen vermischt. Anschließend wurden 50µl 2,5M CaCl₂ und 20µl 0,1M Spermidin (in HPLC-H₂O) dazugegeben und mindestens drei Minuten gevortext. Danach wurden zunächst 100µl, dann in einem zweiten Schritt 200µl eiskalter Ethanol (100%, -20°C) zugegeben, um die DNA auf den Wolframpartikeln zu fällen.

Das Reaktionsgefäß wurde anschließend für mindestens 30 Minuten bei -20°C gefüllt. Nach Pelletierung und Abnahme des Ethanol-Überstandes wurden die DNA-beschichteten Partikel in 50µl HPLC-H₂O aufgenommen, auf das Trägernetz gegeben und in einem einzigen Schuss auf die Pollen geschossen. Hierfür wurde ein Druck von etwa neun bar angelegt, der auf Knopfdruck über das Trägernetz entlassen werden konnte. Als Trägergas diente Helium (Air liquide GmbH, Deutschland). Durch zweimaliges betätigen des Auslösemechanismus wurden die Partikel im Heliumstrom beschleunigt und auf die Pollen in der evakuierten Kammer (-0,8bar) geschossen. Zur Fixierung wurden die Pollen zuvor auf 1% Agarose (*peqGOLD Universal Agarose*, PEQLAB Biotech GmbH) in einer 3.5 cm Petrischale (*NunctionTM Δsurface NUNC*) aufgebracht. Die Pollen wurden hierfür in 100µl Pollenkeimungslösung (6.4.2.11) aufgenommen, auf die Agaroseplatte ausgebracht und im Luftstrom getrocknet. Um die Pollen in Agarose einzubetten, wurden diese nach dem Beschuss in 900µl Pollenkeimungslösung (6.4.2.11) aufgenommen und auf Mulden-Objektträgern zu je 300µl verteilt. Diese Objektträger wurden auf eine Heizplatte (Liebisch, Mod. 2099/Da) bei 40°C gelegt und mit jeweils 300µl zuvor aufgekochter und ebenfalls auf 40°C erkalteter *low-melt*-Agarose (*Roti Low Melt Agarose* Roth GmbH) versetzt. Pollen und Agarose wurden auf dem Objektträger mittels Invertieren durch Pipettieren durchmischt. Nachdem sich die Pollen in der Agarose (welche bei dieser Temperatur noch flüssig ist) am Glasboden des Objektträgers abgesetzt hatten, wurde überstehende Agarose vorsichtig abgenommen, so dass sich eine dünne Agaroseschicht von etwa 0,1 – 0,5mm ergab, in der die Pollen eingebettet waren. Die so fixierten Pollen wurden mit Pollenkeimungslösung überschichtet und Übernacht in Zellkulturschalen bei 4°C gehalten, um verdunstungsbedingte osmotische Effekte zu minimieren. Am darauffolgenden Morgen wurde die Pollenschlauchkeimung etwa fünf Stunden vor der Auswertung am Mikroskop (2.8) durch Überführung auf Raumtemperatur induziert.

2.5 Elektrophysiologische Methoden

2.5.1 Konventionen

Das elektrische Potential an biologischen Membranen wird durch die Ladungsdifferenz zwischen der zellinternen Seite der Membran und dem zellextern auf null festgelegten Ladungsniveau definiert. Ein Einstrom von Kationen in die Zelle sowie ein Ausstrom von Anionen aus der Zelle werden konventionsgemäß als negative Ströme oder Einströme bezeichnet. Folglich handelt es sich beim Ausstrom von Kationen aus der Zelle, bzw. beim Einstrom von Anionen in die Zelle um einen positive Ströme, oder Ausströme.

2.5.2 Messelektroden

Für alle elektrophysiologischen Messungen wurden fein gezogene Glaskapillaren verwendet, die mit 300mM bzw. 3M Kaliumchlorid-Lösung gefüllt wurden, um über einem chlorierten Silberdraht das elektrische Kontinuum zum metallischen Leitersystem des jeweiligen Verstärkers herzustellen. Die Elektroden für Einstichmessungen (2.5.4.1) an Pflanzenzelle wurden mit einem Laserpuller (*p2000*, Sutter Instruments) gezogen. (*HEAT:240; Fil:3; Vel:40; Del:160; Pul:180*). Der Widerstand der so generierten Elektroden lag in der verwendeten Messlösung (5mM KCl, 1mM CaCl₂, pH 5,6 MES/BTP) zwischen 150MΩ und 300MΩ.

Elektroden für die DEVC-Messungen (2.5.4.2) wurden mit einem induktiven Elektrodenpuller (*Narishige pc-10*, Narishige Instruments, Japan) zweistufig gezogen. (80.3 / 58.1). Der Widerstand für die Messungen an Oocyten lag bei diesen Elektroden in den verwendeten Messlösungen (6.4.2.5) zwischen 0,5 und 3 MΩ.

Auch die Elektroden für Patch-Clamp-Messungen wurden mit diesem Puller in zwei Zügen gezogen (80,3 / 67,0). Die Patch-Clamp Elektroden wurden zudem vor der Verwendung über eine Microforge (*Zeiss ID-3/List Medical LM-CPZ101*) hitzepoliert, so dass sich eine leicht trompetenförmige Öffnung an der Spitze der Kapillare formte, was die Ausbildung eines Gigaseals an pflanzlichen Protoplasten verbesserte. Der Widerstand der verwendeten Patch-Clamp-Elektroden lag bei der verwendeten Lösung (Pipette: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2MgCl₂ pH 7,6, Bad: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2MgCl₂ pH 5,6) in allen Fällen zwischen 5MΩ und 10MΩ.

Im Einzelnen wurde für elektrophysiologische Messungen folgendes Borsilikat-Kapillarglas verwendet:

Patch-Clamp: *Hilgenberg, #1807503 (l=75mm, ϕ =1,5mm, w=0,12mm)*

Impalement: *Hilgenberg, #1403547 (l=100mm, ϕ =1mm, w= 0,21mm, Filament)*

DEVC: *Hilgenberg, #1404524 (l=75mm, ϕ =1,5mm, w=0.15mm, Filament)*

2.5.3 Datenerfassung

Daten der DEVC-Messungen wurden mit der elektrophysiologischen Messsoftware *ISO-3* (MFK, Niedernhausen, Deutschland) aufgezeichnet und als ASCII-File exportiert. Die Auswertung erfolgte anschließend mit *Microsoft Office 2010* (Microsoft) oder dem Programm *pclamp-8.1* (Axon). Sowohl die Daten der Einstichmessungen an Pflanzenzellen sowie der Patch-Clamp-Messungen wurden über die Software *WinEDR* (*Windows Electrophysiology Disk Recorder, V.3.1.9* Strathclyde Institute of Pharmacy and Biochemical Sciences, Glasgow, Scotland) aufgezeichnet und sowohl mit *WinEDR* selbst, als auch mit dem Programm *pclamp-8.1* (Axon) ausgewertet.

2.5.4 Einstichmessungen

2.5.4.1 Spannungsmessungen in Pflanzenzellen

Beim Einstich oder *impalement* zur Messung des Membranpotentials wird eine Glaselektrode (2.5.2) in die zu untersuchende Zelle bzw. den symplastischen Zellverband pflanzlichen Mesophyllgewebes eingestochen und das Membranpotential in Bezug zu der die Zelle umgebenden Badlösung gemessen und aufgezeichnet. Mit dieser Methode lässt sich ausschließlich die Änderung des Membranpotentials auf die Folge externer Bedingungsänderungen während der Messung verfolgen. Einstichmessungen an pflanzlichen Zellen wurden in dieser Arbeit an Blattscheiben infiltrierter Blätter von *N. benthamiana* (2.4.4.3) durchgeführt, welche die Channelrhodopsinvarianten C128A und C128T transient exprimierten. Infiltrierte Bereiche des Blattes wurden hierfür mit einer scharfen Rasierklinge ausgeschnitten und über Nacht mit doppelseitigem Klebeband in der Messkammer fixiert. Retinal wurde für diese Messungen in der Endkonzentration 100 μ M zugegeben. Für die Aufzeichnung der lichtinduzierten Änderungen des Membranpotentials (3.1.2.1) wurde die Messelektrode durch die lineare Vortriebfunktion des Mikromanipulators (*S-PS-800*, Scientifica Ltd.) solange in das Mesophyllgewebe des Blattes getrieben, bis ein stabil konstantes Membranpotential von etwa -100 bis -150 mV gemessen wurde. Die Belichtung der Blattscheiben wurde über blaue LEDs (*LUXEON Lumiled*, 2.9) durchgeführt und die Änderung des Membranpotentials während der Belichtung aufgezeichnet. Hierzu wurde eine Lichtleiterfaser (Laser Components GmbH) verwendet, die direkt auf der LED montiert wurde und am anderen Ende mittels Mikromanipulator in unmittelbarer Nähe zur Einstichstelle über der Blattscheibe positioniert wurde. Die Einstichmessungen dieser Arbeit wurden an dem Patch-Clamp-Messplatz (2.5.5.2) mit dem Verstärker EPC-7 (HEKA) durchgeführt (2.5.5.2).

2.5.4.2 Double Electrode Voltage Clamp

Die *Double Electrode Voltage-Clamp* (DEVC) Technik (Hodgkin et al., 1952) ermöglicht die Messung von *whole cell* Strömen bei definierten Membranpotentialen. In dieser Arbeit wurde DEVC an Oocyten von *X. laevis* (2.3) gemessen. Physiologische Strommessungen dieser Methode beruhen prinzipiell darauf, dass über eine der beiden in die Zelle eingestochenen Glaselektroden (Potentialelektrode) das Membranpotential zwischen Zellinnerem und Badlösung erfasst, und als Spannungssignal über den Vorverstärker (Headstage) an den Differenz- oder Operationsverstärker weitergeleitet wird. Über die zweite eingestochene Elektrode (Stromelektrode) wird nun eine vom Differenzverstärker vorgegebene Spannung angelegt, die proportional ist zur Differenz zwischen gemessener Membranspannung und gewünschter Sollspannung. Diese angelegte Spannung fließt also genau solange als Strom über die Oocytenmembran zurück zum Verstärker, bis die Differenz zwischen der vorgegebenen Sollspannung und dem aktuell gemessenen Membranpotential gleich null ist (Abbildung 2.1). Dieser Strom wird vom Computer aufgezeichnet und entspricht im Betrag genau dem Strom, der durch die Summe der zu untersuchenden Ionenkanäle in der Zelle fließt.

2.5.4.3 Aufbau des DEVC-Messplatzes

Der mechanooptische Teil der Messvorrichtung bestand im Wesentlichen aus der Badkammer, in der die Oocyte auf zwei halbschalenförmig zurechtgeschnittenen Silikonschläuchen auflag und von der jeweiligen verwendeten Messlösung umspült werden konnte. Diese Badkammer wurde auf einer Aluminiumplatte unter einem Binokular (*BMS-11*) installiert. Die an den Messverstärker (*Geneclamp 500*, Axon Instruments) angeschlossenen *headstages* (Vorverstärker) wurden über Mikromanipulatoren (Narishige, Japan) bewegt. Die Glaselektroden (2.5.2) wurden auf die dafür vorgesehene Halterung am headstage montiert.

Das gravitative Perfusions-System bestand aus einer Reihe offener Spritzen, die über Polyethylen- und Silikonschläuche mit der Badkammer in Verbindung standen. Der Zulauf der gewählten Lösung konnte durch Umlegen eines Dreiwegehahnes gestartet werden und die Flussgeschwindigkeit durch Variation des Höhenunterschiedes von Lösungsreservoir und Messkammer verändert werden. Auf der anderen Seite der Badkammer wurde die Messlösung, nachdem sie die gemessenen Zellen perfundiert hatte, über eine Absaugvorrichtung (Vakuumpumpe mit vorgeschalteter Flüssigkeitsfalle) aus der Messkammer abgesaugt.

In der folgenden Abbildung ist der schematische Aufbau eines DEVC-Messplatzes dargestellt.

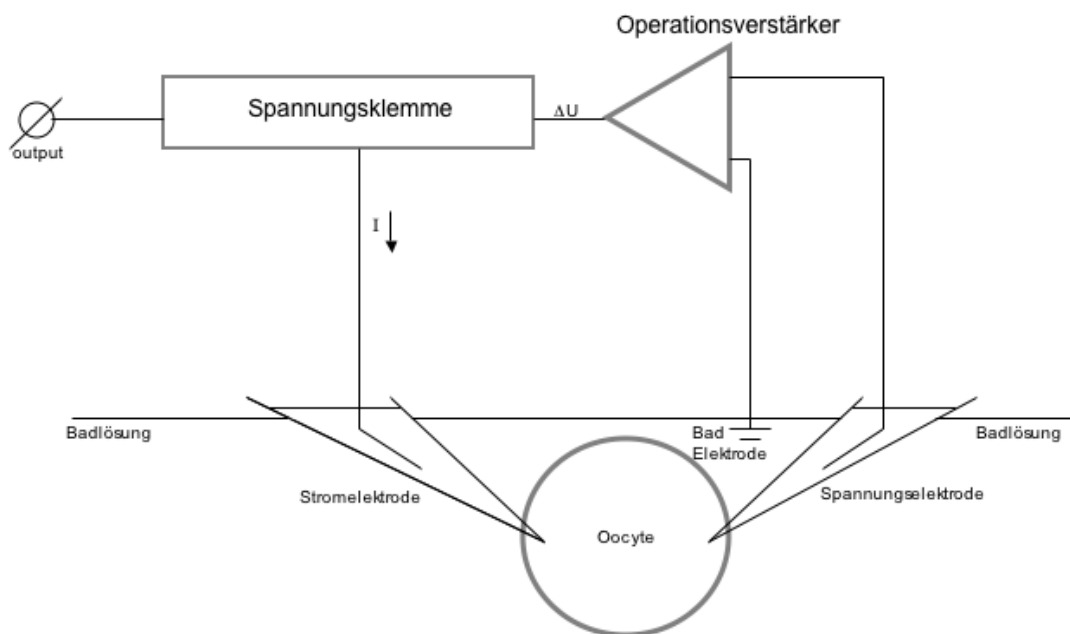


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung eines DEVC-Messplatzes.

2.5.5 Patch-Clamp

2.5.5.1 Patch-Clamp Technik

In dieser Arbeit wurden Patch-Clamp-Messungen (Neher und Sackmann, 1976) an epidermalen Protoplasten von *N. benthamiana* durchgeführt, um die Channelrhodopsin-Varianten C128A::YFP und C128T::YFP erstmals in Pflanzenzellen zu charakterisieren. Bei der Patch-Clamp-Technik wird zunächst durch einen an der Patchelektrode (2.5.2) angelegten Unterdruck eine Verbindung zwischen Zellmembran und Glas der Elektrodenöffnung hergestellt, welche als *Gigaseal* bezeichnet wird, da der Widerstand dieser Verbindung im Normalfall bei mehreren G Ω liegt. Messungen in dieser Konfiguration werden als *cell-attached* bezeichnet. Durch eine kurze Erhöhung des Unterdruckes und/oder durch den Einsatz eines kurzen Spannungspulses ($\Delta U/t = 1 \text{ V/ms}$) kann die Membranfläche unterhalb der Öffnung der Patch-Pipette herausgelöst werden, ohne dass die Verbindung zwischen Zelle und Elektrode verloren geht. Nach dem diffusiven Austausch von Pipettenlösung und Cytoplasma bildet sich ein elektrisches Kontinuum zwischen Patch-Pipette und der Zelle. Messungen in dieser Konfiguration werden als *whole-cell*-Messungen bezeichnet. Ähnlich wie bei DEVC-Messungen an Oocyten (2.5.4.2) entspricht bei Messungen in dieser Konfiguration der kompensative Strom, der vom Differenzverstärker geliefert werden muss um die vorgegebene Klemmspannung zu halten, im Betrag der Summe der Ströme aller in der Zellmembran aktiver Ionenkanäle. Des Weiteren gibt es durch schnelles Abziehen der Elektrode nach der Ausbildung eines Gigaseals die beiden Messkonfigurationen *inside-out* (die ursprüngliche Zellinnenseite ist jetzt der Badlösung zugewandt, wird erreicht, in dem die Pipette aus der *cell-attached*-Konfiguration schnell abgezogen wird) und *outside-out* (die ursprüngliche Zellaußenseite ist auch hier wieder der Badlösung zugewandt, wird erreicht, indem man die Pipette aus der *whole-cell* Konfiguration schnell abzieht), welche zu Einzelkanalmessungen herangezogen werden können. In dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich in der Konfiguration *whole-cell* gemessen.

2.5.5.2 Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes

Der in dieser Arbeit verwendete Patch-Clamp-Messplatz bestand aus einem inversen Mikroskop (*Teival-31 Zeiss*), auf dem die eigentliche Patchkammer (einer konisch ausgeschliffene Polyethylen-Ringscheibe mit angeklebtem Glasboden, Eigenbau) in einem Aluminiumträger über einen zweidimensional beweglichen Objektivtisch montiert war. Der Vorverstärker des Messverstärkers (*EPC-7, Heka*) und die darüber verbundenen Patch-Elektroden (2.5.2) wurde über einen piezoelektrisch gesteuerten Mikromanipulator (*S-PS-800, Scientifica*) fixiert und positioniert. Der Messplatz wurde auf einem schwingungsgedämpften Messtisch (TMC, Technical Manufacturing Cooperation MA, USA) installiert. Das Über- und Unterdrucksystem für die Sealbildung bestand aus einem U-förmig am Faraday-Käfig fixierten Schlauch, der zur Hälfte mit Wasser gefüllt war und über Silikon- und PVC-Schläuche mit der Patchelektrode in Verbindung stand. Der nötige Unterdruck zur Ausbildung des Gigaseals wurde durch leichtes Saugen mit dem Mund erzeugt, da so eine fein dosierbare und schnell veränderbare Druckregulation möglich war. Wie bei der DEVC-Messung (2.5.4.2) bestand das gravitative Perfusionssystem aus einer Reihe offener Spritzen. Durch Umlegen eines Dreiwegehahnes konnte der Zulauf der gewünschten Messlösung gestartet werden. Die Belichtung der Zellen und damit die Aktivierung von Channelrhodopsin-2 fand über blaues Laserlicht (473nm, Push Optotech GmbH) statt, welches in eine Lichtleiterfaser ($\varnothing 1,7\text{mm}$, Laser Components GmbH) eingekoppelt wurde. Die Lichtleiterfaser konnte über Mikromanipulatoren (Narishige, Japan) über der Messkammer bewegt und zellnah positioniert werden (Abbildung 2.2). Die verwendeten Laser konnten zudem über die Software *WinEDR* (2.5.3) vom Computer über TTL-Pulse angesteuert und aktiviert werden.

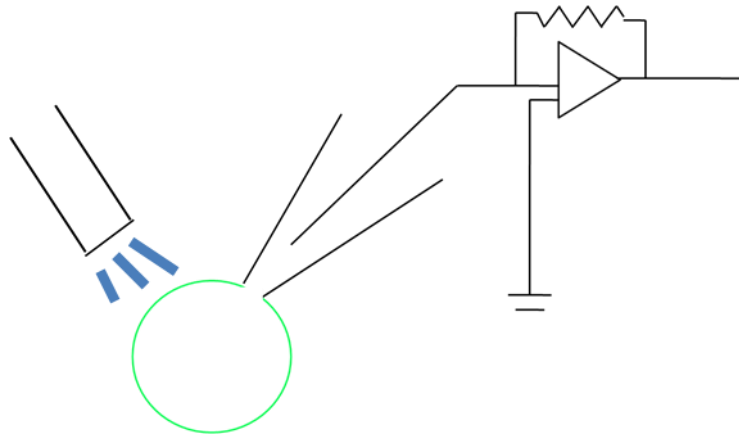


Abbildung 2.2 Belichtungsvorgang Channelrhodopsin-exprimierender Protoplasten während der Patch-Clamp-Messungen.

2.5.5.3 Bau eines einfachen Fluoreszenzmikroskops

Durch den Einsatz zweier lichtstarker Laser und nachträglich in den Strahlengang des Mikroskops (*Telaval-31*, Zeiss) eingebaute optische Kantenfilter konnte ein einfaches Fluoreszenz-Mikroskop gebaut werden. Zur Identifizierung sowie zur Anregung transfizierter Zellen für elektrophysiologische Messungen wurden Laser (473nm und 532nm) verwendet (Push Optotec GmbH, Laser 2000 GmbH), welche in einer einfachen optischen Bank in eine Kunststoff-Lichtleiterfaser ($\varnothing 1,7\text{mm}$, Laser Components GmbH) eingekoppelt wurden (Abbildung 2.3). Durch einen Mikromanipulator (Narishige, Japan) konnte das Ende der Lichtleiterfaser in unmittelbarer Nähe der Messkammer und der gemessenen Zellen positioniert werden (Abbildung 2.2). Durch die verwendeten optischen Kantenfilter (Transmission $>495\text{nm}$ für die Detektion des YFP-Signals bzw. $>560\text{nm}$ für die Detektion des tdimer2RFP-Signals) konnte Exzitation der Laser und Emission der fluorophoren Proteine optisch so gut getrennt werden, dass sowohl die YFP- als auch tdimer2RFP-Fluoreszenz transformierter Zellen auf nahezu schwarzem Hintergrund stark und deutlich sichtbar wurden. Alle Messungen wurden unter abgedunkeltem Raumlicht durchgeführt. Die Patchkammer selbst konnte während der Messung mit rotem Licht erhellt werden, welches in der Wellenlänge jenseits der Aktivierungswellenlängen sämtlicher untersuchter Proteine lag.

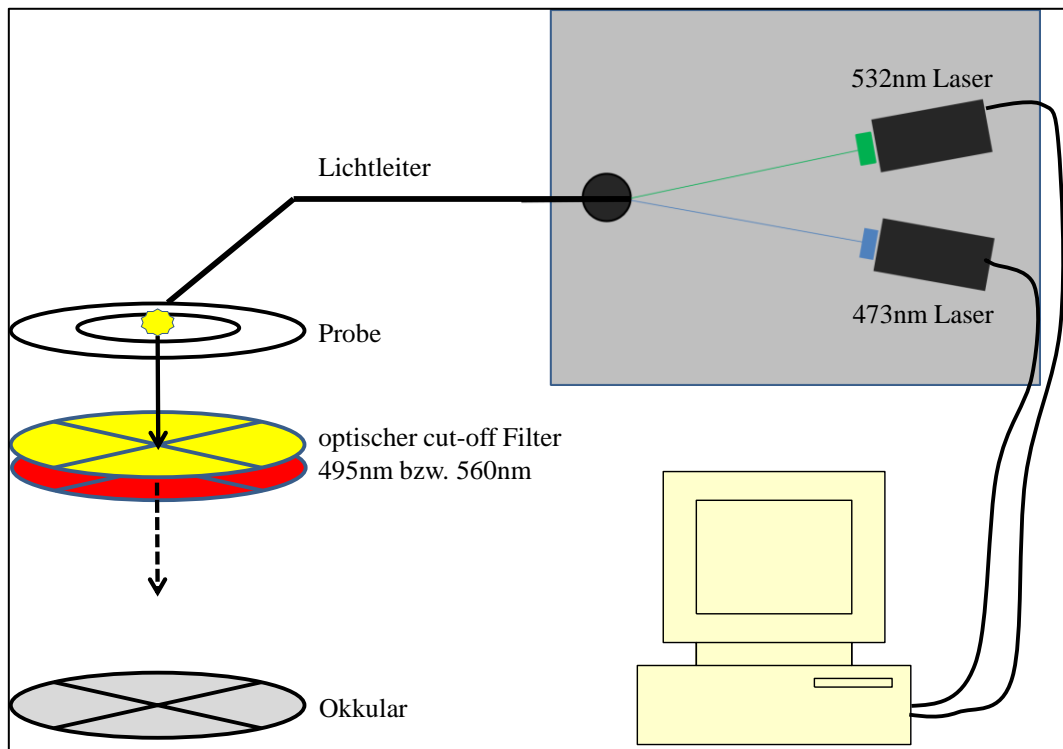


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung eines einfachen selbstgebautes Fluoreszenzmikroskops. Die Anregung der Fluoreszenzproteine YFP oder tdimer2RFP erfolgte mit Laserlicht einer Wellenlänge von 473nm bzw. 532nm, welches in eine Lichtleiterfaser eingekoppelt wurde. Mittels eines Mikromanipulators konnte diese Lichtleiterfaser zellnah positioniert werden. Durch die eingesetzten Kantenfilter (495nm und 560nm) konnte die Emission der Fluoreszenzproteine sauber von der Exzitation des Laserlichtes getrennt werden, und transfizierte Zellen sowohl identifiziert als auch lichtaktiviert werden. Das Lichtsignal konnte über den Computer als TTL-Signal gestartet, und in den jeweiligen Messungen aufgezeichnet werden.

2.6 Immunologische Methoden

2.6.1 ELISA - Quantifikation cyclischer Nucleotide

In dieser Arbeit wurden cAMP- bzw. cGMP-Konzentrationen transient und stabil *bPAC*- bzw. *bPGC*-exprimierender Pflanzenzellen (3.2.3, 0, 3.4.3), pflanzlicher Zellkulturen (3.5) und Oocyten (3.6.1.2) über kompetitiven ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbant Assay) bestimmt. Hierzu wurden die kommerziellen ELISA-Kits (*Total Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit*, Biotrend Chemikalien GMBH Köln, *DetectX-Direct Cyclic GMP Enzyme Immunoassay Kit*, Arbor Assays, Michigan, USA, *Direct cyclic cGMP Enzyme Immunoassay Kit*, *Stressgen*, Enzo life science inc. 2010) verwendet. Alle Schritte zur Durchführung des Assays wurden nach den jeweiligen Protokollen der Hersteller durchgeführt. Wurde anstatt des im Kit vorgelegten sample diluent 0,1M HCL verwendet um Proben aufzunehmen und zu verdünnen, so wurde jeweils eine Eichgerade durch entsprechend angesetzte Standards erstellt. Das Prinzip eines kompetitiven ELISA beruht darauf, dass sowohl Freies- als auch an eine Peroxidase konjugiertes cAMP (bzw. cGMP) um Antikörperbindestellen in einer 96-Well-Microtiterplatte konkurrieren. Nach den im Protokoll vorgegebenen Waschschritten verbleibt je nach cAMP/cGMP-Konzentration der Probe eine reziproke Menge Peroxidasekonjugat-cAMP/-cGMP auf der Platte. Die Intensität der von der Peroxidase verursachten Farbreaktion nach Substratzugabe ist somit indirekt proportional zur Menge an freiem cAMP/cGMP in der Probe. Die Intensität dieser Farbreaktion wurde durch Bestimmung der Absorption bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 460nm im Elisa-Reader (*Microplate Reader Mod.500* Biorad, *Multiscan Ascent*, Thermo Electron Cooperation) gemessen. Anhand einer logarithmisch erstellten Eichgerade (durch den Einsatz von cAMP- bzw. cGMP-Standards definierter Konzentrationen) konnte die Konzentration cyclischer Nucleotide der einzelnen Proben ermittelt werden.

Zur Induktion der Proteinexpression wurden Blätter verschiedener Pflanzen der stabil transgenen Linien abgeschnitten, gewogen und mit einer scharfen Rasierklinge in ca. 0,5cm² große Stücke geschnitten. Diese Blattstücke wurden zur Expressionsinduktion 48 Stunden in östrogenhaltigem Leitungswasser (10µM) eingelegt und wenn nicht anders angegeben während der Expression in Dunkelheit gehalten. Zur Probenentnahme wurden die Blattscheiben nach entsprechender Behandlung (3.4.2, 3.4.3) zunächst auf saugfähigen Papiertüchern abgetrocknet, in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und mit gleichem Volumen (w/v) 0,1M HCl versetzt. Anschließend wurden zwei Stahlkugeln (ø=1,5mm) zugegeben und die Blattproben fünf Minuten in der Kugelmühle (*Retsch 300MM*, 30Hz) homogenisiert. (Bei den durchgeführten Zeitreihen zum Abbau cyclischer Nucleotide (3.4.2.3) wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff gesammelt und gemeinsam homogenisiert). Der Überstand dieses Homogenisates wurde nach Zentrifugation (14000rpm / 5min / RT) je nach Konzentration (welche durch entsprechende Vormessungen bestimmt wurde) entweder unverdünnt, oder in 0,1M HCl verdünnt (entsprechend des im Kit angegebenen Messbereiches) für die cAMP- bzw. cGMP-Quantifikation herangezogen. Um die Konzentration cyclischer Nucleotide aus transient transfizierten Protoplasten (3.2.2) zu bestimmen wurden die Protoplasten nach der Expression durch Zentrifugation (100g / 2min / RT) pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in definierten Volumina 0,1M HCl aufgenommen und die Protoplasten durch vortexen der Proben homogenisiert. Die jeweiligen Konzentrationen cyclischer Nucleotide in den Proben wurden durch den Bezug auf die durch definierte Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden ermittelt. Um die cNMP-Konzentration aus Oocyten-Proben zu bestimmen wurden diese in definierten Volumina Probenpuffer (sample-diluent im Kit) aufgenommen, gegebenenfalls belichtet, und mittels wiederholtem invertieren durch Pipettieren in gelben Pipettenspitzen homogenisiert. Auch hier wurde die Konzentration cyclischer Nucleotide nach Zentrifugation (14000rpm / 10min / RT) aus dem Überstand bestimmt. Für die cAMP-Konzentrationsbestimmung der erstellten Zellkultur *bPAC::YFP* wurden 10ml Zellkultur abgenommen und pelletiert (100g / 2min / RT).

Das Pellet wurde nach vollständiger Abnahme des Kulturmediums gegebenenfalls belichtet und anschließend in der Kugelmühle homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation (14000rpm / 5min / RT) wurde der Überstand abgenommen, mit HCl in der Endkonzentration 0,1M versetzt und der cAMP-Gehalt bestimmt.

2.7 Luminometrischer Calcium-Nachweis

2.7.1 Prinzip der Lumineszenzmessung

Cytoplasmatische Calciumkonzentrationen (3.4.6) wurden in dieser Arbeit luminometrisch durch das Calciumreporterprotein Aequorin (Shimomura et al., 1962, Knight et al., 1991) bestimmt. Dieses Protein weißt drei Calciumbindestellen auf. Ändert sich die cytosolische Calciumkonzentration, so kommt es zur Konformationsänderung der Proteinstruktur und in der Folge zur Freisetzung des Cofaktors Coelenterazin. Dieses wird im ungebundenen Zustand sofort zum Coelenteramid decarboxyliert, wobei Licht der Wellenlänge von 460nm emittiert wird. Dieses Lichtsignal kann vom Photomultiplier eines Luminometers detektiert werden. Die gemessene Lumineszenz-Intensität ist somit direkt proportional zur Calciumkonzentration in der Zelle und wird üblicherweise in *counts / s* angegeben.

Voraussetzung für eine Messung der durch lichtaktivierte Enzyme und Ionenkanäle generierten Calciumsignale ist es, dass der im Luminometer eingebaute Photomultiplier (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH) während des aktivierenden Blaulichtpulses über einen Shutter-Mechanismus (*VCM-DI*, Vincent Associates, Rochester, NY, USA) vor der Starklichtexposition geschützt wird.

Der Aufbau dieses speziell für die Messungen lichtaktivierter Calciumprozesse angepassten Luminometers war eine Eigenentwicklung und Konstruktion der Werkstätten der Botanik-I des Julius-von-Sachs-Institutes der Universität Würzburg und ist schematisch in Abbildung 2.4 dargestellt. Im direkten Anschluss an einen aktivierenden Lichtpuls, welcher durch integrierte blaue LEDs bewerkstelligt wurde, öffnete der Shutter dieses Luminometers und die Messung der Aequorin-Quantenemission durch den Photomultiplier wurde gestartet.

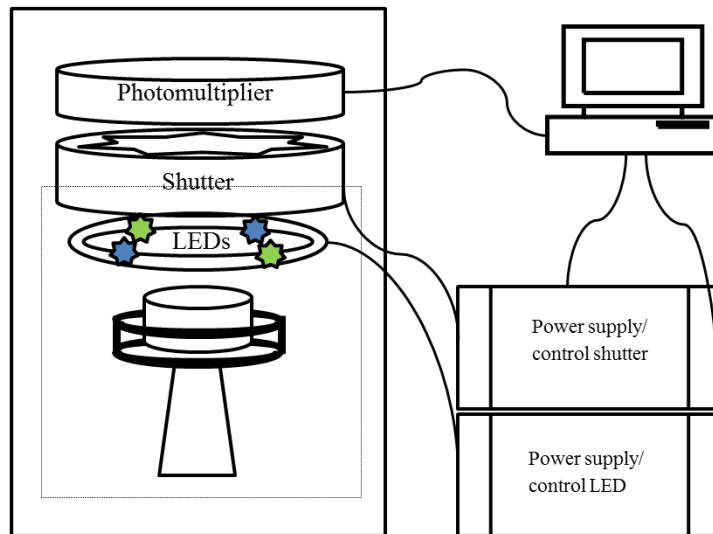


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung eines angepassten Luminometers zur Messung lichtaktivierter Calciumprozesse. Durch die blauen LEDs in der Messkammer konnten die Proben belichtet werden, was zur Aktivierung der Enzyme *bPAC* bzw. *bPGC* in Blattproben der stabil transgenen Pflanzen führte. Im direkten Anschluss an die Blaulichtaktivierung öffnete sich der Shutter und die von der Blattprobe ausgehende Aequorin-Lumineszenz wurde vom Photomultiplier detektiert.

Für luminometrische Messungen wurden Blätter der stabil transgenen Pflanzenlinie abgenommen, mit einer Rasierklinge in etwa 0.5cm^2 große Stücke geschnitten und zur Induktion über Nacht in östrogenhaltigem Leitungswasser ($10\mu\text{M}$) bzw. in entsprechend gepufferter Messlösung eingelegt. Neben Östrogen wurde den Blattscheiben zusätzlich Coelenterazin in der Konzentration $10\mu\text{M}$ zugegeben.

2.8 Fluoreszenzmikroskopie

2.8.1 Confocale Lasermikroskopie

Alle in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen von Einzelzellen und Zellverbänden wurden mit dem confocalen Laserscanning-Mikroskop (*LSM-5 Pascal* auf *Axioskop2MotPlus* Zeiss) aufgenommen. Bei intensitätsvergleichenden Aufnahmen wurde stets darauf geachtet, dass optoelektronisch identische Einstellungen verwendet wurden. Die gezeigten Bilder wurden nicht weiter bearbeitet, ausschließlich zurechtgeschnitten und zusammengeführt.

2.8.2 Epifluoreszenzaufnahmen

Epifluoreszente Aufnahmen von transient transfizierten Blattregionen wurden mit einem Stereo-Binokular (*MZFC-III*, Leica) aufgenommen. Des Weiteren wurde das Keimungsverhalten der stabil transgenen Linie *bPAC::YFP* (3.4.4) über dieses Binokular unter Verwendung einer digitalen Kamera (*spot insight color*, diagnostic instruments inc., USA) dokumentiert.

2.9 Belichtungsparameter

Die im folgenden angegebenen Lichtleistungen wurden mit dem Photometer *Field Mate Laser powermeter* (Coherent Inc.) bei den Wellenlängen der vom Hersteller der jeweiligen Lichtquellen als maximal angegebenen Lichtleistung bestimmt. Die Lichtintensitäten in Gewächshäusern und Klimakammern (Tabelle 2.10) wurden exemplarisch bei vier Wellenlängen im sichtbaren Bereich des Lichtes gemessen.

Tabelle 2.9 Übersicht der Leistungen der verwendeten Lichtquellen

LED (456nm, Belichtung pflanzlicher Proben)	3mW
LED (456nm, Belichtung der Oocyten)	11,6mW
Laser (473nm, Patch-Clamp, DEVC)	8,1mW
Laser (532nm, Patch-Clamp)	25mW
LED (456nm, Luminometer)	1,5mW

Die Intensitäten der Laser wurden bei der maximalen Intensität bei einer Wellenlänge von 473nm bzw. 532nm am Ende der Lichtleiterfaser ($\varnothing 1,7\text{mm}$, Laser Components) gemessen. Die Intensitäten der verwendeten LEDs wurden ebenfalls beim vom Hersteller angegebenen Emissionsmaximum in unmittelbarer Nähe zur Lichtquelle bestimmt.

Tabelle 2.10 Übersicht der Lichtleistung in Gewächshäusern und Klimakammern. Die angegebenen Werte entsprechend den Leistungen in mW.

	400nm	500nm	600nm	700nm
Klimakammer	1,5	0,7	0,6	0,6
Gewächshaus (Langtag)	4,6	2,6	2,0	1,9
Phytotron (Agarplatten)	0,9	0,5	0,4	0,3
Phytotron (Pflanzen)	1,7	0,9	0,8	0,7

2.10 Klonierungen

2.10.1 Die Channelrhodopsin-2-Varianten C128A und C128T

2.10.1.1 Einfügen der Punktmutationen C128A und C128T

Um lichtinduziert Änderungen der cytoplasmatischen Calciumkonzentration sowie Änderungen des Membranpotentials in Pflanzenzellen zu generieren, wurde zunächst versucht, die beiden Channelrhodopsin-2-Varianten C128A und C128T (unveröffentlichte Daten von R. Gueta und G. Nagel, 2008; Berndt et al., 2009; Bamann et al., 2010) in Pflanzenzellen zu exprimieren. Hierzu wurde die codierende Sequenz (CDS) von Channelrhodopsin-2::YFP (WT) zunächst über Restriktionsverdau (2.4.1.3) mit *BamHI* und *HindIII* aus dem Konstrukt Channelrhodopsin-2-315::YFP/pGemHE (int. Klon-Nr 115) herausgeschnitten und über eine Ligationsreaktion (2.4.1.8) in den ebenfalls mit *BamHI* und *HindIII* verdauten Gateway®-Entry-Vektor (2.4.1.11) pENTR-MCS eingebracht. In diesem Vektor wurde anschließend unter der Verwendung der Primer SDMP_Chop_C128A/-T (6.6.4) die Site-directed Mutagenesis (2.4.1.2) durchgeführt, um die Channelrhodopsin-2::YFP Konstrukte ChR2-C128A::YFP/pENTR-MCS und ChR2-C128T::YFP/pENTR-MCS zu erhalten. Die Mutationen wurden jeweils über Sequenzierung (2.4.1.9) überprüft und bestätigt.

2.10.1.2 Umklonierung in den Pflanzentransfektionsvektor pMDC-32

Die Channelrhodopsin-2::YFP-Versionen C128A/pENTR-MCS und C128T/pENTR-MCS wurden unter Verwendung des Gateway®Systems (s. 2.4.1.11) in den binären Pflanzentransfektionsvektor pMDC-32 eingebracht. Das Ergebnis der Klonierung wurde durch Sequenzierung (2.4.1.9) überprüft und bestätigt. Dieses Konstrukt wurde anschließend über Elektroporation (2.4.3.2) in *A. tumefaciens* (2.1.1.2) eingebracht, über Infiltration (2.4.4.3) transient und über floral dipping (2.4.4.1) stabil in Pflanzen transfiziert.

2.10.2 Klonierung der lichtaktivierbaren Adenylatcyclase aus *Beggiatoa*

2.10.2.1 Fusionsprotein bPAC::YFP und bPAC::tdimer2RFP in pGemHE

Um Expression und Lokalisation der lichtaktivierten Adenylatcyclase bPAC (Stierl et al., 2011, 1.3) in den verschiedenen eingesetzten Expressionssystemen zu visualisieren und nachzuvollziehen, wurden Fusionsproteine aus bPAC und den fluorophoren Proteinen YFP (Yellow Fluorescent Protein) und tdimer2RFP (einer Modifikation des Red Fluorescent Protein) erstellt. Hierzu wurde zunächst, ausgehend von der CDS der bPAC::cmyc im Vektor pGemHE (int. Klon-Nr. 358) durch eine site directed Mutagenesis (2.4.1.2) eine Restriktions-Schnittstelle für die Endonuclease *NotI* am 3'-Ende des Gens eingefügt. Ursprünglich befand sich im Vektor pGemHE direkt hinter dem Stopcodon der bPAC::cmyc-CDS eine *HindIII*-Schnittstelle. Diese wurde durch die Site directed Mutagenesis (2.4.1.2) dahingehend verändert, dass das ursprüngliche Stopcodon mit der *NotI*-Schnittstelle überschrieben und das Stopcodon hinter der *NotI* Restriktionsschnittstelle unter Verwendung des Mutagenese-Primerpaares *NotI fwd* und *NotI rev* (6.6.4) erneut eingefügt wurde.

Ursprüngliche Sequenz (nach *bPAC::cmyc*):

stop *HindIII*

5'...gac ctg taa gct tga tct gg...3'

Neue Sequenz (nach *bPAC::cmyc*):

NotI stop

5'...gac ctg gcg gcc gcg taa ctt gat ctg g...3'

Die codierenden Sequenzen für YFP und tdimer2RFP wurden über einen Restriktionsverdau (2.4.1.3) aus den (in der Arbeitsgruppe vorhandenen) Plasmiden *Channelrhodopsin-2_315::YFP/pGemHE*, (Int. Klon Nr. 115) und *Channelrhodopsin-2::tdimer2RFP/pcDNA3.1* mit dem Restriktionsenzym *NotI* ausgeschnitten (2.4.1.3) und nach Aufreinigung aus dem Gel (2.4.1.5) mit dem ebenfalls über *NotI* linearisierten Plasmid *bPAC::cmyc/pGemHE* (s.o.) in einer Ligationsreaktion (2.4.1.8) verbunden. Die entstandenen Sequenzen der Fusionsproteine wurden durch Sequenzierung (2.4.1.9) überprüft und bestätigt (Sequenz *bPAC::YFP*: 6.6.1)

2.10.2.2 Umklonierung in den Pflanzenexpressionsvektor pSAT-2191

Nach erfolgreichen funktionellen Tests in Oocyten wurde das Konstrukt *bPAC::YFP* zunächst in den transienten Pflanzenexpressionsvektor pSAT-2191 umkloniert (Promotor: 2x35S-CaMV). Hierzu wurde durch site directed Mutagenesis (2.4.1.2) hinter dem Stopcodon der CDS von *bPAC::YFP* (2.10.2.1) erneut eine *HindIII* Restriktionsschnittstelle eingefügt, sodass die Sequenz *bPAC::YFP* von *HindIII*-Schnittstellen flankiert wurde (6.6.1). Hierzu wurden die Primer *bPAC-YFP-HindIII* (6.6.4) verwendet.

Ursprüngliche Sequenz (nach *bPAC(cmyc)::YFP*):

NotI stop

5´... tac aag taa agc ggc cgc gta act tga ... 3´

Neue Sequenz (nach *bPAC(cmyc)::YFP*):

NotI *HindIII* stop

5´... tac aag taa agc ggc cgc gaa gct tga ... 3´

Durch einen simultanen *HindIII*- Restriktionsverdau (2.4.1.3) dieses Konstruktes und des Pflanzenexpressionsvektors pSAT-2191, Aufreinigung aus dem Gel (2.4.1.5) und anschließender Ligationsreaktion (2.4.1.8) der beiden Fragmente wurde das Konstrukt *bPAC::YFP/pSAT2191* generiert. Parallel zu dieser Klonierung wurde der Gateway® Entry-Vektor pENTR-MCS ebenfalls durch Restriktionsverdau (2.4.1.3) mit *HindIII* linearisiert und das Konstrukt *bPAC::YFP/pENTR-MCS* durch eine Ligationsreaktion (2.4.1.8) der beiden Fragmente erstellt, was Voraussetzung für die Gateway®-Klonierung (2.4.1.11) in den binären Pflanzenvektor pMDC-32 war. In beiden Fällen wurde das Klonierungsergebnis durch Sequenzierung (2.4.1.9) überprüft und bestätigt.

2.10.2.3 Umklonierung in die binären Pflanzentransfektionsvektoren pMDC-32 und pER-8

Die Klonierung des Fusionsproteins *bPAC::YFP* in den binären Pflanzenvektor pMDC-32 fand unter Verwendung des Gateway® Systems (Invitrogen, 2.4.1.11) mit dem Konstrukt *bPAC::YFP/pENTER-MCS* (2.10.2.2) statt. Das Konstrukt *bPAC::YFP/pMDC-32* wurde durch Sequenzierung (2.4.1.9) bestätigt.

Zudem wurde nach transients Transfektion von *N. benthamiana* durch Infiltration (2.4.4.3) sowohl Fluoreszenz als auch Funktion des unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors exprimierten Proteins *bPAC::YFP* immunologisch gezeigt.

Um die Expression des Fusionsproteins *bPAC::YFP* unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors zu bringen, wurde dieses in den Pflanzen-Transfektionsvektor pER-8 (Zuo et al., 2000) einkloniert. Die glucocorticoidbindende Promotorsequenz dieses Vektors ermöglicht eine induzierte Expression von Genen nach der Zugabe von Östrogen (β -Estradiol, Synchem). Hierzu wurde die CDS von *bPAC::YFP* über PCR (2.4.1.1) aus dem Vektor pGemHE (2.10.2.1) amplifiziert, wobei *SpeI* (= *BcuI*) Überhangprimer verwendet wurden (6.6.4). Nach dem Restriktionsverdau des PCR-Produktes und des Vektors pER-8 mit *SpeI* (2.4.1.3), Aufreinigung aus dem Gel (2.4.1.5) und anschließender Ligationsreaktion (2.4.1.8) konnte das Konstrukt *bPAC::YFP/pER-8* erstellt werden.

Auch in diesem Falle wurde das Produkt der Klonierung *bPAC::YFP/pER-8* durch Sequenzierung überprüft und bestätigt und sowohl Fluoreszenz als auch Funktion nach transients Transfektion von Blattscheiben von *N. benthamiana* (2.4.4.2) immunologisch gezeigt, bevor mit der stabilen Transfektion von *A. thaliana Col-0* Aequorin Pflanzen (2.4.4.1) fortgefahren wurde.

2.10.2.4 Umklonierung in den Pflanzenexpressionsvektor pUBQ-10

Um die Auswirkung einer lichtinduzierten Erhöhung des cytoplasmatischen cAMP- bzw. cGMP-Gehaltes nach transients Transfektion in Pollenschläuchen von *N. SR-1* (2.2.2) zu untersuchen, wurden die Konstrukte *bPAC::YFP* (2.10.2.1) bzw. *bPGC::YFP* (2.10.3) in den transienten Pflanzenexpressionsvektor pUBQ-10 und damit unter die Kontrolle des in Pollen hochaktiven Ubiquitin-Promotors (*Ubi*, Christensen und Quail, 1996) eingebracht. Hierzu wurde die CDS beider Cyclasen mittels PCR (2.4.1.1) unter Verwendung uracilhaltiger USER-PCR-Primer (6.6.4) amplifiziert.

Anschließend wurden unter Verwendung des USER Systems (2.4.1.12) die Konstrukte *bPAC::YFP/pUBQ-10* und *bPGC::YFP/pUBQ-10* generiert und in *E. coli* (2.1.1.1) transformiert (2.4.3). Die Sequenz beider Konstrukte wurde mittels Sequenzierung (2.4.1.9) überprüft und bestätigt.

2.10.3 Mutation zur lichtaktivierbaren Guanylatcyclase

2.10.3.1 Site directed Mutagenesis in pSAT-2191 und pGemHE

Durch den gezielten Austausch zentraler Aminosäuren (nach Ryu et al., 2010) in der cAMP-Bindetasche der *bPAC* (=BlaC, Ryu et al., 2010; Stierl et al., 2011) konnte die Substratspezifität der lichtaktivierten Adenylatcyclase von ATP zu GTP verändert werden, wodurch eine lichtaktivierbare Guanylatcyclase [*bPGC::YFP* (=BlgC), Ryu et al., 2010] erhalten wurde (3.4.3). Entsprechende Mutationen wurden durch Mutageneseprimer (6.6.4) auf den Konstrukten *bPAC::YFP/pSAT2191* (2.10.2.2) sowie auf *bPAC::YFP/pGemHE* (2.10.2.1) durch site-directed-mutagenesis (2.4.1.2) eingefügt. Im Einzelnen handelte es sich um die Substitutionen K197E, D265K und T267G der Aminosäuresequenz von *bPAC*. Die Sequenz der neu entstandenen lichtaktivierten Guanylatcyclase *bPGC::YFP* wurde in beiden Vektoren durch Sequenzierung (2.4.1.9) überprüft und bestätigt.

2.10.3.2 Umklonierung in den Pflanzentransfektionsvektor pER-8

Um die Expression der generierten lichtaktivierten Guanylatcyclase *bPGC::YFP* ebenfalls unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotorsystems zu bringen, wurde die CDS von *bPGC* in den Vektor pER-8 eingebracht (vgl. 2.10.2.3). Hierzu wurde zunächst die die Sequenz von *bPGC* (2.10.3.1) mittels PCR (2.4.1.1) unter Verwendung von *SpeI*-Überhangprimern (6.6.4) amplifiziert.

Sowohl der Zielvektor pER-8 als auch das erhaltene PCR-Produkt wurden mit *SpeI* verdaut (2.4.1.3), aus dem Gel aufgereinigt (2.4.1.5) und in einer Ligationsreaktion (2.4.1.8) miteinander verbunden. Das Produkt dieser Klonierung *bPGC::YFP/pER-8* wurde über Sequenzierung (2.4.1.9) überprüft und bestätigt.

2.10.4 Das Fusionskonstrukt CNGA2_2A_EuPAC

2.10.4.1 Einfügen der 2A-Sequenz in CNGA2::*EuPAC*

Um eine effiziente und äquimolare Expression der lichtaktivierten Adenylatcyclase *EuPAC α* (Iseki et al., 2002; s. 1.2) und dem cAMP-aktivierten Kationenkanal CNGA2 (in der Version C460W/E538M, nach Rich et al., 2001, s. 4.3.5.2) in verschiedenen Expressionssystemen zu gewährleisten, wurden die kodierenden Sequenzen von CNGA2 und *EuPAC α* unter Einfügung einer sog. 2A-Sequenz (Ryan et al., 1991; Tang et al., 2009) miteinander verbunden. Diese Sequenz führt dazu, dass die Translation der darüber verknüpften Gene am Ribosom unterbrochen wird, in dem eine Peptidbindung ausgelassen, bzw. nicht geknüpft wird. Im Anschluss an diese „Lücke“ wird die Translation unverändert fortgeführt, und die durchgängige Polypeptidkette des zweiten Proteins erstellt. Hierzu wurde das bestehende Fusionsprotein CNGA2::*EuPAC* im Vektor pGemHE (erstellt von Dr. Jens Looser, Dissertation 2010, interne Klon-Nr. 300) herangezogen.

Die synthetisierte 2A-Sequenz wurde so entworfen, dass sich beim Aneinanderlagern der beiden Oligonucleotide durch entsprechende Nucleotid-Überhänge beidseitig *EcoRI*-Schnittstellen ergaben (6.6.4). Beide Oligonucleotide wurden zunächst auf eine Konzentration von 1 μ M bzw. 10 μ M verdünnt und anschließend für zehn Minuten auf 90°C erhitzt. Das Zusammenlagern beider Oligonucleotide fand im sich passiv abkühlenden Metallblock eines Heizblocks (*Giant QBT*) über Nacht statt.

Das so erhaltene synthetische 2A-Insert wurde durch eine Ligationsreaktion (2.4.1.8) in das zuvor mit *EcoRI* linearisierte Konstrukt CNGA2::*EuPAC* eingebracht, in welchem sich *in frame* eine *EcoRI*-Schnittstelle zwischen beiden Genen befand. Die Aminosäuresequenz des verwendeten 2A-Inserts (mit der durch // angedeuteten Bruchstelle, nach Tang et al., 2009) ist folgend gegeben:

E-G-R-G-S-L-L-T-C-G-D-V-E-E-N-P-G // P-A-P-G-S

Der Übergang aus der 2A-Sequenz in die codierende Sequenz von *EuPAC α* hat demnach folgende Aminosäuresequenz:

...-N-P-G // P-A-P-G-S-E-F-P-S-A-G-F-**M-Y-I**-...

Kursiv: 2A-Sequenz vor // nach der Trennungsstelle im 2A-Polypeptid.

Fett: Beginn der codierenden Sequenz von *EuPAC α*

Die richtige Orientierung und einfache Insertion dieser Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft und bestätigt. Die Funktion des entstandenen Konstruktes CNGA2_2A_*EuPAC* wurde sowohl elektrophysiologisch (Abbildung 3.42) als auch immunologisch (Abbildung 3.44) in Oocyten von *X. laevis* gezeigt. Die vollständige Sequenz von CNGA2_2A_*EuPAC* ist in 6.6.2 angegeben.

2.10.4.2 Umklonierung in pSAT-2191 und pER-8

Nach Bestätigter Funktion von CNGA2_2A_EuPAC in Oocyten wurde das Gen des Fusionskonstruktes in den Pflanzenexpressionsvektor pSAT-2191 und in den Pflanzentransfektionsvektor pER-8 inkloniert. Hierzu wurde die Sequenz über *KpnI*-Überhangprimer (6.6.4) mittels PCR (2.4.1.1) amplifiziert und nach Aufreinigung (2.4.1.5) und Restriktionsverdau (2.4.1.3) in einer Ligationsreaktion (2.4.1.8) mit dem ebenfalls über *KpnI* linearisierten Vektor pSAT-2191 verbunden. Entsprechend wurde das Konstrukt CNGA2_2A_EuPAC über *SpeI*-Primer mittels PCR amplifiziert, und nach Aufreinigung, Restriktionsverdau und Ligationsreaktion in den über *SpeI* linearisierten Pflanzentransfektionsvektor pER-8 eingebracht. Das Ergebnis der Klonierungsreaktionen wurde über Sequenzierung (2.4.1.9) überprüft und bestätigt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Funktionelle Charakterisierung von Channelrhodopsin in Pflanzen

3.1.1 Transiente Expression in *Nicotiana benthamiana*

Um die Funktion von Channelrhodopsin-2 (Nagel et al., 2003, s. 1.1) erstmals in Pflanzenzellen zu untersuchen, wurden die beiden Channelrhodopsinvarianten C128T::YFP und C128A::YFP transient in *N. benthamiana* exprimiert. Hierzu wurden Blätter wie in 2.4.4.3 beschrieben infiltriert und Protoplasten durch enzymatischen Zellwandverdau gewonnen (2.2.6). Durch Zentrifugation (10g / 120s / RT) konnten epidermale Protoplasten aufgrund fehlender Chloroplasten anteilmäßig im Überstand angereichert und zu Patch-Clamp-Messungen (2.5.5.1) herangezogen werden. Durch die C-terminale Fusion eines YFP-Fluoreszenztags konnten sowohl Expression als auch Membranlokalisierung von Channelrhodopsin in den Protoplasten nachgewiesen werden. In der folgenden Abbildung sind Fluoreszenzaufnahmen der transient transfizierten, Channelrhodopsin C128T-exprimierenden Protoplasten von *N. benthamiana* gezeigt.

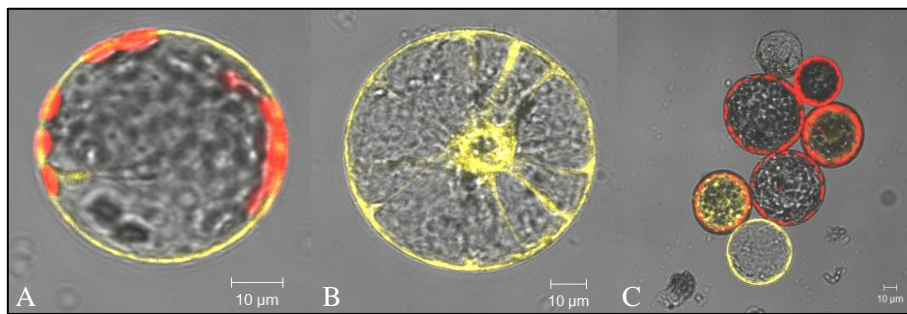


Abbildung 3.1 Transient transfizierte Protoplasten von *N. benthamiana* nach der Expression von Channelrhodopsin-2 C128T::YFP. **A)** Mesophyllprotoplast, zu erkennen an den im Zweitkanal rot eingefärbten Chloroplasten. **B)** Epidermalen, chloroplastenfreier Protoplast von *N. benthamiana*, gut erkennbar sind das Kontinuum des Endoplasmatischen Reticulums sowie die Membranlokalisierung des Fusionsproteins. **C)** Gruppe der vor dem Trennvorgang vorliegenden Protoplastentypen.

3.1.1.1 Retinalunabhängige Expression

Die in dieser Arbeit verwendeten Channelrhodopsinvarianten C128A und C128T (unveröffentlichte Daten von Ronnie Gueta und G. Nagel, 2008; Berndt et al., 2009; Bamann et al., 2010) zeigten in Pflanzenzellen eine Expression, die unabhängig von der Konzentration des zugegebenen Retinals zu sein schien. Gemessen an der Fluoreszenzintensität der Fusionsproteine (2.10.1) war die Expression in Gegenwart von Retinal (100µM) näherungsweise vergleichbar mit absolut Retinal-freier Expression.

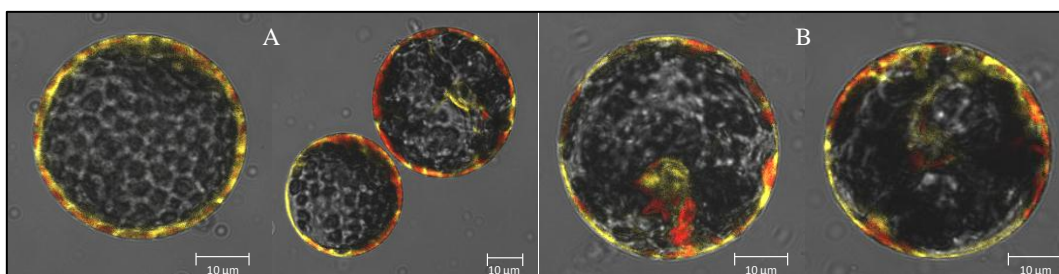


Abbildung 3.2 Expression von Channelrhodopsin-2 C128T::YFP in transient transfizierten Protoplasten von *N. benthamiana*. **A)** Den Protoplasten wurde während und nach dem Protoplastierungsverdau Retinal in der Endkonzentration 100µM für weitere 16 Stunden Expressionsdauer zugegeben. **B)** Eine vergleichbare Expressionsstärke des Proteins wurde auch ohne zusätzlich zugegebenes Retinal nach gleicher Expressionsdauer erreicht. Die Aufnahmen wurden unter intensitätsvergleichenden, optoelektronisch identischen Einstellungen erstellt (2.8.1). Die Protoplasten wurden drei Tage nach der Infiltration durch enzymatischen Zellwandverdau (2.2.6) aus infiltrierten Blättern von *N. benthamiana* (2.4.4.3) generiert.

Die Expressionsstärke von Channelrhodopsin nahm nach Zugabe von Retinal (100 μ M) über Nacht nicht weiter zu. Auch in Abwesenheit von Retinal konnte eine starke Expression dieser Mutanten in Protoplasten von *N. benthamiana* gezeigt werden. Für Patch-Clamp-Messungen (3.1.2.2) wurden Protoplasten sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Retinal herangezogen.

3.1.2 Elektrophysiologische Funktionsbestätigung von Channelrhodopsin in Pflanzenzellen

3.1.2.1 Voltage-Clamp

Zunächst wurde die generelle Funktion von Channelrhodopsin-2 elektrophysiologisch durch Einstichmessungen an Pflanzenzellen (2.5.4.1) in transient transfiziertem Mesophyllgewebe von *N. benthamiana* (2.4.4.3) getestet. Hierzu wurden infiltrierte Blattregionen in einer Fläche von etwa 0,5-1cm² ausgeschnitten und am Vorabend der Messung mit doppelseitigem Klebeband in der Messkammer so fixiert, dass die abaxial-epidermale Seite der Blattscheiben nach oben zeigte. Die Kammer wurde bis zum oberen Rand mit Messlösung aufgefüllt (5mM KCl, 1mM CaCl₂, pH 5,7 MES/BTP) und über Nacht zur Regeneration eines „vitalen“ Membranpotentials bei Raumtemperatur und absoluter Dunkelheit aufbewahrt. Während dieser Zeit und erneut etwa vier Stunden vor der Messung wurde den Blattscheiben Retinal in der Konzentration 100 μ M zugegeben (s. 4.1.1). Die Messung der lichtinduzierbaren Membranpotentialänderung (2.5.4.1) wurde gestartet, sobald sich nach dem Einstich der Messelektrode (2.5.2) ein konstant stabiles Membranpotential (negativer -100mV) eingestellt hatte. Es konnten eindeutig und wiederholbar lichtabhängige, schnelle Membrandepolarisationen um etwa 20mV generiert und gemessen werden.

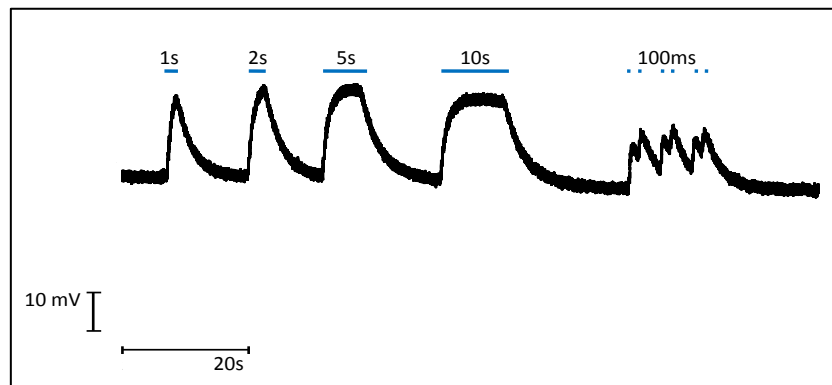


Abbildung 3.3 Lichtinduzierte Depolarisation in Mesophyllzellen transient Channelrhodopsin-2 C128T-transfizierter Blattsegmente von *N. benthamiana* (2.4.4.3). Die Belichtung der Channelrhodopsin-2 C128T::YFP-exprimierenden Blattstücke für 1, 2, 5 und 10 Sekunden mit blauem Licht (456nm, blaue Balken, s. 2.9) führte zur schnellen Depolarisation des Membranpotentials um etwa 20mV während der gesamten Dauer der Belichtung. Nach den Lichtpulsen kam es jeweils zur zügigen Repolarisation zum Ausgangspotential. Auch kurze, 100 Millisekunden andauernde Lichtpulse am Ende der Messung führten zu schnellen Oszillationen des Membranpotentials. (Messlösung: 5mM KCl, 1mM CaCl₂, pH 5,7 MES/BTP).

Nach transients Transfektion und Expression von Channelrhodopsin C128T::YFP in Blattgewebe von *N. benthamiana* konnten durch blaues Licht Membrandepolarisationen in Mesophyllzellen erzeugt werden. Durch Belichtung unterschiedlicher Dauer wurden zeitlich korrelierende Depolarisationen der Zellen um etwa 20mV hervorgerufen (Abbildung 3.3). Auch schnell aufeinanderfolgende, kurze Lichtpulse führten zu entsprechend schnellen Oszillationen des Membranpotentials. Nach Ende eines jeden Lichtpulses kam es zur schnellen Regeneration des Ruhepotentials.

3.1.2.2 Patch-Clamp

Um die Funktion der Channelrhodopsin-2 Varianten C128A und C128T (unveröffentlichte Daten von Ronnie Gueta und G. Nagel, 2008; Berndt et al., 2009; Bamann et al., 2010) auch im pflanzlichen Einzelzellensystem zu zeigen, wurden Patch-Clamp-Messungen an epidermalen Protoplasten von *N. benthamiana* durchgeführt (2.5.5, Abbildung 3.1).

Hierzu wurden zunächst, wie in 3.1 beschrieben, epidermale Protoplasten durch Sedimentation angereichert und transfizierte Protoplasten anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert (2.5.5.3). Alle Messungen fanden drei bis vier Tage nach der Infiltration statt, da zu diesem Zeitpunkt fluoreszenzmikroskopisch die stärkste Expression der Proteine beobachtet wurde. Die Qualität des Seals war in allen gezeigten Patch-Clamp-Messungen größer $1\text{G}\Omega$ in der whole-cell-Konfiguration (2.5.5.1). Während der Sealbildung wurde eine Klemmspannung von -30mV angelegt, was sich positiv auf die Ausbildung des Seals auswirkte. Ausgehend von diesem Potential wurde die Klemmspannung für zehn Sekunden auf -150mV reduziert und der Protoplast bei dieser Spannung mit blauem Licht (100ms, 473nm) belichtet.

Die verwendeten, bis auf den pH-Wert symmetrischen, Lösungsbedingungen (Bad: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl_2 , 2mM MgCl_2 pH 5,6; Pipette: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl_2 , 2mM MgCl_2 pH 7,6) sollten zunächst die generelle Funktion von Channelrhodopsin-2 in Pflanzenzellen bestätigen. Aus diesem Grund wurde eine Messlösung gewählt, die im Falle einer Funktion gesichert Ströme liefern würde. Die resultierenden lichtinduzierten Einwärts-Ströme waren somit größtenteils Protonenströme.

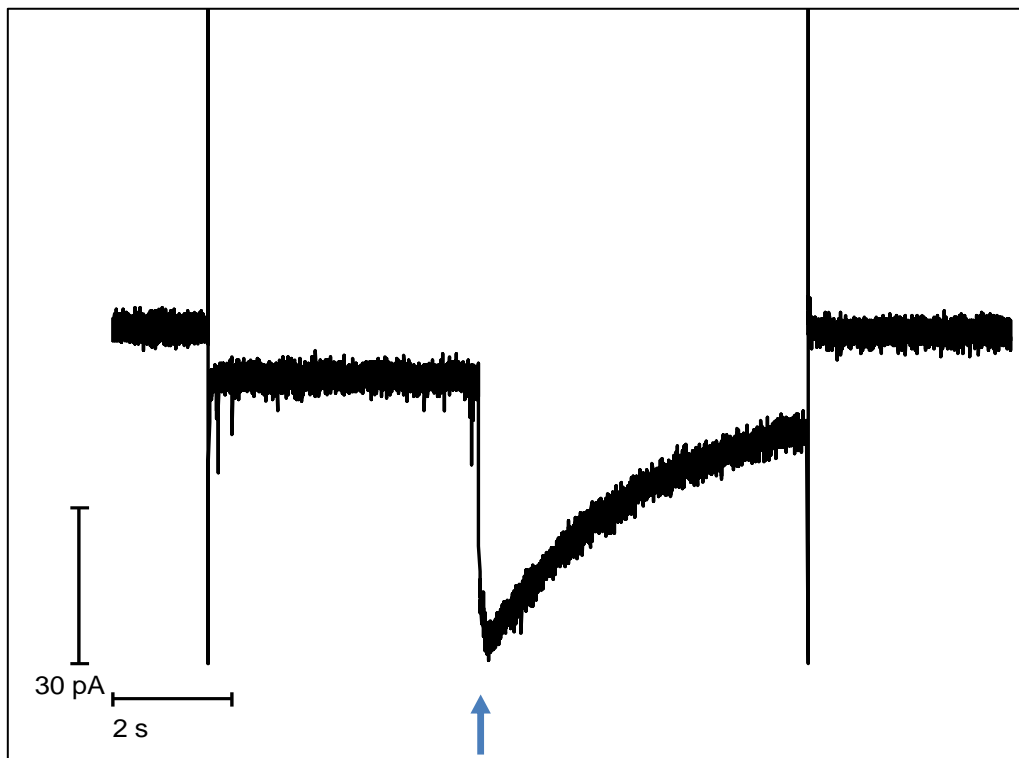


Abbildung 3.4 Patch-Clamp-Messung an einem epidermalen Protoplasten von *N. benthamiana*, welcher nach transienter Transfektion (2.4.4.3) Channelrhodopsin-2 C128T::YFP exprimierte. Bei einer Klemmspannung von -150mV wurde blaues Licht (473nm, 100ms, blauer Pfeil) appliziert. Die Messung fand in bis auf den pH-Wert symmetrischen Lösungsbedingungen statt (Bad: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ pH 5,6; Pipette: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ pH 7,6). Auf die Folge des Lichtpulses kam es zu einem negativen Strom von etwa 50pA.

Es konnten wiederholt blaulichtinduzierte Einwärts-Ströme in Protoplasten gemessen werden, welche die Channelrhodopsinvariante C128T::YFP exprimierten. Nach dem Lichtpuls (100ms, 473nm) kam es bei einer Klemmspannung von -150mV zu einem Einstrom von etwa 50pA. Aufgrund von den bis auf den pH-Wert symmetrischen Lösungsbedingungen handelte es sich in der gezeigten Messung größtenteils um einen Protoneneinstrom. Die Messung der lichtinduzierten Ströme war, je nach Beständigkeit des Seals, beliebig wiederholbar. Auch die Channelrhodopsinvariante C128A wurde in ihrer prinzipiellen Funktion in Pflanzenzellen durch Patch-Clamp-Messungen an transient transfizierten Protoplasten bestätigt.

In Folge der Belichtung mit blauem Licht wurden ebenfalls lichtinduzierte Einwärts-Ströme gemessen. Der hier gemessene Strom unterscheidet sich erwartungsgemäß in der Schließzeit von Jenem der Variante C128T (vgl. Bamann et al., 2010).

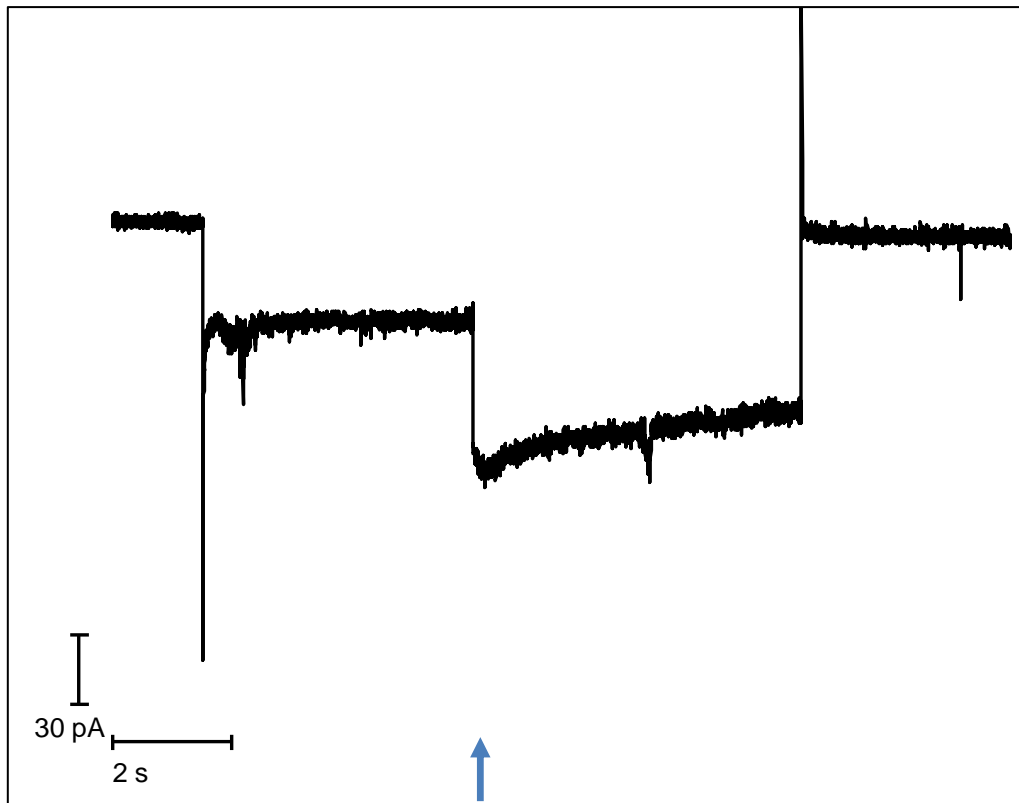


Abbildung 3.5 Patch-Clamp-Messung an einem epidermalen Protoplasten von *N. benthamiana*. Nach transients Transfektion und Expression der Channelrhodopsinvariante C128A::YFP konnten ebenfalls blaulichtinduzierte Einwärts-Ströme (473nm, 100ms, blauer Pfeil) gemessen werden. Die Messung fand in bis auf den pH-Wert symmetrischen Lösungsbedingungen statt (Bad: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ pH 5,6; Pipette: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ pH 7,6). Der Lichtpuls erfolgte bei einer Klemmspannung von -150mV. Im Vergleich zu Abbildung 3.4 wird die langsamere Schließzeit dieser Channelrhodopsinvariante deutlich (vgl. Bamann et al., 2010).

Protoplasten, welche nach transients Transfektion ausschließlich GFP exprimierten, zeigten in Kontrollmessungen keine lichtinduzierten Einwärts-Ströme. Die gezeigten Kontrollmessungen an GFP-exprimierenden Protoplasten fanden bei einer Haltespannung von -200mV statt, um zu verdeutlichen, dass es sich bei den gezeigten Stromantworten der Channelrhodopsin-transfizierten Protoplasten keinesfalls um Artefakt-Ströme, wie sie beispielsweise durch Erwärmung der Protoplastenmembran durch den Laserpuls entstehen könnten, handelt.

Auch wurden hier zur Verdeutlichung zwei kurze Lichtpulse appliziert. In keiner der drei gemessenen GFP-Kontrollzellen konnten Ströme im Zusammenhang mit dem Blaulichtpuls beobachtet werden. Für Kontrollmessungen wurden zu den vorangegangenen Messungen identische Lösungsbedingungen (Bad: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ pH 5,6; Pipette: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ pH 7,6) gewählt.

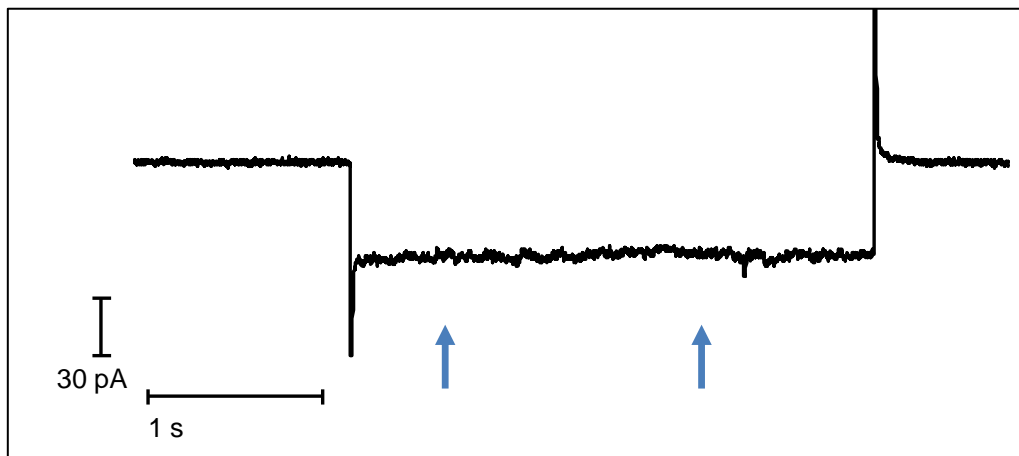


Abbildung 3.6 Patch-Clamp-Messung an ausschließlich GFP-exprimierenden Kontrollprotoplasten von *N. benthamiana*. Nach Belichtung (blaue Pfeile, 473nm) für jeweils 100ms kam es nicht zu lichtinduzierten Einwärts-Strömen, wie sie bei Channelrhodopsin C128A- und C128T-exprimierenden Protoplasten beobachtet wurden (vgl. Abbildung 3.4, Abbildung 3.5). Bad: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ pH 5,6; Pip.: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ pH 7,6. Die Klemmspannung während der Lichtpulse betrug in diesem Fall -200mV.

Um die Eindeutigkeit der gemessenen Signale an Channelrhodopsin-2 C128X-exprimierenden Protoplasten weiter zu verdeutlichen, wurde die Eigenschaft dieser Varianten zu Nutze gemacht, sich durch die Belichtung mit grünem bzw. gelbem Licht ganz oder teilweise schließen zu lassen (unveröffentlichte Daten von Ronnie Gueta und G. Nagel, 2008; Berndt et al., 2009; Bamann et al., 2010). Um diesen Effekt an den Channelrhodopsin C128T::YFP-transfizierten Protoplasten zu zeigen, wurden alternierende Blau-Grün-Belichtungsmuster (2.5.5.2) generiert und die resultierende Stromantwort aufgezeichnet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Kanäle wiederholbar aktiv durch grünes Licht (532nm) teilweise zu schließen waren. (Grünes Licht ist jedoch, in der Lage die Mutante C128T sowohl zu schließen, als sie auch zu einem gewissen Teil zu aktivieren. Daher kommt es auch während der Belichtung mit grünem Licht zu geringen Einwärts-Strömen).

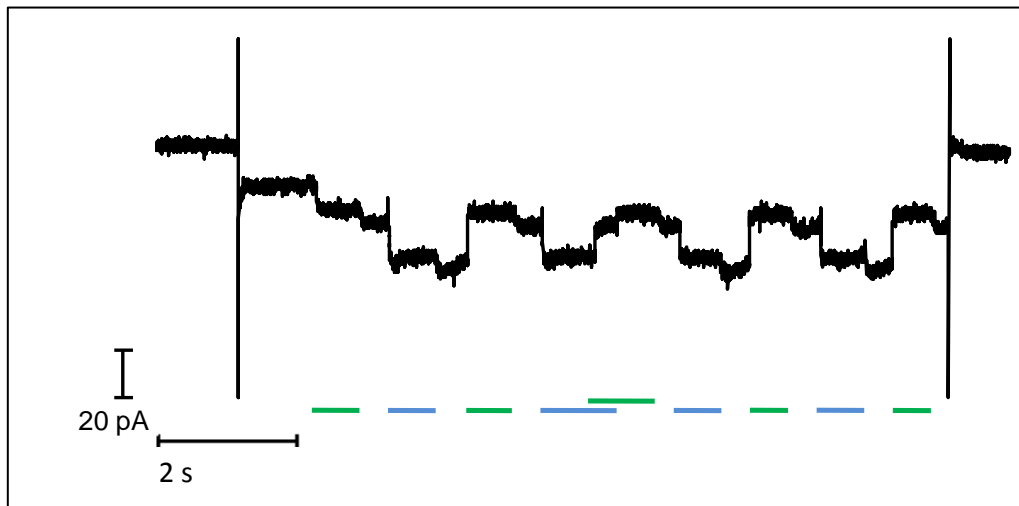


Abbildung 3.7 Patch-Clamp-Messung an einem epidermalen Protoplast von *N. benthamiana* welcher nach transients Transfektion Channelrhodopsin C128T::YFP exprimierte. Durch alternierende Grün- und Blaulichtpulse konnte der Stromverlauf über die Protoplastenmembran über die Lichtqualität gesteuert werden. Dies ist typisches Charakteristikum der verwendeten Mutanten und somit weiterer Beweis für die Spezifität. Lösungsbedingungen: Bad: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ pH 5,6; Pipette: 150mM TEA-Cl, 10mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ pH 7,6. Auch in diesem Fall wurden die Lichtpulse während einer Klemmspannung von -150mV appliziert.

Die beobachtete Stromantwort auf alternierende Blau-Grün-Belichtung ist weiterer Beweis dafür, dass es sich bei den beobachteten Strömen um Channelrhodopsin-Ströme handelt. Es kommt, von links nach rechts beschreibend, nach Belichtung mit grünem Licht (532nm) zunächst zu einem geringen, einwärtsgerichteten Protonenstrom, welcher deutlich zunimmt, sobald blaues Licht appliziert wird (Lichtqualität und Dauer sind durch Balken entsprechender Farbe und Länge dargestellt). Nach dem ersten Blaulichtpuls werden die Kanäle durch den darauffolgenden Grünlichtpuls teilweise geschlossen und der resultierende Strom entspricht dem Strom vor dem blauen Lichtpuls („Grün-Level“). Die leichte Zunahme des Einwärts-Stroms, die nach Ende sämtlicher Lichtpulse zu sehen ist, resultiert durch den Wegfall der gleichzeitig zur Aktivierung der Kanäle auftretenden Hemmung durch starkes Licht.

3.1.3 Funktion ohne die Zugabe von Retinal

Wie in 3.1.1.1 beschrieben, war die Expressionsstärke der verwendeten Channelrhodopsin-Varianten in Pflanzenzellen augenscheinlich unabhängig von der Verfügbarkeit von extern zugeführtem Retinal (Abbildung 3.2). Auch elektrophysiologisch wurden Zellen in Patch-Clamp-Messungen untersucht, welche die Channelrhodopsinvariante C128T entweder in Gegenwart von Retinal (100 μ M), oder vollständiger Abwesenheit von Retinal exprimierten. In der folgenden Abbildung sind die auf die Membrankapazität normierten Ströme dieser Messungen in Abhängigkeit des zugegebenen Retinals dargestellt. Die Zugabe von Retinal (100 μ M) erfolgte während des Protoplastierungsverdaus (2.2.6) über Nacht, sowie erneut etwa vier Stunden vor den jeweiligen Messungen zu den Protoplasten (s. 4.1.1).

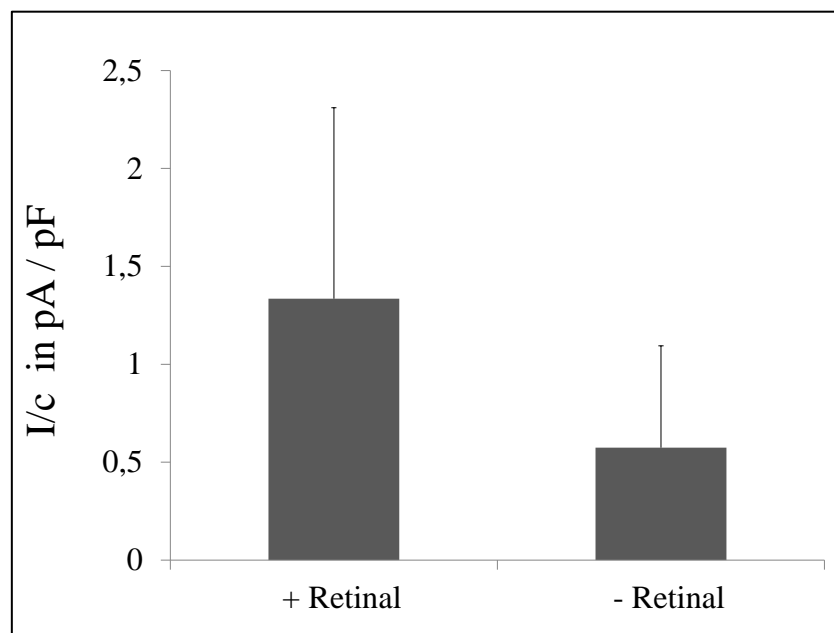


Abbildung 3.8 Darstellung der normierten Ströme sämtlicher Patch-Clamp-Messungen an Channelrhodopsin C128T::YFP exprimierenden, epidermalen Protoplasten von *N. benthamiana* in Abhängigkeit von extern zugeführtem Retinal. Die Zugabe von Retinal (100 μ M) führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der gemessenen Gesamtstromamplituden ($p=0,182$, Mann-Whitney U-Test). Auch ohne die Zugabe von Retinal konnten wiederholt lichtinduzierte Ströme gemessen werden. N (100 μ M Retinal) = 7; N (ohne Retinal) = 6.

Die Zugabe von Retinal (100 μ M) zu den Protoplasten führte nicht zu einer signifikanten Steigerung der gemessenen Channelrhodopsin-Ströme. Sowohl mit als auch ohne zusätzlich zugeführtem Retinal konnten lichtinduzierte Einwärts-Ströme gemessen werden (s. 4.1.2).

3.2 Transiente Expression lichtaktivierbarer Nucleotidcyclasen

3.2.1 Expression und Lokalisation der Fusionsproteine

bPAC::YFP und *bPGC::YFP* in Protoplasten von *A. thaliana*

3.2.1.1 *bPAC::YFP*

Zunächst wurde die lichtaktivierbare Adenylatcyclase *bPAC* (=BlaC, Ryu et al., 2010; Stierl et al., 2011; s. 1.3) nach C-terminaler Fusion mit YFP (2.10.2.1) transient in Protoplasten von *A. thaliana* transfiziert (Yoo et al., 2007; 2.4.4.4), um deren funktionelle Expression in Pflanzenzellen zu testen. Nach der Transfektion mit dem Konstrukt *bPAC::YFP/pSAT2191* (2.10.2.2) wurde die Expression des unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors exprimierten Proteins mindestens 16, maximal 48 Stunden gewährt. Die Protoplasten befanden sich während der Expression der Proteine bei Raumtemperatur in W-5-Lösung (6.4.2.7) und wurden bis zur Durchführung der jeweiligen Messungen lichtgeschützt in Pappschachteln aufbewahrt. Die folgende Aufnahme zeigt einen *bPAC::YFP*-exprimierenden Protoplasten in verschiedenen optischen Ebenen.

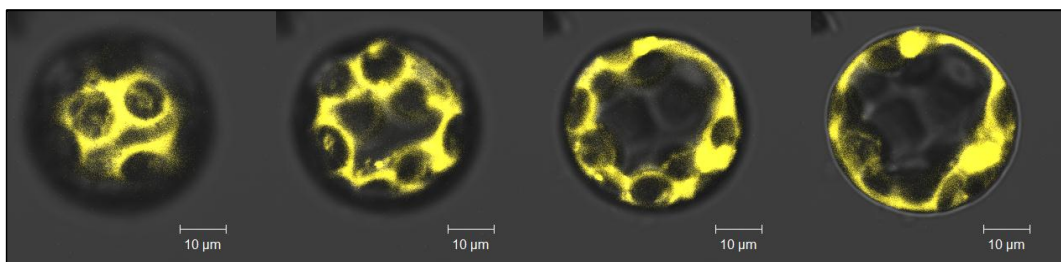


Abbildung 3.9 Starke Expression und cytoplasmatische Lokalisation der lichtaktivierten Adenylatcyclase *bPAC::YFP* nach transienter PEG-Transfektion (Yoo et al., 2007; 2.4.4.4) von *A. thaliana Col-0*-Protoplasten. Die gezeigten Aufnahmen wurden in verschiedenen optischen Ebenen eines Protoplasten (von links: Oberfläche, nach rechts: Äquatorialebene) gemacht, um die cytoplasmatische Expression des Proteins zu verdeutlichen.

Durch die transiente Protoplastentransfektion (Yoo et al., 2007) konnte eine maximale Transfektionseffizienz von etwa 80% erreicht werden. Diese Rate verbesserte sich deutlich, wenn die Protoplasten nach der Isolation (2.2.6) und vor der Transfektion (2.4.4.4) entweder mindestens eine Stunde auf Eis, besser aber über Nacht bei Raumtemperatur in W-5-Lösung (6.4.2.7) gehalten wurden, um sich vom Protoplastierungsverdau zu erholen (Abweichung vom Protokoll). In allen transfizierten Protoplasten war eine starke Expression des Proteins, sowie cytoplasmatische Lokalisation zu beobachten.

3.2.1.2 *bPGC::YFP*

Auch die auf der Basis von *bPAC::YFP* durch gezielte Mutationen generierte, lichtaktivierte Guanylatcyclase *bPGC::YFP* (=BlgC in Ryu et al., 2010, s. 2.10.3) wurde transient in Protoplasten von *A. thaliana* transfiziert, um die generelle Expression und Funktion in Pflanzenzellen zu testen, bevor mit der Generation der stabil transgenen Pflanzenlinie (2.4.4.1) begonnen wurde. Hierzu wurden die Protoplasten ebenfalls über PEG (Yoo et al., 2007; 2.4.4.4) transfiziert. Erwartungsgemäß konnte auch hier starke Expression und cytoplasmatische Lokalisation in Protoplasten gezeigt werden.

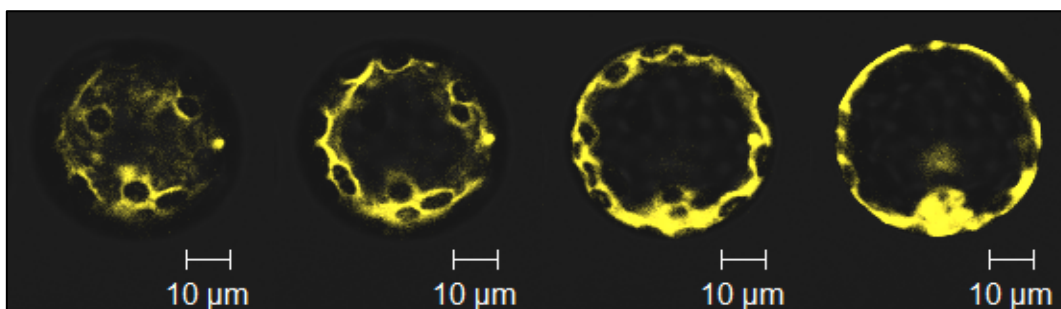


Abbildung 3.10 Expression von *bPGC::YFP* in Protoplasten von *A. thaliana* nach transienter Transfektion. Wie für das Protein *bPAC::YFP* zeigte sich auch für die daraus abgeleitete lichtaktivierte Guanylatcyclase *bPGC::YFP* (2.10.3) ebenfalls starke Expression und cytoplasmatische Lokalisation des Proteins (vgl. Abbildung 3.9). Auch hier wurden zur Verdeutlichung der cytoplasmatischen Lokalisation Aufnahmen in verschiedenen optischen Ebenen gemacht (von links: Oberfläche, nach rechts: Äquatorialebene des Protoplasten).

Die Expressionsstärke beider Nucleotidcyclasen war, gemessen an der Fluoreszenzintensität, in transient transfizierten Protoplasten miteinander vergleichbar. Die transiente Expression von *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* in Protoplasten führten zu keiner augenscheinlichen Veränderungen von Zellmorphologie oder -integrität.

Selbst Protoplasten, welche während der Expression bei Raumlicht in W-5-Lösung (6.4.2.7) gehalten wurden und anhand der beobachteten Fluoreszenz nachweislich *bPAC::YFP* exprimierten, zeigten nach 48 Stunden Raumlicht eine völlig unbeeinträchtigte Zellmorphologie.

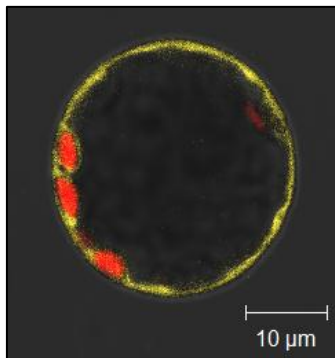


Abbildung 3.11 Dieser *bPAC::YFP*-exprimierende Protoplast von *A. thaliana* zeigte auch nach 48 Stunden Dauerlicht (weißes Raumlicht) in W-5-Lösung (6.4.2.7) eine unveränderte Morphologie zu nicht-transfizierten *A. thaliana* Col-0 Protoplasten.

Auch während der Belichtung der Protoplasten mit dem Laser des confocalen Mikroskops (2.8.1), welcher in seiner Wellenlänge (488nm) im Lichtaktivierungsbereich der *bPAC* lag, (350-520nm, Stierl et al., 2011) konnte kein schädigender Effekt durch die Aktivierung der Nucleotidcyclase *bPAC* auf die Zellen beobachtet werden.

3.2.2 Quantifikation cyclischer Nucleotide durch ELISA

3.2.2.1 *bPAC::YFP*

Um neben Expression und Lokalisation von *bPAC::YFP* auch deren biologische Aktivität als lichtaktivierte Adenylatcyclase in Pflanzenzellen zu zeigen, wurden ELISA-Messungen zur Quantifizierung der lichtinduzierten cAMP-Produktion durchgeführt (2.6.1). Die cAMP-Konzentrationsbestimmungen wurden etwa 24 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Die Expression der Proteine fand unter kompletter Dunkelheit und Raumtemperatur in W-5-Lösung (6.4.2.7) statt.

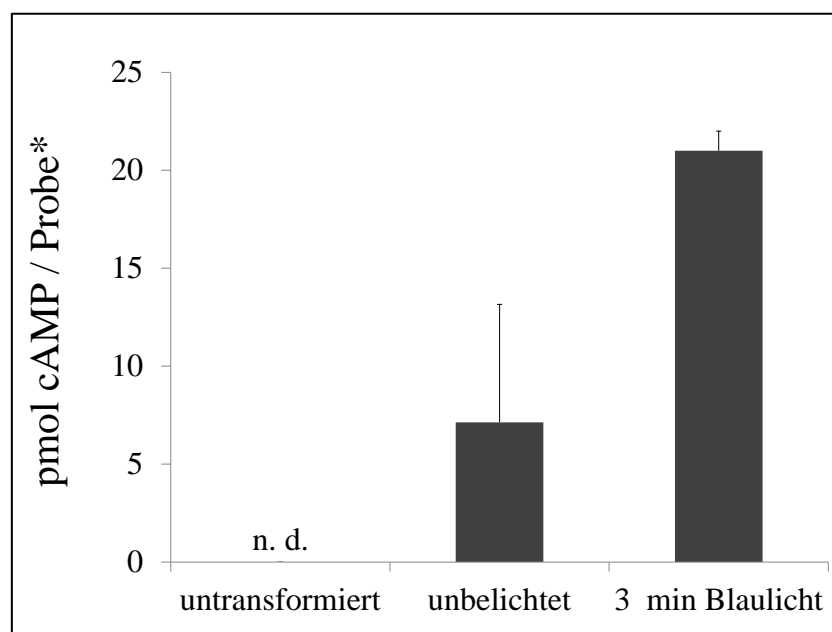


Abbildung 3.12 Lichtinduzierte cAMP-Produktion durch *bPAC::YFP* in transient transfizierten Protoplasten von *A. thaliana*. Für diese Messung befanden sich etwa $1,3$ bis $1,9 \cdot 10^5$ Protoplasten* in jeder Probe, wie vor den Messungen durch Auszählen in der Thomakammer bestimmt, bzw. eingestellt wurde. Die Transfektionseffizienz lag bei allen in diesen Messungen verwendeten Proben über fünfzig Prozent. Es ist eine deutliche Erhöhung der cAMP-Konzentration nach Belichtung mit blauem Licht (3min, 456nm) zu erkennen. In nicht-transfizierten, ebenfalls belichteten *A. thaliana Col-0* Kontroll-Protoplasten konnte keine im Messbereich des verwendeten ELISA Kits (2.6.1) liegende Konzentration an endogenem cAMP nachgewiesen werden. Auch unbelichtete, *bPAC::YFP*-exprimierende Proben zeigten eine erhöhte, durch die Dunkelaktivität der Cyclase hervorgerufene cAMP-Konzentration.

In transient *bPAC::YFP*-transfizierten *A. thaliana* Protoplasten konnte nach Belichtung mit blauem Licht für drei Minuten eine deutliche Erhöhung der cAMP-Konzentration nachgewiesen werden. Protoplasten, welche durchgängig in Dunkelheit gehalten wurden, zeigten ebenfalls eine erhöhte cAMP-Konzentration, welche durch die beschriebene Dunkelaktivität (Stierl et al., 2011) begründet ist.

In untransformierten Kontrollprotoplasten (*A. thaliana Col-0*), welche identisch behandelt und ebenfalls für drei Minuten mit blauem Licht belichtet wurden, konnte kein endogenes cAMP nachgewiesen werden.

3.2.2.2 *bPGC::YFP*

Auch die Funktion der lichtaktivierten Guanylatcyclase *bPGC::YFP* wurde zunächst nach transients Transfektion in Protoplasten von *A. thaliana* getestet. Die Expression der Proteine fand ebenfalls für 24 Stunden unter Dunkelheit in W-5-Lösung (6.4.2.7) statt.

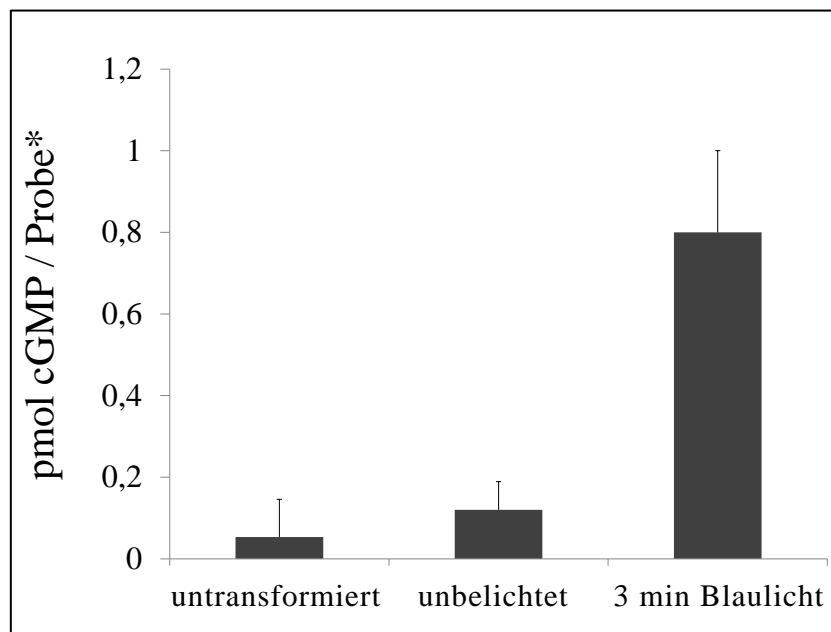


Abbildung 3.13 Lichtinduzierte Produktion von cGMP in transient *bPGC::YFP*-transfizierten *A. thaliana* Protoplasten. Die Zellzahl der für die Messung verwendeten Proben entsprach in allen Fällen ebenfalls etwa $1,3$ bis $1,9 \cdot 10^5$ Protoplasten* bei einer Transfektionseffizienz von mindestens 50%. Die gemessene endogene Konzentration an cGMP in untransfizierten, ebenfalls belichteten *A. thaliana Col-0* Protoplasten war an der Grenze des Messbereichs des verwendeten cGMP-ELISA Kits (2.6.1) und ist daher nicht als gesichert zu betrachten.

Die generelle Funktion der in der vorliegenden Arbeit generierten lichtaktivierbaren Guanylatcyclase *bPGC::YFP* (2.10.3) konnte somit ebenfalls nach transients Transfektion in Pflanzenzellen gezeigt werden. Nach Belichtung mit blauem Licht konnte eine deutliche Erhöhung der cGMP-Konzentration gegenüber unbelichteten Protoplasten gezeigt werden, jedoch zeigten auch unbelichtete Proben erhöhte cGMP-Werte. Dies ist durch die Dunkelaktivität der Guanylatcyclase begründet.

Die absolute, durch *bPGC::YFP* gebildete cGMP-Menge ist, verglichen mit der gebildeten cAMP-Menge durch *bPAC::YFP*, in den transient transformierten Protoplasten etwa um den Faktor 20 geringer. Die hier gezeigten Messungen dienen jedoch lediglich der Bestätigung von Expression und Funktion der jeweiligen Cyclase in Pflanzenzellen. Weitere Untersuchungen zum Auf- und Abbau cyclischer Nucleotide sowie zum Vergleich der jeweiligen spezifischen Umsatzraten von *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* fanden unter Verwendung der beiden generierten, stabil transgenen Pflanzenlinien statt (s. 3.4).

3.2.3 Umsatzraten von *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* in Oocyten

Um die beiden in dieser Arbeit generierten lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* bzw. *bPGC::YFP* prinzipiell in ihrer Umsatzrate bzw. Produktspezifität miteinander zu vergleichen, wurden diese in Oocyten von *X. laevis* (2.3.1) exprimiert und der Gehalt an generiertem cAMP bzw. cGMP nach Belichtung mittels ELISA (2.6.1) quantifiziert. Die Oocyten wurden entweder in Dunkelheit gehalten, um die jeweilige Dunkelaktivität zu bestimmen, oder für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet (2.9). Es wurde neben der produktspezifischen Aktivität der Nucleotidcyclasen auch deren unspezifische Aktivität durch Quantifizierung cyclischer Nucleotide bestimmt, also die cGMP-Produktion durch *bPAC::YFP* bzw. die cAMP-Produktion durch *bPGC::YFP*.

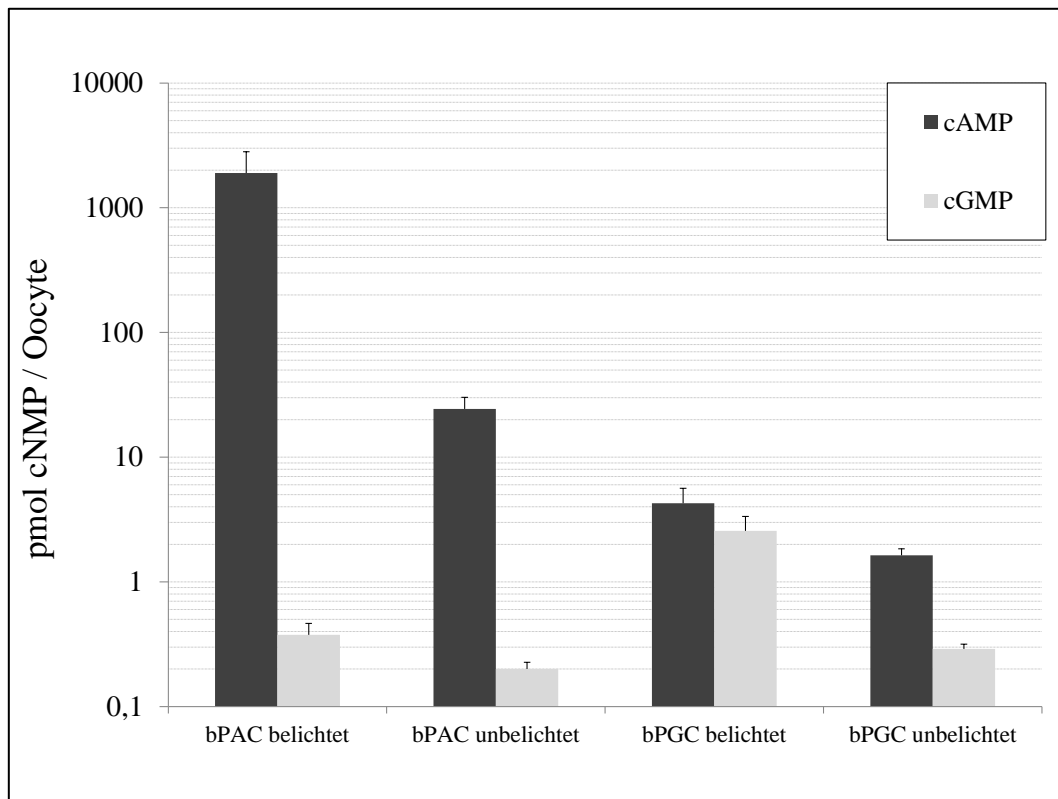


Abbildung 3.14 Bestimmung und Vergleich der enzymatischen cNMP-Bildung durch die Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* nach Expression in Oocyten von *X. laevis* (2.3.4). Die Aktivität beider Cyclasen wurde sowohl in unbelichteten, als auch in belichteten (10min, 456nm) Oocyten anhand der spezifischen und der unspezifischen cNMP-Produktion (reziproke Produktbildung) verglichen. Die Expression der Cyclasen (2.3.4) in den Oocyten fand nach der Injektion von jeweils 30ng RNA (2.3.3) für drei Tage bei 16°C statt.

Nach heterologer Expression von *bPAC::YFP* in Oocyten von *X. laevis* (2.3.1) und Aktivierung für zehn Minuten mit blauem Licht wurde eine etwa hundertfach höhere cAMP-Konzentration bestimmt, als in entsprechenden unbelichteten Oocyten. Weder nach Belichtung noch in Dunkelheit kam es zur nennenswerten cGMP-Bildung, was eine hohe Produktspezifität der Cyclase zeigt. Auch nach Belichtung *bPGC::YFP*-exprimierender Oocyten kam es zur deutlichen Erhöhung der cGMP-Konzentration im Vergleich zu unbelichteten Oocyten, jedoch handelte es sich hier nur um eine Konzentrationssteigerung um etwa den Faktor zehn. Weiterhin kam es zur lichtinduzierten unspezifischen Produktion von cAMP durch *bPGC::YFP*, diese nahm nach Belichtung etwa um den Faktor zwei zu.

Somit ist die Produktspezifität der generierten Guanylatcyclase deutlich geringer. Auch die produktspezifische Umsatzrate von *bPGC::YFP* (cGMP-Produktion) ist im Vergleich zur *bPAC* etwa um den Faktor tausend geringer.

3.3 Expression lichtaktivierter Nucleotidcyclasen in Pollen

3.3.1 Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum

In der vorliegenden Arbeit wurden Pollen von *Nicotiana SR-1* (2.2.2) mit den lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* transfiziert (2.4.4.5), um Auswirkungen eines erhöhten cAMP- bzw. cGMP-Gehaltes auf Physiologie oder Anatomie der Pollenkeimung, sowie mögliche Beeinflussungen des Pollenschlauchwachstums zu untersuchen. Für die Expression der beiden lichtaktivierten Nucleotidcyclasen in Pollen wurden diese zunächst unter die Kontrolle eines in Pollen hochaktiven Ubiquitin-Promotors (*Ubi*) gebracht, wofür sie über das USER-System (2.4.1.12) in den Vektor pUBQ-10 eingebracht wurden (2.10.2.4). Nach der ballistischen Transformation mittels PIG (2.4.4.5) wurden die Pollen über Nacht bei 4°C gehalten und am nächsten Morgen auf Raumtemperatur gebracht, was die Pollenkeimung und das Pollenschlauchwachstum induzierte. Die Keimung der Pollen und das Wachstum der Pollenschläuche fanden zum einen in lichtgeschützten Pappboxen, zum anderen unter Blaulicht statt. Auch bei Pollen, deren Pollenschlauchwachstum unter Blaulichteinfluss untersucht wurde, wurde die Keimung zunächst in Dunkelheit gewährt. Die Überführung der Proben in blaues Licht erfolgte in diesem Falle nach einer Stunde Keimungszeit in Dunkelheit. In der folgenden Abbildung sind Phänotypen transformierter Pollen gezeigt, welche entweder in Dunkelheit oder unter Blaulicht keimten und Pollenschläuche ausbildeten. Es handelt sich bei allen gezeigten Aufnahmen um für den jeweiligen Phänotyp repräsentative Pollen. Insgesamt wurden je Keimungsbedingung (Licht oder Dunkelheit) bzw. untersuchter Cyclase mindestens 15 Aufnahmen von wachsenden Pollenschläuchen gemacht, welche die entsprechenden Phänotypen zeigen und dokumentieren.

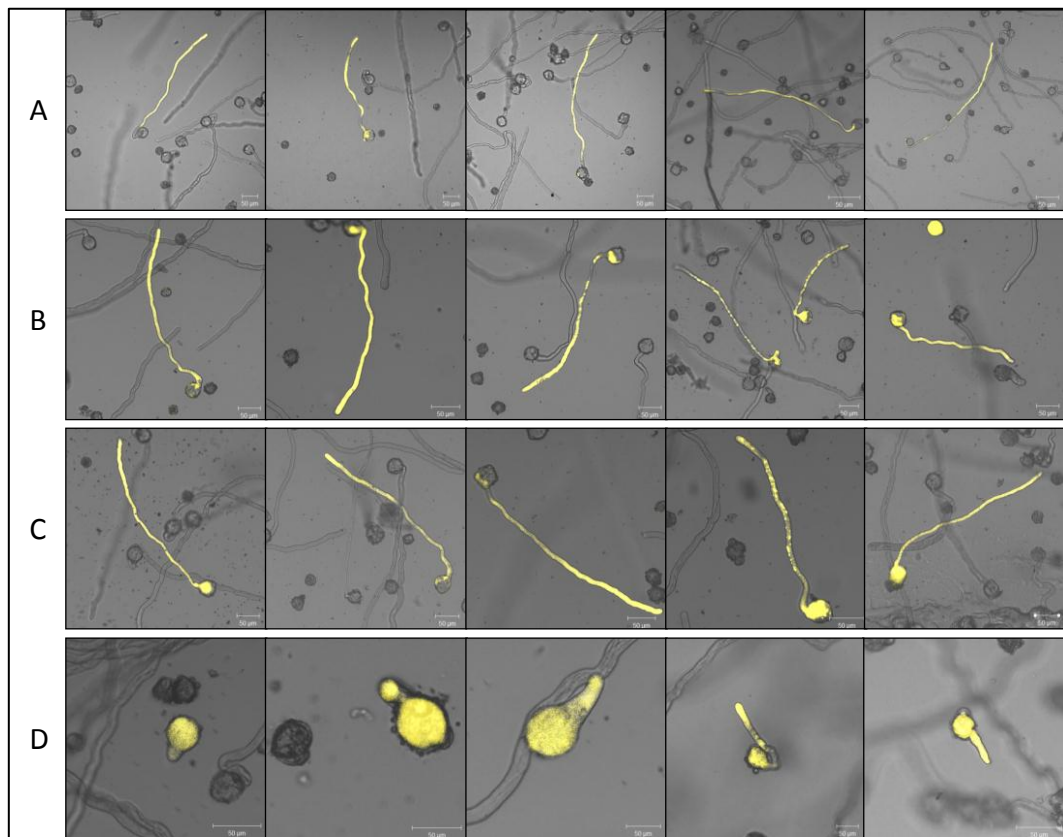


Abbildung 3.15 Phänotypie von wachsenden Pollenschläuchen der mit den lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* bzw. *bPGC::YFP* transfizierten Pollen von *N. SR-1*. **A:** Pollen nach Expression der *bPGC::YFP*. Keimung und Wachstum der Pollenschläuche fanden in kompletter Dunkelheit statt. **B:** Pollen der gleichen Transfektions-Charge. Die Keimung fand in diesem Fall (nach zunächst einer Stunde Dunkelheit) unter andauernder Belichtung mit blauem Licht (456nm) statt. Die Aktivierung von *bPGC::YFP* führte zu keiner Einschränkung des Pollenschlauchwachstums (vgl. A). **C:** Pollen nach der Expression von *bPAC::YFP* und Wachstum in völliger Dunkelheit. **D:** Pollen der gleichen Transfektions-Charge keimten ebenfalls für eine Stunde in Dunkelheit, wurden aber im Wachstum des Pollenschlauches gehemmt, sobald sie blauem Licht exponiert wurden (vgl. C). Die Aktivierung von *bPAC::YFP* durch Blaulicht führte zum absoluten Stillstand des Pollenschlauchwachstums ab dem Zeitpunkt der Lichtexposition. Alle hier gezeigten Aufnahmen wurden fünf bis sechs Stunden nach der Pollenkeimung unter den genannten Bedingungen gemacht.

Pollen, welche nach transienter Transfektion (2.4.4.5) die lichtaktivierte Guanylatcyclase *bPGC::YFP* exprimierten, zeigten sowohl in Dunkelheit als auch unter Blaulicht völlig unbeeinträchtigte Phänotypie bei der Pollenkeimung und dem Pollenschlauchwachstum. In diesem Fall war kein Unterschied zu untransfizierten Pollen (im gleichen Bildausschnitt, keine Fluoreszenz) festzustellen.

Auch die Keimung *bPAC::YFP*-transfizierter Pollen erfolgte zunächst in Dunkelheit. Unter diesen Bedingungen verliefen Pollenkeimung und Wachstum der Pollenschläuche ebenfalls ohne Beeinträchtigung. In einem parallel durchgeführten Ansatz wurden die Pollen nach einer Stunde Dunkelheit (für die Pollenkeimung) blauem Licht exponiert. In diesem Fall stoppte das Wachstum des Pollenschlauches, sobald die Pollen ins Licht überführt wurden. Folgend ist eine tabellarische Übersicht der gemessenen Längen der Pollenschläuche nach einer Wachstumsdauer von fünf bis sechs Stunden nach der Pollenkeimung gegeben.

Tabelle 3.1 Längenverteilung des Pollenschlauchwachstums von *bPAC::YFP*- bzw. *bPGC::YFP*-exprimierenden *Nicotiana SR-1* Pollen nach fünf bis sechs Stunden Wachstum bei Raumtemperatur.

<i>bPAC</i> (im Dunkeln gewachsen)	328,7µm (±86,0µm)
<i>bPAC</i> (nach 1h Dunkelheit im Licht)	49,1µm (±54,8µm)
<i>bPGC</i> (im Licht gewachsen)	322,0µm (±105,7µm)

3.4 Stabil transgene *A. thaliana* Pflanzen

3.4.1 Induzierbare Expression lichtaktivierbarer Nucleotidcyclasen

Nach vorangegangenen Messungen an transient transformierten Protoplasten zur Bestätigung von Expression und Funktion der beiden lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* (3.2), wurden zwei stabil transgene Pflanzenlinien erstellt, welche die lichtaktivierbaren Nucleotidcyclasen unter der Kontrolle eines östrogeninduzierbaren Glucocorticoidpromotors (Zuo et al., 2000) exprimieren. Durch die Verwendung dieses induzierbaren Promotorsystems sollte eine Anzucht der Pflanzen unter normalen Wachstumsbedingungen und ohne vorzeitige Lichtaktivierung der jeweiligen Nucleotidcyclasen ermöglicht werden.

Neben der jeweiligen lichtaktivierten Nucleotidcyclase exprimieren diese Pflanzen weiterhin das Calciumreporterprotein Aequorin unter der Kontrolle des in Pflanzen konstitutiv aktiven 35S-CaMV-Promotors. Diese *A. thaliana Col-0* Aequorin Pflanzen, auf denen die Zweit-Transfektion durchgeführt wurde, wurden vor dem Zeitraum dieser Arbeit von Dr. Petra Dietrich (nach Knight et al., 1991) erstellt und über mehrere Generationen selektioniert. In Abwesenheit von Östrogen zeigten die Pflanzen beider generierten transgenen Linien völlig unveränderte Phänotypie im Vergleich zu Pflanzen vor der Transfektion (*A. thaliana Col-0* Aequorin) sowie *A. thaliana Col-0* Wildtyp Pflanzen. Auch nach Induktion der Expression an der Pflanze kam es nicht zu histologischen oder physiologischen Veränderungen in bzw. an den Blättern. Die Induktion der Proteinexpression wurde durch ab- und adaxiales Benetzen der Blätter mit Östrogenlösung (10 μ M) erreicht und fluoreszenzmikroskopisch (2.8) bestätigt. Um die Benetzung der hydrophoben Blattoberfläche zu verbessern, wurde der wässrigen Östrogenlösung 0,25% Glucopon zugefügt.

Dieses biologisch-abbaubare Alkylpolyglycosid verbesserte die Benetzungseigenschaften der Lösung deutlich, ohne den Blättern zu schaden. Die zunächst verwendeten Detergenzien Tween-20, Triton-X sowie handelsübliche Schmierseife führten in vergleichbarer Konzentration bei wiederholter Benetzung zur deutlichen Schädigung der Blätter. Die Blätter der gezeigten Kontrollpflanzen wurden ebenfalls mit der entsprechenden Lösung benetzt, um direkte Auswirkungen von Östrogen, Glucopon, oder mechanischer Einwirkungen auf die Pflanzenintegrität auszuschließen. In der folgenden Abbildung sind exemplarisch Pflanzen gezeigt, welche die lichtaktivierte Adenylatcyclase *bPAC::YFP* stabil exprimierten. Die Induktion der Expression in Blättern dieser Pflanzen fand durch wiederholte Benetzung mit Östrogenlösung (10 μ M) über 48 Stunden statt. Während dieser Zeit standen die Pflanzen unter weißem Licht.

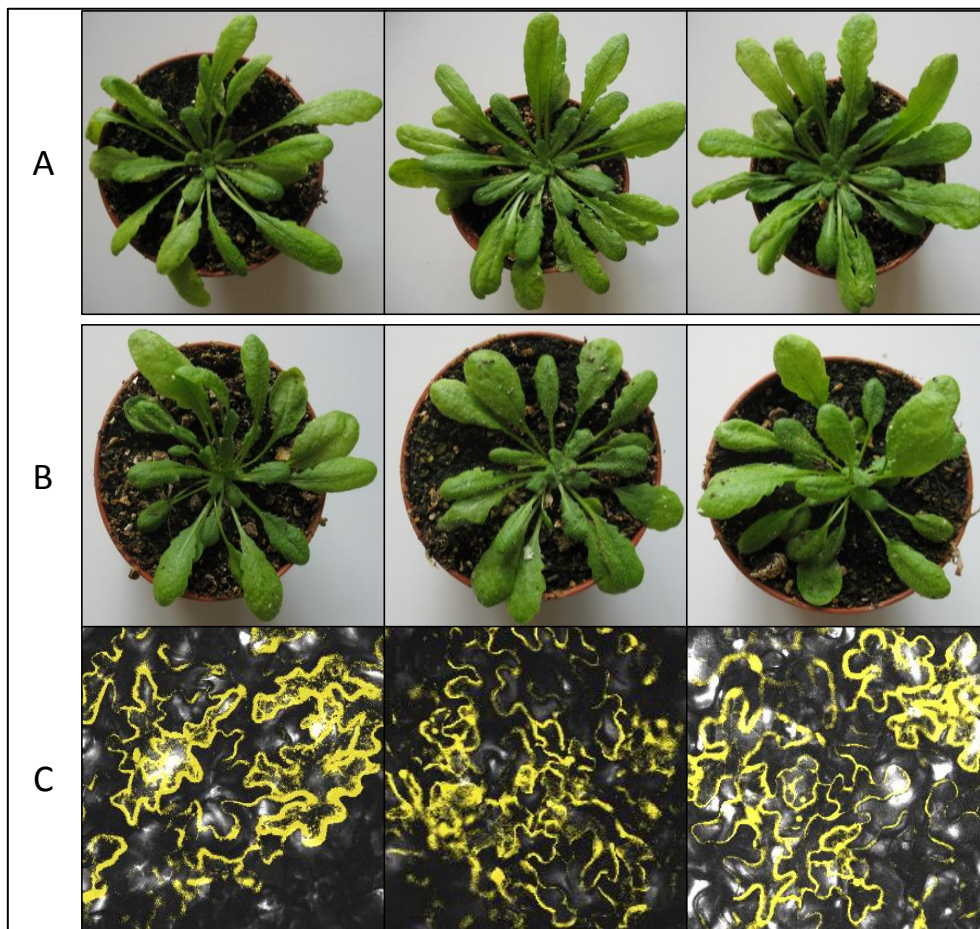


Abbildung 3.16 Phänotypen der Pflanzenlinie *bPAC::YFP* nach Induktion der Proteinexpression. **A:** Kontrollpflanzen *A. thaliana Col-0-Aequorin*. **B:** Stabil transgene Pflanzen nach der Expressionsinduktion von *bPAC::YFP* durch Benetzen der Blätter mit Östrogenlösung (10µM) nach 48 Stunden. **C:** Die Expression des Proteins in den Blättern dieser Pflanzen wurde (ebenfalls nach 48 Stunden) fluoreszenzmikroskopisch bestätigt. Die gezeigten Pflanzen waren etwa sechs Wochen alt.

Die in Abbildung 3.16 gezeigten Pflanzen standen während der Induktion der Proteinexpression durchgehend (8-18Uhr) im Licht. Es konnte keine Veränderung in der Blattmorphologie nach Aktivierung der Adenylatcyclase durch Licht beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.11). Die erfolgreiche Expressionsinduktion von *bPAC::YFP* nach Benetzen der Blätter dieser Pflanzen mit östrogenhaltiger Lösung (10µM) konnte fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden.

Auch Pflanzen der transgenen Linie, welche nach der Induktion der Proteinexpression durch Östrogen ($10\mu\text{M}$) die lichtaktivierte Guanylatcyclase *bPGC::YFP* exprimierten, zeigten keine auffällige Phänotypie beim Wachstum im Licht. Die Expression der Guanylatcyclase nach wiederholtem Benetzen der Blätter mit Östrogenlösung ($10\mu\text{M}$, s.o.) fand ebenfalls für 48 Stunden statt. Während dieser Zeit standen die Pflanzen von 8-18 Uhr unter weißem Licht (2.2.3).

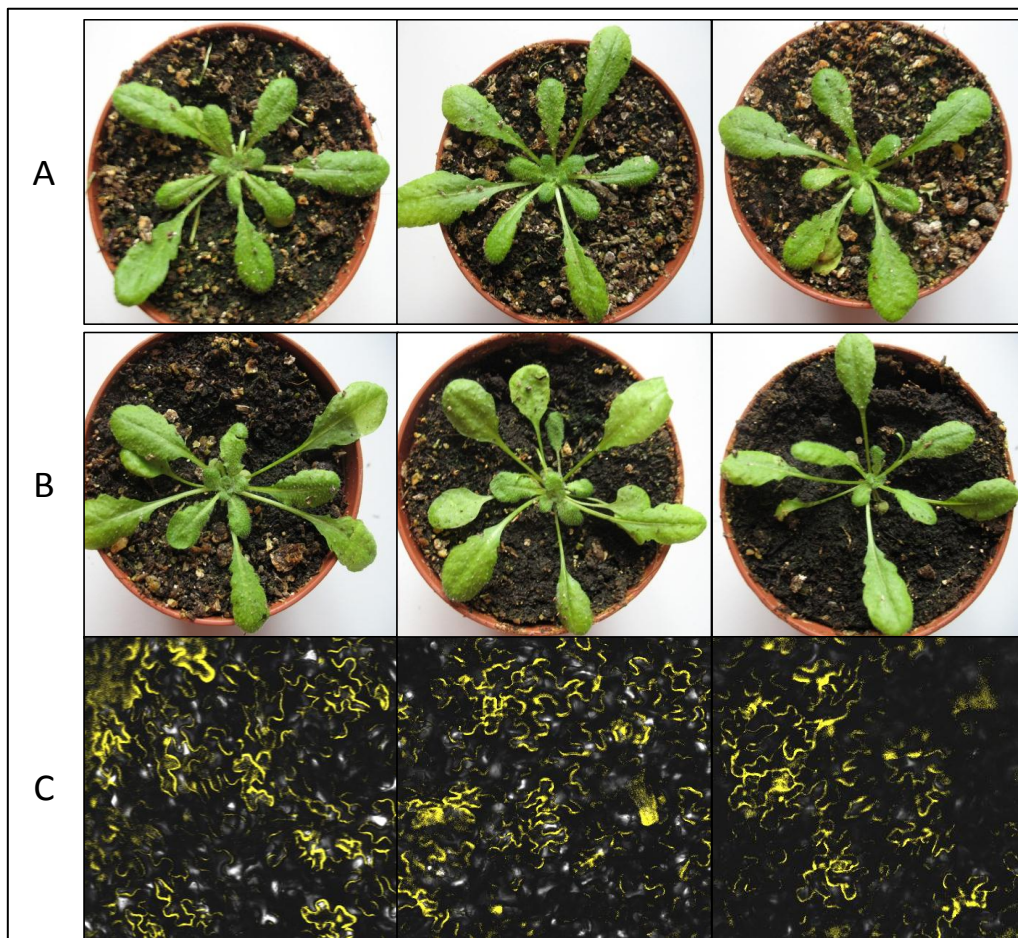


Abbildung 3.17 Phänotypen der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPGC::YFP* nach Induktion der Proteinexpression. **A:** Kontrollpflanzen *A. thaliana Col-0* Aequorin. **B:** Bei den transgenen Pflanzen *bPGC::YFP* zeigte sich auch 48 Stunden nach der Expressionsinduktion der lichtaktivierten Guanylatcyclase durch Benetzen der Blätter mit Östrogen ($10\mu\text{M}$) keine Auswirkung auf den Phänotyp **C:** Die Expression des Proteins in den Blättern der transgenen Pflanzen wurde (ebenfalls 48 Stunden nach der Induktion) fluoreszenzmikroskopisch bestätigt. Die gezeigten Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Aufnahme etwa fünf Wochen alt.

Ein weiterer Versuch die Proteinexpression in den transgenen Pflanzen systemisch zu induzieren wurde unternommen, indem Östrogen in verschiedenen Konzentrationen zum Gießwasser zugegeben wurde. Hierzu wurden die Keimlinge im Alter von etwa zwei Wochen auf Vermiculit (2.2.4) pikiert und mit Gießwasser unterschiedlicher Östrogenkonzentrationen (10 μ M, 100 μ M, 1mM) gegossen. Es kam zur Induktion der *bPAC::YFP*-Expression in der Wurzel, wie durch Fluoreszenzaufnahmen gezeigt werden konnte, jedoch blieb die Induktion in anderen Organen dieser Pflanzen aus. Auch der Versuch, eine Expressionsinduktion in Zellen abgeschnittener Blätter über den Transpirationssog zu erreichen, nachdem diese mit der Schnittfläche in östrogenhaltiges Wasser gestellt wurden, führte ausschließlich zur Induktion der direkt im Kontakt zum Östrogen stehenden Blattregionen. Die folgende Abbildung zeigt die Expression von *bPAC::YFP* in Wurzeln der stabil transgenen Linie *bPAC::YFP* nach Gießen mit östrogenhaltigem Wasser (100 μ M).

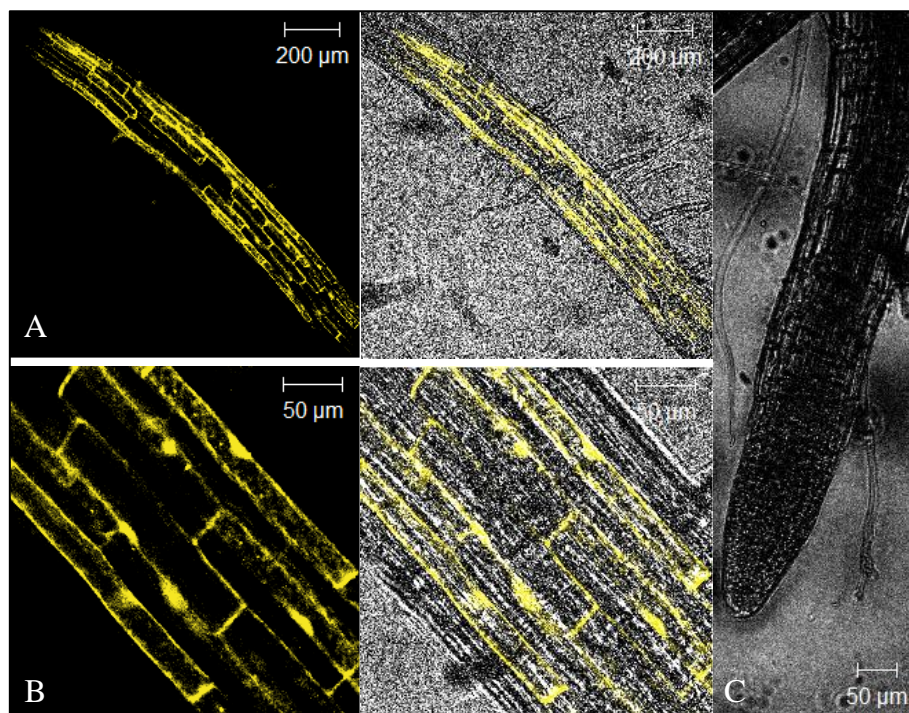


Abbildung 3.18 Starke Fluoreszenz und damit Proteinexpression war in Wurzeln von Pflanzen der transgenen Linie *bPAC::YFP* zu beobachten, welche mit östrogenhaltigem Gießwasser (100 μ M) gegossen wurden. **A:** Übersicht der *bPAC::YFP*-Expression in der Wurzel nach 48 Stunden. **B:** Eine Nahaufnahme derselben Wurzel zeigt die starke cytoplasmatische Expression von *bPAC::YFP* in Wurzelzellen. **C:** Nicht-induzierte Kontrollwurzel einer *bPAC::YFP*-Pflanze.

Da die Expression von *bPAC::YFP* zwar in Wurzeln durch Gießen mit östrogenhaltigem Wasser induziert werden konnte, Fluoreszenz aber in anderen Pflanzenteilen ausblieb, kann davon ausgegangen werden, dass das Östrogen nicht oder nur sehr schlecht innerhalb der Pflanze funktional transportiert werden kann. Somit ist keine systemische Expressionsinduktion der stabilen Pflanzenlinien durch die Zugabe von Östrogen zum Gießwasser möglich.

Pflanzen, welche *bPAC::YFP* in der Wurzel exprimierten, zeigten ebenfalls keinen auffälligen Phänotyp. Dies ist aber auch bei Expression einer lichtaktivierten Nucleotidcyclase in unterirdischen Pflanzenteilen nicht zu erwarten, sieht man von einer geringen Dunkelaktivität der *bPAC* ab.

Die beste Induktion der Proteinexpression (gemessen an der stärksten und flächendeckenden Fluoreszenz) wurde erreicht, indem Blätter der transgenen Pflanzen mit einer scharfen Rasierklinge in etwa $0,5\text{cm}^2$ große Stücke geschnitten und komplett in östrogenhaltiges Wasser ($10\mu\text{M}$) eingelegt wurden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich die Blattstücke vollständig unter Wasser befanden. Bereits nach etwa 16 Stunden konnte Fluoreszenz in einzelnen Zellen beobachtet werden, jedoch nahmen die Stärke der Expression, sowie die Gesamtzahl der fluoreszierenden Zellen mit zunehmender Zeit deutlich zu.

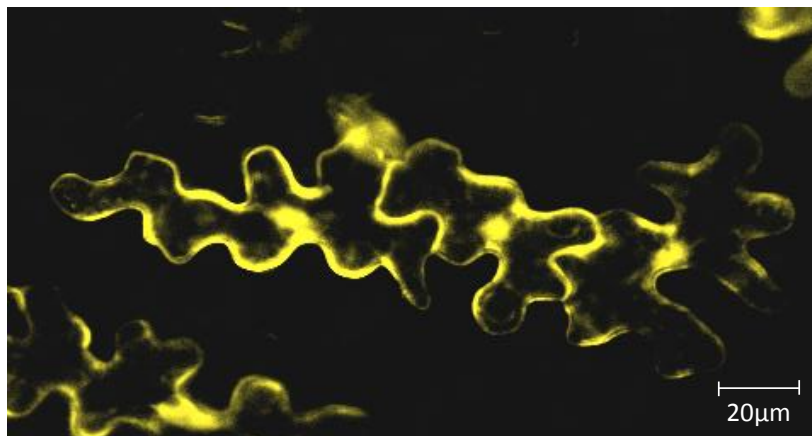


Abbildung 3.19 Induktion der Expression in epidermalen Zellen der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP*. Die gezeigte Aufnahme erfolgte etwa 24 Stunden nach der Induktion durch Einlegen der Blattscheiben in östrogenhaltiges Leitungswasser ($10\mu\text{M}$). Gut zu erkennen ist auch hier die cytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins (vgl. Abbildung 3.9) in drei aneinandergrenzenden, stark exprimierenden Epidermiszellen.

Die stärkste Expression der Nucleotidcyclasen war etwa 48 Stunden nach Beginn der Induktion (durch die Zugabe von 10µM Östrogen zu den in Wasser eingelegten Blattstücken) zu beobachten, weshalb sämtliche Messungen zur Quantifizierung des lichtinduziert erhöhten cAMP- bzw. cGMP-Gehaltes (3.4.2, 3.4.3) nach dieser Expressionsdauer durchgeführt wurden.

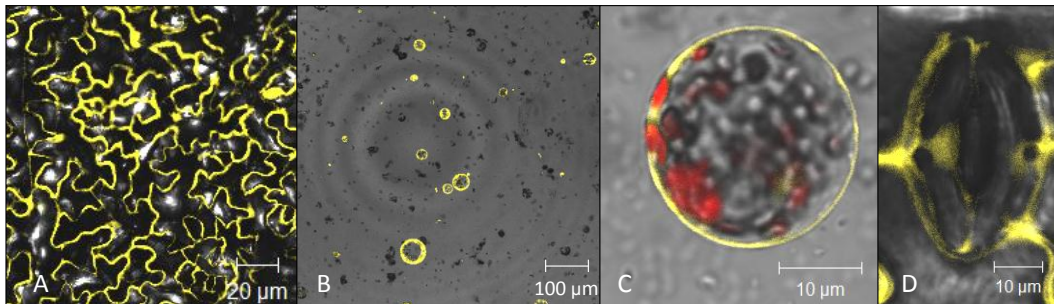


Abbildung 3.20 Zellen der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP* nach Induktion der Proteinexpression durch Östrogen (10µM). **A:** In epidermalen Zellen war nach 48 Stunden eine nahezu flächendeckende, starke Expression in fast allen Zellen zu sehen. **B:** Auch nach enzymatischer Protoplastierung konnte die Proteinexpression in nahezu allen Protoplasten, und damit auch in Zellen tieferliegender Gewebeschichten, nachgewiesen werden. **C:** Mesophyllprotoplast zur Verdeutlichung der cytoplasmatischen Expression des Proteins (Chloroplasten sind hier im Zweitkanal rot eingefärbt). **D:** Auch in Schließzellen konnte die Induktion der Expression von *bPAC::YFP* gezeigt werden.

Nach einer Expressionsdauer von etwa 48 Stunden konnte eine nahezu vollständige Expressionsinduktion in Blattscheiben der Pflanzenlinie *bPAC::YFP* erreicht werden. In Fluoreszenzaufnahmen der Epidermis zeigte sich eine fast flächendeckende Expression in nahezu allen Zellen. Auch nach dem Protoplastierungsverdau, welcher durchgeführt wurde um die Induktion in Zellen aus tieferliegenden Gewebeschichten zu zeigen, wurde die Expression in nahezu allen Protoplasten induziert. Die Expression des Proteins *bPAC::YFP* konnte auch in Schließzellen der transgenen Pflanzen induziert werden.

3.4.2 Lichtinduzierte cAMP-Produktion

Zur Quantifikation des durch die jeweiligen Cyclasen synthetisierten cAMP- bzw. cGMP-Gehaltes in beiden stabil transgenen Pflanzenlinien wurden ELISA Messungen (2.6.1) an induzierten Blattscheiben nach jeweils 48 Stunden Expressionsdauer durchgeführt.

3.4.2.1 Östrogenabhängige Expression

Zunächst wurde die Induzierbarkeit der Proteinexpression anhand des gebildeten Produktes cAMP in Abhängigkeit von der vorliegenden Konzentration des Induktors Östrogen untersucht. Hierfür wurde die Proteinexpression in Blattproben durch unterschiedliche Östrogenkonzentrationen (0, 10nM, 100nM, 1µM und 10µM) induziert und der jeweilige cAMP-Gehalt nach einer Expressionsdauer von 48 Stunden bestimmt (2.6.1). Es wurden sowohl belichtete, als auch unbelichtete Proben entnommen, um die Licht- und Dunkelaktivität der *bPAC::YFP* bei der jeweilig vorliegenden Östrogenkonzentration zu vergleichen.

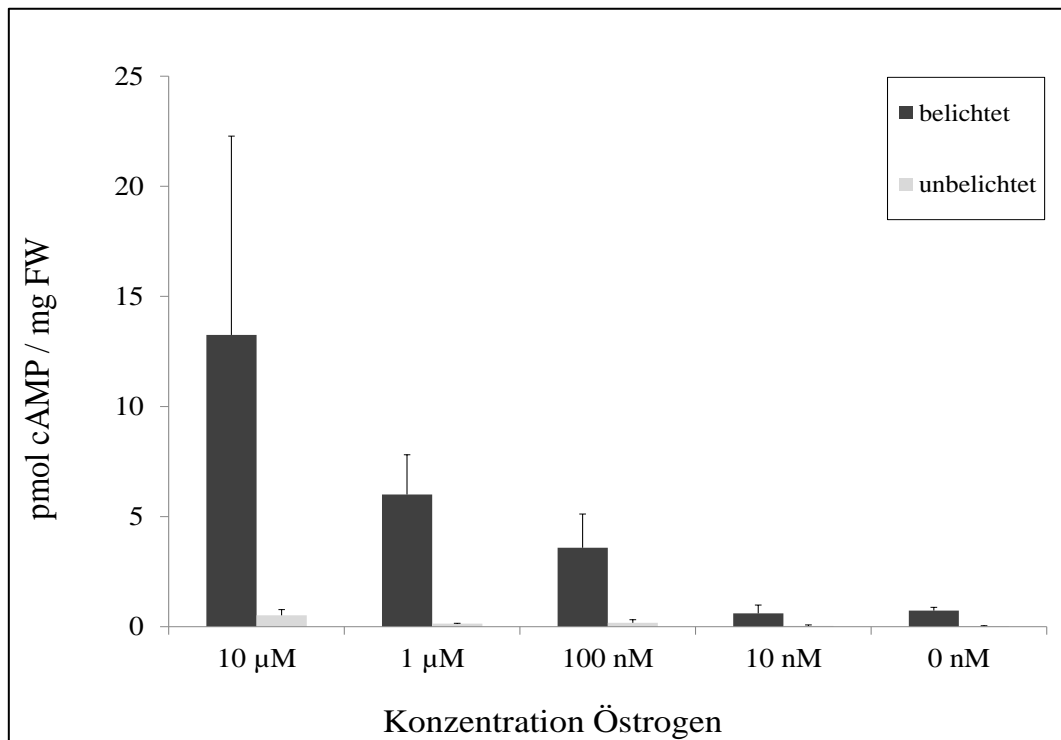


Abbildung 3.21 Die cAMP-Produktion und damit das Expressionslevel der lichtaktivierten Adenylatcyclase *bPAC::YFP* in den stabil transgenen Pflanzenlinien korrelierte positiv mit der vorliegenden Konzentration des Induktors Östrogen. Die Proben wurden nach der Expressionsinduktion durch 0, 10nM, 100nM, 1µM und 10µM Östrogen entweder für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet (456nm, dunkle Balken), oder in kompletter Dunkelheit (helle Balken) gehalten. Anschließend wurde der jeweilige cAMP-Gehalt der Blattproben mittels ELISA (2.6.1) bestimmt.

Durch die Quantifizierung des Umsatzproduktes cAMP in Blattproben der stabil transgenen Pflanzen konnte die östrogenabhängige Expression und Aktivität der Adenylatcyclase *bPAC::YFP* gezeigt werden. Sowohl belichtete (dunkle Balken), als auch in Dunkelheit gehaltene Blattproben (helle Balken) zeigten eine mit der vorliegenden Östrogenkonzentration korrelierende cAMP-Produktionsrate und damit Adenylatcyclaseaktivität. Es konnte beobachtet werden, dass auch nicht-induzierte Blattproben nach Belichtung eine geringe Menge cAMP bildeten. Diese entsprach etwa der Menge nach maximaler Induktion (10µM) in Dunkelheit (s. 4.3.1).

3.4.2.2 Abhängigkeit der cAMP-Produktion von der Belichtungsdauer

Um die cAMP-Produktion in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer der *bPAC::YFP* in Pflanzenzellen zu bestimmen, wurden Blattproben nach 48 Stunden Expression für unterschiedliche Dauer mit blauem Licht belichtet und anschließend der Gehalt des gebildeten cAMP mittels ELISA bestimmt (2.6.1).

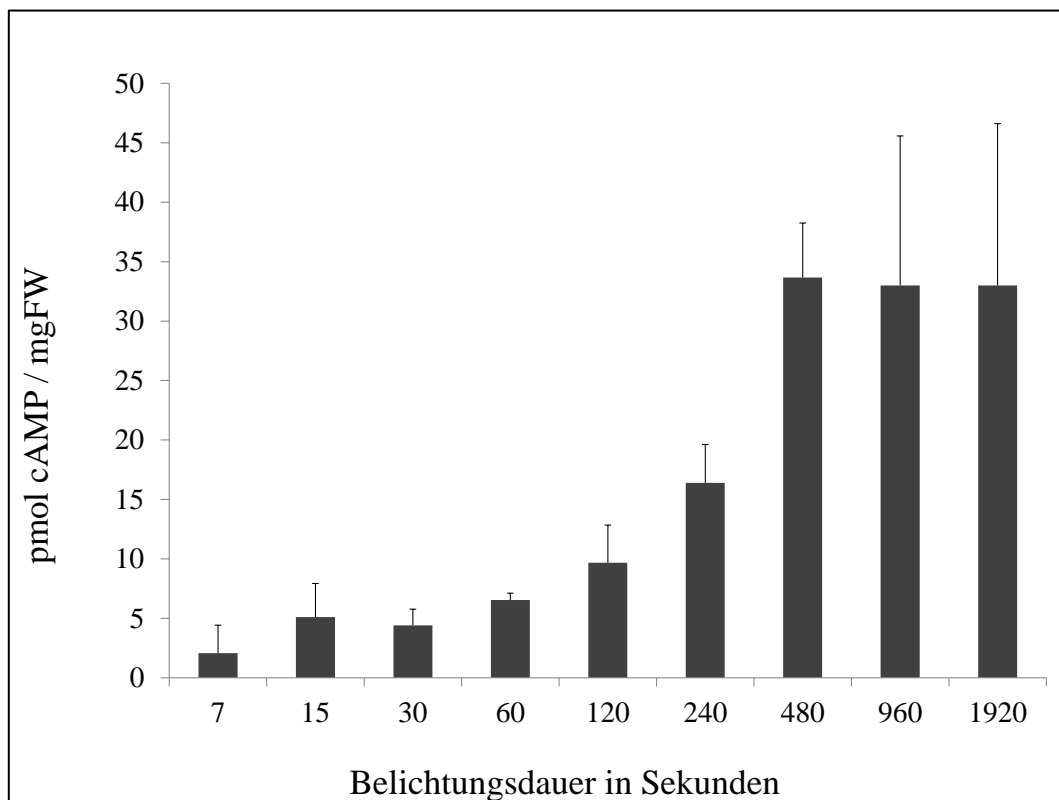


Abbildung 3.22 Abhängigkeit der cAMP-Produktion von der absoluten Belichtungsdauer der *bPAC::YFP* in Pflanzenzellen. Die Blattproben wurden für die angegebene Dauer mit blauem Licht (456nm) belichtet und der cAMP-Gehalt anschließend mittels ELISA (2.6.1) quantifiziert. Die Produktion von cAMP korrelierte zunächst positiv mit der Belichtungsdauer. Eine länger als acht Minuten anhaltende Belichtung führte nicht zum weiteren Anstieg der cAMP-Produktion.

Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von cAMP durch *bPAC::YFP* in den transgenen Pflanzenlinien mit zunehmender Belichtungsdauer anstieg. Eine länger als acht Minuten andauernde Belichtung führte jedoch nicht zum weiteren Anstieg der cAMP-Konzentration, womit sich eine vorübergehende Sättigung der cAMP-Produktion darstellt (s. 4.3.1).

3.4.2.3 Degradation von cAMP

Um die Geschwindigkeit des Abbaus des gebildeten cAMPs in den transgenen Pflanzenlinien zu untersuchen, wurden alle Proben zunächst für zehn Minuten mit blauem Licht (456nm) belichtet und der cAMP-Gehalt anschließend in definierten Zeitabständen nach der Belichtung über ELISA bestimmt (2.6.1). Die Blätter dieser Proben befanden sich nach der Blaulicht-Aktivierung bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme in Dunkelheit bzw. unter rotem Raumlicht.

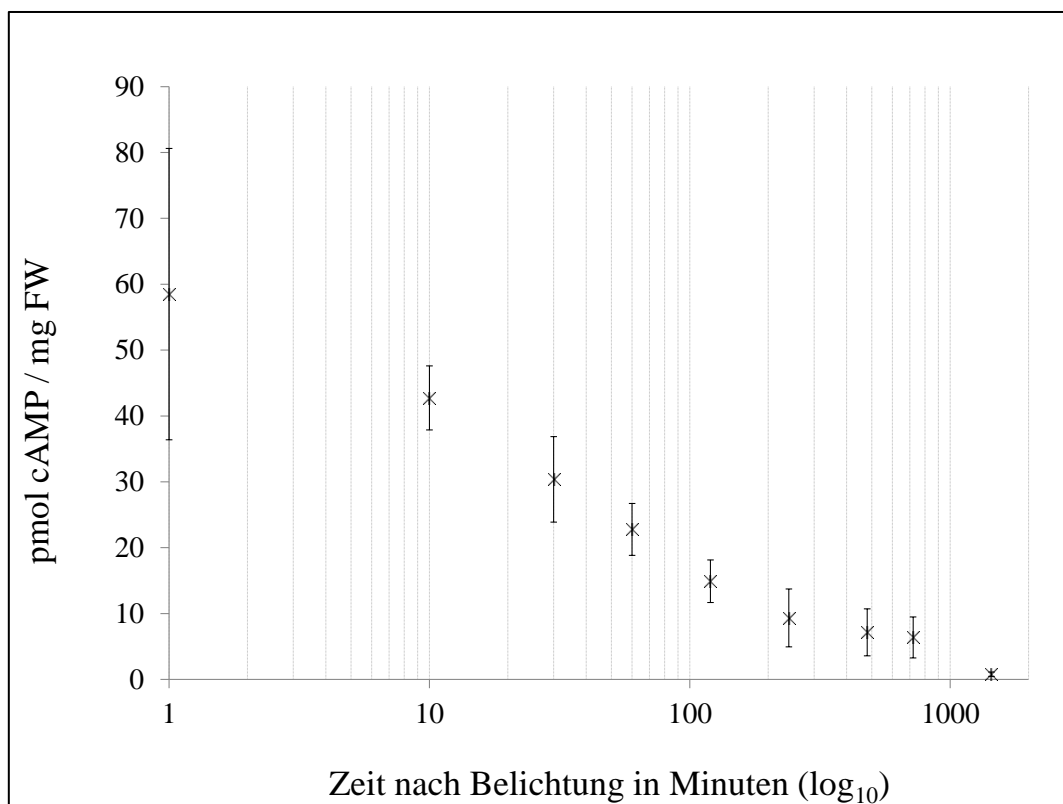


Abbildung 3.23 cAMP-Abbau in Blattproben der stabil transgenen Pflanzenlinie nach Aktivierung von *bPAC::YFP* durch blaues Licht für zehn Minuten. Bereits eine halbe Stunde nach der Belichtung war die cAMP-Konzentration in den Blättern etwa auf die Hälfte reduziert. Nach etwa 24 Stunden war die Konzentration an cAMP etwa auf dem Niveau unbelichteter Proben angelangt (vgl. Abbildung 3.21, 48h Induktion 10 μ M, cAMP-Gehalt der Dunkelprobe).

Bei den Messungen zur cAMP-Abbaugeschwindigkeit in zuvor belichteten Blattproben zeigte sich eine relativ schnelle Degradation von cAMP. Bereits nach einer halben Stunde wurde eine anfänglich vergleichsweise hohe cAMP-Konzentration von fast 60pmol/mg FW auf etwa die Hälfte reduziert. Nach 24 Stunden war der cAMP-Gehalt etwa vergleichbar mit jenem unbelichteter Blattproben (vgl. Abbildung 3.21).

3.4.2.4 Akkumulation von cAMP

Um die maximal mögliche Akkumulation von cAMP in den Blattproben der Pflanzenlinie *bPAC::YFP* zu bestimmen, wurden nach 24, 48 und 72 Stunden Proben entnommen, welche nach der Induktion durch Östrogen (10µM) entweder in kompletter Dunkelheit gehalten wurden, ausschließlich für zehn Minuten mit Blaulicht belichtet wurden, oder während der gesamten Zeit durchgängig unter weißem Dauerlicht standen und zudem direkt vor der Probennahme für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet wurden. Der cAMP-Gehalt dieser Proben wurde dann zu den jeweiligen Messzeitpunkten mittels ELISA (2.6.1) bestimmt.

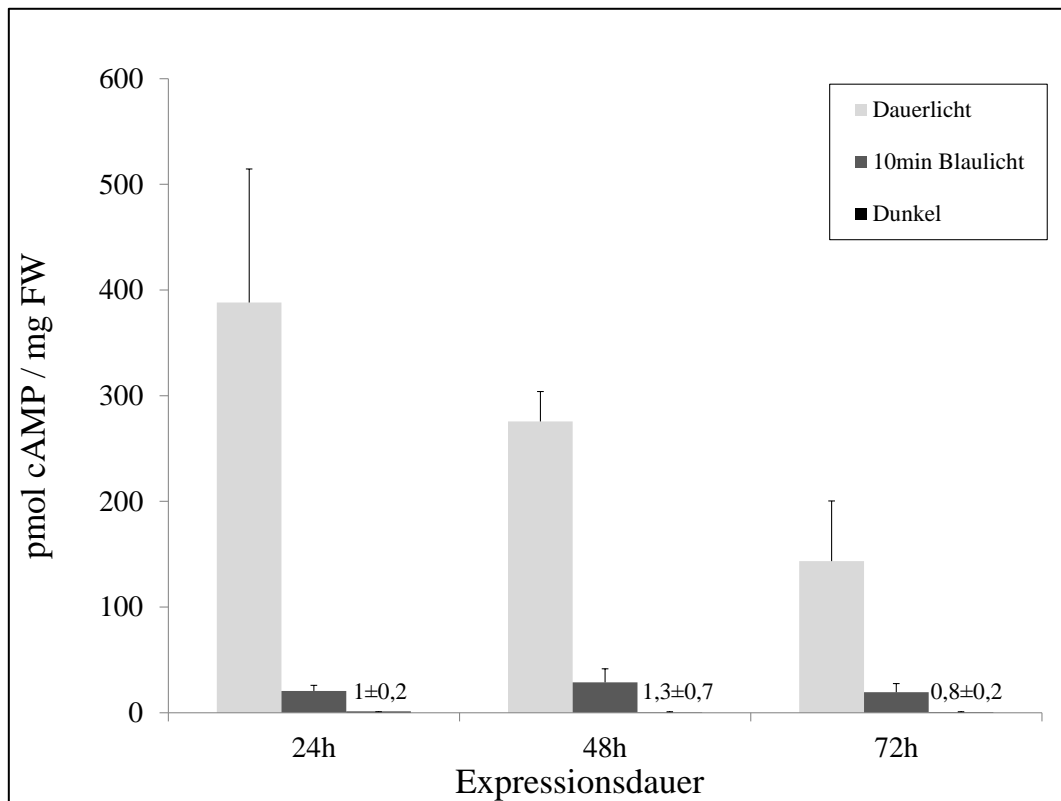


Abbildung 3.24 Akkumulation von cAMP in Blattproben der transgenen Pflanzlinie *bPAC::YFP* nach Induktion der Proteinexpression durch Östrogen ($10\mu\text{M}$). Die Blattproben wurden entweder in kompletter Dunkelheit gehalten (schwarze Balken), ausschließlich für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet (dunkelgraue Balken) oder über die gesamte Zeit unter weißem Dauerlicht gehalten, und zudem unmittelbar vor der Probennahme für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet (helle Balken). Der cAMP-Gehalt der Proben wurde jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden Expressionsdauer bestimmt.

Es konnte beobachtet werden, dass sich bei Blattproben, welche sich im Dauerlicht befanden und zudem direkt vor der Probennahme für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet wurden, eine deutlich höhere cAMP-Konzentration einstellte als bei Proben, welche in Dunkelheit gehalten wurden, und ausschließlich unmittelbar vor der Probennahme für zehn Minuten belichtet wurden (vgl. Abbildung 3.22). Bei Proben, welche unter Dauerlicht standen, war der höchste cAMP-Gehalt zudem bereits nach 24 Stunden zu beobachten, danach kam es zur stetigen Abnahme der cAMP-Produktion (bzw. -akkumulation, s. 4.3.4).

In Proben hingegen, welche *bPAC::YFP* unter kompletter Dunkelheit exprimierten und erst unmittelbar vor der Probennahme für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet wurden, war nach 48 Stunden die höchste Menge an cAMP nachweisbar. In unbelichteten Proben konnte auch nach drei Tagen Expressionsdauer nur sehr wenig cAMP (etwa 1 pmol/mg Frischgewicht) nachgewiesen werden.

3.4.3 Lichtinduzierte cGMP-Produktion

Analog zur Bestimmung der cAMP-Konzentration in *bPAC::YFP*-exprimierenden Pflanzen (3.4.2) wurde auch der cGMP-Gehalt der transgenen *bPGC::YFP*-Pflanzen nach Belichtung von Blattproben mit blauem Licht mittels ELISA bestimmt (2.6.1). Auch hier konnte eine eindeutige, lichtinduzierte Erhöhung der cGMP-Konzentration beobachtet werden.

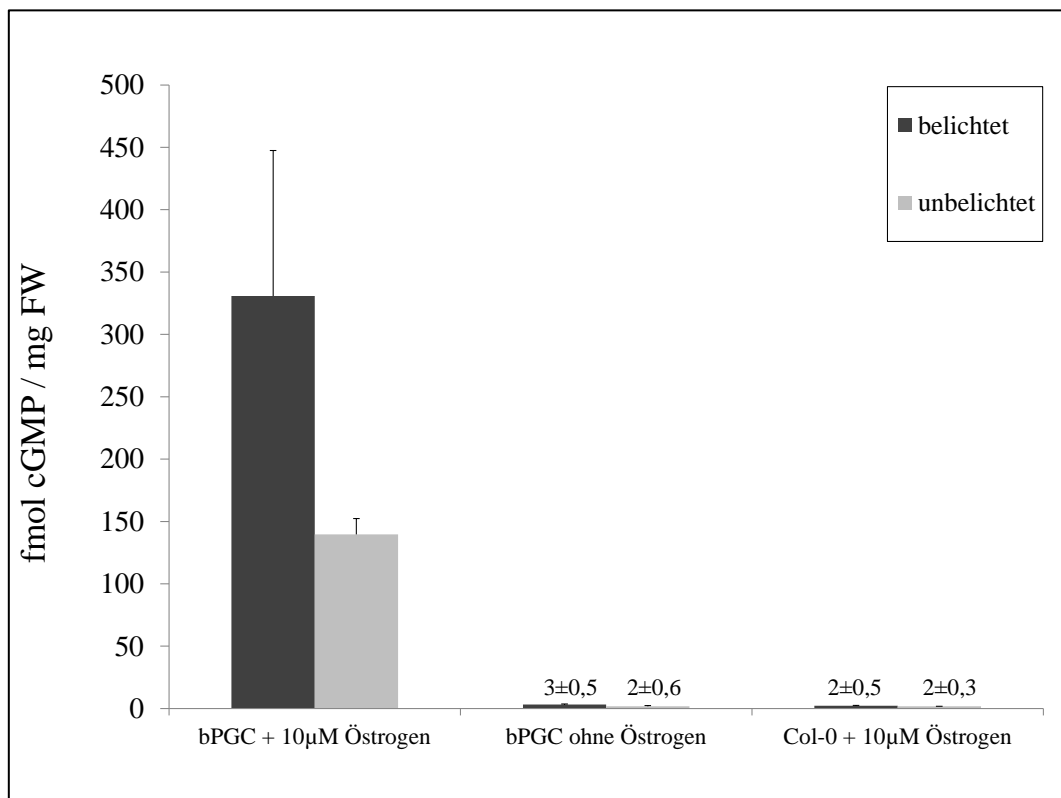


Abbildung 3.25 cGMP-Produktion der lichtaktivierten Guanylatcyclase *bPGC::YFP* in Blattscheiben der entsprechenden stabil transgenen Pflanzenlinie. Der cGMP-Gehalt der Proben wurde nach 48 Stunden entweder ohne Induktion der Proteinexpression oder nach Induktion durch Östrogen (10µM) gemessen. Die Blattproben wurden entweder für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet, oder bis zur Probennahme in Dunkelheit gehalten. Auch die Kontroll-Blattproben (*Col-0*) wurden 48 Stunden in östrogenhaltigem Wasser (10µM) gehalten, und gegebenenfalls zehn Minuten mit blauem Licht belichtet.

Nach Belichtung induzierter Blattproben *bPGC::YFP*-exprimierender Pflanzen der stabil transgenen Linie mit blauem Licht für zehn Minuten kam es zur Erhöhung der cGMP-Konzentration um etwa den Faktor zwei.

Blattproben deren *bPGC::YFP*-Expression nicht durch Östrogen induziert wurde, sowie *A. thaliana Col-0* Aequorin Kontrollpflanzen, wiesen nur eine sehr geringe Konzentration an cGMP auf, welche nahe der Nachweisgrenze des verwendeten Kits lag (2.6.1). Weiterhin wurde die reziproke (unspezifische) Produktion cyclischer Nucleotide und damit die Produktspezifität beider generierter Nucleotidcyclasen in Pflanzen der jeweiligen stabil transgenen Linien bestimmt. (Die cAMP-Produktion durch die Guanylatcyclase *bPGC::YFP* bzw. die cGMP-Produktion durch die Adenylatcyclase *bPAC::YFP*). Hierfür wurden die Blattproben beider stabilen Pflanzenlinien nach einer Expressionsdauer von 48 Stunden für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet und der jeweilige cAMP- bzw. cGMP-Gehalt durch ELISA (2.6.1) ermittelt.

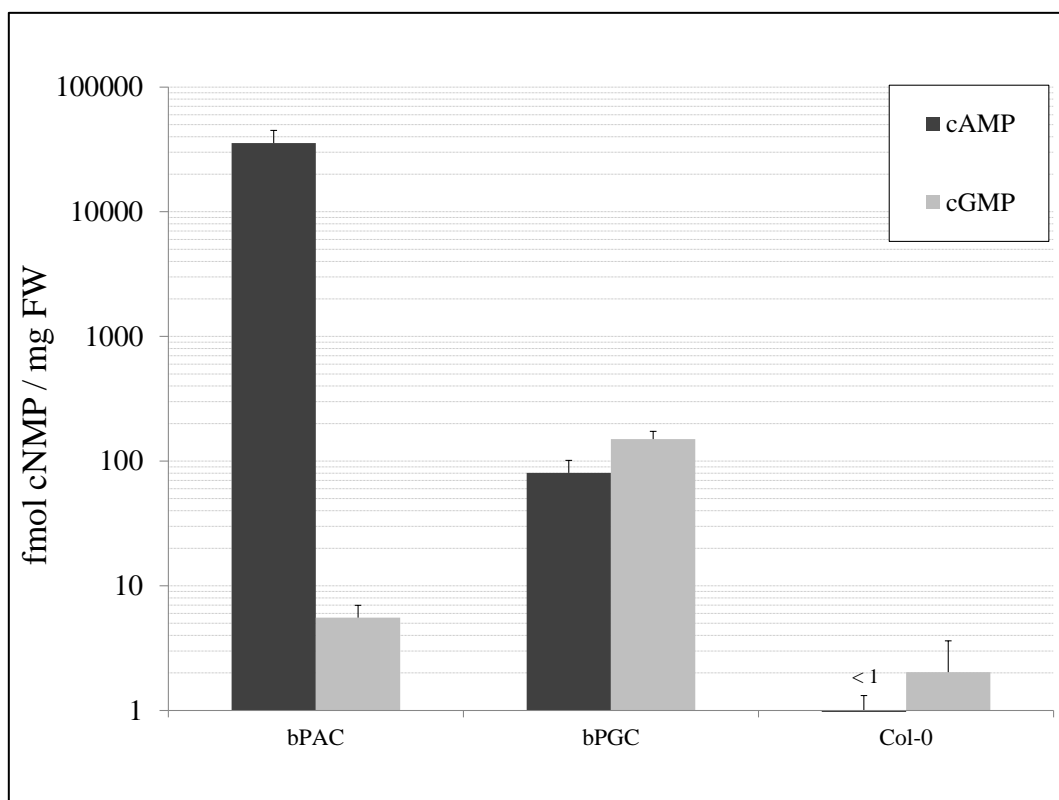


Abbildung 3.26 Vergleich von Umsatzrate und Produktspezifität der beiden lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* in Blattproben der beiden stabil transgenen Pflanzenlinien. Gemessen wurde die jeweilige cAMP- bzw. cGMP-Produktion nach einer Expressionsdauer von 48 Stunden und Belichtung für zehn Minuten mit blauem Licht. Die erhaltenen Werte sind aufgrund der hohen Divergenz logarithmisch dargestellt.

Es war zu beobachten, dass *bPAC::YFP* in den stabil transgenen Pflanzen nach Belichtung mit blauem Licht für zehn Minuten cAMP und cGMP in einem Verhältnis von etwa 7000 : 1 generierte und damit eine relativ hohe Produktspezifität aufwies. *bPGC::YFP* exprimierende Pflanzen hingegen zeigten ein Verhältnis von cGMP zu cAMP von nur etwa 2 : 1, also eine deutlich geringere Produktspezifität. Auch die (spezifische) Umsatzrate beider Nucleotidcyclasen war deutlich verschieden. So war die lichtabhängige cAMP-Produktion durch *bPAC::YFP* etwa um den Faktor 200 höher als die cGMP-Produktion durch *bPGC::YFP*. In untransfizierten *A. thaliana Col-0*-Aequorin Blattproben wurden nur sehr geringe Mengen cyclischer Nucleotide nachgewiesen.

3.4.4 Konstitutive Expression in *A. thaliana*

Es wurde zudem versucht, die Expression der lichtaktivierten Adenylatcyclase *bPAC::YFP* in einer weiteren transgenen Pflanzenlinie unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors 35S-CaMV zu erreichen. Hierzu wurde das Gen für *bPAC::YFP* in den Vektor pMDC-32 eingebracht (2.10.2.3). Nach der stabilen Transfektion von *A. thaliana Col-0* Aequorin Pflanzen (2.4.4.1) konnte zwar das eingebrachte Gen in der genomischen DNA dieser Pflanzen mittels PCR nachgewiesen werden, jedoch konnte weder fluoreszenzmikroskopisch noch immunologisch Expression oder Funktion des Proteins gezeigt werden. Das Konstrukt wurde nach der Klonierung in den binären Vektor sequenziert und in der Sequenz bestätigt. Zudem wurde die generelle Funktionsfähigkeit des Konstrukts nach Infiltration und transienter Expression in Blattscheiben von *N. benthamiana* (2.4.4.3) immunologisch getestet und bestätigt. (Nach Belichtung kam es zu einer Zunahme in der cAMP-Konzentration um etwa den Faktor vier im Vergleich zu unbelichteten Proben; diese Daten werden hier nicht gezeigt.)

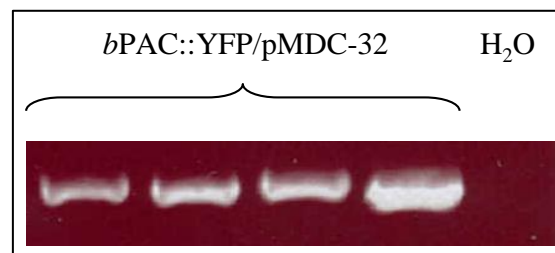


Abbildung 3.27 Nachweis des Gens *bPAC::YFP* in der genomischen DNA von vier verschiedenen Pflanzen der stabil transgenen Linie nach der Transfektion mit dem Konstrukt *bPAC::YFP/pMDC-32*. Trotz der Gegenwart des Gens im Genom dieser Pflanzen konnte unter der Kontrolle des in Pflanzen konstitutiv aktiven 35S-CaMV-Promotors keine Expression des Proteins *bPAC::YFP* erreicht werden, wie fluoreszenzmikroskopisch und immunologisch überprüft wurde. Die hier verwendeten PCR-Primer adressierten das 5'- und das 3'-Ende des Fusionsproteins *bPAC::YFP*, das PCR-Produkt hatte erwartungsgemäß eine Größe von ca. 1,6kb.

Die Pflanzen wurden nach der Transfektion (2.4.4.1) unter Langtagesbedingungen im Gewächshaus (2.2.3) angezogen und zeigten keinen augenscheinlichen Phänotyp. Jedoch konnte weder Fluoreszenz in Blättern dieser Pflanzen, noch eine nach Belichtung erhöhte cAMP-Konzentration nachgewiesen werden. Vermutlich kam es beim Wachstum dieser Pflanzen unter Weißlicht zu silencing-Prozessen und somit zur Unterbindung der Proteinexpression (s. 4.3.2).

3.4.5 Verzögerung der Samenkeimung

Die erste phänotypische Auffälligkeit der in dieser Arbeit erstellten transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP* zeigte sich bereits bei der Keimung der Samen. Um die Auswirkung der lichtaktivierten Adenylatcyclase *bPAC::YFP* bzw. eines hierdurch erhöhten cAMP-Spiegels bei der Keimung zu zeigen, wurden die Samen auf Agarplatten ausgesät, welche in einem Fall 25µM Östrogen (β -Estradiol) im Agar enthielten um die Proteinexpression zu induzieren (3.4.1), im anderen Fall kein Östrogen. Zudem wurde jeder Ansatz unter Weißlicht und vergleichend in Dunkelheit durchgeführt. In der folgenden Abbildung sind repräsentative Aufnahmen der unter den genannten Bedingungen gewachsenen Keimlinge gezeigt.

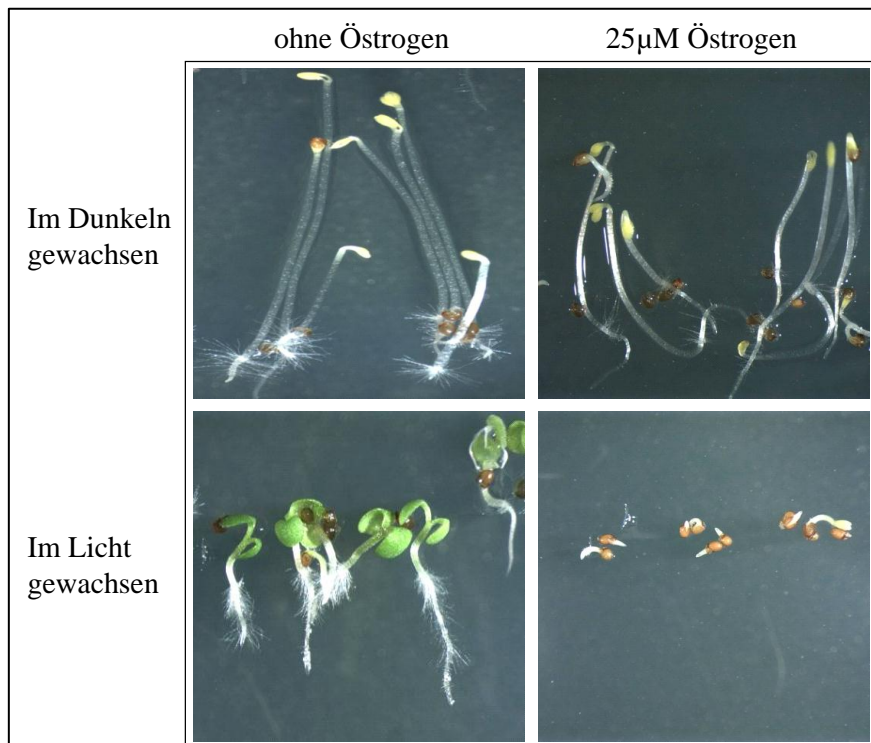


Abbildung 3.28 Phänotypen der Keimlinge der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP*. In Dunkelheit verlief die Samenkeimung dieser Pflanzen sowohl in Gegenwart ($25\mu\text{M}$) als auch in Abwesenheit des Induktors Östrogen völlig normal. Auch im Licht konnten Samen, deren *bPAC::YFP*-Expression uninduziert blieb, normal keimen und wachsen. Samen jedoch, in welchen die Expression der Adenylatcyclase durch Östrogen ($25\mu\text{M}$) induziert wurde, keimten nicht bzw. deutlich verspätet (vgl. Abbildung 3.30) im Licht. Die gezeigten Aufnahmen wurden am fünften Tag nach der Aussaat der Samen erstellt.

Samen der stabilen Linie *bPAC::YFP* konnten unter Dunkelheit sowohl auf östrogenfreiem als auch auf östrogenhaltigem Agar ($25\mu\text{M}$) uneingeschränkt keimen und zeigten keine Abweichung vom Keimungsbild untransformierter- oder GFP-exprimierender Pflanzen (Abbildung 3.29). Auch im Licht konnten Samen auf östrogenfreiem Agar keimen und normal wachsen. Jedoch konnten die auf östrogenhaltigem Agar ($25\mu\text{M}$) ausgesäten Samen, deren *bPAC*-Expression somit induziert war, nach der Lichtaktivierung der Adenylatcyclase nicht bzw. nur deutlich verspätet (vgl. Abbildung 3.30) keimen.

Um einen direkten Östrogeneffekt auf das Wachstum der Keimlinge im Licht auszuschließen, wurde der Keimungsversuch auch mit Samen durchgeführt, welche ausschließlich das Fluoreszenzprotein GFP (ebenfalls stabil transformiert, unter der Kontrolle des östrogeninduzierbaren Glucocorticoid-Promotors, Zuo et al., 2000) exprimierten. In der folgenden Abbildung sind repräsentative Keimlinge gezeigt, welche auf den entsprechenden Agarplatten wuchsen.

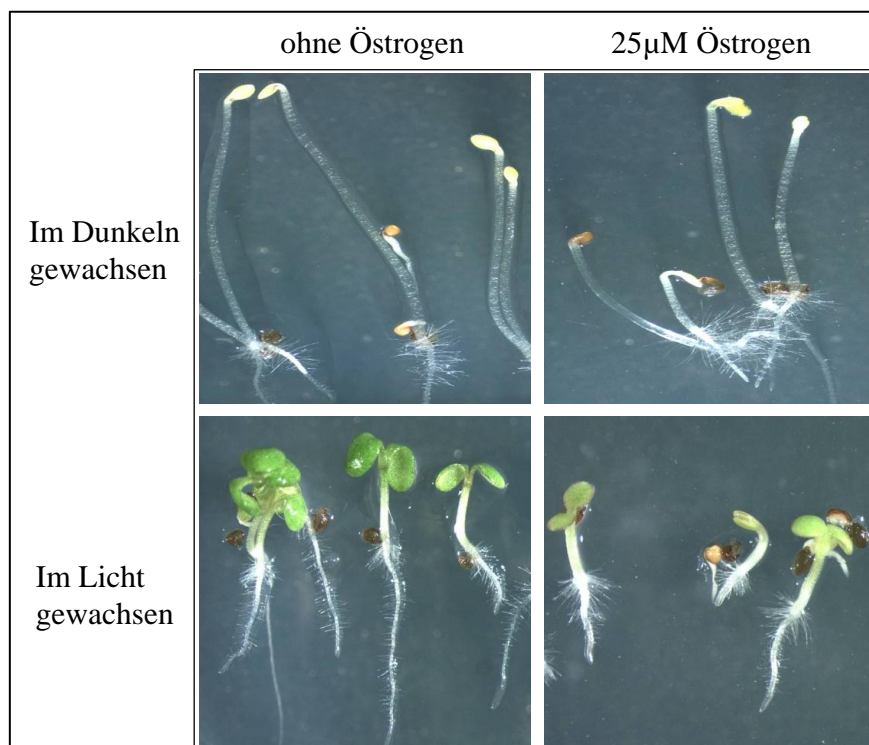


Abbildung 3.29 GFP-exprimierende Keimlinge wurden unter vergleichbaren Versuchsbedingungen (vgl. Abbildung 3.28) ausgesät. Die Samen konnten in Licht und in Dunkelheit sowohl in Anwesenheit (25µM) als auch in Abwesenheit von Östrogen uneingeschränkt keimen.

Keimlinge, welche östrogeninduziert ausschließlich das Fluoreszenzprotein GFP exprimierten, konnten sowohl in Dunkelheit als auch im Licht unabhängig von der vorliegenden Östrogenkonzentration keimen. Somit ist das eingeschränkte Keimungsbild der *bPAC::YFP* exprimierenden Samen (Abbildung 3.28) Effekt der nach der Östrogeninduktion exprimierten und lichtaktivierten Adenylatcyclase.

In der folgenden Abbildung ist der Verlauf der Keimung von Samen dieser Pflanzen innerhalb der ersten neun Tage sowohl in Gegenwart ($25\mu\text{M}$), als auch in Abwesenheit von Östrogen gezeigt. Zur Kontrolle wurden zudem GFP-exprimierende Keimlinge in ihrer Entwicklung dokumentiert, welche ebenfalls auf östrogenhaltigen Agarplatten ($25\mu\text{M}$) herangezogen wurden.

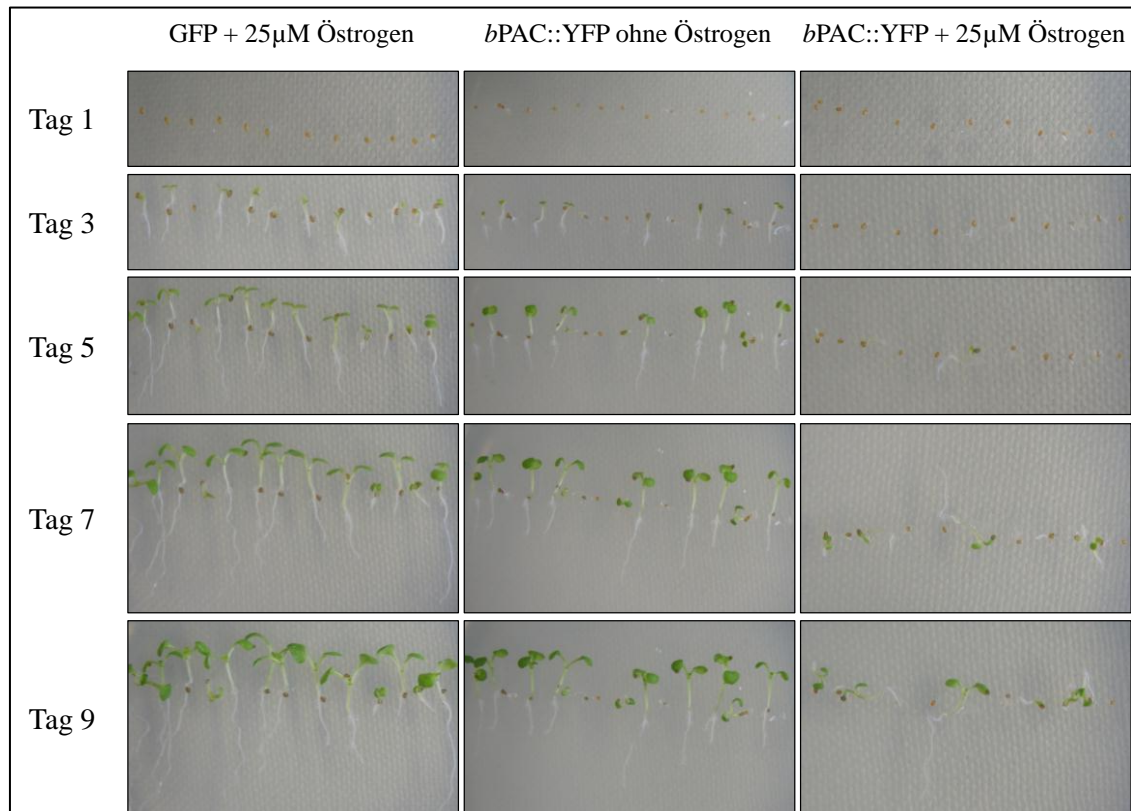


Abbildung 3.30 Übersicht über die Samenkeimung und die Entwicklung der Pflanzen in den ersten neun Tagen nach Aussaat der Samen. Nicht-induzierte *bPAC::YFP*-Keimlinge auf östrogenfreiem, sowie GFP-Kontrollkeimlinge auf östrogenhaltigem Agar ($25\mu\text{M}$) zeigten ein normales Keimungsbild. Die Keimlinge der *bPAC::YFP*-Pflanzen waren jedoch auch auf östrogenfreiem Agar im Durchschnitt kleiner als GFP-Kontrollkeimlinge. Samen der transgenen Linie, deren *bPAC::YFP*-Expression durch Aussaat auf östrogenhaltigem Agar ($25\mu\text{M}$) induziert wurde, zeigten eine deutlich verspätete Samenkeimung. Das Wachstum dieser Keimlinge erschien zudem verlangsamt.

Die Keimung von Samen der transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP* auf östrogenfreiem Agar, sowie die Keimung von GFP-Kontrollsamensamen auf östrogenhaltigem Agar ($25\mu\text{M}$) verlief normal.

Keimlinge der transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP* waren jedoch trotz des identischen Keimungszeitpunktes auch auf östrogenfreien Agarplatten im Durchschnitt kleiner als GFP-Kontrollkeimlinge. Es konnte zudem beobachtet werden, dass nach etwa fünf bis sieben Tagen auch *bPAC::YFP*-exprimierende Samen zu keimen begannen, welche auf einer östrogenhaltigen Agarplatte (25µM) keimten, und deren Proteinexpression hierdurch induziert wurde (vgl. Abbildung 3.28). Das Wachstum dieser Keimlinge war jedoch weiterhin langsamer, als das Wachstum von uninduzierten- oder GFP-Kontrollkeimlingen. Die aus diesen Keimlingen verspätet entstandenen Pflanzen zeigten im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung keinen augenscheinlich vom *A. thaliana* Col-0 Aequorin Wildtyp divergierenden Phänotyp. Auch nach dem Pikieren auf Erde wuchsen die Pflanzen unbeeinträchtigt heran.

Um die Produktion von cAMP bereits während der Samenkeimung bzw. der frühen Keimlingsentwicklung zu verfolgen, wurde der cAMP-Gehalt während der ersten sieben Tage der Keimung mittels ELISA bestimmt (2.6.1). Hierzu wurden die Samen auf Agarplatten ausgesät, welchen in einem Fall 25µM Östrogen, im anderen Fall kein Östrogen zugesetzt war. Die Platten befanden sich während der gesamten Dauer der Keimung unter vollem Weißlicht im Phytotron (2.9).

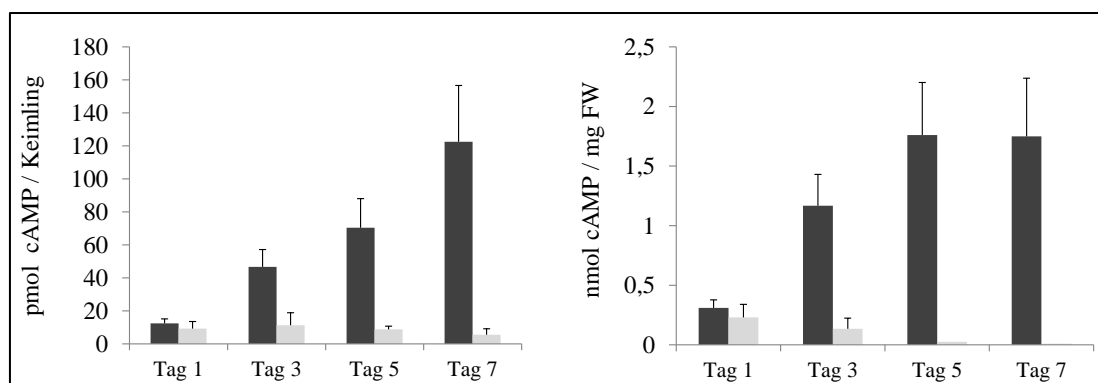


Abbildung 3.31 Zunahme der cAMP-Konzentration in Keimlingen der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP* in der ersten Woche der Samenkeimung im Licht. Samen wurden auf Agarplatten ausgesät, welche in einem Fall 25µM Östrogen enthielten, um die Expression der Adenylatcyclase zu induzieren (dunkle Balken), im anderen Fall kein Östrogen (helle Balken). Die Menge an gebildetem cAMP ist an den jeweiligen Tagen pro Keimling (links) bzw. pro mg Frischgewicht (rechts) angegeben. (vgl. Abbildung 3.30 zur Korrelation der jeweiligen Entwicklungsstadien der Keimlinge).

Die Konzentration an cAMP in den induzierten Samen nahm in der ersten Woche kontinuierlich zu, obwohl die Samen zwischen Tag fünf und Tag sieben zu keimen begannen (vgl. Abbildung 3.30). Die Menge an cAMP pro Keimling der uninduzierten Pflanzen blieb im Vergleich dazu nahezu konstant, obwohl diese Keimlinge bereits am dritten Tag deutlich wuchsen. Bezogen auf das Gewicht der Keimlinge nimmt hier die Konzentration an cAMP während der Keimung sogar ab (s. 4.3.1).

3.4.6 Lichtinduzierte Manipulation cytoplasmatischer Calciumkonzentrationen

In den generierten stabil transgenen Pflanzenlinien *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* konnten durch die transiente Erhöhung der Konzentration cyclischer Nucleotide indirekt lichtinduzierte Calciumsignale hervorgerufen (s. Schema in Abbildung 4.1) und über Aequorin-Lumineszenz (2.7.1) visualisiert werden. Für diese Messungen wurde ein modifiziertes Luminometer verwendet, welches einen Shutter-geschützten Photomultiplier, sowie blaue LEDs zur Anregung der lichtaktivierten Nucleotidcyclasen aufwies (2.7, Abbildung 2.4). Auf diese Weise konnte das Lumineszenz-Signal des Aequorins aus den Blattscheiben direkt nach dem aktivierenden Lichtpuls aufgezeichnet werden.

Die in allen Messungen auftretenden kurzen und schnell abfallenden Peak-Signale in unmittelbarer Folge der Belichtung sind technischer Herkunft und Erscheinungsbild der Messungen des selbstgebauten Luminometers.

In der folgenden Abbildung ist vorweg eine Messung einer leeren Messkammer gezeigt, um zu verdeutlichen, dass es sich bei den kurz andauernden Peak-Signalen nicht um biogene Aequorinlumineszenz-Effekte aus den Blattproben handelt. Dieses Peak-Signal erscheint in allen folgenden Abbildungen, und muss als messtechnisch-bedingter Artefakt in Kauf genommen werden.

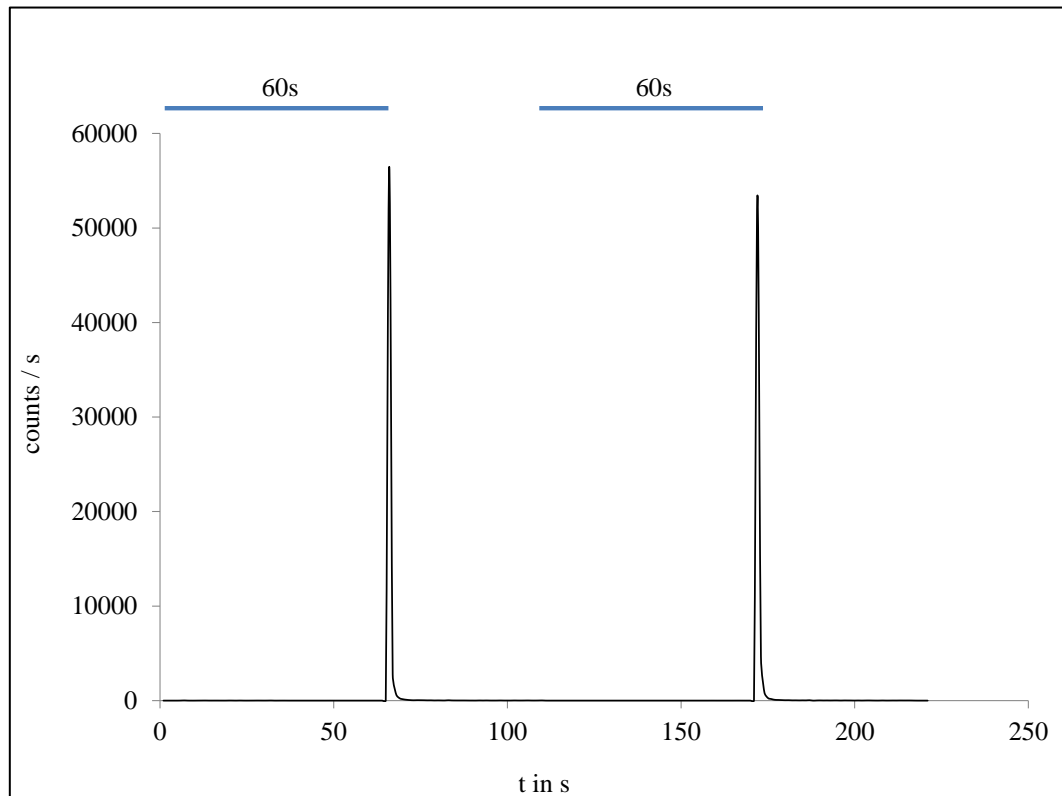


Abbildung 3.32 Technisch bedingtes Artefaktsignal des selbstgebauten Luminometers. Nach einem Lichtpuls kam es auch ohne Zellen in der Messkammer zu kurzen Peak-, „Signalen“.

Auf dieses technische Artefakt-Signal wird vertieft in 4.3.5.5 eingegangen. In den folgenden Abbildungen sind repräsentative Originalspuren luminometrischer Calciummessungen gezeigt.

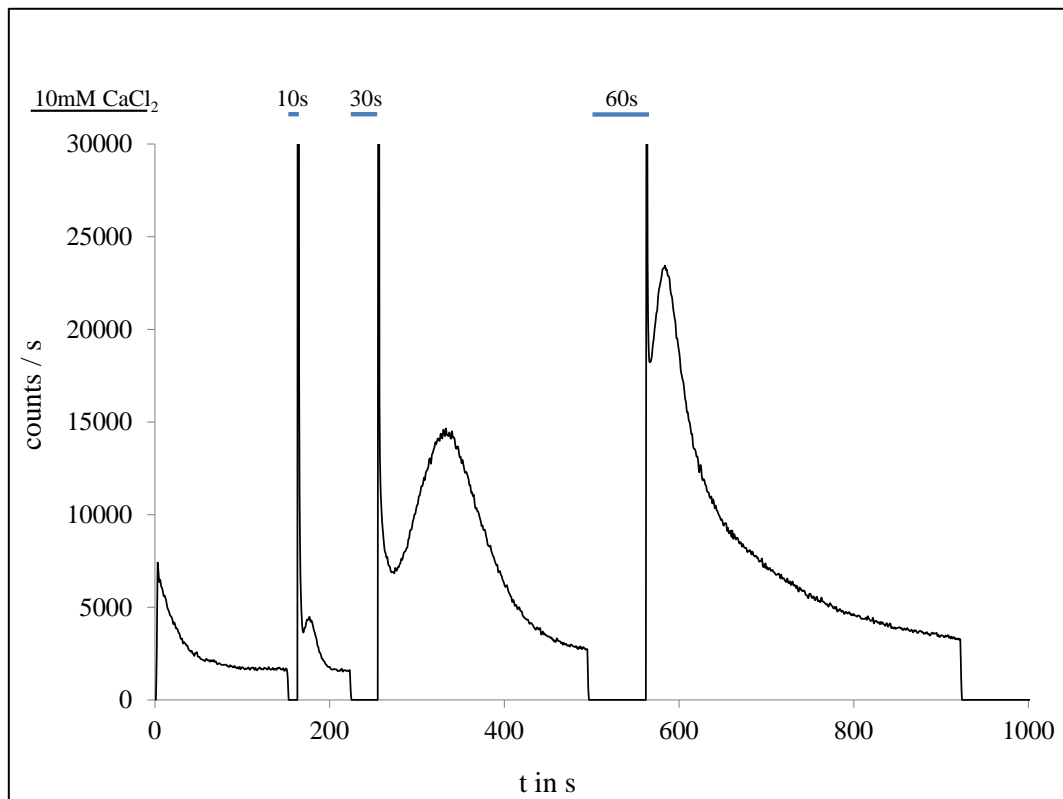


Abbildung 3.33 Lichtinduzierte Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration nach Blaulichtaktivierung der Adenylatcyclase in der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP*. Die Belichtung mit blauem Licht führte (in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer von 10, 30 und 60 Sekunden, blaue Balken) zum Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration. Diese Messung wurde in Leitungswasser durchgeführt, dem kurz vor der Messung 10mM Calciumchlorid zugegeben wurde. (Initiales Calciumsignal bei $t=0$: Calcium-induced Calcium release s. 1.5)

In *bPAC::YFP*-exprimierenden Blattscheiben der stabil transgenen Pflanzenlinien konnten reproduzierbar blaulichtinduzierte Calciumsignale erzeugt werden. Nach Belichtung von Blattscheiben für 10, 30 und 60 Sekunden mit blauem Licht kam es jeweils zum deutlichen, transienten Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration. Je länger die Blattproben belichtet wurden, desto größer war das hervorgerufene Calciumsignal. Die gezeigten Messungen wurden in Leitungswasser (vergleichend zu den Messungen zur Bestimmung des cAMP- bzw. cGMP-Gehaltes, vgl. 3.4.2) durchgeführt, welchem direkt vor der Messung Calciumchlorid (10mM) zugegeben wurde.

Die initial erhöhte Calciumkonzentration in Abbildung 3.33 ist Folge der Calcium induzierten Calcium Antwort (Calcium Induced Calcium Release, s. 1.5) direkt nach der Zugabe von 10mM Calciumchlorid.

Weiterhin wurde die Reproduzierbarkeit dieses lichtinduzierten Calciumsignals untersucht, indem wiederholt Lichtpulse einer Dauer von 30 Sekunden appliziert wurden.

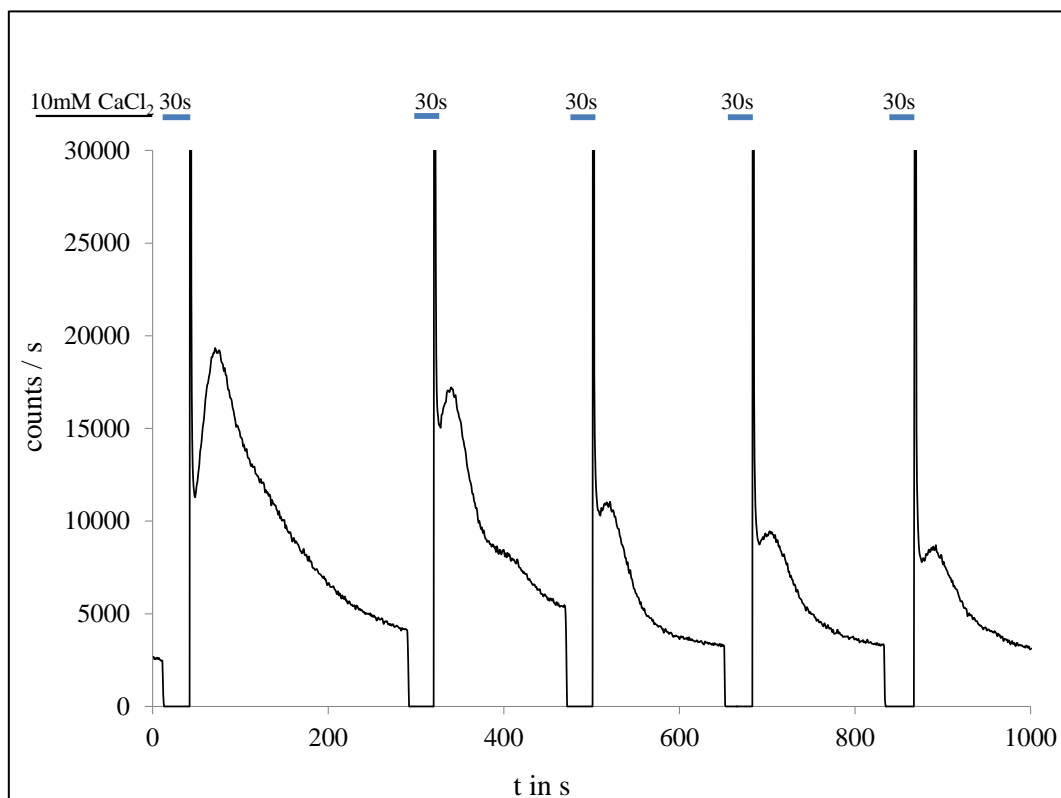


Abbildung 3.34 Die wiederholte Aktivierung der Adenylatcyclase in *bPAC::YFP*-exprimierenden Blattproben der stabil transgenen Pflanzen durch blaues Licht (jeweils 30 Sekunden, blaue Balken, 456nm) führte reproduzierbar zu einer transienten Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration. Die absolute Amplitude der erhaltenen Calciumantwort nahm jedoch mit der Anzahl der Wiederholungen der Blaulichtpulse ab. Auch hier wurde Calciumchlorid (10mM) direkt vor der Messung zugegeben.

Auf die Folge wiederholter Blaulichtaktivierung der Adenylatcyclase in Blattproben der stabil transgenen Pflanzen kam es reproduzierbar zur transienten Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration. Die Intensität bzw. Amplitude dieser Calciumantworten nahm mit der Anzahl der Wiederholungen der Blaulichtpulse ab.

Die lichtaktivierbare und wiederholbare, transiente Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration ist für die Erzeugung von lichtinduzierten Calciumoszillationen, wie sie in der grundlegenden Fragestellung dieser Arbeit gefordert wurden (s. 1.7), wichtige Voraussetzung. In Blattproben der erstellten stabil transgenen Linie konnten somit sowohl transiente Erhöhungen der Calciumkonzentration, als auch Calciumoszillationen durch entsprechende Belichtungsmuster induziert werden.

In Kontrollmessungen an untransformierten Blattscheiben von *A. thaliana-Col-0* Aequorin Pflanzen konnte nach einer Belichtung mit blauem Licht keine Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration festgestellt werden. Auch die Blattscheiben der Kontrollpflanzen wurden versuchskonsistent über Nacht in coelenterazin- und östrogenhaltigem Leitungswasser (je 10 μ M) eingelegt und Calciumchlorid (10mM) direkt vor der Messung zugegeben.

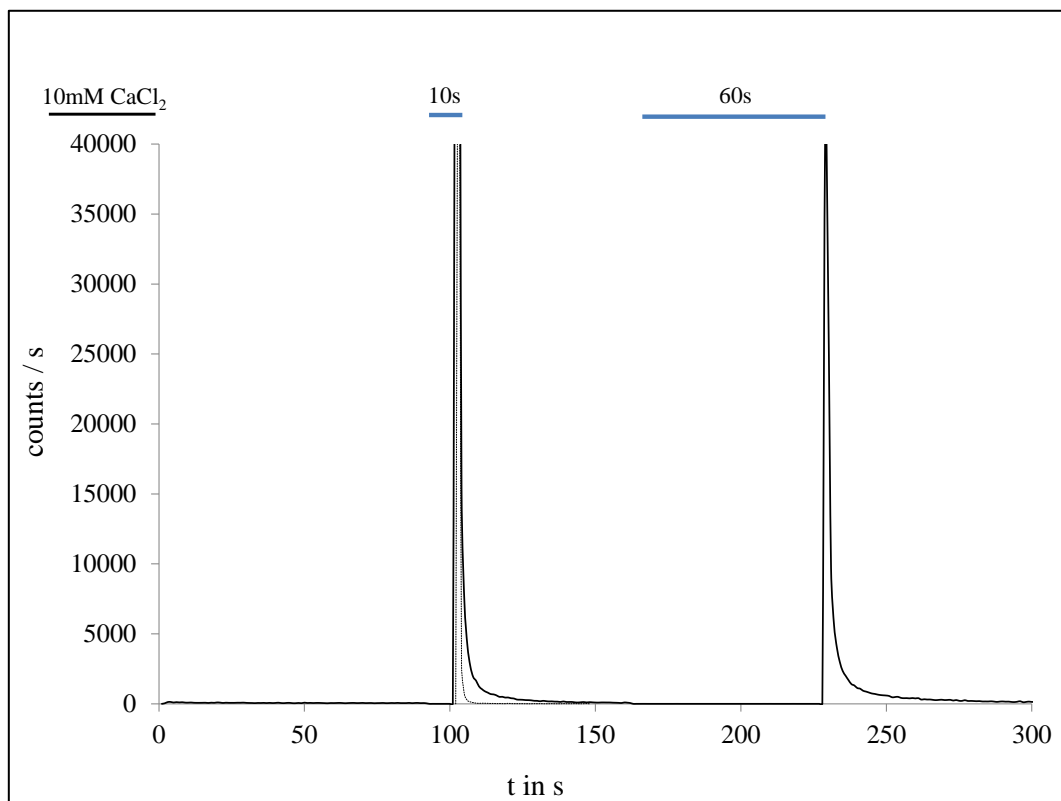


Abbildung 3.35 Kontrollmessungen in Blattscheiben untransformierter *A. thaliana Col-0* Aequorin Pflanzen. Bei Kontrollmessungen kam es auf die Folge von blauen Lichtpulsen (10s, 60s, 456nm, blaue Balken) nicht zur Erhöhung der endogenen Calciumkonzentration. Die unterbrochene Linie zeigt eine Übereinanderlagerung des technisch bedingten Artefaktsignals (vgl. Abbildung 3.32). Das darüber hinaus andauernde Lumineszenzsignal wurde wiederholt in Aequorin-Blattproben beobachtet, jedoch kam es nach dem Lichtpuls nie zu einem Anstieg der Calciumkonzentration nach Belichtung.

Weiterhin wurde die Calciumantwort der *bPAC::YFP*-exprimierenden Pflanzen ohne Induktion der Expression durch Östrogen gemessen. Die Blattscheiben wurden unter (bis auf die Gegenwart von Östrogen) identischen Versuchsbedingungen (vgl. Abbildung 3.33) über Nacht in Leitungswasser eingelegt, und Calciumchlorid (10mM) direkt vor der Messung zugegeben. Coelenterazin wurde ebenfalls über Nacht in der Konzentration 10 μ M zugegeben.

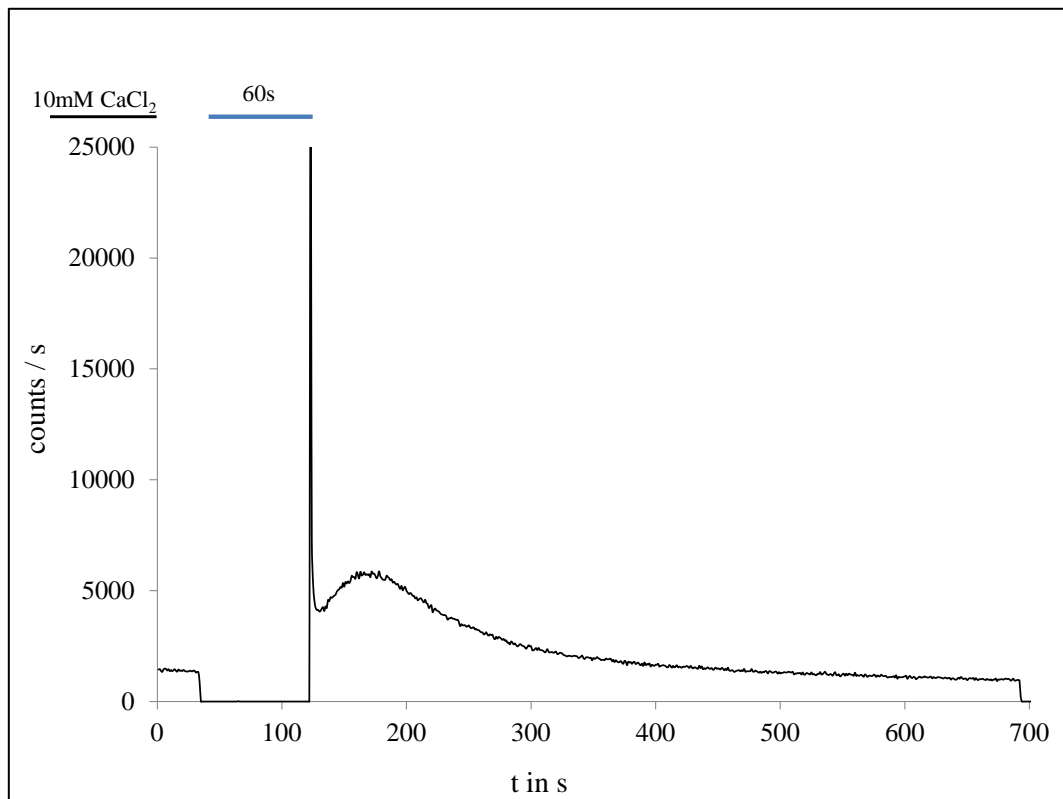


Abbildung 3.36 Auch ohne Zugabe von Östrogen zu Blattscheiben der Pflanzenlinie *bPAC::YFP* kam es nach Belichtung zu einer leichten Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration. Dieses Calciumsignal ist jedoch ohne Induktion der Adenylatcyclase-Expression deutlich kleiner, als jenes nach voll induzierter Proteinexpression nach Induktion mit 10 μ M Östrogen (vgl. Abbildung 3.33).

Blattscheiben der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP*, in welchen die Expression der Adenylatcyclase nicht induziert wurde, zeigten ebenfalls eine leichte Erhöhung des cytoplasmatischen Calciums in Folge von Belichtung mit blauem Licht für sechzig Sekunden. Wie zuvor in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist auch ohne Induktion der Proteinexpression durch Östrogen eine basale, lichtabhängige Aktivität der Adenylatcyclase gegeben (vgl. Abbildung 3.21, s. 4.3.1). Die Amplitude des Calciumsignals war jedoch in diesem Fall etwa um den Faktor fünf geringer als bei Messungen an Blattproben nach voll induzierter *bPAC::YFP*-Expression (vgl. Abbildung 3.33). Vergleicht man die cAMP-Produktion in den Blattscheiben dieser Pflanzen nach Belichtung für zehn Minuten, so konnte eine etwa 13-fache Erhöhung der cAMP-Konzentration nach der Östrogeninduktion im Vergleich zu uninduzierten Proben beobachtet werden (Abbildung 3.21).

Blattproben der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPGC::YFP* wurden unter identischen Versuchsbedingungen auf Calciumsignaturen in Folge einer induziert erhöhten cGMP-Konzentration untersucht. Hierzu wurden Blattstücke dieser Pflanzen (2.7.1) über Nacht in östrogenhaltigem Leitungswasser ($10\mu\text{M}$) eingelegt, um die Proteinexpression zu induzieren. Auch hier wurde Coelenterazin über Nacht in der Konzentration $10\mu\text{M}$ zugegeben.

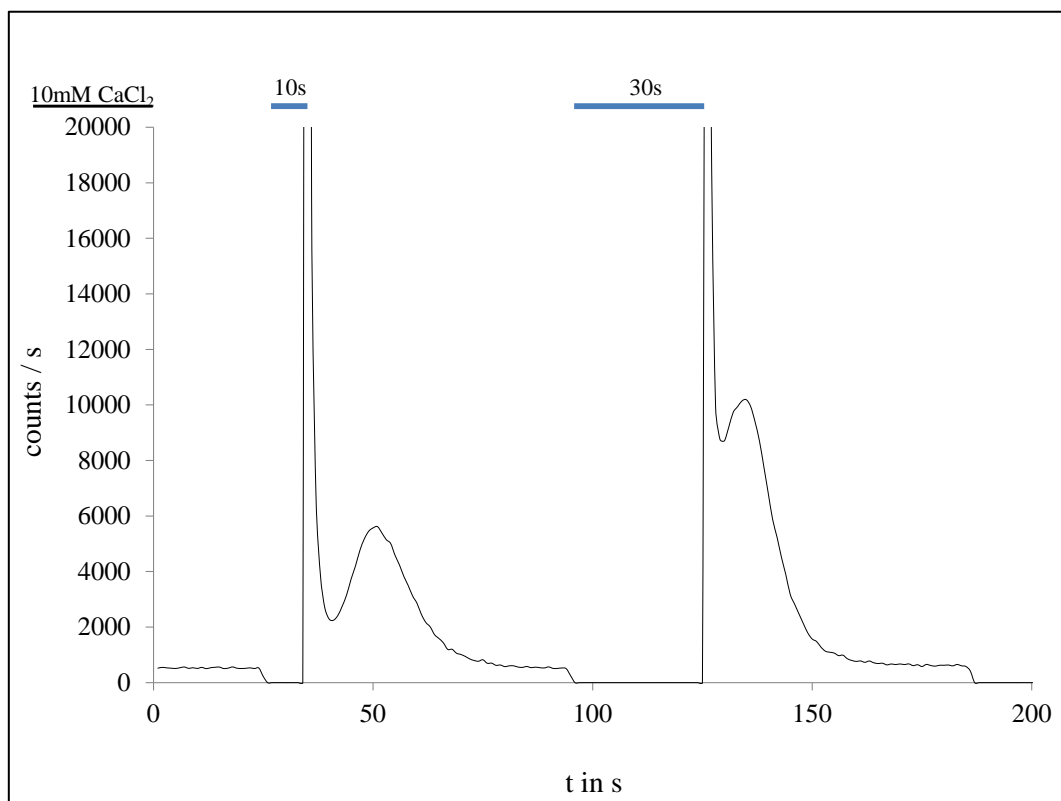


Abbildung 3.37 Auch in Blattscheiben der generierten, stabil transgenen Pflanzenlinie *bPGC::YFP* konnte eine Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration nach Lichtaktivierung der Guanylatcyclase erreicht werden. Calciumchlorid wurde wie zuvor vor Messbeginn in der Konzentration 10mM zugegeben. Nach Belichtung für 10 bzw. 30 Sekunden (blaue Balken) kam es zu einer transienten Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration in Folge einer erhöhten cGMP-Konzentration.

Auch bei Blattproben der Pflanzenlinie *bPGC::YFP* zeigte sich nach Expressionsinduktion durch Östrogen ($10\mu\text{M}$) eine deutliche Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration nach Aktivierung der Guanylatcyclase durch Belichtung der Proben für zehn und dreißig Sekunden mit blauem Licht (s. 4.3.5.3).

Im Bezug zur deutlich geringeren cGMP-Produktion der Linie *bPGC::YFP* von etwa nur 0,5% im Vergleich mit der cAMP-Produktion durch *bPAC::YFP* in entsprechenden Blattproben (Abbildung 3.26, s. 4.3.6) ist das beobachtete Calciumsignal bezogen auf die Menge des produzierten cGMP deutlich größer.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den beobachteten Calciumsignalen den Einstrom von Calcium aus dem Apoplasten oder um Calcium aus internen Calciumspeichern handelt (s. 1.5), wurden luminometrische Messungen vor und nach Zugabe des nicht-selektiven Calciumkanalblockers Lanthanchlorid (LaCl_3) durchgeführt. Hierzu wurde die *bPAC::YFP*-Expression in Blattproben der transgenen Linie in definierten Lösungsbedingungen über Nacht calciumfrei (50mM KCl, 10mM EDTA, pH 6,0) induziert. Östrogen und Coelenterazin wurden hierzu über Nacht in der Konzentration 10 μM zugegeben. Im Verlauf der Messung wurde zunächst Calciumchlorid (30mM) und anschließend Lanthanchlorid (2mM) zugegeben.

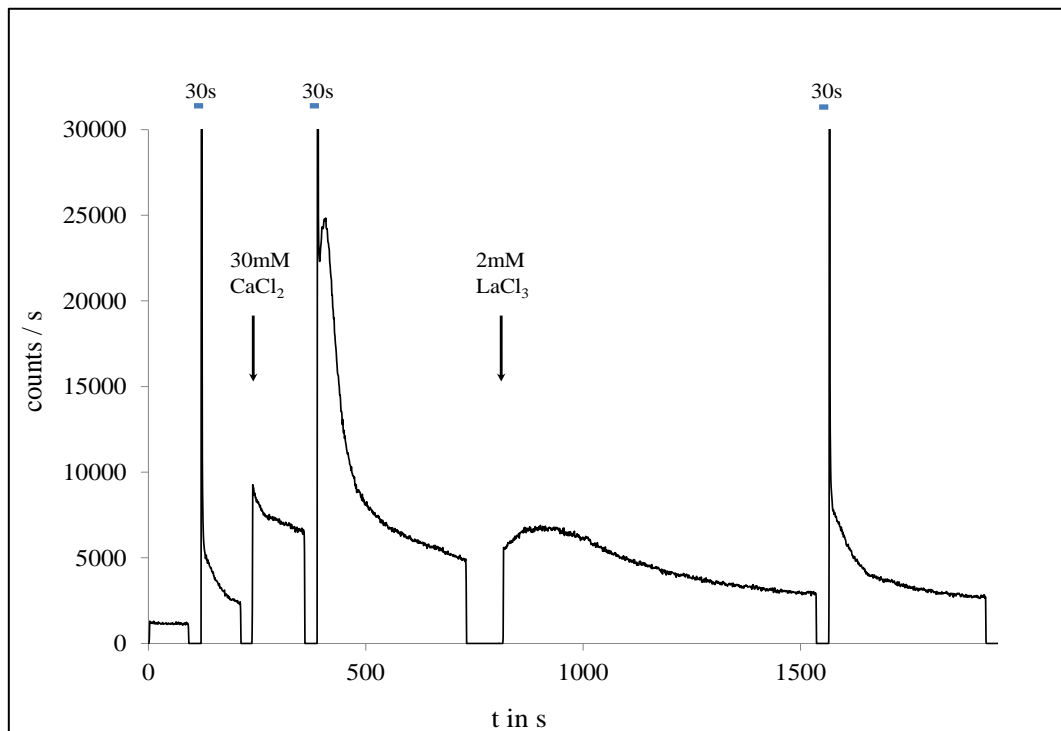


Abbildung 3.38 Die Blattproben der transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP* befanden sich während der Expression (Induktion durch $10\mu\text{M}$ Östrogen, Expression über Nacht) und zu Beginn der Messung in calciumfreier Lösung [50mM KCl, 10mM EDTA, pH 6,0 (Hepes/HCl)]. In Abwesenheit von extern vorliegendem Calcium kam es nach dem ersten Blaulichtpuls (blauer Balken) nicht zur Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration. Nach Zugabe von Calciumchlorid (30mM) zu den Blattproben und erneut appliziertem Lichtpuls konnte eine deutliche, blaulichtinduzierte Erhöhung der Calciumkonzentration beobachtet werden. Nach darauffolgender Zugabe von Lanthanchlorid (2mM) und erneutem Lichtpuls konnte der Calciumeinstrom geblockt werden, und das lichtinduzierte Calciumsignal blieb aus.

Es konnte gezeigt werden, dass das bereits zuvor beobachtete lichtinduzierte Calciumsignal (Abbildung 3.33, Abbildung 3.34) der transgenen Pflanzenlinie erst nach der Zugabe von Calciumchlorid zu den zunächst in calciumfreier Lösung vorliegenden, *bPAC::YFP*-exprimierenden Blattscheiben hervorgerufen werden konnte. In calciumfreier EDTA-Lösung konnte kein lichtinduziertes Calciumsignal beobachtet werden. Wurde während der Messung der nicht-selektive Calciumkanalblocker Lanthanchlorid (2mM) zugegeben, so blieb das zuvor beobachtete lichtinduzierte Calciumsignal ebenfalls aus.

Folglich ist das induzierte Calciumsignal durch Einstrom von Calcium aus dem Apoplasten zu erklären und nicht durch die Rekrutierung von Calcium aus endogenen, internen Calciumspeichern.

Unter identischen Versuchsbedingungen wurden untransfizierte Blätter von *A.thaliana-Col-0* Aequorin Pflanzen zur Kontrolle luminometrisch gemessen. Versuchskonsistent wurden diese Blattproben ebenfalls vor der Messung über Nacht in 10µM Östrogen und 10µM Coelenterazin in entsprechender Messlösung (50mM KCl, 10mM EDTA, pH 6,0) gehalten und während der Messung zunächst Calciumchlorid (30mM) und anschließend Lanthanchlorid (2mM) zugeführt (vgl. Abbildung 3.38).

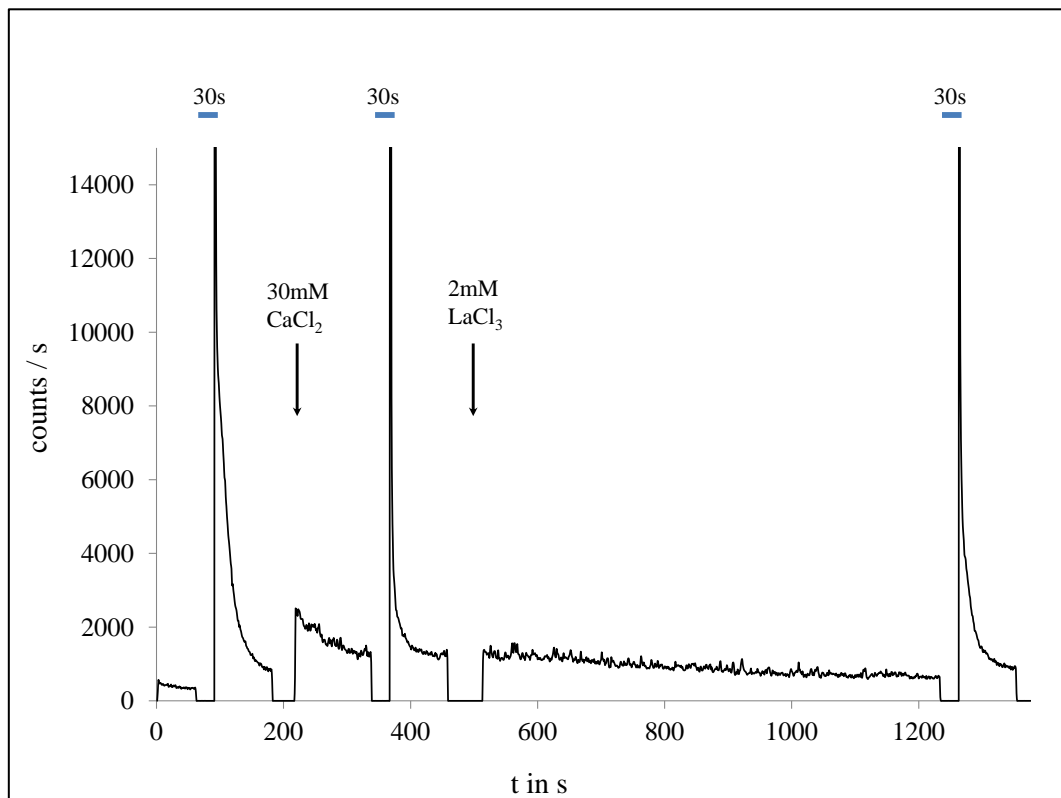


Abbildung 3.39 In Kontrollmessungen an untransfizierten Blattscheiben von *A. thaliana col-0* Aequorin Pflanzen konnten in calciumfreier Lösung (50mM KCl, 10mM EDTA, pH 6,0 (Hepes/HCl), sowie nach der Zugabe von 30mM Calciumchlorid während der Messung keine lichtinduzierten Calciumsignale gemessen werden. Auch nach der Zugabe von Lanthanchlorid kam es nach Belichtung nicht zur nennenswerten Änderung der Calciumsignatur.

In untransformierten Blattscheiben von *A. thaliana Col-0* Aequorin Pflanzen, welche zur Kontrolle gemessen wurden, konnten weder in calciumfreier Lösung (50mM KCl, 10mM EDTA, pH 6,0 (Hepes/HCl)), noch nach Zugabe von Calciumchlorid (30mM) eine lichtinduzierte Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration beobachtet werden. Nach der Zugabe des nicht-selektiven Calciumkanalblockers Lanthanchlorid konnte ebenfalls keine Veränderung in der Calciumsignatur nach Belichtung beobachtet werden.

3.5 Stabil transgene *A. thaliana* Zellkulturen

Neben den beiden stabil transgenen Pflanzenlinien (3.4) wurden in der vorliegenden Arbeit auch stabil transgene *A. thaliana Col-0* Aequorin Zellkulturen generiert, welche die lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* bzw. *bPGC::YFP* ebenfalls unter der Kontrolle des östrogeninduzierbaren Glucocorticoidpromotors (Zuo et al., 2000) exprimierten. Diese Zweit-Transfektion wurde auf der Grundlage einer bereits bestehenden Zellkultur durchgeführt, welche konstitutiv und unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors das Calciumreporterprotein Aequorin exprimierten.

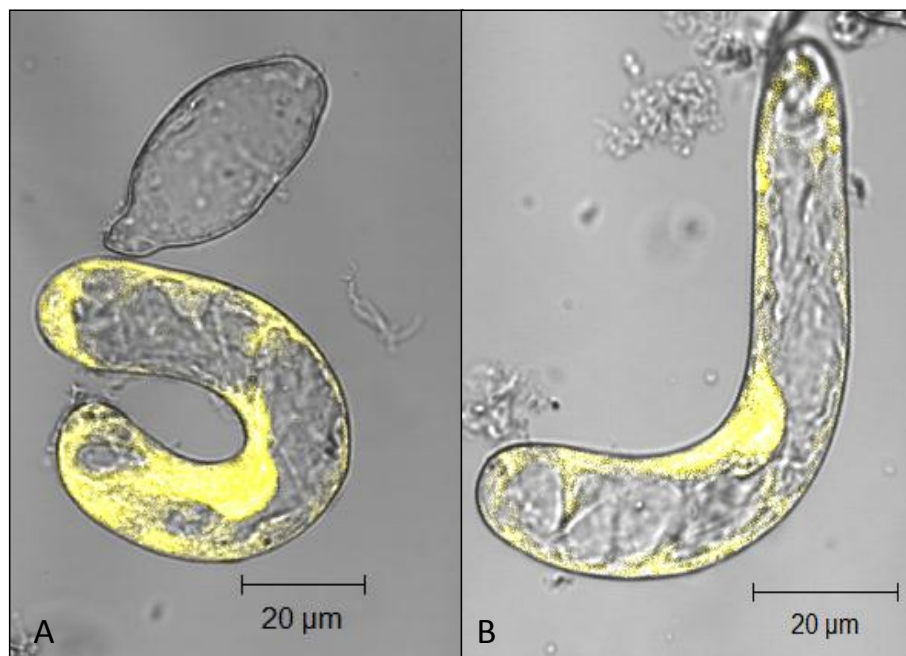


Abbildung 3.40 Expression und cytoplasmatische Lokalisation der lichtaktivierten Nucleotidcyclasen in den beiden generierten, stabil transgenen *A. thaliana Col-0* Aequorin Zellkulturen. **A:** *bPAC::YFP* in *A.thaliana-Col-0* Aequorin Zellkultur **B:** *bPGC::YFP* in *A.thaliana-Col-0* Aequorin Zellkultur. Die Expression wurde über 48 Stunden wiederholt durch die zweimalige Zugabe von 10µM Östrogen (nach 0 und 24 Stunden) induziert. Etwa in 50% der vorliegenden Zellen konnten auf diese Weise die Expression der jeweiligen Nucleotidcyclasen induziert werden.

In beiden erstellten transgenen Zellkulturlinien konnte eine starke Expression der lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* in den Zellen, sowie deren cytoplasmatische Lokalisation gezeigt werden. Nicht-induzierte Zellen zeigten keine Fluoreszenz.

Die Induktion der Proteinexpression konnte in etwa 50% der vorliegenden Zellen durch die zweimalige Zugabe von Östrogen (10 μ M, nach 0 und 24 Stunden) durchgeführt werden.

Die Verwendung dieser heterotrophen Zellkultur bietet die Möglichkeit einer komplett lichtunabhängigen Zellanzucht. Für einige Fragestellungen ist dies insofern interessant, als dass die volle Induktion der Proteinexpression in wachsenden Zellen durchgeführt werden kann, ohne dass die Adenylatcyclase vor der Messung durch Licht aktiviert wird. Für die erstellte Zellkulturlinie *bPAC::YFP* wurde die Funktion der lichtaktivierten Adenylatcyclase ebenfalls mittels ELISA (2.6.1) gezeigt. Hierzu wurden 10ml der induzierten Zellkultur abgenommen, pelletiert (100g / 2min / RT) und nach vollständiger Abnahme des Kulturmediums in der Kugelmühle homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation (14000rpm / 5min / RT) wurde der Überstand abgenommen, mit HCl in der Endkonzentration 0,1M versetzt und der cAMP-Gehalt mittels ELISA (2.6.1) bestimmt. Es wurden belichtete, unbelichtete sowie induzierte und nicht-induzierte Proben entnommen.

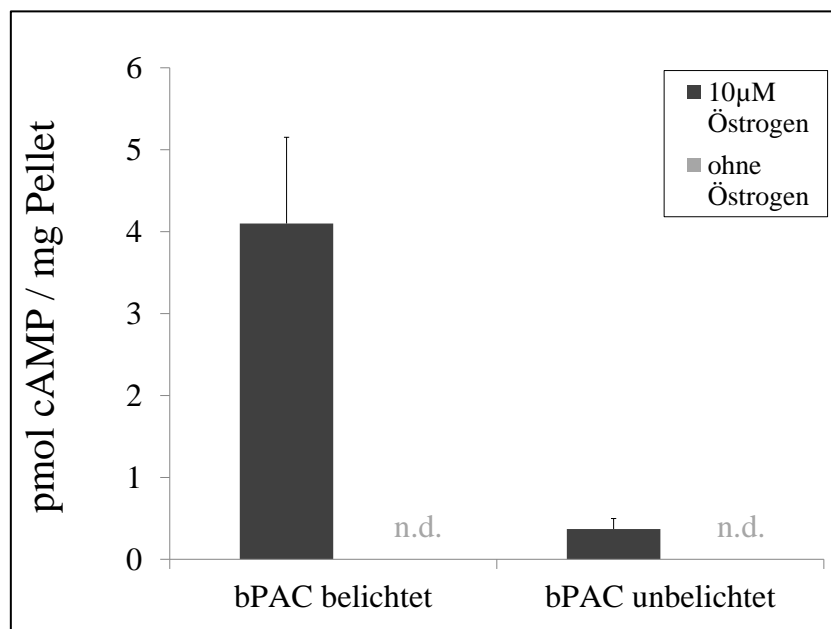


Abbildung 3.41 Lichtinduzierte Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zellkultur *bPAC::YFP* 48 Stunden nach der Induktion der Expression (zweimalig 10 μ M Östrogen, nach 0 und 24 Stunden). Nach Belichtung für zehn Minuten mit blauem Licht kam es zum deutlichen Anstieg der cAMP-Konzentration im Vergleich zu unbelichteten Zellen. Die cAMP-Konzentration nahm hier etwa um den Faktor zehn zu. In Zellproben, deren *bPAC*-Expression nicht durch Östrogen induziert wurde, lag die cAMP-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Kits (2.6.1, s. 4.4).

Auch in der erstellten transgenen Zellkulturlinie *bPAC::YFP* kam es nach Induktion der Proteinexpression durch zweimalige Zugabe von 10µM Östrogen (nach null und 24 Stunden) zur lichtinduzierten Erhöhung der cAMP-Konzentration. Proben, deren cAMP-Gehalt ohne Induktion der *bPAC*-Expression gemessen wurde, zeigten weder im Licht noch in Dunkelheit eine durch das verwendete Kit (2.6.1) nachweisbare cAMP-Erhöhung. In beiden Fällen wurde der cAMP-Gehalt nach einer Expressionsdauer von 48 Stunden und Belichtung für zehn Minuten mit blauem Licht bestimmt. Der cGMP-Gehalt in Proben der Zellkultur *bPGC::YFP* wurde ebenfalls mittels ELISA gemessen, jedoch lag die gebildete cGMP-Menge in allen Fällen unter der Nachweisgrenze des verwendeten Kits (2.6.1). Die Quantifikation cyclischer Nucleotide aus Proben der Zellkultur konnte jedoch nicht unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden (s. 4.4).

3.6 Indirekt lichtaktivierbare Ionenkanäle – ein alternativer Ansatz

3.6.1 CNGA2_2A_EuPAC

Wie zuvor beschrieben, wurden in der vorliegenden Arbeit endogene, calciumpermeable Kationenkanäle in Pflanzen (1.4.1) über die lichtinduzierte Erhöhung des cytoplasmatischen cAMP- bzw. cGMP-Gehaltes indirekt aktiviert, um lichtinduziert Calciumsignale in Pflanzenzellen zu generieren (Abbildung 4.1, s. 3.4.6). In einem parallelen Ansatz hierzu wurde ein Fusionskonstrukt aus der lichtaktivierten Adenylatcyclase *EuPAC α* (1.2) und dem cAMP-aktivierten Kationenkanal CNGA2 (*R. norvegicus*) erstellt (2.10.4), um so das Gen für einen weiteren funktionellen, indirekt über Licht steuerbaren, sowie calciumpermeablen Kationenkanal zu erhalten. Da die direkte Fusion beider Proteine zum Funktionsverlust führte (Daten aus der Dissertation von Dr. Jens Looser, 2010), wurden in der vorliegenden Arbeit die Sequenzen der beiden Gene über eine 2A-Sequenz (2.10.4) miteinander verknüpft, um die Gene beider in der Folge separat translatierten Proteine in einem einzigen ORF (Open Reading Frame) zu vereinen. Die vollständige Sequenz des Fusionskonstruktes ist in 6.6.2 gegeben.

3.6.1.1 Elektrophysiologische Charakterisierung

Zunächst wurde die Funktion des Fusionskonstruktes CNGA2_2A_EuPAC elektrophysiologisch an Oocyten von *X. laevis* (2.3.1) über DEVC (2.5.4.2) getestet. Bei einer Klemmspannung von -50mV konnte nach Belichtung für 15 Sekunden ein deutlicher Einwärts-Strom (Lösung: ORi-Standard, pH 7,6, 6.4.2.5) gemessen werden.

Die Amplitude der gemessenen Ströme variierte stark, bewegte sich jedoch in einzelnen Messungen auch in einem Bereich von Strömen, welche durch separate Injektion der RNA von CNGA2 und *EuPAC* erreicht werden konnten (etwa 4µA bei einer Klemmspannung von -40mV in gleicher Lösung und nach Belichtung für 16 Sekunden, vgl. Dissertation Dr. Jens Looser, 2010, Abbildung 3.14). Die folgende Abbildung zeigt eine Originalspur einer DEVC-Messung (2.5.4.2) des Konstruktes CNGA2_2A_EuPAC nach Expression in Oocyten von *X. laevis*.

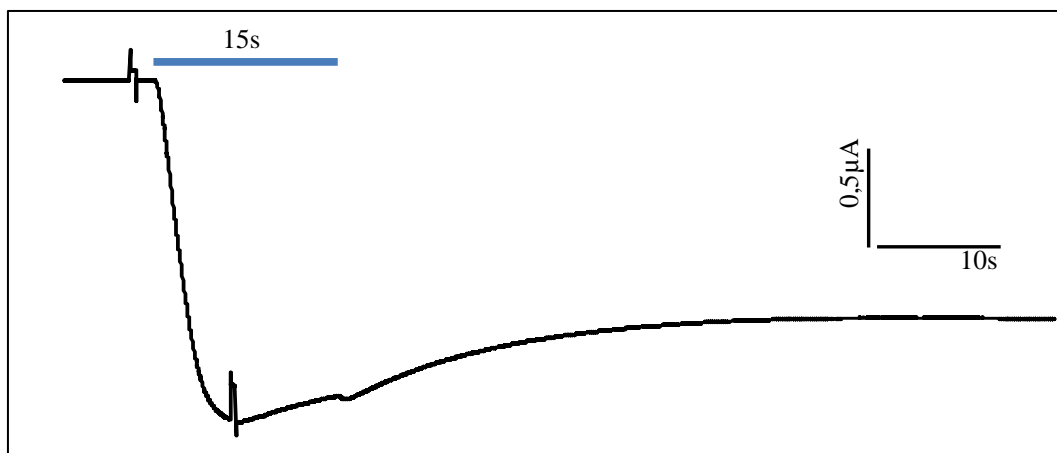


Abbildung 3.42 Exemplarische Darstellung einer DEVC-Messung des Fusionskonstruktes CNGA2_2A_EuPAC nach Expression in Oocyten von *X. laevis*. Nach Belichtung für 15 Sekunden kam es zu deutlichen Einwärts-Strömen (ORi-Standard Lösung, pH 7,6). Das Klemmpotential wurde während der Messung konstant bei -50mV gehalten. Vor und während des Blaulichtpulses (blauer Balken) wurden kurze Spannungssprünge von +10mV (auf -40mV) ausgeführt, um die Zunahme des Leitwertes über das Ohm'sche Gesetz ($G=1/R=\Delta I/\Delta U$) zu bestimmen. Die Expression des Fusionskonstruktes in Oocyten fand für drei Tage bei 16-18°C statt.

Insgesamt variierte die absolut gemessene Stromamplitude stark, die Funktion dieses Fusionskonstruktes konnte jedoch wiederholt gezeigt werden. Kurz vor dem Blaulichtpuls und während der maximalen Stromamplitude wurde die Klemmspannung kurzzeitig um +10mV von -50mV auf -40mV erhöht, um die Zunahme des Leitwertes über das Ohm'sche Gesetz nach $1/R$ zu bestimmen. Es ergibt sich im gezeigten Fall nach der Belichtung eine Erhöhung der Leitfähigkeit um etwa 18µS.

In der folgenden Abbildung sind die über DEVC-Messungen (2.5.4.2) an Oocyten von *X. laevis* erhaltenen Stromantworten des Fusionskonstruktes CNGA2_2A_EuPAC sowie des direkten Fusionsproteins CNGA2::EuPAC (aus der Dissertation von Dr. Jens Looser, 2010) vergleichend dargestellt.

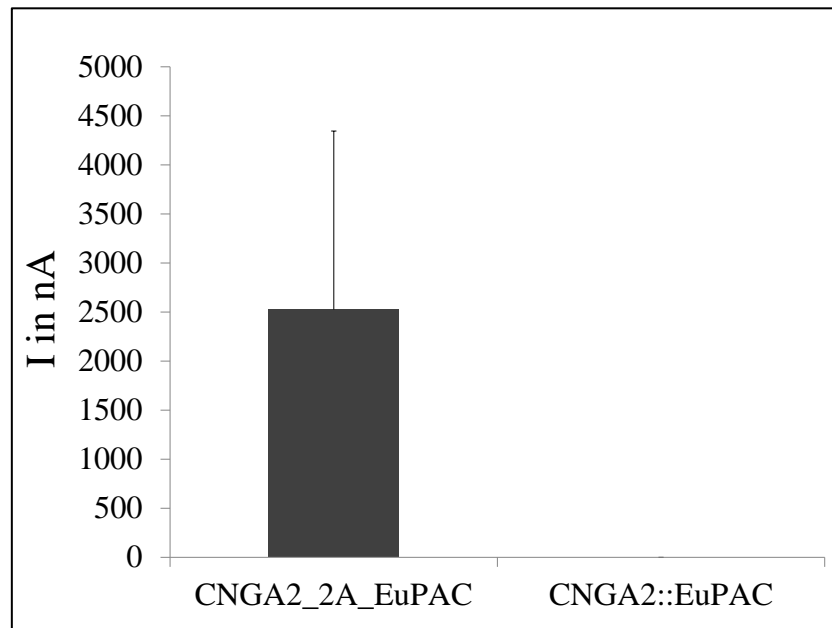


Abbildung 3.43 Funktion beider Fusionskonstrukte nach- und vor Einfügen der 2A-Sequenz. Gezeigt ist das arithmetische Mittel der Maximalströme nach Belichtung für 15 Sekunden mit blauem Licht (vgl. Abbildung 3.42) in Standard-ORi-Lösung pH 7,6 (6.4.2.5). CNGA2_2A_EuPAC: N=13; CNGA2::EuPAC: N=7. Im Falle des direkten Fusionsproteins CNGA2::EuPAC konnten keine lichtinduzierten Ströme gemessen werden.

Nach Einführung der 2A-Sequenz (2.10.4.1) konnte die Funktion des zuvor inaktiv vorliegenden, direkten Fusionsproteins CNGA2::EuPAC wiederhergestellt werden. Im arithmetischen Mittel wurden im Falle von CNGA2_2A_EuPAC Ströme von etwa 2,5 μ A bestimmt, bei dem direkten Fusionsprotein CNGA2::EuPAC hingegen konnten keine Ströme gemessen werden. Nach separater Injektion der RNA von CNGA2 und EuPAC α (in der Dissertation von Dr. Jens Looser, 2010, Abb. 3.14) wurden Ströme von etwa 4 μ A (arithmetisches Mittel) bei einer Klemmspannung von -40mV und einer Belichtungsdauer von 16s beschrieben.

3.6.1.2 Quantifizierung und Vergleich der cAMP-Produktion

Neben der elektrophysiologischen Funktionsbestätigung des Fusionskonstruktes CNGA2_2A_EuPAC wurde dessen Adenylatcyclase-Aktivität auch immunologisch nach heterologer Expression in Oocyten nachgewiesen. Hierzu wurde der cAMP-Gehalt nach Belichtung mit blauem Licht mittels ELISA (2.6.1) quantifiziert. Die Umsatzrate des Fusionskonstruktes wurde verglichen mit Jener frei vorliegender EuPAC α . Hierfür wurde die mRNA für CNGA2_2A_EuPAC und EuPAC α näherungsweise äquimolar injiziert (ca. 30ng CNGA2_2A_EuPAC und ca. 20ng EuPAC α) und die Expression in den Oocyten jeweils für drei Tage gewährt. Zusätzlich wurden Oocyten belichtet und gemessen, welche das direkte Fusionsprotein CNGA2::EuPAC (nach Injektion von ebenfalls 30ng mRNA) exprimierten, welches in der Dissertation von Dr. Jens Looser 2010 kloniert und beschrieben wurde. Weiterhin wurde der cAMP-Gehalt in Kontroll-Oocyten bestimmt, welchen keine RNA injiziert wurde.

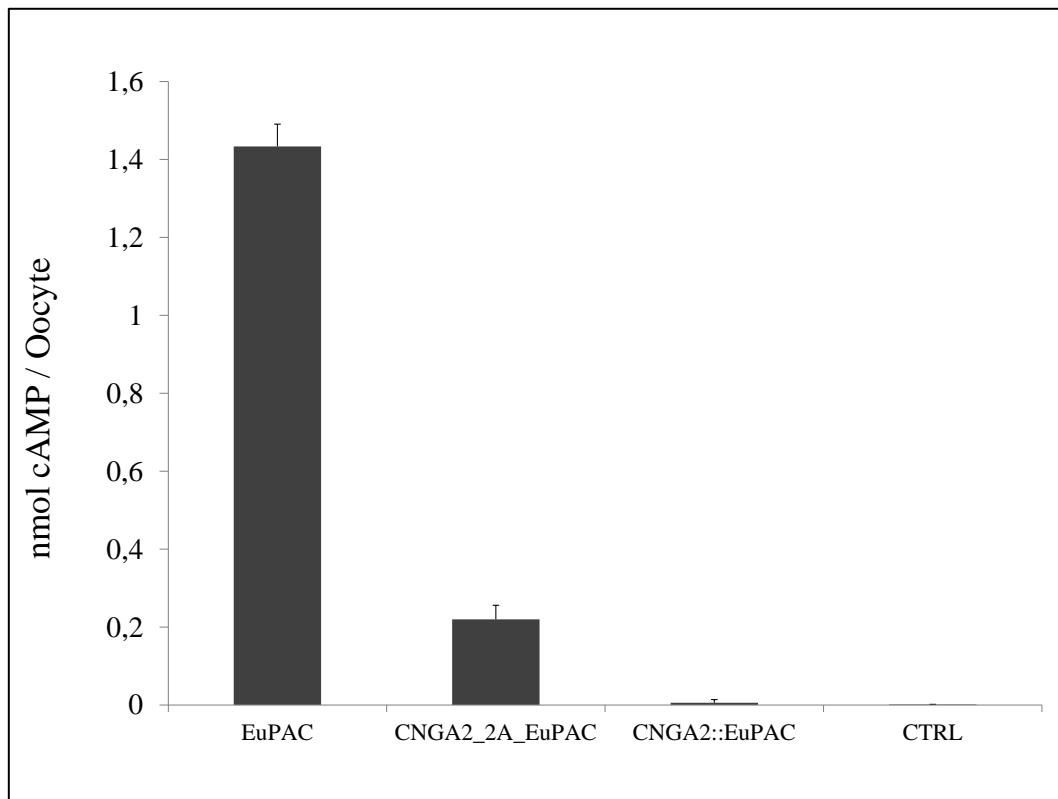


Abbildung 3.44 Quantifizierung der cAMP-Produktion in Oocyten. Verglichen wurden die cAMP-Konzentration nach Belichtung für zehn Minuten mit blauem Licht von frei vorliegender *EuPAC α* , der beiden Fusionskonstrukte CNGA2_2A_*EuPAC* und CNGA2::*EuPAC* sowie von uninjizierten Kontroll-Oocyten (CTRL). Die RNA aller Konstrukte wurde näherungsweise äquimolar injiziert. Hierzu wurden 30ng CNGA2_2A_*EuPAC* bzw. CNGA2::*EuPAC*, und 20ng *EuPAC α* injiziert. (CNGA2::*EuPAC* und CNGA2_2A_*EuPAC*: ca. 5,2kb, *EuPAC α* ca. 3kb) Die Expression der Proteine fand für drei Tage bei 16-18°C statt.

Das Fusionskonstrukt CNGA2_2A_*EuPAC* war in der cAMP-Produktionsrate im Vergleich zu frei vorliegender *EuPAC α* zwar eingeschränkt, aber dennoch funktional. Die Menge an produziertem cAMP durch CNGA2_2A_*EuPAC* nach einer Belichtungsdauer von zehn Minuten entsprach etwa einem Siebtel der Menge, welche von äquimolar, frei vorliegender *EuPAC α* nach gleicher Belichtungsdauer (zehn Minuten, 456nm) generiert wurde. Die Umsatzrate und damit Funktion der C-terminal fusionierten Adenylatcyclase im Fusionskonstrukt CNGA2_2A_*EuPAC* ist jedoch deutlich höher als jene des direkten Fusionsprotein CNGA2::*EuPAC*, wo es zu keiner Erhöhung der cAMP-Produktion nach Belichtung kam. Auch in belichteten Kontroll-Oocyten konnte nur eine geringe endogene cAMP-Menge nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

4.1 Channelrhodopsin *In Planta*

4.1.1 Einsatz der Channelrhodopsin-Varianten C128A und C128T

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Channelrhodopsinvarianten C128A::YFP und C128T::YFP (unveröffentlichte Daten von R. Gueta und G. Nagel 2008, Berndt et al.,2009, Bamann et al.,2010) mit dem Ziel eingesetzt, lichtinduziert Änderungen des Membranpotentials und der cytoplasmatischen Calciumkonzentration in pflanzlichen Zellen zu erzeugen, um in der Folge nicht-invasiv *downstream* stattfindende Prozesse (Schulzlessdorf und Hedrich, 1995; De Koninck, 1998; McAinsh und Pittman, 2009. s. 1.5) über applizierte Lichtmuster zu manipulieren und zu steuern (s. 1.7). Die prinzipielle Funktion der beiden eingesetzten Channelrhodopsinvarianten konnte in Patch-Clamp-Messungen an transient transfizierten epidermalen Protoplasten von *N. benthamiana* gezeigt werden (Abbildung 3.4, Abbildung 3.5).

Um die Proteinexpression sowie die korrekte Lokalisation in der Plasmamembran pflanzlicher Zellen zu verfolgen, wurden beide oben genannten Channelrhodopsin-Varianten im Vorfeld mit dem Fluoreszenzprotein YFP fusioniert. Da sich jedoch die Anregungswellenlänge von YFP mit der Aktivierungswellenlänge von Channelrhodopsin-2 (max. 450nm-470nm) überschneidet, war eine Identifikation der transgenen Protoplasten über die Fluoreszenz nicht ohne eine bereits bei der Lokalisation dieser Zellen stattfindende Aktivierung von Channelrhodopsin möglich.

Da die verwendeten Channelrhodopsinvarianten gegenüber dem Wildtyp ohnehin eine erhöhte Lichtempfindlichkeit aufweisen (Bamann et al., 2010), ist daher davon auszugehen, dass es bereits im Vorfeld der eigentlichen Messung zur Daueraktivierung von Channelrhodopsin kam. Aufgrund des pH-Wertes der verwendeten Messlösung (pH 5,6) kam es folglich zur Ansäuerung des Cytoplasmas und damit vermutlich zur Schädigung der Protoplasten. Nach der Ausbildung des Gigaseals (2.5.5.1) wurde daher einige Minuten gewartet, bis sich die gepufferte Messlösung der Patchpipette (pH 7,6) mit dem Cytoplasma ausgetauscht hatte, bevor die Messungen begonnen wurden.

In den gezeigten Patch-Clamp-Messungen an Protoplasten wurden Messlösungen gewählt, die bis auf den pH-Wert in Bad- und Patchelektrode symmetrisch vorlagen. Da die Leitfähigkeit von Channelrhodopsin für Protonen am höchsten ist (Nagel et al., 2003), sollte so ein deutlicher, lichtinduzierter Protoneneinstrom zunächst die generelle Funktion dieses Kanals in Pflanzenzellen zeigen. Auf die Folge eines kurzen Blaulichtpulses (100ms) konnten schnelle, lichtinduzierte Einwärts-Ströme an Protoplasten, und damit die Funktion der beiden verwendeten Channelrhodopsin-Varianten C128A und C128T erstmals in Pflanzenzellen gezeigt werden (Abbildung 3.4, Abbildung 3.5). Der Versuch jedoch, Channelrhodopsin-2-Wildtyp in Pflanzenzellen stabil oder auch nur transient zu exprimieren sowie funktionell zu charakterisieren, scheiterte in wiederholten Ansätzen (s. 4.1.4).

Es ist aus vorangegangenen Versuchen (unveröffentlichte Daten von Sybille Ullrich und Georg Nagel) an Oocyten bekannt, dass einige Channelrhodopsinvarianten auch ohne zusätzlich zugeführtes Retinal gebildet und in die Plasmamembran von Oocyten eingebaut werden können, wie anhand vergleichender Fluoreszenzintensitätsmessungen beobachtet wurde. Bei einigen Channelrhodopsin-Varianten führt auch die nachträgliche Zugabe von Retinal zu dem bereits exprimierten und in der Plasmamembran lokalisierten Protein zur Zunahme der lichtinduzierten Ströme (Bsp.: Channelrhodopsin-2 T159Y, bis dato unveröffentlichte Daten aus der Dissertation von Sybille Ullrich, 2012).

Auch eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Bindeaffinität einiger Mutanten gegenüber Retinal (darunter die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Varianten C128A und C128T) wird diskutiert und erste Hinweise in *dose-response* Messungen bestätigen diese Vermutung (persönliche Rücksprache mit Prof. Dr. Georg Nagel sowie unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe). Der genaue Mechanismus der retinalunabhängigen Expression dieser Channelrhodopsinvarianten ist jedoch bislang nicht weiter aufgeklärt. Die Wahl und der Einsatz der o.g. Varianten zur Expression in Pflanzenzellen sind daher rein empirisch begründet. Für die Funktion von Channelrhodopsin als lichtaktivierbarer Kationenkanal ist das Chromophor Retinal als Cofaktor des Proteins unabdingbar. Auf die Problematik der Retinalsupplementierung soll im Folgenden eingegangen werden.

4.1.2 Retinalsupplementierung und Proteinexpression

Die Fluoreszenzintensität und damit die Expressionsstärke der beiden Channelrhodopsinvarianten C128A und C128T war in transient transfizierten Protoplasten von *N. benthamiana* sowohl ohne, als auch mit extern zugeführtem Retinal (100 μ M) nahezu identisch (Abbildung 3.2). Auch bei den in Patch-Clamp-Messungen erhaltenen lichtinduzierten Stromantworten wurde kein signifikanter Unterschied in der Stromamplitude zwischen Protoplasten beobachtet, welchen Retinal etwa zwanzig Stunden vor der Messung in der Konzentration 100 μ M zugeführt wurde und Protoplasten, welche Channelrhodopsin vollständig ohne die externe Zugabe von Retinal exprimierten und im Anschluss gemessen wurden ($p=0,182$, Mann-Whitney U-Test, Abbildung 3.8). Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass Retinal sehr schlecht oder nicht funktional über die Protoplastenmembran aufgenommen werden kann.

Sowohl die Enzymlösung zur Protoplastierung (6.4.4.3) als auch die Messlösung, in welcher die Protoplasten isoliert bzw. gemessen wurden, hatten einen sauren pH-Wert (pH5,6), daher liegt beispielsweise eine Reduktion der Aldehydgruppe des Retinals unter diesen Bedingungen nahe. Zudem stellen konjugierte Doppelbindungen im Alkylrest des Retinals potentielle Angriffspunkte für mögliche Oxidationsreaktionen dar, was die Funktion von Retinal als essentiellen Cofaktor von Channelrhodopsin ebenfalls verhindern würde. Somit ist es nicht unwahrscheinlich, dass das zugegebene Retinal, noch bevor es seinen Bestimmungsort in der Pore von Channelrhodopsin erreichte, chemisch modifiziert wurde und in der Folge nicht mehr in ausreichendem Maße funktional vorlag.

Zudem deuten die fluoreszenzmikroskopisch beobachtete, starke Expression der Proteine (Abbildung 3.2), sowie die Messbarkeit lichtinduzierter Ströme auch ohne die externe Zugabe von Retinal (Abbildung 3.8) auf die Gegenwart von pflanzenendogenem Retinal hin.

Dies ist durchaus denkbar, findet sich doch β -Carotin, ein Dimer aus zwei Retinal-Untereinheiten und Vorläufer in der tierischen Retinal-Biosynthese, in den Plastiden vieler pflanzlicher Zellen. Auch gibt es Hinweise in der Literatur auf pflanzenendogenes Retinal. In Blattextrakten von *L. esculentum aurea* beispielsweise konnte Retinal gaschromatographisch nachgewiesen werden (Lorenzi et al., 1994).

Die bei den beiden verwendeten Varianten von Channelrhodopsin-2 (4.1.1) vermutete, gegenüber dem Wildtyp erhöhte Affinität zum Retinal (persönliche Rücksprache mit Prof. Dr. Georg Nagel, s. 4.1.1) würde zudem erklären, warum bei sehr geringen Konzentrationen an pflanzenendogenem Retinal kein Channelrhodopsin-Wildtyp-Protein, jedoch das Protein der Channelrhodopsinvarianten C128A und C128T stabil exprimiert und nachgewiesen werden konnte.

Denkbar ist weiterhin ein in Pflanzen vorkommendes Retinal-Analogon, welches eine Expression und stabile Integration des Proteins in die Membran auch ohne die Gegenwart von *All-Trans* Retinal erklären würde.

Dieses hypothetische Retinal-Analogon müsste jedoch für die gezeigte Funktion von Channelrhodopsin in Pflanzenzellen (Abbildung 3.4, Abbildung 3.5) in der Lage sein, wie *All-Trans*-Retinal eine Schiff'sche Base mit dem Lysin-257 des Channelrhodopsin-Apoproteins einzugehen, sowie auf die Folge von Blaulicht zu photoisomerisieren. Im Fall einer kompetitiven Bindung in der Retinalbindetasche von Channelrhodopsin würde ein hypothetisches Analogon die nichtsignifikante Zunahme der Stromamplitude nach weiterer Retinal-Zugabe, sowie die insgesamt sehr geringen gemessenen Ströme erklären. Jedoch wurde weder ein Unterschied in der Kinetik noch in der Absorptionswellenlänge beobachtet, was zumindest bei einem funktionellen, von Retinal verschiedenen Chromophor anzunehmen wäre.

Die Verfügbarkeit bzw. Zugänglichkeit von funktionellem *All-Trans*-Retinal ist somit sehr wahrscheinlich *ein*, wenn nicht *der* limitierende Faktor, um in Pflanzenzellen durch Verwendung von Channelrhodopsin lichtgesteuerte und physiologisch relevante Änderungen der cytoplasmatischen Calciumkonzentration oder des Membranpotentials zu generieren.

4.1.3 Eingeschränkte Funktion in Pflanzenzellen

Die in Patch-Clamp-Messungen beobachteten Ströme der Channelrhodopsinvariante C128T::YFP in transient transfizierten Protoplasten von *N. benthamiana* waren im Vergleich zu den in tierischen Zellen gemessenen Werten sehr klein. So wurde in Protoplasten eine durchschnittliche Stromdichte von nur etwa 1,5pA/pF bestimmt (Abbildung 3.8), in tierischen Zellen liegt diese etwa zwei Größenordnungen darüber. Neben den in 4.1.2 genannten Limitationen bei der Retinal-supplementierung ist hier zudem die Beschaffenheit der pflanzlichen Plasmamembran zu diskutieren. Eine ungeeignete Lipidkomposition beispielsweise oder die Gegenwart bzw. Abwesenheit strukturgebender Proteine in der Membran könnte die für den Photocyclyc notwendige Bewegungsfreiheit und damit die lichtinduzierte Leitfähigkeit von Channelrhodopsin einschränken.

Auch die Abwesenheit bei der Translation möglicherweise notwendiger Chaperone in Pflanzen, oder eine von tierischen- und Algenzellen verschiedene codon-usage könnte ein (jedoch unwahrscheinlicher) Grund für die im Vergleich zu tierischen Zellen deutlich geringeren Channelrhodopsinströme sein.

Neben diesen möglicherweise physiologisch bedingten Einschränkungen der Funktion von Channelrhodopsin in Pflanzenzellen ist auch eine vorzeitige Aktivierung der Channelrhodopsine durch blaues Laserlicht (für die Detektion transgener Protoplasten über ihre YFP-Fluoreszenz) denkbar und wahrscheinlich. Kommt es hierdurch bereits vor der Messung zur Aktivierung der Kanäle und in der Folge zur Ansäuerung des Cytoplasmas, wäre dies ebenfalls Grund für die beobachtete, gering ausfallende lichtinduzierte Stromantwort. Auch die Tatsache, dass die lichtsensitivere Channelrhodopsinvariante C128A (Bamann et al., 2010) aufgrund der vergleichsweise seltenen Sealbildung sehr viel schlechter in Protoplasten zu messen war, deutet darauf hin, dass es zu einer vorzeitigen Aktivierung der Kanäle und damit zur Schädigung der Zellen kam. Es war zudem zu beobachten, dass bereits etwa 15-20 Minuten nachdem die Protoplasten aus der Dunkelheit in die Patch-Kammer überführt wurden, kaum noch intakte Channelrhodopsin C128A-exprimierende Protoplasten auszumachen waren. Somit wurde zwar einerseits die Funktion, andererseits aber auch die nicht-Eignung für die Verwendung dieser Mutanten in Pflanzenzellen gezeigt. Vermutlich befanden sich die in der vorliegenden Arbeit verwendeten und in Pflanzenzellen exprimierten Channelrhodopsinvarianten auch nach kürzester Lichtexposition im offenen Zustand, was die Ionenhomöostase, das Membranpotential und den pH-Wert des Protoplastencytoplasmas stark beeinflusste und störte.

4.1.4 Strategiewechsel

Die prinzipielle Funktion von Channelrhodopsin in Pflanzenzellen konnte elektrophysiologisch sowohl durch Einstichmessungen in Blattscheiben (Abbildung 3.3), als auch durch Patch-Clamp-Messungen an Protoplasten (Abbildung 3.4, Abbildung 3.5) nach transienter Transfektion gezeigt werden. Der Versuch jedoch, stabil transgene Pflanzen zu generieren, scheiterte wiederholt. Weder in Western Blots zur Detektion des Proteins noch fluoreszenzmikroskopisch konnte die Expression der verwendeten Channelrhodopsinvarianten unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors (2.10.1.2) nachgewiesen werden. Die Gegenwart und Transkription der jeweiligen Gene im pflanzlichen Genom jedoch konnte mittels RT-PCR (*Reverse Transcriptase-PCR*) gezeigt werden. Vermutlich verhinderten daher silencing-Prozesse die stabile Expression von Channelrhodopsin in diesen Pflanzen. Auch der Versuch verschiedene Channelrhodopsinvarianten unter der Kontrolle eines östrogeninduzierbaren Promotorsystems (vgl. 2.10.2.3) zu exprimieren, führte nicht zum erhofften Erfolg der stabilen Transgenisierung von *A. thaliana* (diese Daten sind Bestandteil der anfänglich kooperativ angefertigten Dissertation von Melanie Baumann, 2012, und sind hier nach persönlicher Mitteilung erwähnt).

Jedoch wären stabil Channelrhodopsin-exprimierende Pflanzen ohnehin schwer anzuziehen, bzw. funktionell zu charakterisieren. Liegt in pflanzlichen Zellen kein endogenes Retinal vor, so ist auch keine Funktion von Channelrhodopsin oder den daraus abgeleiteten Varianten anzunehmen. Die nachträgliche Supplementierung von Retinal zum bereits exprimierten Protein führte in den durchgeführten Patch-Clamp-Messungen nicht zur signifikanten Funktionssteigerung (Abbildung 3.8, s. 4.1.2). Besonders eine systemische Applikation von Retinal zur funktionellen Expression von Channelrhodopsin in allen Pflanzenteilen wäre nicht realisierbar. Denkbar wäre eine - möglicherweise ebenfalls induzierbare - Expression Retinal-produzierender Enzyme bzw. Enzymkaskaden, welche Retinal in der Pflanze *de novo* synthetisieren und so direkt zur Verfügung stellen könnten.

Im Falle einer Gegenwart von pflanzenendogenem Retinal in Pflanzenzellen (wie in 4.1.2 diskutiert wurde), käme es bereits unter normalen Licht- und Wachstumsbedingungen zur dauerhaften Aktivierung von Channelrhodopsin und damit zur Störung der gesamten Ionenhomöostase der Zellen. Die Pflanzen müssten in diesem Fall vollständig unter Rotlichtbedingungen angezogen werden, um eine Aktivierung von Channelrhodopsin zu verhindern. Die Tatsache, dass unter normalen Lichtbedingungen keine stabil Channelrhodopsin-exprimierenden Pflanzenlinien generiert werden konnten, sowie die beobachteten Ströme in Protoplasten auch ohne die Zugabe von Retinal, lassen die Expression von Channelrhodopsin in pflanzlichen Zellen letal erscheinen.

Aufgrund der Probleme bei der Retinal-Supplementierung (bzw. der ausreichenden Verfügbarkeit und Zugänglichkeit von endogenem Retinal in pflanzlichen Zellen) kommt es vermutlich zu den beobachteten, relativ kleinen Channelrhodopsin-Strömen. Folglich ergibt sich das Problem, lichtinduzierte und physiologisch-relevante Erhöhungen der cytoplasmatischen Calciumkonzentration oder Änderungen des Membranpotentials zu erzeugen. Eine Leitfähigkeit für Calcium ist zwar prinzipiell in beiden verwendeten Mutanten, wie auch im Wildtyp von Channelrhodopsin-2 gegeben (Nagel et al., 2003; Caldwell et al., 2008), jedoch verglichen mit den Leitfähigkeiten für Protonen, Natrium oder Kalium deutlich geringer.

Eine durch Channelrhodopsin hervorgerufene Änderung in der cytoplasmatischen Calciumkonzentration wäre daher stets überlagert von Membranpotential- und pH-abhängigen Effekten, und könnte nicht isoliert hervorgerufen bzw. untersucht werden. Aufgrund der gemessenen, ohnehin sehr geringen Protonenstromdichte (Abbildung 3.8) von Channelrhodopsin in Pflanzenzellen erschien es daher nicht sinnvoll, weitergehende Bemühungen, lichtinduzierte Calciumsignaturen über den Einsatz von Channelrhodopsin bzw. daraus abgeleiteten Varianten zu generieren, anzustellen.

Da es jedoch die erklärte Absicht der vorliegenden Arbeit war, lichtinduzierte Änderungen der cytoplasmatischen Calciumkonzentration sowie des Membranpotentials zu generieren (1.7), wurde die Strategie zur Verwirklichung dieser Ziele grundlegend geändert.

Ausgehend von Gegenwart und Funktion endogener, calciumpermeabler und cNMP-aktivierter Kationenkanäle (Clough et al., 2000; Frietsch et al., 2007; Urquhart, 2011; s. 1.4.1, 1.4.2), wurde die lichtaktivierbare Adenylatcyclase *bPAC* aus *Beggiatoa spec.* (=BlaC, Ryu et al., 2010; Stierl et al., 2011) und eine daraus abgeleitete Guanylatcyclase *bPGC* (=BlgC nach Ryu et al., 2010) transient und stabil in Pflanzen exprimiert, um die cytoplasmatische Konzentration der cyclischen Nucleotide cAMP und cGMP lichtinduziert zu erhöhen.

In der Folge sollten cNMP-aktivierte- und calciumpermeable CNG-Kanäle indirekt über Licht angesteuert- und auf diese Weise ein nichtinvasiv-induzierter Calciuminflux erzeugt werden. In der folgenden Abbildung ist die theoretische Funktionsweise dieser Pflanzen schematisch dargestellt.

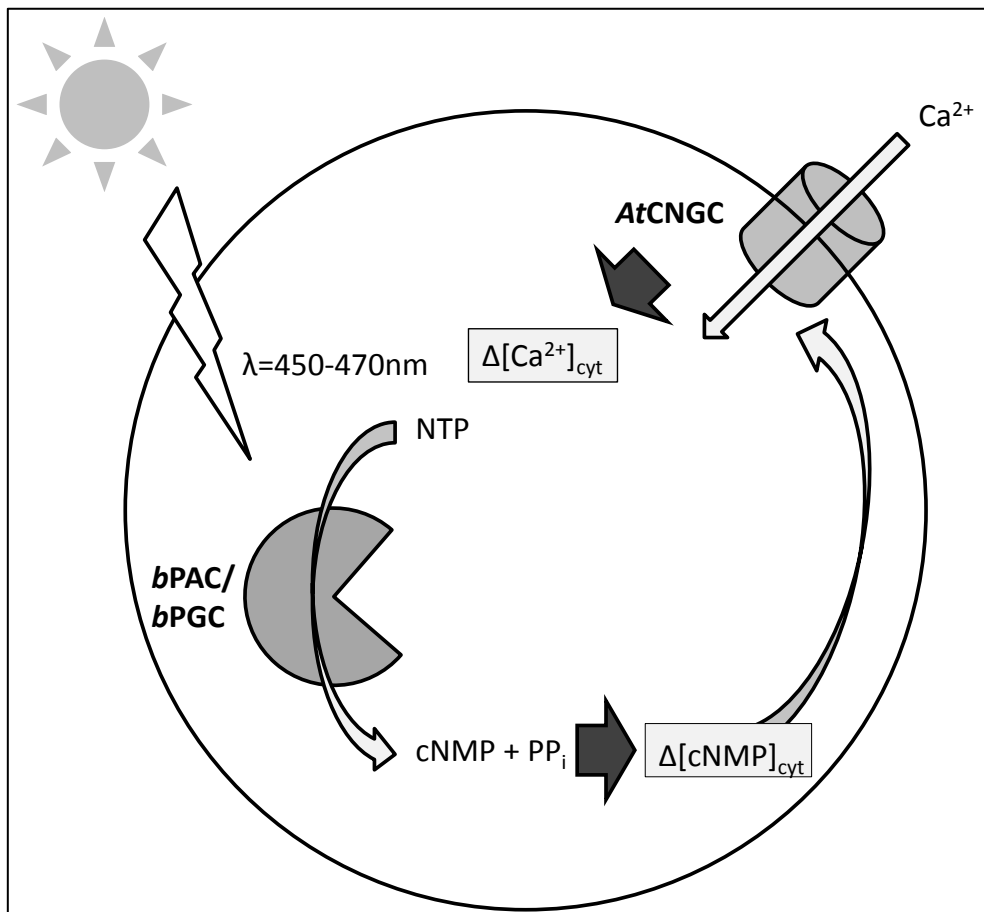


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung und Funktionsweise der indirekt-lichtgesteuerten Aktivierung pflanzenendogener, cNMP-aktivierter und calciumpermeabler Ionenkanäle (cyclic nucleotide gated channels, CNGCs, 1.4.1, 1.4.2) zur nichtinvasiven Induktion cytoplasmatischer Calciumsignaturen. Durch die Belichtung von *bPAC* bzw. *bPGC* mit blauem Licht (450-470nm) kommt es zu deren Aktivierung und somit zur Produktion von cyclischen Nucleotiden (cNMP). In der Folge kommt es zur Öffnung endogener, cNMP-gesteuerter Calciumkanäle und zum Einstrom von Calcium.

Auf die Folge der Aktivierung von *bPAC* (bzw. *bPGC*) durch blaues Licht kommt es zunächst zur Produktion von cyclischen Nucleotiden und hierdurch zur Aktivierung cNMP-gesteuerter und calciumpermeabler Kationenkanäle (Clough et al., 2000; Frietsch et al., 2007; Übersicht in Kaplan, 2007; Übersicht in Dietrich et al., 2010). Auf diese Weise sollte ein Einstrom von Calcium indirekt über Licht induziert werden können.

Dieser Ansatz ist zudem unabhängig von Retinal oder einem anderen essentiellen, in der Pflanze nicht vorhandenen oder supplementierbaren Cofaktor. Der einzige für die Funktion der Cyclase nötige Cofaktor FAD (Flavin Adenin Dinucleotid) liegt in Pflanzenzellen vor, wo eine Rolle bei der natürlichen Nitratreduktion beschrieben wird (Beevers und Hageman, 1969).

Die Expression der Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* in den erstellten stabil transgenen Pflanzenlinien (3.4) wurde unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotorsystems reguliert (Zuo et al., 2000), um ein Wachstum der Pflanzen in Abwesenheit des Induktors unter normalen Licht- und Wachstumsbedingungen zu gewährleisten (2.10.2.3).

4.2 Transiente Expression lichtaktivierter Nucleotidcyclasen in Pflanzen

4.2.1 Quantifikation cyclischer Nucleotide

Vor der Erstellung der transgenen Pflanzenlinien *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* wurde die Funktion beider lichtaktivierten Nucleotidcyclasen nach transienter Transfektion in Protoplasten von *A. thaliana* (Yoo et al., 2007, 2.4.4.4) getestet. Die Werte der cNMP-Konzentrationen in den gezeigten Messungen zeigten eine relativ große Streuung. Dies wird verständlich, wenn man die variierende Gesamtzellzahl der Protoplasten in der Transfektionscharge, sowie eine unterschiedliche Transfektionseffizienz in Betracht zieht. Bei den gezeigten Messungen wurde die Zahl der Protoplasten durch Auszählen in der Thomakammer abgeschätzt und die Transfektionsrate anteilmäßig bestimmt. Ab einer Transfektionsrate größer 50% und einer Zellzahl von etwa $1,3 \cdot 10^5$ Protoplasten wurden die Proben für die Bestimmung der cAMP- bzw. cGMP-Konzentrationen herangezogen. Die Transfektionseffizienz stieg deutlich an, wenn die Protoplasten nach dem Protoplastierungsverdau über Nacht bei Raumtemperatur in W-5-Lösung gehalten wurden. Das Alter der Pflanzen sollte für die Transfektion zwischen drei und sechs Wochen nach der Aussaat liegen (Yoo et al., 2007), Protoplasten älterer Pflanzen ließen sich deutlich schlechter transfizieren. Zur Probenentnahme für die ELISA-Messungen (2.6.1) wurden die transfizierten Protoplasten durch kurzes Zentrifugieren pelletiert, der Überstand abgenommen, das Pellet gegebenenfalls belichtet und anschließend in definierten Volumina 0,1M HCl aufgenommen. Die Abnahme des Überstandes hatte unter Rotlicht zu erfolgen, um die Nucleotidcyclasen nicht vorzeitig und unkontrolliert zu aktivieren. Es kann somit nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der Überstand vollständig entfernt wurde und die bestimmte cNMP-Konzentration hierdurch eventuell verdünnt wurde. Ebenso ist eine Verschleppung von pelletierten Protoplasten nicht auszuschließen, die gezeigten Werte sind also in Relation zueinander und nicht absolut zu betrachten.

4.2.2 Expression in Pollen von *N. SR-1*

Transient *bPAC::YFP*-exprimierende Pollen von *Nicotiana SR-1* (2.2.2) wurden im Wachstum ihres Pollenschlauchs gehemmt, sobald diese mit blauem Licht belichtet wurden. In untransfizierten, sowie *bPGC*-exprimierenden Pollen konnte hingegen kein Einfluss von blauem Licht auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Pollenschlauches beobachtet werden (Abbildung 3.15).

Die Rolle cyclischer Nucleotide beim gerichteten Wachstum von Pollenschläuchen wird bereits lange diskutiert. So zeigten Moutinho und Mitarbeiter, dass in der Nähe der Spitze wachsender Pollenschläuche lateral appliziertes, membranpermeables dibutyryl-cAMP die Richtung des Pollenschlauchwachstums positiv beeinflusste (Moutinho et al., 2001). Auch konnte die Bedeutung eines cNMP-aktivierten Calciumkanals beim gerichteten Pollenschlauchwachstum gezeigt werden. So wurde der cNMP-aktivierte Kationenkanal *AtCNGC-18* nach GUS-Reporter Studien ausschließlich in Pollen von *A. thaliana* gefunden, in anderen Pflanzengeweben wurde keine Expression dieses Kanals beobachtet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch den *Knock-out* des Kanals *AtCNGC-18* das Wachstum der Pollenschläuche stark beeinträchtigt wurde und entsprechende Pflanzen steril waren (Frietsch et al., 2007).

Nach der heterologen Expression von *AtCNGC-18* in *E. coli* konnte zudem eine Akkumulation von Calcium in den Zellen und damit eine Calciumleitfähigkeit dieses Kanals nachgewiesen werden. Demnach ist der cNMP-aktivierte Kationenkanal *AtCNGC-18* in Pollen von *A. thaliana* Integrationsstelle cNMP-basierter Calciumsignale. Nach einem ebenfalls in dieser Arbeit vorgestellten Modell kommt es durch eine lokale Erhöhung cyclischer Nucleotide sowie einer apikal verstärkten Expression von *AtCNGC-18* zu einem von der Pollenschlauchspitze ausgehenden Calciumgradienten. Dieser ermöglicht, eventuell auch über eine sekundäre Aktivierung weiterer calcium- oder spannungsgesteuerter Kanäle, ein gerichtetes Pollenschlauchwachstum (Frietsch et al., 2007).

Bereits Ende des letzten Jahrhunderts konnte ein von der Pollenschlauchspitze ausgehender oszillierender Calciumgradient gezeigt werden, welcher in direktem Zusammenhang mit dem Wachstum des Pollenschlauches stand (Holdaway-Clarke et al., 1997).

Die Daten vieler Arbeiten zum gerichteten Pollenschlauchwachstum legen die Gegenwart eines cNMP-Gradienten bzw. eine apikal verstärkte Expression von CNG-Kanälen als Notwendigkeit für eine Richtungsinformation nahe (Holdaway-Clarke et al., 1997; Moutinho et al., 2001; Rato et al., 2004; Frietsch et al., 2007). In einer Arbeit von Rato und Mitarbeitern konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Erhöhung der cAMP-Konzentration auch mit einem Anstieg der Calmodulin-Aktivität einhergeht. Zudem wurde ein direkter Zusammenhang eines von der Pollenschlauchspitze ausgehenden cAMP-Gradienten mit einem Calmodulin-Aktivitätsgradienten postuliert und beschrieben (Rato et al., 2004).

Da die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Expression der lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* im gesamten Cytoplasma des Pollenschlauch homogen verteilt ist (Abbildung 3.15), ist auch eine gleichmäßige Verteilung der gebildeten cyclischen Nucleotide nach Aktivierung der jeweiligen Nucleotidcyclasen durch Licht anzunehmen. Somit wären auf cNMP-Gradienten basierende Richtungsinformationen aufgehoben und ein gerichtetes Pollenschlauchwachstum könnte nicht mehr stattfinden. Andererseits wäre durch einen erhöhten cNMP-Gehalt und folglich die Aktivierung von CNG-Kanälen die gesamte Ionenhomöostase gestört und man würde ein Anschwellen oder Platzen der Pollenschläuche erwarten, wie es beispielsweise auf die Folge von Calciumeinstrom beschrieben wurde (Dresselhaus und Marton, 2009). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit in keinem Fall beobachtet.

Sehr wahrscheinlich ist daher eine Integration weiterer Signalkomponenten bzw. Second Messenger notwendig, die konzertiert für die Steuerung des gerichteten Pollenschlauchwachstums agieren müssen (Übersicht in Hepler et al., 2011). Beispielsweise ist eine Interaktion von cyclischen Nucleotiden und Calmodulin bei der Aktivierung von CNG-Kanälen beschrieben worden (Liu et al., 1994; Kohler et al., 1999). Auch ist eine für die Aktivierung endogener CNG-Kanäle optimale Konzentration cyclischer Nucleotide in Pflanzen denkbar, welche bei einer deutlichen Überhöhung (Spiteri et al., 1989; Witters et al., 1996; vgl. Abbildung 3.26.) zur Aktivierung regulatorischer Gegenmechanismen führt.

Weiterhin ist zu überlegen, ob es sich bei dem eingestellten Wachstum der Pollenschläuche nicht um einen direkten cAMP-Effekt, sondern um einen ATP-Mangeleffekt handeln könnte, wird doch in kürzester Zeit sehr viel ATP zur cAMP-Produktion verbraucht. Je nach ATP-Nachbildungs-Geschwindigkeit könnte also ein akuter ATP-Mangel in den Pollenschläuchen ebenfalls Grund für das eingestellte Wachstum der Pollenschläuche sein.

Besonders die Tatsache, dass die lichtaktivierte Guanylatcyclase *bPGC* nach Expression in Pollen nicht zum selben Effekt führte, obwohl im Vergleich zu den basalen, kaum nachweisbaren cNMP-Konzentrationen (in Blattscheiben, s. Abbildung 3.25, Abbildung 3.26), sowohl cAMP als auch cGMP übermäßig produziert werden, deutet darauf hin, dass es sich bei dem eingestellten Pollenschlauchwachstum nicht zwingend ausschließlich um direkt von cNMP-hervorgerufene Effekte handeln muss. In Blattscheiben der stabil transgenen Pflanzenlinie konnte beispielsweise auch gezeigt werden, dass ein länger als acht Minuten anhaltender Blaulichtimpuls nicht zur maßgeblichen Steigerung der cAMP-Konzentration führte (Abbildung 3.22). Wurden diese Pflanzen jedoch über 24 Stunden oder länger im Dauerlicht gehalten, konnte eine deutlich höhere Menge an cAMP akkumuliert werden (Abbildung 3.24). Diese Daten deuten auf einen akuten ATP-Mangel als vorübergehend limitierenden Faktor der cAMP-Produktion in diesen Blattproben hin. Somit könnte auch ein akuter ATP-Mangel in *bPAC::YFP*-exprimierenden Pollen das im Licht eingestellte Wachstum der Pollenschläuche erklären.

Es war leider nicht möglich, die transient transfizierten Pollen bzw. deren auswachsende Pollenschläuche vor dem ersten Blaulichtkontakt in ihrem Wachstum zu filmen und anschließend direkt zu dokumentieren, wie das Pollenschlauchwachstum unter Blaulichteinfluss gestoppt wurde. Durch die PIG-Transfektion von Pollen wurde eine Transfektionseffizienz von etwa 0.1-1% erreicht, was bedeutet, dass transgene Pollen zunächst über ihre Fluoreszenz identifiziert werden mussten. Wie in 4.1.1 diskutiert, kommt es auch hier zur Überschneidung der Anregungswellenlänge von YFP und der Aktivierungswellenlänge der lichtaktivierten Nucleotidcyclasen, womit diese bereits beim Identifizierungsprozess transgener Pollen über YFP-Fluoreszenz aktiviert wurden. Jedoch kann anhand des in Dunkelheit uneingeschränkten Wachstums *bPAC::YFP*-exprimierender Pollenschläuche davon ausgegangen werden, dass das Wachstum erst durch die Lichtaktivierung der Adenylatcyclase inhibiert wird (vgl. Tabelle 3.1, Abbildung 3.15).

Entsprechende Messungen an Pollen der stabil transformierten Pflanzenlinien konnten nicht durchgeführt werden, da die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von Östrogen nicht im Zeitfenster zwischen Pollenkeimung und dem natürlich endendem Pollenschlauchwachstum durchgeführt werden konnte.

Im Vergleich zu Einbettungsverfahren der *N. SR-1* Pollen (2.2.2) wurden die Pollen der stabil transgenen *A. thaliana* Linie (2.2.1) durch Tupfen der auf einem Sammelnetz befindlichen Pollen auf eine östrogenhaltige Agaroseschicht aufgebracht, da *A. thaliana* Pollen für ein normales Wachstum Sauerstoffkontakt benötigen. Die Gegenwart von Östrogen in der Agarose hatte keinen direkten Effekt auf die Pollenkeimung, da sowohl *bPAC::YFP*-exprimierende Pollen als auch untransfizierte Pollen von *A. thaliana Col-0* unbeeinträchtigt von der vorliegenden Östrogenkonzentration (0, 10µM, 100µM, 1mM) keimten und wuchsen.

In keinem der Pollen der transgenen Pflanzenlinien konnte jedoch die Expression der lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* oder *bPGC::YFP* induziert werden, wie fluoreszenzmikroskopisch überprüft wurde. Auch der Versuch, Östrogen nach der erfolgten Keimung der Pollenschläuche zuzugeben, führte nicht zur erhofften Induktion der Proteinexpression im Zeitraum des Pollenschlauchwachstums.

Die Tatsache, dass die erstellten stabil transgenen Linien fertil waren zeigt aber, dass ohne Induktion der Proteinexpression normales und uneingeschränktes Pollenschlauchwachstum stattfindet. Die basale, in Blattscheiben gemessene cAMP-Produktion an uninduzierten Proben (Blattscheiben, s. Abbildung 3.21) scheint somit keinen negativen Einfluss auf das Pollenschlauchwachstum zu haben.

4.3 Stabil transgene Pflanzenlinien

4.3.1 Expression lichtaktivierter Nucleotidcyclasen in Pflanzen

Nach der Funktionsbestätigung lichtaktivierter Nucleotidcyclasen in transient transfizierten Protoplasten (3.2.2) wurden stabil transgene Pflanzenlinien auf der Grundlage von *A. thaliana Col-0* Aequorin generiert (2.4.4.1, 0). Bis zum Abschluss der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit konnte jedoch im Falle der *bPAC::YFP*-Pflanzen nur mit Pflanzen der F-1-Generation gearbeitet werden, es handelt sich demnach durchweg um Messungen und Beobachtungen an heterozygoten Pflanzen.

Pflanzen der Linie *bPGC::YFP* wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt generiert, in diesem Falle handelt es sich bei den gezeigten Daten um Messungen an Blattproben aus Pflanzen aus der F-0-Generation. Vor den Messungen zur Quantifikation cyclischer Nucleotide wurden alle Pflanzen einzeln auf ihre Transgenität getestet, indem Blätter abgeschnitten, über Nacht in Östrogenlösung (10 μ M) eingelegt und die Expression von *bPAC::YFP* bzw. *bPGC::YFP* fluoreszenzmikroskopisch (2.8.1) nachgewiesen wurde. Die Induktion der Proteinexpression für die Messungen zur Quantifizierung cyclischer Nucleotide fand, wenn nicht anders angegeben, über 48 Stunden statt, da hier anhand der Fluoreszenzintensität die stärkste Proteinexpression beobachtet wurde (3.4.1).

Es konnte indirekt gezeigt werden, dass die Expression des Proteins proportional zur vorliegenden Konzentration des Induktors Östrogen war. Bis zu einer Konzentration von 10 μ M konnte eine Zunahme der cAMP-Produktion durch die Aktivität von *bPAC::YFP* beobachtet werden (Abbildung 3.21), wobei bei einer enzymtypischen Umsatzrate eine ebenfalls mit der Östrogenkonzentration positiv korrelierende Proteinmenge angenommen werden kann. In der Literatur wird bei der Einführung dieses Promotorsystems eine für die Proteinexpression sättigende Östrogenkonzentration von 5 μ M beschrieben (Zuo et al., 2000).

Bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Östrogenkonzentration von 10µM (wenn nicht anders angegeben) fand folglich die maximal mögliche Proteinexpression statt. Auch ohne die Zugabe des Induktors Östrogen wurde sowohl bei *bPAC::YFP* als auch bei *bPGC::YFP* eine basale Adenylat- bzw. Guanylatcyclaseaktivität beobachtet, was auf eine unzureichend stringente Promotorregulation zurückzuführen ist.

Möglicherweise ist dies aber auch ein Effekt einer unspezifischen Promotoraktivierung durch Phytohormone der Klasse der Brassinosteroide. Phytohormone dieser Klasse weisen partiell strukturelle Ähnlichkeiten zum Östrogen auf, weshalb hier eine unspezifische Promotoraktivierung denkbar ist (s. 4.3.3). Auch Proben, welche nach der Induktion in Dunkelheit gehalten wurden, wiesen erhöhte cAMP- bzw. cGMP-Konzentrationen auf, was durch die beschriebene Dunkelaktivität der Cyclasen (Stierl et al., 2011) zu erklären ist. Die Expressionsstärke der lichtaktivierten Nucleotidcyclasen in den stabil transgenen Pflanzen kann somit durch die dosierte Zugabe von Östrogen im bestimmten Maße reguliert werden.

Die Induktion der Proteinexpression durch wiederholtes Benetzen der Blätter der transgenen Pflanzenlinien (welche sich in diesem Fall noch an der intakten Pflanze befanden) durch Östrogenlösung (10µM) führte nicht zu einer augenscheinlichen Veränderung der Pflanzen- oder Blattmorphologie (Abbildung 3.16, Abbildung 3.17). Es konnte hier jedoch keine flächendeckende Induktion in den Blättern erreicht werden, vermutlich ist das oxidationssensitive Östrogen nach Verdunsten der Lösung nicht mehr in der Lage, chemisch funktional physiologische Blattbarrieren zu überwinden. Bereiche jedoch, in welchen die Expression von *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* nach wiederholtem Benetzen mit östrogenhaltiger Lösung induziert werden konnte (wie fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen wurde), zeigten ebenfalls keine augenscheinliche Veränderung von Blattmorphologie oder -Histologie.

Weitere Versuche zur systemischen Induktion der Proteinexpression durch die externe Applikation von Östrogen scheiterten. So konnte weder durch Gießen mit östrogenhaltigem Gießwasser, noch durch flächendeckendes Besprühen der Blätter mit östrogenhaltiger Lösung eine systemische Expression der Nucleotidcyclasen induziert werden. Auch Versuche, Pflanzen hydroponisch (in flüssigem Nährmedium) anzuziehen und Östrogen über die Nährlösung zu supplementieren, scheiterten. Zwar kam es nach Gießen der Pflanzen mit östrogenhaltigem Gießwasser nachweislich zur Proteinexpression in Wurzeln (Abbildung 3.18), jedoch blieb ein Transport von funktionellem Östrogen innerhalb der Pflanze, und somit die erhoffte systemische Induktion aus.

Es kam in keinem Fall zur Proteinexpression in anderen als den in direktem Kontakt zur Östrogenlösung stehenden Pflanzenteilen. In parallel durchgeführten Versuchen wurden Blätter transgener Pflanzen abgeschnitten und mit der Schnittfläche in östrogenhaltiges Leitungswasser (10 μ M) gestellt. Auch hier kam es ausschließlich zur Induktion der Proteinexpression in Zellen, welche in direktem Kontakt zur Östrogenlösung standen.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass Östrogen innerhalb der Pflanze nicht, oder zumindest nicht funktional, transportiert werden kann. Somit ist eine systemische Induktion der Proteinexpression in der gesamten Pflanze durch externe Östrogen-Applikation nicht möglich.

4.3.2 Konstitutive Expression

Es wurde versucht, die Expression der lichtaktivierten Adenylatcyclase in einer weiteren stabil transgenen Pflanzenlinie unter der Kontrolle des in Pflanzen konstitutiv-aktiven Promotors 35S-CaMV zu erreichen. Nach der stabilen Transfektion von *A. thaliana Col-0* Aequorin Pflanzen (2.4.4.1) konnte zwar das eingebrachte, in der Sequenz bestätigte, Gen für *bPAC::YFP* in der genomischen DNA mittels PCR nachgewiesen werden (Abbildung 3.27), jedoch konnte weder auf fluorezenzmikroskopischer noch auf immunologischer Ebene Expression bzw. Funktion des Proteins gezeigt werden.

Die Pflanzen dieser Linie wuchsen zudem unter Weißlicht ohne augenscheinlichen Phänotyp heran. Durch die Aussaat und Selektion auf hygromycinhaltigem Medium und Wachstum unter Weißlicht wurden daher vermutlich ausschließlich Pflanzen selektioniert, welche das Gen und damit die Resistenz zwar aufgenommen hatten, das Protein *bPAC::YFP* jedoch durch aktive Silencing-Prozesse nicht exprimierten. (vgl. 4.1.3; Auch die Expression von Channelrhodopsin unter diesem Promotor führte sehr wahrscheinlich zum Silencing der Proteinexpression).

Wie in 4.3.3 diskutiert wird, ist die Samenkeimung *bPAC::YFP*-exprimierender Samen der induzierbaren transgenen Pflanzenlinie nach Östrogeninduktion stark verzögert (Abbildung 3.30). Es ist daher naheliegend, dass die konstitutive Expression des Proteins somit für die Samenkeimung ebenfalls hinderlich ist. Demnach konnten nur Samen keimen, welche die Aktivität des Proteins durch Silencing-Effekte unterdrücken konnten.

Der Versuch, die Samen dieser erstellten Linie unter Rotlichtbedingungen keimen zu lassen, steht aus. Der Ansatz zur konstitutiven Expression wurde parallel zu jenem der östrogeninduzierbaren Proteinexpression unter dem Glucocorticoid-Promotor durchgeführt (Zuo et al., 2000; 2.10.2.3). Die nach voller Induktion beobachtete starke Fluoreszenz und damit Expression von *bPAC::YFP* in Pflanzen mit dem induzierbaren Glucocorticoid-Promotorsystem führte zu der Entscheidung, ausschließlich diesen Ansatz weiter zu verfolgen.

Zudem wurde die cAMP-Produktionsrate von *bPAC* unter der Kontrolle der beiden Promotorsysteme nach Infiltration und transienter Expression in Blättern von *N. benthamiana* (2.4.4.3) verglichen. Nach maximaler Induktion (10µM Östrogen, 48 Stunden Expression) produzierte die unter der Kontrolle des Glucocorticoid-Promotors exprimierte *bPAC* bereits nach einer Belichtungsdauer von zwei Minuten etwa zehnmal mehr cAMP als unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors. (Diese Daten dienen ausschließlich der Präferenzbildung und werden hier nicht gezeigt).

4.3.3 Eingeschränkte Samenkeimung

Bei der Keimung von Samen der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP* kam es zur deutlichen Verzögerung des Keimungszeitpunktes, wenn die Aussaat auf östrogenhaltigen Agarplatten (25µM) stattfand (Abbildung 3.30). Durch die auf diese Weise induzierte *bPAC::YFP*-Expression keimten entsprechende Samen bei Wachstum im Licht im Durchschnitt fünf bis sieben Tage verspätet. In Dunkelheit sowie in Abwesenheit des Induktors Östrogen fand die Keimung hingegen vergleichbar zur Keimung von GFP-Kontrollkeimlingen statt (Abbildung 3.28).

Es wurde jedoch beobachtet, dass im Licht gewachsene Keimlinge auch in Abwesenheit von Östrogen im Durchschnitt kleiner waren, als GFP-Kontrollpflanzen (Abbildung 3.30). Dies ist möglicherweise auf eine basale Expression des Proteins auch in Abwesenheit von Östrogen zurückzuführen, welche wiederum durch eine unzureichende Promotorregulation zu erklären ist (vgl. Abbildung 3.21).

Interessanterweise nahm die Konzentration an cAMP in Abwesenheit von Östrogen, bezogen auf das Gewicht der wachsenden Keimlinge, im Verlauf der Keimung innerhalb der ersten sieben Tage sogar ab (Abbildung 3.30, Abbildung 3.31). Möglicherweise ist hier eine im Samen erhöhte Konzentration an Brassinosteroiden ausschlaggebend für eine erhöhte Proteinexpression in sehr frühen Stadien der Entwicklung.

Diese pflanzenendogenen Steroidhormone weisen partielle strukturelle Ähnlichkeiten zum Östrogen auf und führen möglicherweise ebenfalls zur unspezifischen Aktivierung des verwendeten Glucocorticoidpromotors (die experimentelle Bestätigung dieser Vermutung steht jedoch aus). Bereits 1997 konnte die Gegenwart von Brassinosteroiden in Samen von *A. thaliana* nachgewiesen werden (Schmidt et al., 1997). Sowohl in *N. tabacum* als auch in *A. thaliana* wurde zudem die Beteiligung von Brassinosteroiden bei der Samenkeimung gezeigt (Clouse et al., 1996; Steber und McCourt, 2001; Leubner-Metzger, 2001).

Die insgesamt sehr hohen cAMP-Konzentrationen in den Samen der *bPAC*-transfizierten Pflanzenlinie, sowie die Abnahme der cAMP-Konzentration uninduzierter Keimlingsproben innerhalb der ersten sieben Tage der Keimlingsentwicklung (Abbildung 3.31, rechts) deuten somit möglicherweise auf eine zusätzliche, unspezifisch durch Brassinosteroide induzierte Proteinexpression hin. Bezogen auf einen Keimling nimmt die Menge an cAMP in induzierten Keimlingen bis zum siebten Tag kontinuierlich zu, was bedeutet, dass *bPAC* dauerhaft aktiv ist und es zur Akkumulation von cAMP kommt (Abbildung 3.31, links). Eine Regulation an der Cyclase-Aktivität selbst auf prä- oder posttranslationaler Ebene ist daher sehr wahrscheinlich nicht Ursache für die verspätet einsetzende Samenkeimung. Vielmehr scheint sich eine Insensibilität gegenüber der erhöhten cAMP-Konzentration einzustellen (vgl. 4.3.4).

Möglicherweise ist auch hier die konzertierte Wirkung von cyclischen Nucleotiden und weiteren Signalkomponenten nötig, um die Funktion als Second Messenger zu erfüllen. Beispielsweise wurden Calmodulinbindestellen für einige pflanzliche CNG-Kanäle beschrieben (Kohler et al., 1999), was die Integration von Calciuminformationen ermöglichen würde.

Diese Überlegung würde eine Keimung der Samen trotz stark erhöhter cAMP-Konzentrationen nach dem fünften Tag erklären, wenn von einer strikten Regulation (bzw. Antiregulation) weiterer, interagierender Signalkomponenten bei der Samenkeimung ausgegangen wird. Im weiteren Verlauf der Entwicklung der verspätet gekeimten Pflanzen zeigte sich kein vom Standard des *A. thaliana Col-0* Wildtyps abweichender Phänotyp. Die Pflanzen wuchsen unter den genannten Bedingungen (2.2.3) uneingeschränkt heran. Interessanterweise wurde 2010 für die Rolle von cGMP bei der Samenkeimung von *A. thaliana* ein gegenteiliger Effekt beschrieben. Demnach führt ein erhöhter cGMP-Spiegel zu einer erhöhten Samenkeimungsrate, wobei in dieser pharmakologischen Arbeit nicht auf den Keimungszeitpunkt eingegangen wird. Sowohl nach der Applikation von membranpermeablen 8-Brom-cGMP als auch nach der Inhibierung endogener cGMP-Phosphodiesterasen durch Tadalafil wurde hier eine erhöhte Samenkeimungsrate beschrieben (Teng et al., 2010). Die Samen der in der vorliegenden Arbeit erstellten, stabil transgenen Pflanzenlinie *bPGC::YFP* standen im Zeitraum der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit noch nicht zur Verfügung [ausschließlich Samen der F-0 Generation in welcher das *floral dipping* (2.4.4.1) durchgeführt wurde]. Die Durchführung entsprechender Keimungsversuche (vgl. 3.4.4) mit Samen dieser Pflanzenlinie sollte weitere Aufklärung über die Rolle von cGMP bzw. der Spezifität cyclischer Nucleotide bei der Samenkeimung verschaffen.

4.3.4 Hinweise auf pflanzenendogene Phosphodiesterasen

Die Geschwindigkeit des cAMP-Abbaus in Blattproben der generierten Pflanzenlinie *bPAC::YFP* wurde untersucht, um einen indirekten Hinweis auf möglicherweise endogen vorliegende Phosphodiesterasen zu erhalten. Nach der Aktivierung der Adenylatcyclase in der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP* durch blaues Licht (10min, 456nm) wurde der cAMP-Gehalt der Blattproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt.

Bereits nach einer halben Stunde nach der Belichtung kam es zur Reduktion der cAMP-Konzentration um etwa fünfzig Prozent. Etwa 24 Stunden nach der Belichtung wurde der cAMP-Gehalt auf etwa den anfänglichen Wert eingestellt (Abbildung 3.23). Geht man von natürlicherweise sehr geringen Konzentrationen cyclischer Nucleotide in Pflanzenzellen aus (Spiteri et al., 1989; Witters et al., 1996), so deutet diese schnelle Abbaugeschwindigkeit bei einer stark überhöhten Konzentration an cyclischen Nucleotiden auf die Gegenwart und Aktivität von Phosphodiesterasen hin. Die Gegenwart von pflanzlichen Phosphodiesterasen konnte zudem bereits Ende des letzten Jahrhunderts in *S. tuberosum* und *S. oleracea* gezeigt werden (Ashton und Polya, 1975; Brown et al., 1979). Der konsistent durchzuführende Versuch, die Abbaugeschwindigkeit cyclischer Nucleotide in Blattproben dieser Pflanzen in Gegenwart eines Phosphodiesterase-Inhibitors, beispielsweise Tadalafil oder IBMX, zu dokumentieren, steht aus. Es wurde weiterhin untersucht, nach welcher Belichtungsdauer in *bPAC*-exprimierenden Blättern eine vorläufige Sättigung der cAMP-Konzentration nach Belichtung erreicht werden kann. Eine länger als acht Minuten anhaltende Belichtungsdauer führte nicht zu einer maßgeblich zunehmenden cAMP-Produktion (Abbildung 3.22). Dies legt in diesem Fall jedoch vermutlich daran, dass die nach acht Minuten Belichtungsdauer gemessene cAMP-Konzentration durch einen akuten ATP-Mangel limitiert wird, da bei andauernder Belichtung unter Weißlicht (länger als 24 Stunden) deutlich höhere cAMP-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.24).

Es konnte beobachtet werden, dass Blattstücke von Pflanzen, welche über 24-, 48- und 72 Stunden durchgängig unter vollem Licht standen (und anschließend zusätzlich für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet wurden), weitaus höhere cAMP-Mengen akkumulierten, als dies in Blattstücken nach einer Expression in Dunkelheit und anschließender Belichtung für zehn Minuten mit blauem Licht der Fall war (Abbildung 3.22, Abbildung 3.24). Im Vergleich zur zehnminütigen Belichtung steigt die cAMP-Konzentration jedoch nach Expression für 24 Stunden unter Dauerlicht (und anschließender Belichtung für zehn Minuten) nur etwa um den Faktor zehn.

Geht man davon aus, dass die Expression von *bPAC::YFP* etwa 12-16 Stunden nach der Expressionsinduktion beginnt (wie fluoreszenzmikroskopisch beobachtet wurde), und die Produktion sowie die Akkumulation von cAMP kontinuierlich, sowie unter Weißlicht unter Lichtsättigung der *bPAC* verläuft, so wäre in den acht bis zwölf Stunden der enzymatischen Aktivität von *bPAC* unter Dauerlichtbedingungen (verglichen mit den Proben, welche nach 24 Stunden aus Dunkelheit entnommen-, und anschließend für zehn Minuten belichtet wurden) eine cAMP-Zunahme um das 50- bis 70- fache zu erwarten. Die beobachtete Zunahme um etwa den Faktor zehn lässt sich also mitunter durchaus durch die Aktivität von Phosphodiesterasen erklären, welche in dieser Zeit aktiv waren, und das gebildete cAMP abbauten. Die beobachtete Abbaugeschwindigkeit ist zudem als Netto-Abbaugeschwindigkeit zu betrachten, da cAMP durch die kontinuierliche Aktivierung von *bPAC* unter Dauerlicht fortlaufend nachgebildet wird.

Weiterhin wurde beobachtet, dass bei induzierten Proben, welche in Dunkelheit gehalten wurden und anschließend nach 24, 48 oder 72 Stunden für zehn Minuten mit blauem Licht belichtet wurden, die cAMP-Konzentration nach etwa 48 Stunden am höchsten war. Bei induzierten Blattproben, welche durchgehend im Licht gehalten wurden, wurde der höchste cAMP-Gehalt bereits nach 24 Stunden beobachtet, nach 48 und 72 Stunden nahm die Konzentration an cAMP in den Proben deutlich ab (Abbildung 3.24).

Auch wurde, wie zuvor beschrieben, beobachtet, dass die Fluoreszenzintensität und damit die Expressionsstärke von *bPAC::YFP* bei Expression in Dunkelheit nach 48 Stunden deutlich höher war, als nach 24 Stunden (s. 3.4.1). Die Tatsache, dass unter Dauerlicht trotz insgesamt zunehmender Proteinmenge nach 48 bzw. 72 Stunden insgesamt weniger cAMP akkumuliert werden konnte, legt ebenfalls eine Regulation des unter Dauerlicht erhöhten cAMP-Spiegels durch -möglicherweise unter diesen Bedingungen in der Expression hochregulierte- Phosphodiesterasen nahe.

4.3.5 Lichtinduzierbare Calciumoszillationen in Pflanzenzellen

4.3.5.1 Ursprung der Calciumsignale

In der vorliegenden Arbeit konnten lichtinduziert transiente Änderungen der cytoplasmatischen Calciumkonzentration in Blattscheiben der generierten stabil transgenen Pflanzenlinien hervorgerufen werden (3.4.6). Durch Blaulichtaktivierung der Adenylatcyclase *bPAC* (sowie der Guanylatcyclase *bPGC*, s. 4.3.5.2) und der in der Folge erhöhten Konzentration cyclischer Nucleotide (Abbildung 3.26), kam es in Blattscheiben der stabil transgenen Linie (3.4) reproduzierbar zu Calciumsignalen, die in der Intensität mit der Dauer der Belichtung der Blattproben korrelierten (Abbildung 3.33, Abbildung 4.1). Um zu untersuchen, ob es sich bei dem Anstieg der Calciumkonzentration um Calcium aus internen Speichern oder um Calcium apoplastischen Ursprungs handelt, wurden luminometrische Messungen in zunächst calciumfreier Lösung durchgeführt. Befand sich kein Calcium in der die Blattscheiben umgebenden Lösung, so konnten auch keine lichtinduzierten Calciumsignale generiert werden. Wurde im Laufe der Messung Calciumchlorid zu den Blattscheiben in Lösung zugegeben, so konnten reproduzierbar lichtinduzierte Calciumsignaturen erzeugt werden. Um den apoplastischen Ursprung weiter zu verifizieren, wurde der unspezifische Calciumkanalblocker Lanthanchlorid zugegeben, um den Calciumeinstrom aus dem Apoplasten zu unterbinden. Nach dem Block sämtlicher plasmamembranständigen Calciumkanäle konnte kein lichtinduziertes Calciumsignal mehr hervorgerufen werden (Abbildung 3.38). Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den beobachteten Calciumsignalen um Calcium apoplastischen Ursprungs handelt. Wie bereits in 1.5 erwähnt, sind sehr wahrscheinlich pflanzenendogene Calciumkanäle mit einer cytoplasmatischen Bindestelle für cyclische Nucleotide Verantwortlich für die beobachteten Calciumsignale in Folge einer erhöhten cNMP-Konzentration.

In *A. thaliana* wurden 20 CNG (Cyclic Nucleotide Gated)-Kanäle beschrieben, welche in ihrer Aktivität durch cyclische Nucleotide reguliert werden können (Übersicht in Kaplan et al., 2007; Dietrich et al., 2010). Für den Kanal *AtCNGC-2* beispielsweise konnte nach heterologer Expression in HEK-293-Zellen eine Leitfähigkeit für Calcium in Folge einer erhöhten cAMP-Konzentration gezeigt werden. (Leng et al., 2002). Ein Defekt in dem Calciumkanal *AtCNGC-2* ist zudem die funktionelle Ursache für die Unfähigkeit der Arabidopsis Mutante *dnd-1* die unspezifische pflanzliche Immunreaktion Hypersensitive-Response einzuleiten (Clough et al., 2000). Auch für die pflanzlichen Kanäle *AtCNGC-11* und *AtCNGC-12* sind Calcium-Leitfähigkeiten und zentrale Regulationsfunktionen in der Pathogenabwehr, dem Wurzelgravitropismus und der Seneszenz bei *A. thaliana* beschrieben worden (Urquhart et al., 2011). Der Kationenkanal *AtCNGC-18* weist ebenfalls eine Calciumleitfähigkeit auf, die Expression wurde bislang jedoch in *A. thaliana* ausschließlich in Pollen beschrieben (Frietsch et al., 2007). Wie schematisch in Abbildung 4.1 vorgeschlagen, konnten also pflanzenendogene, cNMP-aktivierte und calciumpermeable Kanäle (sehr wahrscheinlich aus der *AtCNGC*-Familie) indirekt über die Blaulichtaktivierung von *bPAC* bzw. *bPGC* und in der Folge einer erhöhten Konzentration cyclischer Nucleotide angesteuert werden, und so ein indirekt-lichtinduzierter Calciumeinstrom hervorgerufen werden. Versuche mit verschiedenen *AtCNGC-knockout*-Linien zur Identifizierung der für die Calciumsignatur verantwortlichen Kanäle stehen aus.

4.3.5.2 Aktivierung endogener Kationenkanäle

Die Tatsache, dass Calciumsignaturen sowohl in Folge einer lichtinduziert erhöhten cAMP- als auch cGMP- Konzentrationen erzeugt werden konnten (Abbildung 3.33, Abbildung 3.37), deutet darauf hin, dass die adressierten, endogenen, für die Calciumleitfähigkeit verantwortlichen cNMP-aktivierten Kanäle (4.3.5.1) in der Bindeaffinität ihres Aktivators relativ unstringent sind und sowohl durch cAMP als auch durch cGMP aktiviert werden können.

Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit auf der Grundlage der *bPAC* (Stierl et al., 2011) erstellte Guanylatcyclase *bPGC::YFP* ebenfalls cAMP synthetisiert (Abbildung 3.26). Demnach ist es aus diesen bisherigen Versuchsdaten nicht möglich, gesichert von einer Aktivierung endogener CNG-Kanäle durch cGMP auszugehen.

Da jedoch auch durch eine deutlich geringere Konzentration cyclischer Nucleotide (sowohl von cAMP als auch von cGMP) durch die Lichtaktivierung von *bPGC* ein Calciumsignal annähernd gleicher Amplitude ausgelöst werden konnte (vgl. Abbildung 3.26, Abbildung 3.33 und Abbildung 3.37), ist die Vermutung naheliegend, dass es sich möglicherweise sogar bevorzugt um eine cGMP-Aktivierung endogener Kanäle handelt und es in *bPAC::YFP*-exprimierenden Pflanzen nur aufgrund der stark überhöhten cAMP-Konzentration (Abbildung 3.26) zur unspezifischen Kanalaktivierung kommt.

Von tierischen CNG-Kanälen ist beispielsweise bekannt, dass ihre Affinitäten für cyclische Nucleotide sehr unterschiedlich sind. Der Kanal OLF-1 (ein cNMP-aktivierter Kationenkanal aus dem olfaktorischen Epithel von *B. taurus*) zeigt im Wildtyp für cAMP einen Halbsättigungswert von 53,7 μ M und für cGMP 1,4 μ M. Durch Einfügen der Mutation T537A konnte die Affinität für cAMP deutlich erhöht werden. So wurde nach dem Austausch von Threonin zu Alanin der Halbsättigungswert für cAMP bereits bei 16,3 μ M erreicht, was einer mehr als dreifachen Erhöhung der Affinität für cAMP gleichkommt. Die Affinität für cGMP jedoch verringert sich durch diese Mutation; so wurde nach Einfügen der Mutation T537A ein Halbsättigungswert von 53 μ M für cGMP beschrieben (Altenhofen et al., 1991). Für den tierischen CNG-Kanal CNGA2 aus *R. norvegicus* wurde für cAMP ein Halbsättigungswert von 36 μ M, für cGMP von nur 1,6 μ M bestimmt. Durch die eingefügte Mutationen C460W/E538M konnte die Affinität für cAMP ebenfalls deutlich erhöht werden, es fand sich hiernach ein Halbsättigungswert für cAMP bei bereits 1,2 μ M. Die Halbsättigungswert für cGMP lag nach Einfügen der Mutation bei 12 μ M (Rich et al., 2001). Diese Version von CNGA2 (C460W/E538M) wurde auch in der vorliegenden Arbeit für die Erstellung des Fusionskonstruktes CNGA2_2A_EuPAC (2.10.4) herangezogen.

Für die Affinitäten der in *A. thaliana* beschriebenen *AtCNG*-Kanäle gegenüber cyclischen Nucleotiden ist jedoch bislang wenig bekannt. Geht man jedoch von einer relativ hohen Homologie von pflanzlichen und tierischen CNG-Kanälen aus (Leng et al., 1999), so ist jedoch auch bei pflanzlichen CNG-Kanälen eine natürlicherweise bevorzugte Aktivierung durch cGMP anzunehmen.

Auch ohne Induktion der Proteinexpression in Blattproben der stabil transgenen Linie *bPAC::YFP* durch Östrogen konnten nach lichtinduzierter Erhöhung cyclischer Nucleotide Calciumsignale erzeugt werden (Abbildung 3.36). Dies wird ersichtlich, wenn man die basale Produktion von cAMP durch *bPAC* auch in Abwesenheit des Induktors betrachtet (Abbildung 3.21. s. 4.3.3). Pflanzen der stabil transgenen Linien zeigten jedoch beim Wachstum unter Laborbedingungen (2.2.3) keinen augenscheinlichen Phänotyp, wie dies bei einer gestörten Calciumhomöostase zu erwarten wäre. Aufgrund der Daueraktivierung der Nucleotidcyclasen kann deshalb davon ausgegangen werden, dass sich sowohl die Konzentrationen cyclischer Nucleotide als in der Folge auch der erhöhten cytoplasmatischen Calciumkonzentration über Regulationsprozesse auf einem physiologisch sinnvollen Niveau gehalten werden können. In Blattscheiben konnte beispielsweise eine Abnahme der durch die Aktivität der *bPAC* stark erhöhten cAMP-Konzentration bereits innerhalb der ersten drei Tage nach Expressionsinduktion beobachtet werden (Abbildung 3.24, s. 4.3.4). Auch bei der Keimung von Samen der transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP* war ohne die Expressionsinduktion durch Östrogen eine Abnahme der Konzentration cyclischer Nucleotide in den ersten sieben Tagen der Samenkeimung zu beobachten (Abbildung 3.31, s. 4.3.3). Daher ist auch in nichtinduzierten, transgenen Pflanzen ein aktiver Regulationsmechanismus anzunehmen, der einem dauerhaft überhöhten cAMP-Spiegel entgegenwirken kann (4.3.4). Auch eine möglicherweise notwendige konzertierte, oder causal-interagierende Wirkungsweise cyclischer Nucleotide mit weiteren Signalmolekülen könnte eine Insensitivität der Pflanzen gegenüber der stark überhöhten Konzentration cyclischer Nucleotide erklären (vgl. 4.3.4). So sind beispielsweise für einige Vertreter der *AtCNGC*-Familie sowohl Bindestellen für cyclische Nucleotide, als auch für Calmodulin beschrieben worden (Kohler et al., 1999).

Auch in tierischen Systemen wird für die Aktivierung des Kanals CNGA2 eine Abhängigkeit der Aktivierung von cyclischen Nucleotiden und Calmodulin beschrieben. (Liu et al., 1994). Wenn auch in Pflanzen ein hypothetischer zweiter Faktor für die Aktivierung der CNG-Kanäle in der Konzentration unverändert oder strikt antireguliert vorläge, würde eine überhöhte cNMP-Konzentration alleine ebenfalls keinen Effekt hervorrufen können.

4.3.5.3 Quantifizierung des Calciumsignals

Die Quantifizierung des Anstieges der cytoplasmatischen Calciumkonzentration auf die Folge des Blaulichtpulses war nicht möglich, da das Aequorin-Signal mit dem selbstgebauten Luminometer bautechnisch bedingt erst nach Ende der applizierten Lichtpulse aufgenommen werden konnte (s. 2.7.1). Bei länger andauernden Belichtungen ist ein früh stattfindender Anstieg der Calciumkonzentration bereits während der Belichtungsphase anzunehmen. In Messungen an tierischen Zellen (in Oocyten von *X. laevis*) beispielsweise öffnet der coexprimierte, cNMP-aktivierte Kationenkanal CNGA2 bereits eine halben Sekunde nach der Aktivierung der Adenylatcyclase durch blaues Licht (Schroder-Lang et al., 2007). Auch das Aequorin-Signal nach Zugabe von 10% Ethanol zur Permeabilisierung der Membranen und somit zur Kalibrierung und Berechnung der maximal möglichen Aequorinlumineszenz-Amplitude konnte technisch bedingt nicht durchgängig aufgezeichnet werden, da Ethanol nur über die Fronttüre des Luminometers zugegeben werden konnte. Während die Türe geöffnet war, musste der Photomultiplier ebenfalls über den Shutter geschützt werden und das Signal konnte erst verspätet aufgezeichnet werden. Die Tatsache, dass ein Anstieg des Calciumsignals immer nach Ende eines Lichtpulses unabhängig von der vorgenommenen Belichtungsdauer zu beobachten war, lässt über eine gleichzeitige Limitierung des Netto-Calciumeinstroms durch eine Aktivierung weiterer, Calcium-exportierender Mechanismen (beispielsweise einer Calcium-ATPase, s. 1.5) durch starkes Blaulicht spekulieren.

Nach Wegfall dieser putativen, antagonistischen Reaktion käme es demnach aufgrund der nach Ende des Lichtpulses noch erhöhten cNMP-Konzentration im Cytoplasma zur darüber hinaus anhaltenden Aktivierung der Calciumkanäle (s. 4.3.5.1).

4.3.5.4 Möglichkeiten und Limitationen

Durch wiederholte Blaulichtpulse konnten lichtinduziert Oszillationen der cytoplasmatischen Calciumkonzentration in Blattscheiben der stabil transgenen Pflanzenlinien hervorgerufen, und durch Aequorin-Lumineszenz gezeigt werden (Abbildung 3.33, Abbildung 3.34). Dies war zentraler Bestandteil der Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit, um auf diese Weise über lichtinduzierte Calciummuster natürlich vorkommende Calciumsignaturen, wie sie in biotischen und abiotischen Interaktionen von Pflanzen beschrieben wurden (McAinsh et al., 1995; Cessna et al., 2001), zu simulieren und diese Informationen in Pflanzenzellen zu übertragen (s. 1.7). Das beobachtete, lichtinduzierte Calciumsignal nahm jedoch nach wiederholter Belichtung in der Amplitude ab (Abbildung 3.34). Möglicherweise liegt dies an durch wiederholten Calciumeinstrom voraktivierten Calciumexport-Mechanismen (Liang et al., 1997; Geisler et al., 2000; Cheng et al., 2003; s. 1.5), weshalb es zum schnellen Abtransport, bzw. nicht zur Akkumulation von Calcium in zuvor erreichten Konzentrationen kommt. Das nach dem Lichtpuls aufgenommene Calcium wurde in allen Fällen relativ schnell wieder aus dem Cytoplasma abtransportiert. Etwa drei Minuten nach dem Lichtpuls und dem dadurch erzeugten Calciumeinstrom war die cytoplasmatische Calciumkonzentration auf etwa ein Niveau reguliert, wie es vor dem Lichtpuls vorlag. Auch dies deutet auf aktive und effektive Calciumexportmechanismen hin (1.5).

Eine Abnahme der Aequorin-Lumineszenz aufgrund des wiederholten Calciumeinstroms und ein auf diese Weise begründeter Verbrauch von konstituiertem Aequorin ist hingegen unwahrscheinlich, da nach der Durchführung aller gezeigten Messungen nach Zugabe von 10% Ethanol ein alle zuvor gemessenen Signale deutlich übersteigendes Aequorin-Signal erhalten wurde, und so dessen uneingeschränktes Calciumdetektionspotential bis zum Ende der Messungen gezeigt werden konnte. Diese Beobachtungen zeigen aber auch eine Limitation des verwendeten Systems (Abbildung 4.1) zur Erzeugung lichtinduzierter Calciummuster. Da es sich um eine indirekte Aktivierung endogener, calciumpermeabler Kanäle durch cyclische Nucleotide handelt, konnten Calciumoszillationen nur relativ niederfrequent erzeugt werden.

Jedoch sollte diese Frequenz theoretisch ausreichend sein, um beispielsweise die beobachteten Calciumoszillationen in Schließzellen, welche zum Stomaschluss führen (Allen et al., 1999), zu simulieren.

Auch einmalig auftretende, transiente Calciumpeaks, wie sie beispielsweise auf die Folge von Salz-, Kälte- oder osmotischem Stress beschrieben worden sind (Cessna et al., 2001), konnten durch blaues Licht hervorgerufen werden (Abbildung 3.33). Es besteht also durch die in der vorliegenden Arbeit generierten, stabil transgenen Pflanzenslinien *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* die Möglichkeit, ausgewählte natürlich vorkommende Reize, welche spezifische intrazelluläre Calciummuster in Pflanzen zur Folge haben, durch eine durch Lichtmuster erzeugte Calciumsignatur zu simulieren und so zu imitieren. In der Folge könnten *downstream* dieser Calciumsignaturen liegende Reaktionsschritte sowohl untersucht, als auch nicht-invasiv manipuliert werden, was zentraler Gegenstand der Fragestellung der vorliegenden Arbeit war (1.7).

4.3.5.5 Artefakte am Luminometer

Lichtinduzierte Calciumsignale in Pflanzenzellen wurden in dieser Arbeit durch Aequorin-Lumineszenz in einem für diese Zwecke entwickelten Luminometer (2.7) visualisiert. Dieses Luminometer ermöglichte die Belichtung der Probe durch LEDs, während der Photomultiplier für die Dauer der Belichtung über einen Shutter-Mechanismus geschützt wurde (Abbildung 2.4). Nach dem aktivierenden Lichtpuls wurde der Shutter instantan geöffnet und die Aequorin-Lumineszenz über den Photomultiplier detektiert. Neben der Limitierung, während der Belichtungsphase keine Aequorin-Lumineszenz aufnehmen zu können, kam es bei der Verwendung dieses Luminometers zu Artefakt-Signalen, die im Folgenden erörtert werden sollen (s. a. 3.4.6). Es handelt sich bei diesen Artefakt-Signalen vermutlich sogar um die Übereinanderlagerung zweier Artefakt-Quellen. In unmittelbarer Folge ($< 1\text{s}$) nach dem Lichtpuls kommt es in allen gezeigten Messungen zu einem sehr starken, aber schnell abfallenden Peak-Signal (Abbildung 3.32). Der Ursprung dieses Signals ist nicht bekannt, ist aber gesichert technischer Herkunft. Auch in Abwesenheit von Zellen in der Messkammer konnte dieses Signal wiederholt beobachtet werden. Das zweite Falschsignal entsteht vermutlich durch ein schwaches Nachleuchten der verwendeten LEDs. Dieses Signal erstreckt sich über mehrere Sekunden nach dem Ende des vorgegebenen Lichtpulses und war stärker, wenn sich ein verspiegelter Tisch in der Messkammer unter den LEDs befand (s. Aufbau in Abbildung 2.4). Die in dieser Arbeit gezeigten und beschriebenen, lichtinduzierten Calciumsignale der transgenen Pflanzen sind jedoch deutlich höher als diese langsamen Artefakt-Signale und zeigen zudem einen deutlichen Anstieg nach Ende der Belichtung. Ein Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration nach Belichtung konnte in keiner der durchgeführten Kontrollmessungen an *A. thaliana Col-0* Aequorin Blattscheiben beobachtet werden.

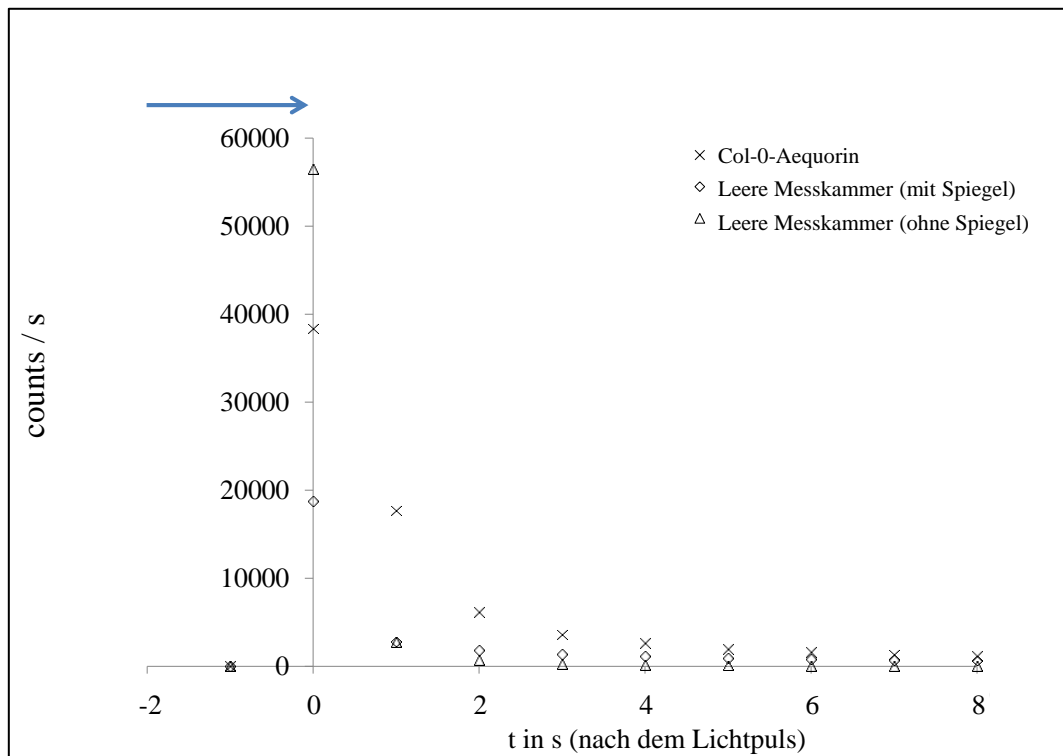


Abbildung 4.2 Darstellung der technisch bedingten Artefakt-Signale des verwendeten, selbstgebauten Luminometers. Nach Ende des Lichtpulses (blauer Pfeil) kam es zu transienten „Signalen“ -auch ohne Zellen in der Messkammer (◇,△). Befanden sich *A. thaliana Col-0* Aequorin Blattscheiben in der Kammer (x), so konnte nach Belichtung ein leichtes, zusätzliches Lumineszenz-Signal beobachtet werden, jedoch kam es in Kontrollmessungen an Blattproben untransfizierter *A. thaliana Col-0* Aequorin Pflanzen (vgl. Abbildung 3.35) nie zum Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration nach Belichtung.

A. thaliana col-0 Aequorin-Blattproben zeigten neben dem beschriebenen Artefakt-Signal eine basale, kurz andauernde, biogene Lumineszenz. Die Form dieses Signals war jedoch deutlich verschieden vom Calciumsignal *bPAC::YFP*-exprimierender Blattproben der transgenen Pflanzen. In keiner der durchgeführten Kontrollmessungen konnte ein Anstieg des Calciumsignals nach Belichtung gemessen werden (vgl. Abbildung 3.35).

4.3.6 Umsatzrate der lichtaktivierten Guanylatcyclase

Insgesamt war die spezifische Umsatzrate der *bPGC::YFP* in der stabil transgenen Pflanzenlinie etwa um den Faktor zweihundert geringer als jene der *bPAC::YFP* in der entsprechenden Pflanzenlinie (Abbildung 3.26). Auch in Oocyten wurde die jeweilige spezifische Umsatzrate der beiden Cyclasen bestimmt und miteinander verglichen (Abbildung 3.14). Auch hier war die spezifische Umsatzrate der *bPGC* etwa um den Faktor hundert geringer als jene der *bPAC*. Die spezifische Umsatzrate von *BlaC (=bPAC)* und die durch die beschriebenen Mutationen (K197E, D265K und T267G) generierte *BlgC (=bPGC)* aus *Beggiatoa spec.* wird in *in vitro* Studien nach Belichtung für fünf Minuten bei Raumtemperatur als näherungsweise gleich (je etwa $16\text{nmol cNMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) angegeben (Ryu et al., 2010). *In vivo* können jedoch sowohl Substratmangel als auch antagonistische Regulationsmechanismen (beispielsweise nucleotidspezifische Phosphodiesterasen) dieses Verhältnis grundlegend verschieben. So ist zu diskutieren ob GTP, das Substrat der Guanylatcyclase, in Oocyten und in pflanzlichen Zellen ausreichend vorliegt, bzw. in Fließgleichgewichten entsprechend schnell nachgeliefert werden kann.

Auch wurde für die lichtaktivierte Guanylatcyclase *BlgC* eine starke Inhibierung durch relativ hohe Konzentrationen von GTP ($>200\mu\text{M}$) und auch ATP ($>50\mu\text{M}$) beschrieben (Ryu et al., 2010). Möglicherweise ist auch dies Ursache für die beobachtete, eingeschränkte Guanylatcyclaseaktivität in Oocyten (Abbildung 3.14) und Pflanzenzellen (Abbildung 3.26). Des Weiteren ist im Falle einer möglichen, regulativen Funktion von cGMP in Pflanzenzellen, wie sie in diversen Arbeiten postuliert wird (Penson et al., 1996; Suita et al., 2009; Bastian et al., 2010), eine stringenter und schnellere Regulation des cGMP-Gehaltes durch spezifische Phosphodiesterasen anzunehmen, als dies für cAMP der Fall ist. Dies würde ebenfalls die geringe Menge an nachweisbarem cGMP erklären, welche in den pflanzlichen Proben gemessen wurde.

4.4 Stabil transgene *A. thaliana* Zellkultur

Die in der vorliegenden Arbeit erstellten, transgenen Zellkulturen *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* auf der Grundlage einer bestehenden, heterotrophen *A. thaliana Col-0* Aequorin Zellkultur bieten die Möglichkeit einer Anzucht in Dunkelheit und somit eine Proteinexpression ohne vorzeitige Aktivierung durch Licht. In den Zellen dieser Kulturlinie konnte nach Induktion durch Östrogen sowohl die starke Expression der jeweiligen Nucleotidcyclasen als auch deren cytoplasmatische Lokalisation gezeigt werden (Abbildung 3.40). Im Falle der *bPAC::YFP*-Zellkultur konnte zudem die Funktion von *bPAC* über den Nachweis des durch Belichtung gebildeten cAMP gezeigt werden (Abbildung 3.41). Jedoch ist die absolute Zunahme der cAMP-Konzentration nach der Belichtung aufgrund der schlechten Messbarkeit cyclischer Nucleotide aus der Zellkultur nicht mit jener aus Blattproben der *A. thaliana* Pflanzenlinien (Abbildung 3.21) zu vergleichen.

Auch der cGMP-Gehalt der *bPGC::YFP* Linie konnte messbedingt nicht aus der Zellkultur nachgewiesen werden. In beiden Fällen wurde zur Bestimmung der Konzentration cyclischer Nucleotide Zellkultur pelletiert, das Zellpellet in 0,1M HCl homogenisiert und der cAMP- bzw. cGMP-Gehalt nach Zentrifugation im Überstand des Homogenisates gemessen. In einigen Fällen war die Extinktion dieser Proben sogar höher als in leeren Kontroll-Wells der ELISA-Platte, was bedeutet, dass Substanzen aus dem Zellpellet und/oder dem Kulturmedium (6.4.3.3) die ELISA-Messung (2.6.1) verfälschten. Die ohnehin geringe Konzentration an cGMP, die auch in den Pflanzen nach Belichtung deutlich unter der cAMP-Konzentration lag (Abbildung 3.26, vgl. 4.3.6), konnte deshalb nicht durch das verwendete ELISA-Kit (2.6.1) nachgewiesen werden. Auch die ermittelten cAMP-Konzentrationen bzw. das Konzentrationsverhältnis von unbelichteten zu belichteten Proben *bPAC::YFP*-exprimierender Zellen sind aus diesem Grund nur in Relation zueinander und nicht als absolut zu betrachten.

4.5 Das Fusionskonstrukt CNGA2_2A_EuPAC

4.5.1 Expression in Oocyten

Das Fusionskonstrukt CNGA2_2A_EuPAC (2.10.4) wurde erstellt, um ein weiteres optogenetisches Werkzeug zur lichtinduzierten Manipulation zellulärer Ionen- bzw. Calciumkonzentrationen zu generieren. Die Calciumleitfähigkeit des hierfür verwendeten Kanals CNGA2 wurde zuvor beschrieben (Kaupp et al., 2002; Cheng et al., 2008). Es wurde eine Variante dieses Kanals verwendet, welche durch gezielte Mutation in der Nucleotid-Bindetasche in der Sensitivität gegenüber cAMP erhöht ist (C460W/E583M, nach Rich et al., 2001, s. 4.3.5.2).

In direkter, C-terminaler Fusion dieses Kanals mit der lichtaktivierten Nucleotidcyclase *EuPAC α* (CNGA2::*EuPAC*, kloniert und beschrieben in der Dissertation von Dr. Jens Looser, 2010) konnte in elektrophysiologischen Messungen nach Expression in Oocyten (2.3.4) keine Funktion gezeigt werden (Abbildung 3.43). Vermutlich ist hier die für die Funktion der Cyclase sowie des Kanals notwendige Oligomerisierung durch die direkte Fusion der beiden Proteine beeinträchtigt. Auch die Quantifikation des durch CNGA2::*EuPAC* gebildeten cAMPs nach Belichtung zeigt den nahezu vollständigen Funktionsverlust der Cyclase im Fusionsprotein gegenüber frei vorliegender *EuPAC α* (Abbildung 3.44). Die gemessene Konzentration von cAMP nach Lichtaktivierung des Fusionsproteins CNGA2::*EuPAC* lag etwa bei jener von Kontroll-Oocyten. Die in die Sequenz des Fusionsprotein CNGA2::*EuPAC* eingefügte 2A-Sequenz verbesserte die Funktion der folglich separat translatierten Proteine. Diese 2A-Sequenz stammt aus einem viralen Genom und führt bei der Translation der über diese Sequenz verbundenen Gene zu deren äquimolaren, unabhängigen Proteinexpression (Ryan et al., 1991; Tang et al., 2009, s. 2.10.4.1).

Die über die 2A-Sequenz verknüpften Proteine werden trotz durchgängigem open reading frame (ORF) unabhängig voneinander exprimiert, da das Ribosom während des Translationsvorgangs eine Peptidverknüpfung aussetzt, und im Anschluss erneut mit der durchgängigen Translation der darauffolgenden Sequenz beginnt (s. 2.10.4.1). Die Funktion des Fusionskonstruktes *CNGA2_2A_EuPAC* konnte sowohl elektrophysiologisch (Abbildung 3.42) als auch immunologisch über die Quantifikation des gebildeten cAMPs nach Belichtung mittels ELISA (2.6.1) gezeigt werden (Abbildung 3.44). Jedoch war sowohl die Menge an produziertem cAMP, als auch die Amplitude der gemessenen *CNGA2*-Ströme geringer als nach individueller Injektion der RNA und separater Expression der Proteine in Oocyten. Vermutlich kommt es bei der unabhängigen Translation der beiden über die 2A-Schnittstelle verbundenen Proteine, oder im Anschluss bei deren funktionellen Oligomerisierung zu Problemen. Hierfür spricht die Tatsache, dass die Menge an produziertem cAMP aus dem Fusionskonstrukt etwa um den Faktor sieben geringer ist, als nach Injektion einer näherungsweise äquimolaren Menge freier *EuPAC α* . Im Vergleich zum direkten Fusionsprotein *CNGA2::EuPAC* jedoch wurde die Konzentration von cAMP um etwa den Faktor 35 erhöht. (Abbildung 3.44). Auch die große Streuung der Stromamplituden des Fusionskonstruktes in elektrophysiologischen Messungen deutet ebenfalls darauf hin, dass die getrennte Expression der beiden Protein nicht in allen Fällen vollständig abläuft, oder es zu Einschränkungen in der Oligomerisierungsfähigkeit des Kanals oder der Cyclase kommt (Abbildung 3.43).

Möglicherweise ist der auch der Beginn der Proteinsequenz von *EuPAC α* aufgrund einer teilweise fehlerhaften Translations-Wiederaufnahme hinter Spaltdomäne der 2A-Sequenz modifiziert, was Ursache für funktionelle Einschränkungen in Kanal- bzw. Cyclase-Aktivität sein kann.

Nach der Trennung der 2A-Sequenz würde sich (idealerweise) ein in der Aminosäuresequenz folgendermaßen veränderter N-Terminus des Proteins *EuPAC α* ergeben:

...-N-P-G // P-A-P-G-S-E-F-P-S-A-G-F-M-Y-I-...

Kursiv: 2A-Sequenz vor // nach der Trennungsstelle im 2A-Polypeptid.

Fett: Beginn der codierenden Sequenz von *EuPAC α* .

Eine Einschränkung der Oligomerisierungsfähigkeit und damit der Cyclaseaktivität von *EuPAC α* durch diese N-terminale Modifikation ist zwar aufgrund von zusätzlichen zwölf Aminosäuren vor dem eigentlichen Start der kodierenden Sequenz prinzipiell denkbar, scheint jedoch (nach persönlicher Rücksprache mit Prof. Dr. Georg Nagel) sehr unwahrscheinlich. Auch nach der C-terminalen Fusion an die lichtaktivierte Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR::*EuPAC α*) beispielsweise konnte die Funktion der hierdurch membrangebundenen Cyclase *EuPAC α* noch gezeigt werden (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Georg Nagel). Wahrscheinlich ist also auch eine teilweise nicht-stattfindende Trennung in der 2A-Sequenz Ursache für die beobachtete, reduzierte Aktivität von Kanal und Cyclase. Die Sequenz von CNGA2_2A_*EuPAC* ist in 6.6.2 angegeben.

4.5.2 Expression in Pflanzen

Weiterhin wurde versucht, das Fusionskonstrukt CNGA2_2A_EuPAC in Pflanzen zu exprimieren und auf seine Funktion zu testen. Hierzu wurden Protoplasten von *A. thaliana Col-0* Aequorin Pflanzen transient transfiziert (2.4.4.4). Nach einer Expressionsdauer von 24 Stunden wurde versucht, die Funktion des Fusionskonstruktes über den Nachweis lichtinduzierter Calciumsignaturen am Luminometer zu zeigen (vgl. 3.4.6). In diesem Fall konnte jedoch keine Funktion gezeigt werden. Es konnte aber nicht gesichert von einer erfolgreichen Transfektion ausgegangen werden, da dieses Konstrukt nicht fluoreszenzmarkiert ist und die Expression der Proteine daher nicht bestätigt werden konnte.

Das Konstrukt CNGA2_2A_EuPAC wurde zudem bereits für die stabile Transfektion von Pflanzen in den oben beschriebenen östrogeninduzierbaren Pflanzen-transfektionsvektor pER-8 (Zuo et al., 2000) inkloniert. Dieser Ansatz wurde aber in der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt.

5 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit wurden lichtaktivierte Nucleotidcyclasen auf Basis der lichtaktivierten Adenylatcyclase *bPAC* (=BlaC, Ryu et al., 2010; Stierl et al., 2011), sowie der direkt lichtaktivierbare Kationenkanal Channelrhodopsin-2 (Nagel et al., 2003) eingesetzt, um lichtinduzierte und damit nicht-invasive Manipulationen der Second Messenger cAMP, cGMP und Calcium, sowie des Membranpotentials in Pflanzenzellen vorzunehmen. Nach transienter Transfektion von *N. benthamiana* konnte sowohl die Expression der beiden Channelrhodopsinvarianten C128A::YFP und C128T::YFP (unveröffentlichte Daten von R. Gueta und G. Nagel, 2008, Berndt et al., 2009; Bamann et al., 2010), als auch deren Lokalisation in der Plasmamembran von Protoplasten fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden. Die Funktion von Channelrhodopsin als lichtaktivierbarer Kationenkanal konnte in dieser Arbeit erstmals elektrophysiologisch in Pflanzenzellen nachgewiesen werden. In Einstichmessungen im Mesophyllgewebe von *N. benthamiana* wurden reproduzierbar blaulichtinduzierte Depolarisationen der Plasmamembran erzielt, die in Dauer und Frequenz über das applizierte Lichtmuster steuerbar waren. In Patch-Clamp-Messungen an epidermalen Protoplasten von *N. benthamiana*, welche transient Channelrhodopsin-2-C128A und Channelrhodopsin-2-C128T exprimierten, konnten zudem blaulichtinduzierte Einwärts-Ströme gezeigt werden. Die Expression der beiden verwendeten Channelrhodopsinvarianten schien hierbei annähernd unabhängig von der vorliegenden Konzentration des zugegebenen Retinals. Des Weiteren konnte in *A. thaliana* sowohl die Expression als auch die Funktion der lichtaktivierbaren Adenylatcyclase *bPAC*::YFP (Stierl et al., 2011), sowie einer hieraus durch gezielte Mutation (nach Ryu et al., 2010) abgeleiteten lichtaktivierbaren Guanylatcyclase (*bPGC*::YFP) erstmalig in höheren Pflanzen gezeigt werden. Nach Bestätigung der Funktion dieser beiden lichtaktivierbaren Nucleotidcyclasen in transient transfizierten Protoplasten von *A. thaliana* wurden zwei stabil transgene Pflanzenlinien generiert.

Pflanzen dieser Linie exprimierten neben dem konstitutiv unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors exprimierten Calciumreporterprotein Aequorin zusätzlich und unter der Kontrolle eines östrogeninduzierbaren Glucocorticoidpromotors (Zuo et al., 2000) die lichtaktivierten Nucleotidcyclasen *bPAC::YFP* bzw. *bPGC::YFP*. In beiden stabil transgenen Pflanzenlinien wurden Expression und Funktion der jeweiligen lichtaktivierten Nucleotidcyclase gezeigt. In Messungen an einem modifizierten Luminometer konnten weiterhin erstmals blaulichtinduzierte Calciumsignaturen in Pflanzenzellen generiert werden. Auf die Folge von Blaulichtpulsen kam es wiederholt zum Calciumeinstrom in Zellen der erstellten transgenen Pflanzenlinien. Neben der Möglichkeit, sowohl die Konzentration der cyclischen Nucleotide als auch des cytoplasmatischen Calciums über Licht zu manipulieren, wurde durch diese Pflanzen ein direkter Zusammenhang beider Second Messenger gezeigt. Weiterhin sind phänotypische Auffälligkeiten der erstellten Pflanzenlinien beobachtet worden. Es kam zur Verzögerung des Keimungszeitpunktes *bPAC::YFP*-exprimierender Samen im Licht, jedoch wuchsen die Pflanzen im Anschluss an die verzögerte Keimung normal und uneingeschränkt weiter. In *bPAC::YFP*-exprimierenden Pollen von *Nicotiana SR-1* konnte zudem das Wachstum der Pollenschläuche durch blaues Licht gestoppt werden. *bPGC::YFP*-exprimierende Pollen hingegen zeigten auch im blauen Licht unverändertes Pollenschlauchwachstum. Neben den beiden erfolgreich generierten, stabil transgenen Pflanzenlinien wurden in analogen Ansätzen transgene *A. thaliana Col-0* Aequorin Zellkulturlinien generiert, die neben dem konstitutiv aktiven Calciumreporterprotein Aequorin ebenso *bPAC::YFP* bzw. *bPGC::YFP* unter der Kontrolle des östrogeninduzierbaren Glucocorticoidpromotors (Zuo et al., 2000) exprimierten. Auch hier konnten Expression und Funktion beider Nucleotidcyclasen immunologisch und fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden. Über den Einsatz einer sog. 2A-Sequenz wurde weiterhin ein funktionsfähiges Fusionskonstrukt aus dem cAMP-aktivierten Kationenkanal CNGA2 (C460W-E583M, nach Rich et al., 2001) und der lichtaktivierten Adenylatcyclase *EuPAC α* (Iseki et al., 2002) erstellt. Die Funktion dieses Fusionskonstruktes wurde elektrophysiologisch sowie immunologisch gezeigt.

SUMMARY

In this study, light-activated nucleotide cyclases based on *bPAC* (= *BlaC*, Ryu et al., 2010; Stierl et al., 2011), and the direct light-activated cation channel channelrhodopsin-2 (Nagel et al., 2003) have been used to non-invasively manipulate the level of the second messengers cAMP, cGMP and calcium as well as the membrane potential in plant cells by means of light. After transient transfection of *N. benthamiana*, the expression of the two channelrhodopsin variants C128A and C128T (unpublished data from Ronnie Gueta and G. Nagel 2008; Berndt et al., 2009; Bamann et al., 2010) as well as their correct localization in the plasma membrane, was shown by fluorescence microscopy imaging. The general function of channelrhodopsin as a light-activated cation channel was shown for the first time electrophysiologically in higher plants. Using impalement measurements on leaf discs, blue-light-induced depolarizations of the plasma membrane could reproducibly be evoked, which followed the given light pattern in duration and frequency. By Patch-Clamp recordings on *N. benthamiana* protoplasts, clear blue-light-induced inward currents were demonstrated. The expression of both employed channelrhodopsin variants C128A and C128T was almost independent from supplementation of Retinal during their expression. Furthermore, expression and function of the light activated adenylyl cyclase *bPAC::YFP* (Stierl et al., 2011) and a therefrom derived light activated guanylyl cyclase *bPGC::YFP* (according to Ryu et al., 2010) was shown for the first time in higher plants. Two stable transgenic plant lines have been generated, which, aside to the constitutively expressed calcium reporter protein Aequorin, express the light-activated nucleotide cyclases *bPAC::YFP* and *bPGC::YFP*, respectively, under the control of an estrogen-inducible glucocorticoid promotor (Zuo et al., 2000). Also in these transgenic plants, expression and function of both light-activated nucleotide cyclases was shown.

For the first time, blue-light-induced calcium signatures in plant cells were evoked by illumination of leafdiscs of the transgenic plant lines as an implication of an elevated cNMP-level. Beside the possibility to manipulate cNMP-levels as well as the free cytoplasmic calcium concentration in those plants by means of light, a direct interrelation between these two second messengers was shown. Also physiological impairments in the generated plant lines were observed. The germination of *bPAC::YFP* expressing seeds was considerably delayed when grown in light. Further, the pollen tube growth of transiently *bPAC::YFP*-transfected pollen of *Nicotiana SR-1* was fully stopped by illumination with blue light, whereas normal growth was documented under dark conditions. In contrast, *bPGC*-transfected pollen did not show affected growth of their pollen tubes neither in darkness nor upon blue light illumination. Beside the generated stable transgenic plant lines, two stable transgenic *Arabidopsis thaliana Col-0*-Aequorin cell-culture lines have been generated in an analogous approach. Also in this case, the expression of *bPGC::YFP* and *bPAC::YFP* was estrogen-inducibly expressed under control of the glucocorticoid-promotor (Zuo et al., 2000), and expression as well as function was shown by means of fluorescence microscopy imaging and cNMP-quantification using ELISA. Furthermore, a fused construct of the cAMP-gated cation channel CNGA2 (C460W-E583M, according to Rich et al., 2001) and the light activated adenylyl-cyclase *EuPAC α* (Iseki et al., 2002) was cloned using a 2A-sequence (Tang et al., 2009) and expressed in oocytes. The function of this construct has been shown electrophysiologically and immunologically.

6 ANHANG**6.1 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**(6451): 162-166.
- Ahmad, M., J. A. Jarillo, et al.** (1998). "CHIMERIC PROTEINS BETWEEN CRY1 AND CRY2 ARABIDOPSIS BLUE LIGHT PHOTORECEPTORS INDICATE OVERLAPPING FUNCTIONS AND VARYING PROTEIN STABILITY." *Plant Cell* **10**(2): 197-207.
- Allen, G. J., J. M. Kwak, et al.** (1999). "CAMELEON CALCIUM INDICATOR REPORTS CYTOPLASMIC CALCIUM DYNAMICS IN ARABIDOPSIS GUARD CELLS." *Plant J* **19**(6): 735-747.
- Allen, G. J., S. P. Chu, et al.** (2001). "A DEFINED RANGE OF GUARD CELL CALCIUM OSCILLATION PARAMETERS ENCODES STOMATAL MOVEMENTS." *Nature* **411**(6841): 1053-1057.
- Altenhofen, W., J. Ludwig, et al.** (1991). "CONTROL OF LIGAND SPECIFICITY IN CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNELS FROM ROD PHOTORECEPTORS AND OLFACTORY EPITHELIUM." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(21): 9868-9872.
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000). "ANALYSIS OF THE GENOME SEQUENCE OF THE FLOWERING PLANT ARABIDOPSIS THALIANA". *Nature* **408**: 796-815
- Ashton, A. R. and G. M. Polya** (1975). "HIGHER-PLANT CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASES. RESOLUTION, PARTIAL PURIFICATION AND PROPERTIES OF THREE PHOSPHODIESTERASES FROM POTATO TUBER." *Biochem J* **149**(2): 329-339.
- Bamann, C., R. Gueta, et al.** (2010). "STRUCTURAL GUIDANCE OF THE PHOTOCYCLE OF CHANNELRHODOPSIN-2 BY AN INTERHELICAL HYDROGEN BOND." *Biochemistry* **49**(2): 267-278.

- Bastian, R., A. Dawe, et al.** (2010). "GIBBERELIC ACID AND cGMP-DEPENDENT TRANSCRIPTIONAL REGULATION IN ARABIDOPSIS THALIANA." *Plant Signal Behav* **5**(3): 224-232.
- Batra, P. P. and G. Tollin** (1964). "PHOTOTAXIS IN EUGLENA .I. ISOLATION OF EYE-SPOT GRANULES + IDENTIFICATION OF EYE-SPOT PIGMENTS." *Biochimica Et Biophysica Acta* **79**(2): 371-378
- Baylor, D. A.** (1987). "PHOTORECEPTOR SIGNALS AND VISION." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **28**(1): 34-49.
- Beevers, L. and R. H. Hageman** (1969). "NITRATE REDUCTION IN HIGHER PLANTS." *Annual Review of Plant Physiology* **20**: 495-522.
- Bergmans, H. E. N., I. M. Vandie, et al.** (1981). "TRANSFORMATION IN ESCHERICHIA-COLI - STAGES IN THE PROCESS." *Journal of Bacteriology* **146**(2): 564-570.
- Berndt, A., O. Yizhar, et al.** (2009). "BI-STABLE NEURAL STATE SWITCHES." *Nat Neurosci* **12**(2): 229-234.
- Bernstein, J.G., Han, X. et al.** (2008). "PROSTHETIC SYSTEMS FOR THERAPEUTIC OPTICAL ACTIVATION AND SILENCING OF GENETICALLY-TARGETED NEURONS." *Proc. Soc. Photo Opt. Instrum. Eng.* **6854** (68540H)
- Bewell, M. A., F. J. M. Maathuis, et al.** (1999). "CALCIUM-INDUCED CALCIUM RELEASE MEDIATED BY A VOLTAGE-ACTIVATED CATION CHANNEL IN VACUOLAR VESICLES FROM RED BEET." *FEBS Lett* **458**(1): 41-44.
- Bindschedler, L. V., F. Minibayeva, et al.** (2001). "EARLY SIGNALLING EVENTS IN THE APOPLASTIC OXIDATIVE BURST IN SUSPENSION CULTURED FRENCH BEAN CELLS INVOLVE CAMP AND CA²⁺." *New Phytologist* **151**(1): 185-194.
- Birnboim, H. C. and J. Doly** (1979). "A RAPID ALKALINE EXTRACTION PROCEDURE FOR SCREENING RECOMBINANT PLASMID DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523.
- Blume, B., T. Nurnberger, et al.** (2000). "RECEPTOR-MEDIATED INCREASE IN CYTOPLASMIC FREE CALCIUM REQUIRED FOR ACTIVATION OF PATHOGEN DEFENSE IN PARSLEY." *Plant Cell* **12**(8): 1425-1440.

- Bowler, C., G. Neuhaus, et al.** (1994). "CYCLIC-GMP AND CALCIUM MEDIATE PHYTOCHROME PHOTOTRANSDUCTION." *Cell* **77**(1): 73-81.
- Boyden, E. S., F. Zhang, et al.** (2005). "MILLISECOND-TIMESCALE, GENETICALLY TARGETED OPTICAL CONTROL OF NEURAL ACTIVITY." *Nat Neurosci* **8**(9): 1263-1268.
- Briggs, W. R., J. M. Christie, et al.** (2002). "PHOTOTROPIN LOV DOMAINS EXHIBIT DISTINCT ROLES IN REGULATING PHOTORECEPTOR FUNCTION." *Plant Journal* **32**(2): 205-219.
- Brown, E. G., M. J. Edwards, et al.** (1979). "PLURALITY OF CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE IN SPINACEA-OLERACEA - SUBCELLULAR-DISTRIBUTION, PARTIAL-PURIFICATION, AND PROPERTIES." *Phytochemistry* **18**(12): 1943-1948.
- Builder, S. E., J. A. Beavo, et al.** (1979). "MECHANISM OF ACTIVATION OF PROTEIN-KINASE BY CAMP." *Journal of Supramolecular Structure*: 26-26.
- Butcher, R. W. and E. W. Sutherland** (1962). "ADENOSINE 3',5'-PHOSPHATE IN BIOLOGICAL MATERIALS .1. PURIFICATION AND PROPERTIES OF CYCLIC 3',5'-NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE AND USE OF THIS ENZYME TO CHARACTERIZE ADENOSINE 3',5'-PHOSPHATE IN HUMAN URINE." *Journal of Biological Chemistry* **237**(4): 1244-1250.
- Caldwell, J. H., G. A. Herin, et al.** (2008). "INCREASES IN INTRACELLULAR CALCIUM TRIGGERED BY CHANNELRHODOPSIN-2 POTENTIATE THE RESPONSE OF METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR mGLUR7." *J Biol Chem* **283**(36): 24300-24307.
- Carricarte, V. C., G. M. Bianchini, et al.** (1988). "ADENYLATE-CYCLASE ACTIVITY IN A HIGHER-PLANT, ALFALFA (MEDICAGO-SATIVA)." *Biochemical Journal* **249**(3): 807-811.
- Carter, P.** (1986). "SITE-DIRECTED MUTAGENESIS." *Biochemical Journal* **237**(1): 1-7.
- Cashmore, A. R., C. T. Lin, et al.** (1998). "ENHANCEMENT OF BLUE-LIGHT SENSITIVITY OF ARABIDOPSIS SEEDLINGS BY A BLUE LIGHT RECEPTOR CRYPTOCHROME 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2686-2690.
- Cashmore, A. R., J. A. Jarillo, et al.** (1999). "CRYPTOCHROMES: BLUE LIGHT RECEPTORS FOR PLANTS AND ANIMALS." *Science* **284**(5415): 760-765.

- Cessna, S. G., M. A. Messerli, et al.** (2001). "MEASUREMENT OF STRESS-INDUCED CA(2+) PULSES IN SINGLE AEQUORIN-TRANSFORMED TOBACCO CELLS." *Cell Calcium* **30**(3): 151-156.
- Cheng, K. T., Y. K. Leung, et al.** (2008). "CNGA2 CHANNELS MEDIATE ADENOSINE-INDUCED CA₂⁺ INFLUX IN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS." *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **28**(5): 913-918.
- Cheng, N. H.** (2003). "THE ARABIDOPSIS CAX1 MUTANT EXHIBITS IMPAIRED ION HOMEOSTASIS, DEVELOPMENT, AND HORMONAL RESPONSES AND REVEALS INTERPLAY AMONG VACUOLAR TRANSPORTERS." *The Plant Cell Online* **15**(2): 347-364.
- Cheng, S. H., M. R. Willmann, et al.** (2002). "CALCIUM SIGNALING THROUGH PROTEIN KINASES. THE ARABIDOPSIS CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE GENE FAMILY." *Plant Physiol* **129**(2): 469-485.
- Christensen, A. H. and P. H. Quail** (1996). "UBIQUITIN PROMOTER-BASED VECTORS FOR HIGH-LEVEL EXPRESSION OF SELECTABLE AND/OR SCREENABLE MARKER GENES IN MONOCOTYLEDONOUS PLANTS." *Transgenic Res* **5**(3): 213-218.
- Clough, S. J. and A. F. Bent** (1998). "FLORAL DIP: A SIMPLIFIED METHOD FOR AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF ARABIDOPSIS THALIANA." *Plant Journal* **16**(6): 735-743.
- Clough, S. J., K. A. Fengler, et al.** (2000). "THE ARABIDOPSIS DND1 "DEFENSE, NO DEATH" GENE ENCODES A MUTATED CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 9323-9328.
- Clouse, S. D., M. Langford, et al.** (1996). "A BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE MUTANT IN ARABIDOPSIS THALIANA EXHIBITS MULTIPLE DEFECTS IN GROWTH AND DEVELOPMENT." *Plant Physiol* **111**(3): 671-678.
- Cook, N. J., W. Hanke, et al.** (1987). "IDENTIFICATION, PURIFICATION, AND FUNCTIONAL RECONSTITUTION OF THE CYCLIC GMP-DEPENDENT CHANNEL FROM ROD PHOTORECEPTORS." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(2): 585-589.
- Cramer, M. and J. Myers** (1952). "GROWTH AND PHOTOSYNTHETIC CHARACTERISTICS OF EUGLENA GRACILIS." *Archiv Fur Mikrobiologie* **17**(4): 384-402.

- Curran, A. C., I. Hwang, et al.** (2000). "AUTOINHIBITION OF A CALMODULIN-DEPENDENT CALCIUM PUMP INVOLVES A STRUCTURE IN THE STALK THAT CONNECTS THE TRANSMEMBRANE DOMAIN TO THE ATPASE CATALYTIC DOMAIN." *J Biol Chem* **275**(39): 30301-30308.
- De Koninck, P.** (1998). "SENSITIVITY OF CAM KINASE II TO THE FREQUENCY OF CA²⁺ OSCILLATIONS." *Science* **279**(5348): 227-230.
- Demidchik, V., R. J. Davenport, et al.** (2002). "NONSELECTIVE CATION CHANNELS IN PLANTS." *Annu Rev Plant Biol* **53**: 67-107.
- Dietrich, P., U. Anschutz, et al.** (2010). "PHYSIOLOGY AND BIOPHYSICS OF PLANT LIGAND-GATED ION CHANNELS." *Plant Biology* **12**: 80-93.
- Donaldson, L., N. Ludidi, et al.** (2004). "SALT AND OSMOTIC STRESS CAUSE RAPID INCREASES IN ARABIDOPSIS THALIANA CGMP LEVELS." *FEBS Lett* **569**(1-3): 317-320.
- Douglass, A. D., S. Kraves, et al.** (2008). "ESCAPE BEHAVIOR ELICITED BY SINGLE, CHANNELRHODOPSIN-2-EVOKED SPIKES IN ZEBRAFISH SOMATOSENSORY NEURONS." *Curr Biol* **18**(15): 1133-1137.
- Dresselhaus, T. and M. L. Marton** (2009). "MICROPYLAR POLLEN TUBE GUIDANCE AND BURST: ADAPTED FROM DEFENSE MECHANISMS?" *Current Opinion in Plant Biology* **12**(6): 773-780.
- Ehsan, H., J. P. Reichheld, et al.** (1998). "EFFECT OF INDOMETHACIN ON CELL CYCLE DEPENDENT CYCLIC AMP FLUXES IN TOBACCO BY-2 CELLS." *FEBS Lett* **422**(2): 165-169.
- Evans, N. H., M. R. McAinsh, et al.** (2001). "CALCIUM OSCILLATIONS IN HIGHER PLANTS." *Current Opinion in Plant Biology* **4**(5): 415-420.
- Ferrol, N. and A. B. Bennett** (1996). "A SINGLE GENE MAY ENCODE DIFFERENTIALLY LOCALIZED CA²⁺-ATPASES IN TOMATO." *Plant Cell* **8**(7): 1159-1169.
- Finer, J. J., P. Vain, et al.** (1992). "DEVELOPMENT OF THE PARTICLE INFLOW GUN FOR DNA DELIVERY TO PLANT-CELLS." *Plant Cell Reports* **11**(7): 323-328.

- Foster, K. W. and R. D. Smyth** (1980). "LIGHT ANTENNAS IN PHOTOTACTIC ALGAE." *Microbiological Reviews* **44**(4): 572-630.
- Frietsch, S., Y. F. Wang, et al.** (2007). "A CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL IS ESSENTIAL FOR POLARIZED TIP GROWTH OF POLLEN." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(36): 14531-14536.
- Gallagher, S., T. W. Short, et al.** (1988). "LIGHT-MEDIATED CHANGES IN TWO PROTEINS FOUND ASSOCIATED WITH PLASMA MEMBRANE FRACTIONS FROM PEA STEM SECTIONS." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21): 8003-8007.
- Gaymard, F., M. Cerutti, et al.** (1996). "THE BACULOVIRUS/INSECT CELL SYSTEM AS AN ALTERNATIVE TO XENOPUS OOCYTES - FIRST CHARACTERIZATION OF THE AKT1 K⁺ CHANNEL FROM ARABIDOPSIS THALIANA." *Journal of Biological Chemistry* **271**(37): 22863-22870.
- Geisler, M., K. B. Axelsen, et al.** (2000). "MOLECULAR ASPECTS OF HIGHER PLANT P-TYPE CA(2⁺)-ATPASES." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**(1-2): 52-78.
- Geu-Flores, F., H. H. Nour-Eldin, et al.** (2007). "USER FUSION: A RAPID AND EFFICIENT METHOD FOR SIMULTANEOUS FUSION AND CLONING OF MULTIPLE PCR PRODUCTS." *Nucleic Acids Res* **35**(7): e55.
- Gottschalk, A., G. Nagel, et al.** (2005). "LIGHT ACTIVATION OF CHANNELRHODOPSIN-2 IN EXCITABLE CELLS OF CAENORHABDITIS ELEGANS TRIGGERS RAPID BEHAVIORAL RESPONSES." *Current Biology* **15**(24): 2279-2284.
- Gyula, P., E. Schäfer, et al.** (2003). "LIGHT PERCEPTION AND SIGNALLING IN HIGHER PLANTS." *Current Opinion in Plant Biology* **6**(5): 446-452.
- Han, X. and E. S. Boyden** (2007). "MULTIPLE-COLOR OPTICAL ACTIVATION, SILENCING, AND DESYNCHRONIZATION OF NEURAL ACTIVITY, WITH SINGLE-SPIKE TEMPORAL RESOLUTION." *PLoS One* **2**(3): e299.
- Hanke, W., N. J. Cook, et al.** (1988). "CGMP-DEPENDENT CHANNEL PROTEIN FROM PHOTORECEPTOR-MEMBRANES - SINGLE-CHANNEL ACTIVITY OF THE PURIFIED AND RECONSTITUTED PROTEIN." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(1): 94-98.
- Hedrich, R., and Neher, E.** (1978). "CYTOPLASMIC CALCIUM REGULATES VOLTAGE-DEPENDENT ION CHANNELS IN PLANT VACUOLES." *Nature* **329** (29): 833-836.

- Hepler, K.P., Kunkel, J.G. et al.** (published online: 19. Nov. 2011). "CALCIUM ENTRY INTO POLLEN TUBES" *Trends in Plant Science* (in press Dez. 2011, DOI: 10.1016/j.tplants.2011.10.007)
- Hetherington, A. M. and C. Brownlee** (2004). "THE GENERATION OF Ca^{2+} SIGNALS IN PLANTS." *Annu Rev Plant Biol* **55**: 401-427.
- Hinck, S., T. R. Neu, et al.** (2007). "PHYSIOLOGICAL ADAPTATION OF A NITRATE-STORING BEGGIATOA SP. TO DIEL CYCLING IN A PHOTOTROPHIC HYPERSALINE MAT." *Appl Environ Microbiol* **73**(21): 7013-7022.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, et al.** (1952). "MEASUREMENT OF CURRENT-VOLTAGE RELATIONS IN THE MEMBRANE OF THE GIANT AXON OF LOLIGO." *Journal of Physiology-London* **116**(4): 424-448.
- HoldawayClarke, T. L., J. A. Feijo, et al.** (1997). "POLLEN TUBE GROWTH AND THE INTRACELLULAR CYTOSOLIC CALCIUM GRADIENT OSCILLATE IN PHASE WHILE EXTRACELLULAR CALCIUM INFLUX IS DELAYED." *Plant Cell* **9**(11): 1999-2010.
- Horsager, A., M. M. Doroudchi, et al.** (2011). "VIRALLY DELIVERED CHANNELRHODOPSIN-2 SAFELY AND EFFECTIVELY RESTORES VISUAL FUNCTION IN MULTIPLE MOUSE MODELS OF BLINDNESS." *Molecular Therapy* **19**(7): 1220-1229.
- Hoshi, T.** (1995). "REGULATION OF VOLTAGE-DEPENDENCE OF THE $KAT1$ CHANNEL BY INTRACELLULAR FACTORS." *Journal of General Physiology* **105**(3): 309-328.
- Hwang, I., H. Sze, et al.** (2000). "A CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE CAN INHIBIT A CALMODULIN-STIMULATED Ca^{2+} PUMP (ACA2) LOCATED IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM OF ARABIDOPSIS." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6224-6229.
- Hwang, T. C., G. Nagel, et al.** (1994). "REGULATION OF THE GATING OF CYSTIC-FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR CL CHANNELS BY PHOSPHORYLATION AND ATP HYDROLYSIS." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 4698-4702.
- Iseki, M., S. Matsunaga, et al.** (2002). "A BLUE-LIGHT-ACTIVATED ADENYLYL CYCLASE MEDIATES PHOTOAVOIDANCE IN EUGLENA GRACILIS." *Nature* **415**(6875): 1047-1051.

- Jarillo, J. A., H. Gabrys, et al.** (2001). "PHOTOTROPIN-RELATED NPL1 CONTROLS CHLOROPLAST RELOCATION INDUCED BY BLUE LIGHT." *Nature* **410**(6831): 952-954.
- Jorgensen, B. B. and N. P. Revsbech** (1983). "COLORLESS SULFUR BACTERIA, BEGGIATOIA SPP AND THIOVULUM SPP IN O₂ AND H₂S MICROGRADIENTS." *Appl Environ Microbiol* **45**(4): 1261-1270.
- Kaplan, B., T. Sherman, et al.** (2007). "CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNELS IN PLANTS." *FEBS Lett* **581**(12): 2237-2246.
- Kateriya, S.** (2004). ""VISION" IN SINGLE-CELLED ALGAE." *News in Physiological Sciences* **19**(3): 133-137.
- Kaupp, U. B. and R. Seifert** (2002). "CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNELS." *Physiological Reviews* **82**(3): 769-824.
- Knight, M. R., A. K. Campbell, et al.** (1991). "TRANSGENIC PLANT AEQUORIN REPORTS THE EFFECTS OF TOUCH AND COLD-SHOCK AND ELICITORS ON CYTOPLASMIC CALCIUM." *Nature* **352**(6335): 524-526.
- Kohler, C., T. Merkle, et al.** (1999). "CHARACTERISATION OF A NOVEL GENE FAMILY OF PUTATIVE CYCLIC NUCLEOTIDE- AND CALMODULIN-REGULATED ION CHANNELS IN ARABIDOPSIS THALIANA." *Plant Journal* **18**(1): 97-104.
- Krupa, A., Anamika, et al.** (2006). "GENOME-WIDE COMPARATIVE ANALYSES OF DOMAIN ORGANISATION OF REPERTOIRES OF PROTEIN KINASES OF ARABIDOPSIS THALIANA AND ORYZA SATIVA." *Gene* **380**(1): 1-13.
- Laemmli, U. K.** (1970). "CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Leng, Q., R. W. Mercier, et al.** (1999). "CLONING AND FIRST FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A PLANT CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CATION CHANNEL." *Plant Physiol* **121**(3): 753-761.
- Leng, Q., R. W. Mercier, et al.** (2002). "ELECTROPHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF CLONED CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNELS." *Plant Physiol* **128**(2): 400-410.
- Leubner-Metzger, G.** (2001). "BRASSINOSTEROIDS AND GIBBERELLINS PROMOTE TOBACCO SEED GERMINATION BY DISTINCT PATHWAYS." *Planta* **213**(5): 758-763.

- Levine, R. P.** (1960). "GENETIC CONTROL OF PHOTOSYNTHESIS IN CHLAMYDOMONAS REINHARDI." *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**(7): 972-978.
- Li, J., X. Wang, et al.** (published online: 9. May 2011). "CGMP REGULATES HYDROGEN PEROXIDE ACCUMULATION IN CALCIUM-DEPENDENT SALT RESISTANCE PATHWAY IN ARABIDOPSIS THALIANA ROOTS." *Planta* (DOI 10.1007/s00425-011-1439-3)
- Li, W. W., S. Luan, et al.** (1994). "CYCLIC-AMP STIMULATES K⁺ CHANNEL ACTIVITY IN MESOPHYLL-CELLS OF VICIA-FABA-K." *Plant Physiol* **106**(3): 957-961.
- Liang, F., K. W. Cunningham, et al.** (1997). "ECA1 COMPLEMENTS YEAST MUTANTS DEFECTIVE IN CA²⁺ PUMPS AND ENCODES AN ENDOPLASMIC RETICULUM-TYPE CA²⁺-ATPASE IN ARABIDOPSIS THALIANA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16): 8579-8584.
- Lin, C. T., M. Ahmad, et al.** (1996). "ARABIDOPSIS CRYPTOCHROME 1 IS A SOLUBLE PROTEIN MEDIATING BLUE LIGHT-DEPENDENT REGULATION OF PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT." *Plant Journal* **10**(5): 893-902.
- Liu, M. Y.** (1994). "CALCIUM-CALMODULIN MODULATION OF THE OLFACTORY CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CATION CHANNEL" *Science* **266**(5193): 1933-1933.
- Lorenzi, R., N. Ceccarelli, et al.** (1994). "IDENTIFICATION OF RETINAL IN HIGHER-PLANTS - IS A RHODOPSIN-LIKE PROTEIN THE BLUE-LIGHT RECEPTOR." *Phytochemistry* **36**(3): 599-600.
- Luan, S., J. Kudla, et al.** (2002). "CALMODULINS AND CALCINEURIN B-LIKE PROTEINS: CALCIUM SENSORS FOR SPECIFIC SIGNAL RESPONSE COUPLING IN PLANTS." *Plant Cell* **14**: 389-400.
- Ludidi, N. and C. Gehring** (2003). "IDENTIFICATION OF A NOVEL PROTEIN WITH GUANYLYL CYCLASE ACTIVITY IN ARABIDOPSIS THALIANA." *J Biol Chem* **278**(8): 6490-6494.
- Maathuis, F. J.** (2006). "CGMP MODULATES GENE TRANSCRIPTION AND CATION TRANSPORT IN ARABIDOPSIS ROOTS." *Plant J* **45**(5): 700-711.
- Maathuis, F. J.** (2006). "THE ROLE OF MONOVALENT CATION TRANSPORTERS IN PLANT RESPONSES TO SALINITY." *J Exp Bot* **57**(5): 1137-1147.

- Maathuis, F. J. M. and D. Sanders** (2001). "SODIUM UPTAKE IN ARABIDOPSIS ROOTS IS REGULATED BY CYCLIC NUCLEOTIDES." *Plant Physiol* **127**(4): 1617-1625.
- McAinsh, M. R. and J. K. Pittman** (2009). "SHAPING THE CALCIUM SIGNATURE." *New Phytologist* **181**(2): 275-294.
- McAinsh, M. R., A. A. R. Webb, et al.** (1995). "STIMULUS-INDUCED OSCILLATIONS IN GUARD-CELL CYTOSOLIC-FREE CALCIUM." *Plant Cell* **7**(8): 1207-1219.
- Meier, S., Madeo L. et al.** (2009). "DECIPHERING cGMP SIGNATURES AND cGMP-DEPENDENT PATHWAYS IN PLANT DEFENCE." *Plant Signaling & Behaviour* **4** (4): 307-309; Article Addendum
- Meinke, D. W., J. M. Cherry, et al.** (1998). "ARABIDOPSIS THALIANA: A MODEL PLANT FOR GENOME ANALYSIS." *Science* **282**(5389): 662-682.
- Moscatiello, R., S. Alberghini, et al.** (2009). "EVIDENCE FOR CALCIUM-MEDIATED PERCEPTION OF PLANT SYMBIOTIC SIGNALS IN AEQUORIN-EXPRESSING MESORHIZOBIUM LOTI." *BMC Microbiol* **9**(206):1-11
- Montminy, M. R. and L. M. Bilezikjian** (1987). "BINDING OF A NUCLEAR-PROTEIN TO THE CYCLIC-AMP RESPONSE ELEMENT OF THE SOMATOSTATIN GENE." *Nature* **328**(6126): 175-178.
- Moutinho, A., P. J. Hussey, et al.** (2001). "cAMP ACTS AS A SECOND MESSENGER IN POLLEN TUBE GROWTH AND REORIENTATION." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10481-10486.
- Mullis, K., F. Faloona, et al.** (1986). "SPECIFIC ENZYMATIC AMPLIFICATION OF DNA INVITRO - THE POLYMERASE CHAIN-REACTION." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-273.
- Nagel, G., D. Ollig, et al.** (2002). "CHANNELRHODOPSIN-1: A LIGHT-GATED PROTON CHANNEL IN GREEN ALGAE." *Science* **296**(5577): 2395-2398.
- Nagel, G., J. Looser, et al.** (2009). "MECHANISTIC INSIGHTS IN LIGHT-INDUCED cAMP PRODUCTION BY PHOTOACTIVATED ADENYLYL CYCLASE ALPHA (PAC ALPHA)." *Biological Chemistry* **390**(11): 1105-1111.

- Nagel, G., T. Szellas, et al.** (2003). "CHANNELRHODOPSIN-2, A DIRECTLY LIGHT-GATED CATION-SELECTIVE MEMBRANE CHANNEL." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 13940-13945.
- Neher, E. and B. Sakmann** (1976). "SINGLE CHANNEL CURRENTS RECORDED FROM DENERVATED FROG MUSCLE-FIBERS." *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **362**: 31-31.
- Nelson, D. C. and R. W. Castenholz** (1982). "LIGHT RESPONSES OF BEGGIATOIA." *Archives of Microbiology* **131**(2): 146-155.
- Ntefidou, M., M. Iseki, et al.** (2003). "PHOTOACTIVATED ADENYLYL CYCLASE CONTROLS PHOTOTAXIS IN THE FLAGELLATE EUGLENA GRACILIS." *Plant Physiol* **133**(4): 1517-1521.
- Ordenes, V. R., F. C. Reyes, et al.** (2002). "A THAPSIGARGIN-SENSITIVE CA(2+) PUMP IS PRESENT IN THE PEA GOLGI APPARATUS MEMBRANE." *Plant Physiol* **129**(4): 1820-1828.
- Pacini, B., A. Petrigliano, et al.** (1993). "ADENYLYL-CYCLASE ACTIVITY IN ROOTS OF PISUM-SATIVUM." *Phytochemistry* **34**(4): 899-903.
- Peiter, E., F. J. M. Maathuis, et al.** (2005). "THE VACUOLAR CA(2+)-ACTIVATED CHANNEL TPC1 REGULATES GERMINATION AND STOMATAL MOVEMENT." *Nature* **434**(7031): 404-408.
- Penson, S. P., R. C. Schuurink, et al.** (1996). "cGMP IS REQUIRED FOR GIBBERELIC ACID-INDUCED GENE EXPRESSION IN BARLEY ALEURONE." *Plant Cell* **8**(12): 2325-2333.
- Rall, T. W. and E. W. Sutherland** (1958). "FORMATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE BY TISSUE PARTICLES." *Journal of Biological Chemistry* **232**(2): 1065-1076.
- Rannels, S. R. and J. D. Corbin** (1980). "STUDIES OF PARTIALLY DENATURED REGULATORY SUBUNIT FROM CAMP-DEPENDENT PROTEIN-KINASE." *Federation Proceedings* **39**(6): 2094-2094.
- Rato, C., D. Monteiro, et al.** (2004). "CALMODULIN ACTIVITY AND CAMP SIGNALLING MODULATE GROWTH AND APICAL SECRETION IN POLLEN TUBES." *Plant Journal* **38**(6): 887-897.

- Reddy, V. S., G. S. Ali, et al.** (2002). "GENES ENCODING CALMODULIN-BINDING PROTEINS IN THE ARABIDOPSIS GENOME." *J Biol Chem* **277**(12): 9840-9852.
- Reed, J. W., A. Nagatani, et al.** (1994). "PHYTOCHROME-A AND PHYTOCHROME-B HAVE OVERLAPPING BUT DISTINCT FUNCTIONS IN ARABIDOPSIS DEVELOPMENT." *Plant Physiol* **104**(4): 1139-1149.
- Rich, T. C., T. E. Tsf, et al.** (2001). "IN VIVO ASSESSMENT OF LOCAL PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY USING TAILORED CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNELS AS CAMP SENSORS." *Journal of General Physiology* **118**(1): 63-77.
- Rizzini, L., J. J. Favory, et al.** (2011). "PERCEPTION OF UV-B BY THE ARABIDOPSIS UVR8 PROTEIN." *Science* **332**(6025): 103-106.
- Robison, G. A., R. W. Butcher, et al.** (1967). "ADENYL CYCLASE AS AN ADRENERGIC RECEPTOR." *Annals of the New York Academy of Sciences* **139**(A3): 703-723.
- Robison, G. A., R. W. Butcher, et al.** (1968). "CYCLIC AMP." *Annual Review of Biochemistry* **37**: 149-174.
- Rudd, J. J. and V. E. Franklin-Tong** (2001). "UNRAVELLING RESPONSE-SPECIFICITY IN CA²⁺ SIGNALLING PATHWAYS IN PLANT CELLS." *New Phytologist* **151**(1): 7-33.
- Ryan, M. D., A. M. Q. King, et al.** (1991). "CLEAVAGE OF FOOT-AND-MOUTH-DISEASE VIRUS POLYPROTEIN IS MEDIATED BY RESIDUES LOCATED WITHIN A 19 AMINO-ACID-SEQUENCE." *Journal of General Virology* **72**: 2727-2732.
- Ryu, M. H., O. V. Moskvina, et al.** (2010). "NATURAL AND ENGINEERED PHOTOACTIVATED NUCLEOTIDYL CYCLASES FOR OPTOGENETIC APPLICATIONS." *J Biol Chem* **285**(53): 41501-41508.
- Sager, R. and G. E. Palade** (1957). "STRUCTURE AND DEVELOPMENT OF THE CHLOROPLAST IN CHLAMYDOMONAS .1. THE NORMAL GREEN CELL." *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **3**(3): 463-506.
- Sakai, T., T. Kagawa, et al.** (2001). "ARABIDOPSIS NPH1 AND NPL1: BLUE LIGHT RECEPTORS THAT MEDIATE BOTH PHOTOTROPISM AND CHLOROPLAST RELOCATION." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6969-6974.

- Sanders, D., E. Peiter, et al.** (2005). "THE VACUOLAR CA(2+)-ACTIVATED CHANNEL TPC1 REGULATES GERMINATION AND STOMATAL MOVEMENT." *Nature* **434**(7031): 404-408.
- Sanders, D., J. Pelloux, et al.** (2002). "CALCIUM AT THE CROSSROADS OF SIGNALING." *Plant Cell* **14**: 401-417.
- Schmidt, J., T. Altmann, et al.** (1997). "BRASSINOSTEROIDS FROM SEEDS OF ARABIDOPSIS THALIANA." *Phytochemistry* **45**(7): 1325-1327.
- Schmidt, M., G. Gessner, et al.** (2006). "PROTEOMIC ANALYSIS OF THE EYESPOT OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII PROVIDES NOVEL INSIGHTS INTO ITS COMPONENTS AND TACTIC MOVEMENTS." *Plant Cell* **18**(8): 1908-1930.
- Schroder-Lang, S., M. Schwarzel, et al.** (2007). "FAST MANIPULATION OF CELLULAR CAMP LEVEL BY LIGHT IN VIVO." *Nat Methods* **4**(1): 39-42.
- Schroll, C., T. Riemensperger, et al.** (2006). "LIGHT-INDUCED ACTIVATION OF DISTINCT MODULATORY NEURONS TRIGGERS APPETITIVE OR AVERSIVE LEARNING IN DROSOPHILA LARVAE." *Curr Biol* **16**(17): 1741-1747.
- Schulzlessdorf, B. and R. Hedrich** (1995). "PROTONS AND CALCIUM MODULATE SV-TYPE CHANNELS IN THE VACUOLAR-LYSOSOMAL COMPARTMENT - CHANNEL INTERACTION WITH CALMODULIN INHIBITORS." *Planta* **197**(4): 655-671.
- Sentenac, H., N. Bonneaud, et al.** (1992). "CLONING AND EXPRESSION IN YEAST OF A PLANT POTASSIUM-ION TRANSPORT-SYSTEM." *Science* **256**(5057): 663-665.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, et al.** (1962). "EXTRACTION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF AEQUORIN, A BIOLUMINESCENT PROTEIN FROM LUMINOUS HYDROMEDUSAN, AEQUOREA." *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**(3): 223-239.
- Smidt-Jaworska, A., K. Jaworski, et al.** (2003). "BIOCHEMICAL EVIDENCE FOR A CGMP-REGULATED PROTEIN KINASE IN PHARBITIS NIL." *Phytochemistry* **63**(6): 635-642.
- Spiteri, A., O. M. Viratelle, et al.** (1989). "ARTEFACTUAL ORIGINS OF CYCLIC-AMP IN HIGHER-PLANT TISSUES." *Plant Physiol* **91**(2): 624-628.

- Steber, C. M. and P. McCourt** (2001). "A ROLE FOR BRASSINOSTEROIDS IN GERMINATION IN ARABIDOPSIS." *Plant Physiol* **125**(2): 763-769.
- Stierl, M., P. Stumpf, et al.** (2011). "LIGHT MODULATION OF CELLULAR CAMP BY A SMALL BACTERIAL PHOTOACTIVATED ADENYLYL CYCLASE, BPAC, OF THE SOIL BACTERIUM BEGGIATO." *J Biol Chem* **286**(2): 1181-1188.
- Suita, K., T. Kiryu, et al.** (2009). "CYCLIC GMP ACTS AS A COMMON REGULATOR FOR THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF THE FLAVONOID BIOSYNTHETIC PATHWAY IN SOYBEAN." *Planta* **229**(2): 403-413.
- Sutherland, E. W., T. W. Rall, et al.** (1962). "ADENYL CYCLASE .1. DISTRIBUTION, PREPARATION, AND PROPERTIES." *Journal of Biological Chemistry* **237**(4): 1220-1227.
- Sweerts, J. P. R. A., D. Debeer, et al.** (1990). "DENITRIFICATION BY SULFUR OXIDIZING BEGGIATO SPP MATS ON FRESH-WATER SEDIMENTS." *Nature* **344**(6268): 762-763.
- Talke, I.** (2003). "CNGCs: PRIME TARGETS OF PLANT CYCLIC NUCLEOTIDE SIGNALLING?" *Trends in Plant Science* **8**(6): 286-293.
- Tang, W., I. Ehrlich, et al.** (2009). "FAITHFUL EXPRESSION OF MULTIPLE PROTEINS VIA 2A-PEPTIDE SELF-PROCESSING: A VERSATILE AND RELIABLE METHOD FOR MANIPULATING BRAIN CIRCUITS." *Journal of Neuroscience* **29**(27): 8621-8629.
- Teng, Y., W. Xu, et al.** (2010). "cGMP IS REQUIRED FOR SEED GERMINATION IN ARABIDOPSIS THALIANA." *J Plant Physiol* **167**(11): 885-889.
- Urquhart, W., K. Chin, et al.** (2011). "THE CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNELS ATCNGC11 AND 12 ARE INVOLVED IN MULTIPLE CA(2+)-DEPENDENT PHYSIOLOGICAL RESPONSES AND ACT IN A SYNERGISTIC MANNER." *J Exp Bot* **62**(10): 3671-3682.
- Wang, H., J. Peca, et al.** (2007). "HIGH-SPEED MAPPING OF SYNAPTIC CONNECTIVITY USING PHOTOSTIMULATION IN CHANNELRHODOPSIN-2 TRANSGENIC MICE." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(19): 8143-8148.
- Ward, J. M. and J. I. Schroeder** (1994). "CALCIUM-ACTIVATED K⁺ CHANNELS AND CALCIUM-INDUCED CALCIUM-RELEASE BY SLOW VACUOLAR ION CHANNELS IN GUARD-CELL VACUOLES IMPLICATED IN THE CONTROL OF STOMATAL CLOSURE." *Plant Cell* **6**(5): 669-683.

- Wassle, H., S. Thyagarajan, et al.** (2010). "VISUAL FUNCTION IN MICE WITH PHOTORECEPTOR DEGENERATION AND TRANSGENIC EXPRESSION OF CHANNELRHODOPSIN-2 IN GANGLION CELLS." *Journal of Neuroscience* **30**(26): 8745-8758.
- Witters, E., L. Quanten, et al.** (2004). "PRODUCT IDENTIFICATION AND ADENYLYL CYCLASE ACTIVITY IN CHLOROPLASTS OF NICOTIANA TABACUM." *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**(4): 499-504.
- Witters, E., L. Roef, et al.** (1996). "QUANTITATION OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN BIOLOGICAL SAMPLES BY NEGATIVE ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY COUPLED TO ION SUPPRESSION LIQUID CHROMATOGRAPHY." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **10**(2): 225-231.
- Yoo, S. D., Y. H. Cho, et al.** (2007). "ARABIDOPSIS MESOPHYLL PROTOPLASTS: A VERSATILE CELL SYSTEM FOR TRANSIENT GENE EXPRESSION ANALYSIS." *Nat Protoc* **2**(7): 1565-1572.
- Zhang, F., Aranis A.M., et al.** (2007). "CIRCUIT-BREAKERS: OPTICAL TECHNOLOGIES FOR PROBING NEURAL SIGNALS AND SYSTEMS." *Nature Reviews Neuroscience* **8**: 577-581
- Zhang, F., L. P. Wang, et al.** (2006). "CHANNELRHODOPSIN-2 AND OPTICAL CONTROL OF EXCITABLE CELLS." *Nat Methods* **3**(10): 785-792.
- Zhang, L.** (2003). "CALMODULIN-BINDING PROTEIN KINASES IN PLANTS." *Trends in Plant Science* **8**(3): 123-127.
- Zufall, F., S. Firestein, et al.** (1991). "ANALYSIS OF SINGLE CYCLIC-NUCLEOTIDE GATED CHANNELS IN OLFACTORY RECEPTOR-CELLS." *Journal of Neuroscience* **11**(11): 3573-3580.
- Zuo, J., Niu, Q.W., and Chua, N-H** (2000). "AN ESTROGEN RECEPTOR-BASED TRANSACTIVATOR XVE MEDIATES HIGHLY INDUCIBLE GENE EXPRESSION IN TRANSGENIC PLANTS." *The Plant Journal* **24** (2) 265-273.

6.2 Abbildungsverzeichnis

ALLGEMEIN

Abbildung 1.1 Struktur cyclischer Nucleotidmonophosphate.....	- 8 -
Abbildung 1.2 Synthese und Degradation cyclischer Nucleotide	- 9 -
Abbildung 2.1 Aufbau eines DEVC-Messplatzes.	- 62 -
Abbildung 2.2 Belichtungsvorgang bei den Patch-Clamp-Messungen.	- 65 -
Abbildung 2.3 Schematische Darstellung: Fluoreszenzmikroskop.....	- 66 -
Abbildung 2.4 Schematische Darstellung: Luminometer	- 71 -

EXPRESSION VON CHANNELRHODOPSIN-2 IN PFLANZENZELLEN

Abbildung 3.1 Transiente Expression von Channelrhodopsin in <i>N. benthamiana</i> . -	84 -
Abbildung 3.2 Retinalunabhängige Expression von ChR-2 C128T.....	- 84 -
Abbildung 3.3 Lichtinduzierte Membrandepolarisation.....	- 86 -
Abbildung 3.4 Patch-Clamp-Messung an Protoplasten: ChR-C128T.....	- 88 -
Abbildung 3.5 Patch-Clamp-Messung an Protoplasten: ChR-C128A	- 89 -
Abbildung 3.6 Patch-Clamp-Messung an Protoplasten: GFP-Kontrolle.....	- 90 -
Abbildung 3.7 Lichtgesteuerte Manipulation des Stromverlaufes	- 91 -
Abbildung 3.8 Channelrhodopsinströme ohne Retinalzugabe	- 92 -

EXPRESSION LICHTAKTIVIERTER NUCLEOTIDCYCLASEN IN PFLANZENZELLEN

Abbildung 3.9 Transiente Expression von <i>bPAC::YFP</i> in <i>A. thaliana</i>	- 94 -
Abbildung 3.10 Transiente Expression von <i>bPGC::YFP</i> in <i>A. thaliana</i>	- 95 -
Abbildung 3.11 Phänotyp <i>bPAC::YFP</i> -transfizierter Protoplasten	- 96 -
Abbildung 3.12 cAMP-Produktion in Protoplasten von <i>A. thaliana</i>	- 97 -
Abbildung 3.13 cGMP-Produktion in Protoplasten von <i>A. thaliana</i>	- 99 -

EXPRESSION DER KONSTRUKTE *bPAC::YFP* UND *bPGC::YFP* IN OOCYTEN

Abbildung 3.14 Spezifische Umsatzraten von *bPAC* und *bPGC* in Oocyten - 101 -

EXPRESSION DER LICHTAKTIVIERTEN NUCLEOTIDCYCLASEN IN POLLEN

Abbildung 3.15 Expression von *bPAC::YFP* und *bPGC::YFP* in Pollen - 104 -

STABIL TRANSGENE PFLANZEN

Abbildung 3.16 Phänotypen der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPAC::YFP*..... - 108 -

Abbildung 3.17 Phänotypen der stabil transgenen Pflanzenlinie *bPGC::YFP*..... - 109 -

Abbildung 3.18 Expressionsinduktion von *bPAC::YFP* in der Wurzel - 110 -

Abbildung 3.19 Expressionsinduktion in epidermalen Zellen von *A. thaliana*..... - 111 -

Abbildung 3.20 Induktion und maximale Proteinexpression nach 48 Stunden ... - 112 -

Abbildung 3.21 Induktionsabhängige cAMP-Produktion - 114 -

Abbildung 3.22 Belichtungsabhängige cAMP-Produktion - 115 -

Abbildung 3.23 cAMP-Degradation..... - 116 -

Abbildung 3.24 cAMP-Akkumulation nach 24, 48 und 72 Stunden..... - 118 -

Abbildung 3.25 cGMP-Produktion in der transgenen Pflanzenlinie *bPGC::YFP* - 120 -

Abbildung 3.26 Spezifische Umsatzraten von *bPAC* und *bPGC* in *A. thaliana* .. - 121 -

Abbildung 3.27 Konstitutive Expression in *A. thaliana*..... - 123 -

PHÄNOTYP: VERZÖGERTE SAMENKEIMUNG

Abbildung 3.28 Verzögerte Samenkeimung nach induzierter *bPAC*-Expression - 124 -

Abbildung 3.29 Samenkeimung von GFP-Kontrollpflanzen - 125 -

Abbildung 3.30 Verlauf der Samenkeimung - 126 -

Abbildung 3.31 cAMP-Konzentrationsverlauf bei der Samenkeimung..... - 127 -

LUMINOMETRISCHE CALCIUM-MESSUNGEN

Abbildung 3.32 Technisch bedingtes Artefaktsignal am Luminometer.....	- 129 -
Abbildung 3.33 Erhöhung der zellulären Calciumkonzentration durch Licht	- 130 -
Abbildung 3.34 Lichtinduzierbare Calciumoszillationen	- 131 -
Abbildung 3.35 Kontrollmessung an untransformierten Blattproben.	- 133 -
Abbildung 3.36 Lichtinduziertes Calciumsignal ohne Östrogeninduktion	- 134 -
Abbildung 3.37 Lichtinduziertes Calciumsignal in der Linie <i>bPGC::YFP</i>	- 135 -
Abbildung 3.38 Inhibition des Calciumsignals durch Lanthanchlorid.....	- 137 -
Abbildung 3.39 Kontrollmessung an untransformierten Blattproben (2).....	- 138 -

STABIL TRANSGENE ZELLKULTUR

Abbildung 3.40 Expression von <i>bPAC::YFP</i> und <i>bPGC::YFP</i> in Zellkultur.....	- 140 -
Abbildung 3.41 Lichtinduzierbare cAMP-Produktion in der Zellkultur.....	- 141 -

DAS FUSIONSKONSTRUKT *CNGA2_2A_EuPAC*

Abbildung 3.42 DEVC-Messung des Fusionskonstruktes <i>CNGA2_2A_EuPAC</i> -	144 -
Abbildung 3.43 Vergleich der Fusionskonstrukte in DEVC-Messungen.	- 145 -
Abbildung 3.44 Vergleich der Fusionskonstrukte in ELISA-Messungen.....	- 147 -

DISKUSSION

Abbildung 4.1 Funktionsweise der Pflanzenlinie <i>bPAC::YFP</i>	- 157 -
Abbildung 4.2 Artefaktsignale am Luminometer.....	- 182 -

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Standard-Reaktionsansatz einer PCR (50µl)	- 38 -
Tabelle 2.2 Exemplarisches Programm einer PCR.....	- 38 -
Tabelle 2.3 Standard-Reaktionsansatz einer <i>site directed mutagenesis</i> (50µl)	- 40 -
Tabelle 2.4 Exemplarisches Programm einer <i>site directed mutagenesis</i>	- 40 -
Tabelle 2.5 Standard-Reaktionsansatz Restriktionsverdau (50µl)	- 41 -
Tabelle 2.6 Standard-Reaktionsansatz Ligationsreaktion (10µl)	- 45 -
Tabelle 2.7 Standard-Reaktionsansatz USER Reaktion (10µl)	- 47 -
Tabelle 2.8 Standard-Reaktionsansatz einer In-Vitro-Transkription(20µl)	- 49 -
Tabelle 2.9 Leistungen der verwendeten Lichtquellen.....	- 73 -
Tabelle 2.10 Belichtung in Gewächshäusern und Klimakammern	- 73 -
Tabelle 3.1 Längenverteilung des Pollenschlauchwachstums.....	- 105 -
Tabelle 6.1 Übersicht der zur Selektion verwendeten Antibiotika.....	- 224 -
Tabelle 6.2 Übersicht der erstellten Konstrukte	- 232 -
Tabelle 6.3 Übersicht der verwendeten Klonierungsprimer.....	- 233 -

6.4 Puffer und Lösungen

6.4.1 Wasser

6.4.1.1 DEPC-Wasser (RNAse-frei)

DEPC (Di-Ethyl-Pyro-Carbonat) 0,1 vol%

in HPLC Wasser 24 Stunden magnetisch gerührt,
autoklaviert, aliquotiert, bei -20°C gelagert.

6.4.1.2 HPLC Wasser

HPLC-gereinigtes Wasser,

ROTISOLV HPLC H₂O (*Roth*)

6.4.1.3 Vollentsalztes (VE)- Wasser (ddH₂O)

Wasser aus der Entsalzungsanlage *TKA-LAB HP*

6.4.2 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden wenn nicht anders angegeben in ddH₂O angesetzt.

6.4.2.1 TAE-Puffer (Laufpuffer DNA-Gelelektrophorese)

Tris-Acetat	40mM
EDTA	1mM
pH 7,5	(TRIS / HCl)

6.4.2.2 MEN-Puffer (Laufpuffer RNA-Gelelektrophorese)

MOPS	200mM
EDTA	5mM
Natriumacetat	50mM
pH 7,0	(NaOH)

6.4.2.3 TENS-Puffer (Lysispuffer *E. coli*)

NaOH	100mM
SDS	0,5 %
RNAse	200µg/ml
in TE-Puffer (6.4.2.4)	

6.4.2.4 TE-Puffer (DNA Elution, USER Klonierung)

Tris	10mM
EDTA	1mM
pH 7,5	(TRIS / HCl)

6.4.2.5 ORi (Oocyten-Ringer)- Standardlösung (Messlösung Oocyten)

KCl	5mM
NaCl	110mM
CaCl ₂ / BaCl ₂	2mM
MgCl ₂	1mM
HEPES	5mM
pH 7,6	(HEPES / TRIS)

6.4.2.6 ND-96 (Lösung zur Proteinexpression in Oocyten)

NaCl	96mM
KCl	2mM
CaCl ₂	1mM (optional)
MgCl ₂	1mM
HEPES	5mM
pH 7,4	(HEPES/TRIS)

6.4.2.7 W-5-Lösung (Proteinexpression Protoplasten)

NaCl	154mM
CaCl ₂	125mM
KCl	5mM
MES	2mM
pH 5,6	(MES/TRIS)

6.4.2.8 MMG-Lösung (Protoplastentransfektion)

D-Mannitol	0,4M
MgCl ₂	15mM
MES	4mM
pH 5,6	(MES/TRIS)

6.4.2.9 Agromix-Puffer (Infiltration)

MgCl ₂	10mM
MES	10mM
Acetosyringon	150µM
pH 5,6	(KOH)

(frisch ansetzen und dunkel lagern!)

6.4.2.10 PEG-Transformationslösung Protoplasten

PEG	40% w/v
H ₂ O	30% v/v
D-Mannitol	200mM
CaCl ₂	100mM

6.4.2.11 Pollenschlauch Keimungsmedium (*N. benthamiana*)

Borsäure	1,6mM
CaCl ₂	100µM
MES	1mM
pH 5,8	(MES/TRIS)
$\pi = 430$	(D-Saccharose)

6.4.2.12 Pollenschlauch Keimungsmedium (*A. thaliana*)

Borsäure	0,8mM
KCl	1mM
CaCl ₂ / CaNO ₃	2mM
MES	1mM
pH 5,6	(MES/TRIS)
$\pi = 400$	(D-Saccharose)

6.4.3 Kulturmedien

Alle Kulturmedien wurden in ddH₂O angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert.

6.4.3.1 LB (Luria Broth)-Medium (E. coli)

NaCl	10g/l
Trypton	10g/l
Yeast Extract	5g/l

6.4.3.2 YEB-Medium (A. tumefaciens)

Trypton	5g/l
Yeast Extract	5g/l
Saccharose	5g/l
MgSO ₄	50mM

6.4.3.3 HaM-Kulturmedium (*A. thaliana* Zellkultur)

MS + MES (Duchefa #M0255 + Vitamin)	1x
Saccharose	20g/l
2,4 D (Auxin, stock: 50mg/ml)	10µl/l
Eisenstammlösung*	20ml/l
(*FeSO ₄ 1,4g/l; EDTA1,9g/l)	
pH 5,7	(KOH)

6.4.3.4 SOC-Medium (*E. coli*)

NaCl	0,5g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5g/l
Trypton	20g/l
Yeast Extract	5g/l
Glucose	20mM

6.4.3.5 LB-Agarplatten (Selektion *E. coli*)

Agar Agar (*Applichem / Peqlab*) 1,5% (w/v)

in LB-Medium (6.4.3.1)

6.4.3.6 YEB-Agarplatten (Selektion *A. tumefaciens*)

Agar Agar (*Applichem / Peqlab*) 1,5 % (w/v)

In YEB-Medium (6.4.3.2)

6.4.3.7 HaM Agarplatte (*A. thaliana* Selektion)

Phytigel 0,3% (w/v)

In HaM-Medium (6.4.3.3)

6.4.3.8 MS-Medium

Murashige-Skoog Medium,

+/- Vitamin

Duchefa Biochemie BV

6.4.4 Enzymlösungen

Alle Enzymlösungen wurden in ddH₂O angesetzt.

6.4.4.1 Protoplastierung für PEG-Transformation (*A. thaliana*)

Cellulase R-10	1,5%
Macerozym R-10	0,25%
KCl	20mM
MES	20mM
(Durchführung) Wasserbad	10min/55°C
(Durchführung) abkühlen lassen	RT
CaCl ₂	1mM
BSA	0,1%
pH 5,6	(MES/TRIS)
$\pi = 650$	(D-Sorbitol)

6.4.4.2 Protoplastierung von *A. thaliana* (Standard)

Pectolyase Y-23 (Yakult)	0,05%
Cellulase R-10 (Ohnutsuka)	0,5%
Macerozym R-10	0,5%
BSA	1%
CaCl ₂	1mM
MES	5mM
pH 5,6	(MES/TRIS)
$\pi = 500$	(D-Sorbitol)

6.4.4.3 Protoplastierung von *N. benthamiana* (Standard)

Cellulase Y-C	1%
Pectolyase Y-23	1%
BSA	0,5%
PVP (Polyvenylpyrrolidon)	0,5%
CaCl ₂	1mM
MES	8mM
pH 5,6	(MES/TRIS)
$\pi = 560$	(D-Sorbitol)

6.4.5 Probenpuffer

6.4.5.1 Probenpuffer DNA

Glycerin	50% (w/v)
EDTA	100mM
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylen-Cyanol FF	0,25% (w/v)

6.4.5.2 Probenpuffer RNA

MEN-Puffer	100µl
Formaldehyd (37%)	175µl
Formamid	500µl
DNA-Probenpuffer (6.4.5.1)	25µl
add 1 ml DEPC-H ₂ O (6.4.1.1)	

6.4.6 Verwendete Antibiotika

Tabelle 6.1 Übersicht der zur Selektion verwendeten Antibiotika und deren Einsatzkonzentrationen in den jeweiligen Organismen

<u>Antibiotikum</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Organismus</u>
Ampicillin	50µg/ml	<i>E. coli</i> MRF´
Gentamycin	25µg/ml // 50µg/ml	<i>A. thaliana</i> // Oocyten
Hygromycin	40µg/ml // 30µg/ml	<i>E. coli</i> // Pflanzenkeimlinge
Kanamycin	50µg/ml	<i>E. coli</i> MRF´
Rifampicin	10µg/ml	<i>A. tumefaciens</i>
Spectinomycin	100µg/ml	<i>A. tumefaciens</i>

6.5 Chemikalien

Acetosyringon	Aldrich	CAS: 2478-38-8
Agar Agar	Applichem	CAS: 9002-18-0
Agarose	Peq-Gold, Biozym LE-Agarose	CAS: 9012-36-6
Agarose (low melting Agarose)	Roth	CAS: 39346-81-1
Borsäure	Applichem,	CAS: 10043-353
CaCl ₂	Applichem, P>99,8%,	CAS:10035-04-8
Coelenterazin	Synchem	CAS: 55779-481
DEPC	Applichem,	CAS:1609-47-8
DTT	Applichem	CAS: 27565-419
EDTA	Applichem,	CAS: 6381-92-6
Estrogen (β-Estradiol)	Sigma Aldrich	CAS: 50-28-2
Ethanol	Roth, >99,8%,	CAS: 64-17-5
Formaldehyd	Applichem, 37%	CAS: 50-00-0
Formamid (ultrapure)	Applichem,	CAS: 75-12-7
Glucose (D+Glucose)	Merk	CAS: 50-99-7
Glycerin	Applichem	CAS: 56-81-5
HEPES	Applichem,	CAS: 7365-45
Isopropanol	Applichem	CAS: 67-63-0
KCl	Applichem, p>99,5%;	CAS: 7447-18-6
Mannitol (D-Mannitol)	Sigma Aldrich	CAS: 6965-8
MES	Applichem	CAS: 145224-948
MgSO ₄	Applichem, p>99,5%;	CAS: 10034-998
MOPS	Applichem	CAS: 1132-61-2
MgCl ₂	Applichem, p>99%;	CAS: 7791-18-6
NaOH	Applichem, p>99%;	CAS: 1310-73-2
NaCl	Applichem, p>99,5%;	CAS: 7647-14-4
Phenol/Chloroform/Isoamyl	Fluka Biochemika	CAS: 136112-000
PEG-4000	Aldrich chemnistry	CAS: 25322-86-3

Phytigel	Sigma Aldrich	CAS: 71010-521
PVP	Sigma Aldrich	CAS: 9003-39-8
(D-) Saccharose	Applichem	CAS: 57-50-1
SDS (ultrapure)	Roth, p>99%,	CAS: 151-21-3
Sorbitol (D Sorbitol)	Sigma Aldrich	CAS: 50-70-4
TRIS	Applichem, p>99,9%,	CAS: 77-86-1
Tryptophan	Applichem	CAS: 73-22-3
Yeast Extract	Applichem	CAS: 8013-01-2

6.6 Sequenzdaten

Die Nucleotidsequenzen der wichtigsten in dieser Arbeit erstellten Konstrukte sind im Folgenden dargestellt. Für die Klonierung relevante Restriktionsschnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen, das jeweilige Start- und Stopcodon der CDS (auch *start-in-frame* bei Fusionskonstrukten) ist **fett** gedruckt. Alle Sequenzen sind in 5'- 3' Richtung angegeben.

6.6.1 Das Fusionsprotein *bPAC::YFP*

AAGCTTGCCACC**ATG**ATGAAGCGGCTGGTGTACATCAGCAAGATCAGCGGCCACCTG
 AGCCTGGAAGAGATCCAGCGGATCGGCAAGGTGTCCATCAAGAACAACCAGCGGGAC
 AACATCACCGGCGTGCTGCTGTACCTGCAGGGCCTGTTCTTCCAGATCCTGGAAGGC
 GAGAACGAGAAGGTGGACAAGCTGTACAAGAAAATCCTGGTGGACGACCGGCACACC
 AACATCCTGTGCCTGAAAACCGAGTACGACATCACCGACCGGATGTTCCCCAACTGG
 GCCATGAAAACCATCAACCTGAACGAGAACAGCGAGCTGATGATCCAGCCCATCAAG
 AGCCTGCTGCAGACCATCACCCAGAGCCACCGGGTGCTGGAAAAGTACATGCCCGCC
 AGAGTGATCTACCTGATCAACCAGGGCATCAACCCCCTGACCGTGGAGCCCCAGCTG
 GTCGAGAAGATCATCTTCTTCAGCGACATCCTGGCCTTCAGCACCTGACCGAGAAG
 CTGCCCCTGAACGAGGTGGTCATCCTGGTCAACCGGTACTTCAGCATCTGCACCCGG
 ATCATCAGCGCCTACGGCGGCGAAGTGACCAAGTTCATCGGCGACTGCGTGATGGCC
 AGCTTCACCAAAGAGCAGGGCGACGCCGCCATCCGGACCAGCCTGGACATCATCTCC
 GAGCTGAAGCAGCTGCGGCACCACGTGGAGGCCACCAACCCCCTGCACCTGCTGTAC
 ACCGGCATCGGCCTGAGCTACGGCCACGTGATCGAGGGCAACATGGGCAGCAGCCTG
 AAGATGGACCACACCCTGCTGGGGGACGCCGTGAACGTGGCCGCCAGGCTGGAAGCC
 CTGACAAGACAGCTGCCCTACGCCCTGGCCTTTACAGCCGGCGTGAAGAAGTGCTGC
 CAGGCCCAGTGGACCTTCATCAACCTGGGAGCCCACCAGGTCAAGGGCAAGCAGGAA
 GCCATCGAGGTCTACACCGTGAATGAGGCCCAGAAGTACTACGACACCCTGCAGATC
 ACCCAGCTGATCCGGCAGACCCTGGAAAACGACAAGCCGCGGACGTACGAGCAAAAAG
 CTGATCTCGGAGGAGGACCTGGCGGCCGCC**ATG**GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG

TTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAG
TTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG
TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTC
GGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTC
TTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC
GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC
CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG
CTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC
GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC
GCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT
CACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG
CTGTACAAG**TAA**AGCGGCCGCGAAGCTTGATC

6.6.2 Das Fusionskonstrukt CNGA2_2A_EuPAC

GGATCCGATGATGACCGAAAAATCCAATGGTGTGAAAAGCTCTCCAGCTAATAACCA
TAACCATCATCCTCCTCCTTCTATCAAGGCCAATGGCAAAGATGACCACAGGGCAGG
AAGCAGACCACAGTCTGTGGCAGCTGATGATGACACTTCTCCAGAACTACAAAGGCT
GGCAGAGATGGATACCCCTCGGAGGGGGAGGGGTGGCTTCCAAAGGATTGTTTCGCCT
GGTGGGGGTCATCAGGGACTGGGCCAACAAAGAATTTCCGTGAAGAGGAACCAAGGCC
TGA CTCTTCTAGAGCGTTTCCGTGGGCCAGAACTCCAGACTGTGACAACCCATCA
GGGGGATGACAAAGGCGGCAAGGACGGCGAGGGAAAGGGCACCAAAAAGAAATTTGA
ACTGTTTGTGGACCCAGCCGAGACTGGTATTACCGTTGGTTGTTTGTTCATTGC
CATGCCTGTTCTTTACA ACTGGTGCCTGTTGGTGGCCAGAGCCTGCTTCAGTGATCT
ACAGAGAAACTATTTTGTGGTATGGCTGGTGGTGGACTACTTCTCAGACACTGTCTA
TATCGCAGACCTCATCATTCGGCTGCGCACAGGCTTCCTAGAACAGGGGCTCTTGGT
CAAAGATCCCAAGAAATTGCGAGACA ACTATATTCACACTTTGCAGTTCAAATTGGA
TGTGGCTTCTATCATTCCTACTGACCTTATCTATTTTGTCTGTGGGTATCCACAGCCC
TGAGGTACGCTTCAACCGTCTATTACACTTTGCCCGTATGTTTGGAGTTCTTTGACCG
CACTGAGACACGCACCAGCTACCCCAACATCTTCCGAATCAGCAATCTGGTCCTTTA
CATCTTGGTCATCATCCACTGGAATGCTTGTATTTATTATGTTATTTCTAAGTCCAT
TGGCTTTGGAGTTGACACCTGGGTTTACCCCAACATTACTGACCCTGAATATGGCTA
CCTGGCTAGAGAGTACATTTACTGTCTTTACTGGTCCACACTGACCCTCACCACCAT
TGGAGAGACACCACCCCTGTAAAGGATGAGGAGTACCTATTTGTCATCTTTGACTT
CTTGATTGGTGTCTCATCTTTGCCACTATTGTGGGAAATGTGGGCTCCATGATCTC
CAACATGAATGCCACACGAGCAGAGTTCCAGGCCAAGATTGATGCTGTCAAACACTA
CATGCAGTTCCGAAAGGTCAGCAAAGACATGGAAGCCAAGGTCATCAAATGGTTTGA
CTACTTGTGGACCAATAAGAAGACAGTAGATGAACGAGAAGTCCTCAAGAACCTGCC
AGCAAAGCTCAGGGCTGAGATAGCCATTAATGTTCACTTGTCCACTCTGAAGAAAGT
GCGCATATTCCAGGATTGTGAAGCTGGCCTACTGGTGGAACTGGTACTGAAGCTTCG
TCCTCAGGTCTTTAGTCCTGGAGATTATATTTGCCGTAAGGGGGACATTGGCAAGGA
AATGTACATCATCAAGGAGGGCAAGTTGGCAGTGGTAGCTGATGATGGCGTGACTCA
GTATGCCTTGCTCTCAGCTGGGAGCTGCTTTGGTGGAGATTAGTATCCTTAACATTAA
GGGTAGCAAAATGGGCAATCGACGTA CTGCTAATATCCGTAGCCTGGGCTACTCAGA
TCTCTTCTGCTTGTCCAAGGACGATCTTATGGAAGCTGTA ACTGAGTATCCTGATGC

CAAGAAGGTCCTGGAGGAACGGGGTAGGGAGATCCTGATGAAGGAAGGTCTACTGGA
 TGAGAATGAAGTGGCAGCTAGTATGGAGGTAGATGTTT CAGGAGAAGCTGGAACAGTT
 GGAGACAAACATGGATACCTTGTACACTCGCTTTGCCCGCCTGCTGGCTGAGTACAC
 TGGGGCCCAGCAGAAGCTCAAGCAACGCATCACAGTGCTAGAGACCAAGATGAAACA
 GAACCATGAGGATGATTATCTATCAGATGGGATAAACACTCCTGAGCCAACCTGCTGC
TGAATTCGAGGGCCGCGGCTCCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGG
CCCCGCCCCGGCTCCGAATTCCCATCCGCGGGATTCAATGTACATCCTTGTTTGGAA
 AGAAGGCCAGCAGATCAGGACTTTCCAAGATTTGGAGGAGTGTGGGCAGTTCCAAAC
 TGCATCCAATATAACAGATGGTCAGATATTCAGTATCAATGTCACACCCACCATGAG
 CAAGGGAGGAGAAACCGGAGAGACGCAACTCCGGCGGCTCATGTATCTCTCCGCATC
 AACTGAGCCAGAAAAATGCAATGCTGAGTACCTTGCTGATATGGCGCACGTTGCAAC
 TCTCAGGAACAAACAAATTGGTGT CAGCGGCTTCTTGTTGTACAGTTCCCTTTCTT
 TTTCCAAGTTATTGAAGGAACTGACGAAGACCTGGACTTCCTTTTCGCAAAAATCTC
 TGCTGATCCGAGACATGAGAGATGTATTGTGCTTGCAAATGGTCCCTGTACAGGGCG
 CATGTATGGGGAGTGGCACATGAAAGACTCCACATTGACAACATAACGAAGCACCC
 AGCCATTAAGACCATCCTCTTCCAAATTGCAAGGTCATTCTCCAGCATGTGGTCCTA
 CCTGCCAAAGAATGCGGCCAACATGTTGCTTCTCGGGAAGAACCCAAACAAGCAAGC
 CCCTGAACCCATGAGTGTGGTGGTCACTTTCATCTATCTGGTGGAGTTCTCTTCCAT
 TTTGGCCCACCCTGGACTGACTGAGCAGTGTGCAGACATCCTTGCTGCGTTTGTGGA
 CGCCTGTGTTTCGCAACGT CGAAGGTACAGGGGGCCAAGTGGCAAAGTTCATCACTGG
 GATTTGCATGGCGTATTGGCCAATAAACAGGGCCGAAGATGCTCTGGTCGGGTTGCA
 GCAACTGTCGGAGGACTTGGCCGAGCTGCGCAGCCAGCAACCTCCTGGATCTGCGCT
 GTCCCTGATTTACTCCCGGTGTGGAGTGCATTACGGTCGAGCTTTGCTGTGCAATGC
 TGGTTTCCGAAAGGCTGATTTACCCCTCCTTGGCGACTGCATCAACACTGCCTCTCG
 GATCACCTCGTTGTCCGTCAAACCTCAAGGTGCCACTTCTCCTTTCTTTTCGAAGTGAG
 GTGCCTTCTGGGTGATGAAATGCGAGAGGAGCTTGAAAGTTCTGGGCTGCACAAGGT
 GAAAGGCCGTGACAAGCCTGTGCAAGTGTACCAATTCAATGCTCCAGAGCTGGACAG
 CGCGATGGTTTCGTGCGAAGATTGAGCAGTTCAACCCTGGAAGGTACAGGGCATTGTG
 CCCAGTCAAGCCGTATGAGAGTTTGCACCCAGCTCAGAGACCACCAATCTTTGATGA
 CACCCACGAGAGAACCAGCCAAAACCTCAGCCAAGTTCAGCGACGCGACAGCCTTGT
 GGATCGCCTCAGCTTGATTGCAAAGCTTGCTTTCCCTTCGAGCATGATGGCAGGTGG
 TGAAGGCCAGCTCATCACATTGACATACATTTCCCAAGCAGCCCATCCCATGTCCCG

TTTGGATTTGGCATCAATCCAGAGGATTGCATTTGCTCGGAATGAATCCTCAAATAT
CACAGGCTCATTGCTTTATGTGAGCGGTTTGTGGTACAGACATTGGAAGGTCCCAA
GGGCGCTGTGGTTTCCCTGTATCTCAAGATCAGGCAAGACAAGCGACACAAAGATGT
GGTTGCGGTCTTCATGGCCCCATCGATGAACGGGTGTATGGCAGTCCCTTGGATAT
GACCTCCGCCACTGAGGAAATGTTGGCCACCTTCCCACCCCTGCAGGACGTGCTCTC
GCAGCTGGCCAAGTCGTTTCATCTCCCTCGAGACCTATGTCCCCTCCACGGTGGTGCG
CTACCTCACCGCCGGCAACAATCCCCGCAATCTGCAACCTGTTTCGGTGGAAGTTGT
CATGCTTGCCACTGACATCTGCAGCTTCACTCCACTGTCCGAGAAGTGTTCCTGAC
AGAGGTGTGGACCATTGCAACACCTTCATTGACGCCTGCACCAGTGCCATCTGCAA
TGAAGGTGGGGAGGTCATTAAATTGATTGGTGATTGTGTGACAGCATATTTCCCCC
GACAGGTGCCGACAACGCTGTCCATGCATGCCAGGAGATCGTCAGCTTCTGTGCTCA
GCTGCGAGATGCCTTCCACGACGTCTTGGACTGCCGGTCTGTGGTGGCTTGTGGGGT
GGGGCTGGACTTCGGGCAGGTCATCATGGCCCAGTGCGGCAGTTTGGGGATGACAGA
GTTTGTGGTGGCTGGGGAGGTCAGCGCTCGTGTGATGGAGGTTGAAGCCCTCACGCG
CGAGGCAGGGCGTGCATCATACCGAACCAGTTGCGGATCGACTGTCTCCCAA
ACTGCGTGACACGGGCATCGTCCCCTGCCAGGAAGGAGTGGACGGCGTCCCTTGCTA
TGGAATCCTGGGCCCTGAATGGGAATTGGATGTGGCAACCATCAAGAAGAACATTTA
CGGGTTCCACGACGCCCGGGCCCTGGCCGCCATGAAGAAGGTGGACGACGGCACCAA
CGCCCCGGGCCGGGGCGCCCCGCGGGGGCATCCCCTCCTCCCCAAGGTTTCGACC
ACCAGGCCGCACCAATTCAGTGTCCAGCTACACCCCTGACCCCAATGAGGCACTGGA
TCCTCGGATGGCGGAATCGGTGTTTCTTGACATGTGTCATCAGCGGGGAGATACCGC
CAACAACCTCCATCGCCGTCAAATTGCGGCAGGCGGCCAACGACGATCGGTGGACCT
GGGCAGGATGTTGCAAGGGCCACACGAGCTCATGCCTGTGATGCAGGCCATCAAGCA
CCTGACCAACCTGCGAATGCTCAATATGAGCGACAATTTTCGTGGATGACAACAACGT
TGGAGAACTTGTGGAATCGTGCATTCCAATGCGTTCGTTACAGGTGTTGGACTTGTC
CAACAACCCTGGCTTGACGAAGGTCATCGCCCTGAAGCGCCTCATCAAGCATAACAC
CCAGGTCCGGGAGATCCTTCTGAACGGCACCCGCATCGCCCCAACCGAGCAAAAGCT
GATCTCGGAGGAGGACCTGAAGGGTTCGCACAAATATGAACAT**TAATA**AAAATTCTCT
AGAGCAAGCTT

6.6.3 Übersicht der erstellten Konstrukte

Im Folgenden findet sich eine tabellarische Übersicht der in der vorliegenden Arbeit erstellten und erfolgreich eingesetzten genetischen Konstrukte (Tabelle 6.2). Von allen generierten Genkonstrukten bestehen saubere DNA-Stocklösungen, die bei -20°C gelagert sind. Die DNA der generierten Konstrukte lässt sich jederzeit nach Transformation (2.4.3) in kompetente *E. coli* Bakterien vermehren (2.1.1.1).

Tabelle 6.2 Übersicht der in der vorliegenden Arbeit erstellten und erfolgreich eingesetzten Konstrukte

Insert	Vektor	Resistenz	Promotor
<i>bPAC::YFP</i>	pENTR-MCS	Amp	—
<i>bPAC::YFP</i>	pSAT-2191	Amp	CaMV (35 S)2x
<i>bPAC::YFP</i>	pER-8	Spec	Glucocorticoid
<i>bPAC::YFP</i>	pUBQ-10	Amp	Ubi
<i>bPAC::YFP</i>	pGemHE	Amp	T7
<i>bPAC::YFP</i>	pMDC-32	Kan	CaMV (35 S)
<i>bPAC::tdimer2RFP</i>	pGemHE	Amp	T7
<i>bPGC::YFP</i>	pSAT-2191	Amp	CaMV (35 S)2x
<i>bPGC::YFP</i>	pGemHE	Amp	T7
<i>bPGC::YFP</i>	pER-8	Spec	Glucocorticoid
<i>bPGC::YFP</i>	pUBQ-10	Amp	Ubi
Channelrhodopsin C128A	pENTER-MCS	Amp	—
Channelrhodopsin C128A	pMDC-32	Kan	CaMV (35 S)
Channelrhodopsin C128T	pENTER-MCS	Amp	—
Channelrhodopsin C128T	pMDC-32	Kan	CaMV (35 S)
CNGA2_2A_EuPAC	pGemHE	Amp	T7
CNGA2_2A_EuPAC	pSAT-2191	Amp	CaMV (35 S)2x
CNGA2_2A_EuPAC	pER-8	Spec	Glucocorticoid

6.6.4 Primer

Tabelle 6.3 Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Klonierungsprimer in 5'-3'-Orientierung (bei den SDMP-Primern für die side-directed mutagenesis ist jeweils nur der forward-primer angegeben).

<i>bPAC_SpeI_fwd</i>	AGA TAC TAG TAT GAT GAA GCG GCT GGT GTA C
<i>bPAC_USER_fwd</i>	GGC TTA AUA TGA TGA AGC GGC TGG TGT AC
<i>CNGA2_2A_SpeI_fwd</i>	AGA TAC TAG TAT GAT GAC CGA AAA ATC CAA TGG TGT G
<i>CNGA2_KpnI_fwd</i>	AGA TGG TAC CAT GAT GAC CGA AAA ATC CAA TGG TGT G
<i>EuPAC_KpnI_rev</i>	ATC TGG TAC CTT AAT GTT CAT ATT TGT GCG AAC C
<i>EuPAC_SpeI_rev</i>	ATC TAC TAG TTT AAT GTT CAT ATT TGT GCG AAC C
<i>SDMP_bPAC_K197E</i>	GGC GGC GAA GTG ACC GAG TTC ATC GGC GAC T
<i>SDMP_bPAC_D265K_T267G</i>	AGC AGC CTG AAG ATG AAA CAC GGC CTG CTG GGG GACGCC
<i>SDMP_bPAC_YFP_Hind</i>	AAG CGG CCG CGA AGC TTG ATC TGG TTA CCA C
<i>SDMP_bPac_NotI</i>	CTGATCTCGGAGGAGGACCTGGCGGCCGCGTAACTTGATCTGGTTACCACT
<i>SDMP_Chop2_C128_A</i>	TGG CTT CTC ACC GCC CCG GTC ATT CTC AT
<i>SDMP_Chop2_C128_T</i>	TTG CTT CTC ACC ACC CCG GTC ATT CTC AT
<i>YFP_SpeI_rev</i>	ATC TAC TAG TTT ACT TGT ACA GCT CGT CCA TGC
<i>YFP_USER_rev</i>	GGT TTA AUA TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C
<i>-2A- (Insertionssequenz) fwd</i>	AAT TCG AGG GCC GCG GCT CCC TGC TGA CCT GCG GCG ACG TGG AGG AGA ACC CCG GCC CCG CCC CCG GCT CCG
<i>-2A- (Insertionssequenz) rev</i>	GCT CCC GGC GCC GAG GGA CGA CTG GAC GCC GCT GCA CCT CCT CTT GGG GCC GGG GCG GGG GCC GAG GCT TAA

6.7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Ampere, Alanin
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
ABA	Abscissinsäure (engl. Ab scisic Acid)
<i>BamHI</i>	B acillus amyloli I (Restriktionsenzym)
BlaC	B lue light activated A denylyl C yclase
BlgC	B lue light activated G uanylyl C yclase
bp	B asenpaare (engl. <i>basepairs</i>)
<i>bPAC</i>	P hotoactivated A denylyl C yclase (<i>Beggiatoa spec.</i>)
<i>bPGC</i>	P hotoactivated G uanylyl C yclase (<i>Beggiatoa spec.</i>)
bzw.	B eziehungsweise
C	Cytosin, Celsius, Coulomb, Carboxy (-terminal), Cystein
c	Konzentration (engl.: <i>concentration</i>)
cAMP	c yclisches A denosin- M ono- P hosphat
cDNA	Komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CDS	c oding sequence
cGMP	c yclisches G uanosin- M ono- P hosphat
CNGC	C yclic N ucleotide G atec C hannel
cNMP	c yclisches N ucleotid- M ono- P hosphat
CICR	C alcium I nduced C alcium R elease

D	Asparaginsäure
dNTP	d esoxy- N ucleotid- T ri- P hospat
DNA	D esoxyribo- N ukleinsäure (engl. A cid)
<i>DpnI</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i> I (Restriktionsenzym)
E	Glutaminsäure
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> 1 (R estriktions- E nzym)
EDTA	E thylendiamintetraacetat
et al.	und Andere (lat.: <i>et aliae</i>)
<i>EuPAC</i>	P hotoactivated A denylyl C yclase (<i>Euglena gracilis</i>)
FW	f resh w eight (engl. Frischgewicht)
fwd	Vorwärts (engl.: <i>forward</i> , 5´-3´-orientiert)
f	femto (10 ⁻¹⁵)
F	Phenylalanin
G	G uanin, Giga (10 ⁹), Leitwert, Glycin
g	g ramm
GA	Giberrellinsäure (engl. G ibberillic A cid)
GTP	G uanosin- T ri- P hospat
h	Stunde (engl.: <i>hour</i>)
H	Histidin
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> III (Restriktionsenzym)

I	Strom, Isoleucin
IVT	In vitro Transkription
K	Lysin
kb	Kilobasen
<i>KpnI</i>	Klebsiella pneumoniae I (Restriktionsenzym)
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria Broth/Bertani (Medium)
M	Molar, Mega (10^6), Methionin
m	Meter, milli (10^{-3}), Masse
MCS	multiple cloning site
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
μ	micro (10^{-6})
n	Stoffmenge, nano (10^{-9})
N	Asparagin
<i>NheI</i>	Neisseria mucosa I (Restriktionsenzym)
<i>NotI</i>	Nocardia otitidis I (Restriktionsenzym)
ORF	open reading frame (Leseraster DNA)
p	pico (10^{-12})

P	Prolin
PCR	P olymerase C hain R eaktion
pH	p otentia H ydrogenii (Säuregrad)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Glutamin
R	Widerstand, (engl. <i>resistance</i>), Arginin
rcf	Zentrifugalkraft (engl. <i>round centrifugation force</i>)
rev	Rückwärts (engl. <i>reverse 3'-5'-orientiert</i>)
revcomp	Rückwärtskomplementär (engl. <i>reverse-complementary</i>)
RNA	R ibo- N ucleinsäure (engl. <i>-Acid</i>)
RNAse	R ibonuclease
RFP	R ed F luorescent P rotein
rpm	revolutions p er m inute (engl. Umdrehungen pro Minute)
RT	R aum T emperatur
s	Sekunde
S	Siemens, Serin
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
<i>SpeI</i>	<i>Sphaerotilus species I</i> (Restriktionsenzym)
t	t ime (engl. Zeit)
T	T hymine, T hreonin

TAE	Tris-Acetat EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TENS	TE-NaOH-SDS-Puffer (TE-NaOH-SDS-Puffer (Lysispuffer))
T _m	Schmelztemperatur (engl. <i>melting Temperature</i>)
u	unit
U	Spannung
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt (engl. <i>voltage</i>), Valin
VE	Voll Entsalzt (VE-Wasser)
W	Watt, Tryptophan
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
YFP	Yellow Fluorescent Protein
z.B.	Zum Beispiel

6.8 Curriculum Vitae

Name: Christoph Stangl

Geboren am: 07.05.1981

Geburtsort: Schweinfurt

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Studium

- 2008-2011 Experimentelle Phase der vorliegenden Dissertation an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg am Institut für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georg Nagel.
- 2007-2008 Diplomarbeit an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg am Institut für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik zum Thema „Biophysikalische Untersuchungen an Rhodopsinen“ unter der Betreuung von Prof. Dr. Georg Nagel und Dr. Jens Looser
- 2004-2007 Hauptstudium an der Fakultät für Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Studienschwerpunkte: Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Zell- und Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie, Verhaltensphysiologie und Biotechnologie. Diplomprüfung: 11/12 2006.
- 2002-2004 Grundstudium an der Fakultät für Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Vordiplom: 2004.

Zivildienst

- 2001-2002 Zivildienst (Leopoldina-Krankenhaus der Stadt Schweinfurt)

Schule

- 1992-2001 Walther-Rathenau-Gymnasium, Schweinfurt. Abgeschlossen mit der allgemeinen Hochschulreife (Abitur): 2001.
- 1988-1992 Hugo-von-Trimberg-Grundschule, Niederwerrn

7 DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei den folgenden Personen ganz besonders bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit in direkter oder indirekter Weise beigetragen haben.

Bei **Prof. Dr. Georg Nagel** und **PD Dr. Dirk Becker** bedanke ich mich für die Möglichkeit, die Fragestellung der vorliegenden Arbeit unter guter Betreuung und Finanzierung bearbeiten zu können, sowie für die Möglichkeit stets eigene Ideen einbringen und verwirklichen zu können.

Bei **Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser** möchte ich mich für die Bereitschaft bedanken, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Mein besonderer Dank geht an **Elfriede Reisberg**, die durch hervorragende technische Assistenz und Interesse am Projekt wichtige Beiträge zum Erfolg der Arbeit leistete. Sämtliche Arbeiten rund um Zellkultur, Pflanzenanzucht und ELISA wurden von ihr mit äußerster Sorgfalt und Zuverlässigkeit durchgeführt. Auch **Doris Waffler** sei für ihre technische Assistenz gedankt.

Bei der gesamten „**AG Nagel**“ möchte ich mich für konstruktive Gespräche und ein angenehmes Laborklima in den letzten vier Jahren bedanken.

Bei **Dr. Kai Konrad** und **Dr. Patrick Mumm** bedanke ich mich für die Einführung in das Expressionssystem *Pollen* und die anfängliche Hilfe beim Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes.

Zuletzt und zuerst: Bei meiner **FAMILIE** und meinen **FREUNDEN**.

8 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die von mir 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 keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den _____

Christoph Stangl