
Optogenetische Simulation und Analyse elektrischer und Calcium-basierter Signale in Pflanzen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

angefertigt am

Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik

an der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Melanie Baumann

geboren in Erlenbach am Main

Würzburg 2013



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: PD. Dr. Dirk Becker

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Weber

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	6
1.1 Elektrische und Calcium-basierte Signale in Pflanzen.....	6
1.1.1 Formen elektrischer Signale	6
1.1.2 Formen von Calcium-Signalen.....	8
1.2 ΔV_m und $\Delta[Ca^{2+}]_{cyt}$ als Komponenten der Signaltransduktion „nicht- erregbarer“ Pflanzen	10
1.2.1 Stomabewegung in Schließzellen.....	10
1.2.2 Blaulicht	11
1.2.3 Polares Pollenschlauch- und Wurzelhaarwachstum.....	11
1.2.4 Symbiose von Leguminosen mit Rhizobien/Mykorrhiza.....	13
1.2.5 Pathogenabwehr: Elicitor-Perzeption und Herbivorie.....	14
1.2.6 Abiotische Stressantworten	15
1.2.7 Circadiane Calcium-Oszillationen.....	16
1.3 Grundlage elektrischer Signale in „nicht-erregbaren“ Pflanzen.....	16
1.3.1 Kodierung elektrischer Signale: Generierung von ΔV_m	16
1.3.2 Dekodierung von elektrischen Signalen	20
1.3.3 Beispiele ΔV_m -vermittelter Genregulation.....	22
1.4 Calcium-basierte Signaltransduktion und -spezifität.....	23
1.4.1 Kodierung des Calcium-Signals	23
1.4.2 Dekodierung – Spezifität durch Expression, Affinität und Lokalisation der Calcium-Sensoren	28
1.4.3 Beispiele der Calcium-Signalspezifität	30
1.5 Channelrhodopsin-2 als molekulares Werkzeug zur Generierung von ΔV_m und $\Delta[Ca^{2+}]_{cyt}$	32
1.5.1 Struktur und Funktion von ChRs.....	32
1.5.2 Channelrhodopsin-2 – Charakterisierung.....	33
1.5.3 ChR2 als optogenetisches Werkzeug im tierischen System.....	34
1.6 Zielsetzung der Arbeit	35
2 Material und Methoden	37
2.1 Molekularbiologische Methoden I - Arbeiten mit Nukleinsäuren	37
2.1.1 Extraktion von Nukleinsäuren	37
2.1.2 Reverse Transkription	38

Inhaltsverzeichnis	2
2.1.3 Gelelektrophorese	39
2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
2.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion	41
2.1.6 Gerichtete <i>in-vitro</i> Mutagenese	43
2.2 Molekularbiologische Arbeiten II - Klonierungen	43
2.2.1 Vektoren	43
2.2.2 Klonierung über Restriktionsschnittstellen	45
2.2.3 USER TM -Klonierung	46
2.2.4 Gateway [®] -Klonierung	47
2.2.5 Klonierung der verwendeten Konstrukte	47
2.3 Mikrobiologische Methoden - Arbeiten mit Bakterien	49
2.3.1 <i>Escherichia coli</i>	49
2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA	50
2.3.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
2.3.4 Kryokonservierung	53
2.4 Sequenzierung	53
2.5 Pflanzen und Anzuchtbedingungen	54
2.5.1 Verwendete Pflanzen	54
2.5.2 Anzuchtbedingungen	54
2.6 Arbeiten mit pflanzlicher Zellkultur	55
2.7 Transformationen von Pflanzen	56
2.7.1 Transiente Transformation von Arabidopsis-Protoplasten	56
2.7.2 Transiente Transformation von Arabidopsis-Kotyledonen	57
2.7.3 Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> -Blättern	58
2.7.4 Stabile Transformation von Arabidopsis-Pflanzen - „Floral Dipping“	59
2.7.5 Stabile Transformation von <i>Nicotiana SR1</i> -Blattscheiben: Regeneration von stabilen Transformanten	60
2.7.6 Stabile Transformation pflanzlicher Zellkultur	61
2.8 Biochemische Arbeiten	62
2.8.1 Protein-Extraktion aus Pflanzengewebe	62
2.8.2 SDS-PAGE	63
2.8.3 Coomassie-/Silberfärbung	64
2.8.4 Western-Blot	65
2.9 Mikroelektroden- Einstich in intaktes Gewebe	66
2.9.1 Theorie	67
2.9.2 Herstellung der Elektroden	68

Inhaltsverzeichnis	3
2.9.3 Aufbau des Messplatzes	68
2.9.4 Messlösungen	69
2.9.5 Präparation des Pflanzenmaterials	70
2.9.6 Durchführung und Auswertung	70
2.10 Aequorin-basierte Calcium-Messungen	70
2.10.1 Theorie	70
2.10.2 Luminometer Set-Up	72
2.10.3 Durchführung der Messungen	73
2.11 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	73
2.11.1 Methode	73
2.11.2 Bildakquisition	74
2.12 RNA-Sequencing	74
2.12.1 Methode	75
2.12.2 Durchführung bzw. experimentelles Design	76
2.12.3 RNA Präparation	76
2.12.4 cDNA-Bibliothek und RNA-Seq	77
2.12.5 Bioinformatische Auswertung der RNA-Seq Daten	78
3 Ergebnisse	79
3.1 Vorarbeiten – Oozyten	79
3.1.1 Expression und Lokalisation von ChR2-YFP in Oozyten	79
3.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der ChR2-Mutanten in Xenopus-Oozyten	80
3.2 Transiente Transformation in Pflanzen – Lokalisation von Chop2/ChR2	83
3.2.1 Lokalisation von Chop2 in Arabidopsis	84
3.2.2 Lokalisation von Chop2-YFP in Nicotiana	85
3.3 ChR2-Funktion in Pflanzen	89
3.3.1 Funktionsbeweis in Arabidopsis-Keimblättern	90
3.3.2 Funktionsnachweis im Tabak	91
3.3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung der ChR2-Mutanten im Tabak	92
3.4 Aequorin-basierte Calcium-Messungen	102
3.4.1 Artefakt direkt nach BL	103
3.4.2 Blaulicht-basierte Calcium-Signale	104
3.4.3 ChR2-vermittelte Calcium-Signale	104
3.5 Differentielle Genregulation durch ΔV_m – RNA Sequencing	108
3.5.1 Wahl der Blaulicht-Pulse	109
3.5.2 Probenvorbereitung	112

3.5.3	Ergebnis der Transkriptionsanalyse I: ChR2-vermittelte elektrische Signale erzeugen Stimulus-spezifische Genregulation in Pflanzen.....	113
3.5.4	Ergebnis der Transkriptionsanalyse II: Die Nachahmung des Pathogen-spezifischen elektrischen Signals verursacht ein zur Pathogenantwort ähnliches Expressionsmuster	126
3.6	Stabile Transformation von Pflanzen	128
3.6.1	Transiente Vorversuche	128
3.6.2	Stabile Expression	130
4	Diskussion.....	134
4.1	ChR2-Expression in Pflanzen.....	134
4.1.1	Chop2-Targeting.....	134
4.1.2	Expressionsunterschiede im transienten Expressionssystem: WT-ChR2 vs. ChR2-Mutanten	135
4.1.3	Stabile Expression von Chop2 in Pflanzen	137
4.2	Funktion I: Membranpotentialänderungen	139
4.2.1	Vergleich mit ChR2-Daten aus Oozytenmessungen	139
4.2.2	Korrelation ChR2-Expression – Depolarisationsamplitude	141
4.2.3	Membranpotentialmessungen in Arabidopsis-Kotyledonen	142
4.2.4	Grundlage der durch ChR2 ausgelösten Depolarisation in Pflanzen	143
4.2.5	Optogenetik in Pflanzen: Variation definierter Membranpotentialänderungen durch ChR2	145
4.3	Funktion II: Calcium-Messungen.....	146
4.3.1	Kritische Betrachtung der Messmethodik	146
4.3.2	ChR2-vermitteltes Calcium-Signal – C128A vs. L132C	148
4.4	Ist es optogenetisch möglich, ΔV_m und $\Delta[Ca^{2+}]$ Signale von physiologischer Bedeutung zu generieren?.....	151
4.5	RNA-Seq	153
4.5.1	Interpretation der RNA-Seq-Daten.....	154
4.5.2	Zusammenfassung und Ausblick RNA-Seq.....	160
5	Zusammenfassung	163
6	Summary	165
7	Anhang.....	167
7.1	Literaturverzeichnis	167
7.2	Chemikalienverzeichnis	198
7.3	Primertabelle.....	200
7.4	Genlisten RNA-Seq	201

Inhaltsverzeichnis	5
<hr/>	
7.5 Chop2-Sequenzen.....	212

1 Einleitung

Pflanzen müssen aufgrund ihrer sessilen Lebensweise auf besondere Weise in der Lage sein, eine Vielzahl an Reizen biotischer sowie abiotischer Natur zu perzipieren und in definierte Antworten umzusetzen. Sie nutzen hierfür ein komplexes Netzwerk an Signaltransduktionsmechanismen, für welche sowohl elektrische als auch Calcium-basierte Signale eine entscheidende Rolle spielen.

1.1 Elektrische und Calcium-basierte Signale in Pflanzen

Calcium ist als Botenstoff in Signalkaskaden zahlreicher Reaktionen der Pflanze auf verschiedenste Stimuli involviert. Die meisten dieser Prozesse beinhalten aber gleichzeitig auch die Induktion elektrischer Signale, die sich über Änderungen im Membranpotential definieren. Während zahlreiche Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Calcium-vermittelten Signaltransduktion existieren, beschränkt sich das Wissen über elektrische Signale auf eine weitaus geringere Anzahl von Publikationen bzw. konzentriert sich hauptsächlich auf Messungen an Einzelzellsystemen wie das der Schließzellen, Wurzelhaare oder Pollenschläuche. Bekannt ist jedoch, dass beide Signaltypen in unterschiedlichen Formen auftreten und über die Form des jeweiligen Stimulus als Informationsträger wirken.

1.1.1 Formen elektrischer Signale

In Pflanzen wurden elektrische Signale erstmals durch Burdon-Sanderson 1873 beschrieben, der diese in Venusfliegenfallen (*Dionaea muscipula*) im Zusammenhang mit deren Schließverhalten nachweisen konnte. Dies war eine Sensation, da damals angenommen wurde, elektrische Signale wären eine auf das Tierreich beschränkte Form der Signaltransduktion. Diese pflanzlichen Signale waren im Vergleich zu neuronalen Aktionspotentialen (APs) in Hinblick auf deren Ausbreitungsgeschwindigkeit 1000-fach verlangsamt, wiesen aber eine wesentlich höhere Amplitude auf (Sibaoka, 1991). Mit dieser Entdeckung entstand die Idee, dass auch Pflanzen elektrische Signale zur Informationsverarbeitung nutzen könnten. Zudem konnten einige der Komponenten des tierischen neuronalen Netzwerks auch in Pflanzen nachgewiesen werden. So produzieren diese z. B. Neurotransmitter wie Acetylcholin oder GABA (γ -Aminobuttersäure) in

Folge von Stress (Cao et al., 2006). Bisher wurden drei Formen elektrischer Signale in Pflanzen beschrieben, denen eine Rolle in der Informationsübertragung über Langstrecken aufgrund ihrer Propagation zugeschrieben wird: Das Aktionspotential (AP), das Variationspotential (VP) und das systemische Potential (SP). Während APs und VPs auf Depolarisation (Membranpotentialänderung zu positiveren Werten) basieren, liegt SPs eine Hyperpolarisation zugrunde (Membranpotentialänderung zu negativeren Werten).

APs werden mit konstanter Geschwindigkeit und Amplitude weitergeleitet und folgen dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip, wohingegen sich VPs durch eine kontinuierlich sinkende Amplitude während der Ausbreitung vom Entstehungsort definieren und sich zudem in der Form des Signals je nach Stimulus unterscheiden. APs steuern sehr schnelle Signaltransduktionsprozesse wie die Blattbewegung bei Mimosen (Fromm & Lautner, 2007; Volkov et al., 2010) oder das rapide Schließen der Fallen bei Venusfliegenfallen (Forterre et al., 2005; Volkov et al., 2007). VPs werden hauptsächlich durch Stressreize wie Hitze und Verwundung, aber auch durch Kälte oder nach Behandlung mit dem Phytohormon Auxin beobachtet (Fromm & Lautner, 2007). SPs sind wie APs selbstpropagierend, folgen jedoch nicht der „Alles-oder-nichts“-Antwort und variieren folglich wie VPs in ihrer Amplitude abhängig vom applizierten Stimulus (Zimmermann et al., 2009). Sowohl APs als auch VPs und SPs konnten bei Pathogenbefall bzw. Herbivorie beobachtet werden (Alarcon & Malone, 1994; Maffei et al., 2004; Volkov & Haack, 1995; Wildon et al., 1992).

Die Hypothese, dass APs, VPs und SPs einen Mechanismus der systemischen Signaltransduktion über Plasmodesmata und Leitgefäße darstellen könnten, wird sehr kontrovers diskutiert. Man vermutet, dass jedoch gerade großwüchsige Pflanzenarten davon „profitieren“ könnten: In der Tat konnten in Messungen an Avocadobäumen sowohl sich über die Pflanzen ausbreitende APs als auch VPs aufgezeichnet werden, wobei die Geschwindigkeit der Signaltransduktion zu groß war, um durch ein chemisches Signal ausgelöst worden sein zu können (Oyarce & Gurovich, 2011). Es wird vermutet, dass Pflanzen elektrische Signale als Langstrecken-Informationsträger generieren, da diese Form der Signaltransduktion, im Gegensatz zur chemischen oder hormonellen, sehr schnell über große Distanzen möglich ist. So können z. B. Stressstimuli, die an einem bestimmten Teil von der Pflanze wahrgenommen werden, schnellstmöglich innerhalb der Pflanze kommuniziert werden.

Nicht immer geht das Auslösen elektrischer Signale mit einer offensichtlichen, makroskopisch beobachtbaren Reaktion – wie etwa dem schnellen Schließen der Fallen oder der Blätter bei Venusfliegenfallen bzw. Mimosen – einher. So wurden auch in der Modellpflanze *Arabidopsis* (Ackerschmalwand), als sogenannter „nicht-erregbarer Pflanze“, Membranpotentialänderungen (ΔV_m) auf externe Stimuli wie Licht oder Pathogenbefall gemessen (siehe 1.2) (Carpaneto et al., 2007; Elzenga et al., 1995; Jeworutzki et al., 2010). Hierbei treten sowohl Depolarisationen als auch Hyperpolarisationen auf. Viele dieser Signale wurden als lokale elektrische Potentiale (LEPs) gemessen. Es gibt jedoch nahezu keine Daten darüber, ob sich diese nicht auch ausbreiten und als Langstreckensignale wirken könnten. Durch die Vielzahl an physiologischen Reaktionen, bei denen elektrische Signale einen Teil des Signaltransduktionsprozesses in Pflanzen einnehmen, wird jedoch klar, dass diese Form der Signalweiterleitung nicht nur auf das Tierreich beschränkt ist, sondern auch in Pflanzen eine entscheidende Rolle bei der Informationsvermittlung einnimmt. Im Einklang mit dem Auftreten elektrischer Signale in Pflanzen findet man alle hierfür notwendigen Komponenten: Ionengradienten, Rezeptoren, Ionenkanäle und Pumpen (siehe 1.3.1).

1.1.2 Formen von Calcium-Signalen

Calcium ist in Pflanzen im Gegensatz zu elektrischen Signalen als universeller Botenstoff etabliert, der in diversen Signaltransduktionskaskaden eine zentrale Rolle spielt. Calcium-Ionen haben die Fähigkeit, Komplexe mit Proteinen, Membranen und organischen Säuren zu bilden. Dies führt zu toxischen Effekten aufgrund von Präzipitationen. Daher muss die Calcium-Konzentration im Cytosol sehr gering gehalten werden. Die Notwendigkeit einer präzisen Kontrolle der cytosolischen Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) stellt wahrscheinlich die Basis der zentralen Rolle für Calcium als Botenstoff dar (Kudla et al., 2010). Aufgrund der Tatsache, dass Änderung in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ und die damit verbundenen Calcium-Signale sehr unterschiedlich in ihrer Dauer, Amplitude, Frequenz und auch Lokalisation sein können (siehe Beispiele in 1.2), stellten Webb et al. (1996) die Hypothese der Calcium-Signaturen auf. Diese postuliert eine Spezifität des Calcium-Signals, die sich über die Charakteristika des Signals selbst definiert (näheres in 1.4.3). Calcium-Signale wurden in drei verschiedenen Formen beobachtet: monophasisch, biphasisch und oszillierend bzw. als sogenanntes „Spiking“ (schematisch dargestellt in Abb. 1-1). Dabei unterscheiden sich die jeweiligen Signale zusätzlich in ihrer Amplitude, Länge bzw. Frequenz. Biphasische Calcium-Signale werden insbesondere

bei der simultanen Messung der Calcium-Antwort von Zellpopulationen beobachtet. Dabei „starten“ alle Zellen in Folge eines Stimulus gleichzeitig und generieren so einen initialen Peak, wobei der zweite Anstieg auf einer divergenten Reaktion der Zellen basieren könnte (Hashimoto & Kudla, 2011). Da die jeweiligen Calcium-Indikatoren, die zur Messung herangezogen werden jedoch immer eine Art Pufferwirkung haben, bergen auch Einzelzellmessungen das Problem, dass deren Einsatz einen Einfluss auf die Calcium-Homöostase der Zelle und somit das Calcium-Signal selbst hat.

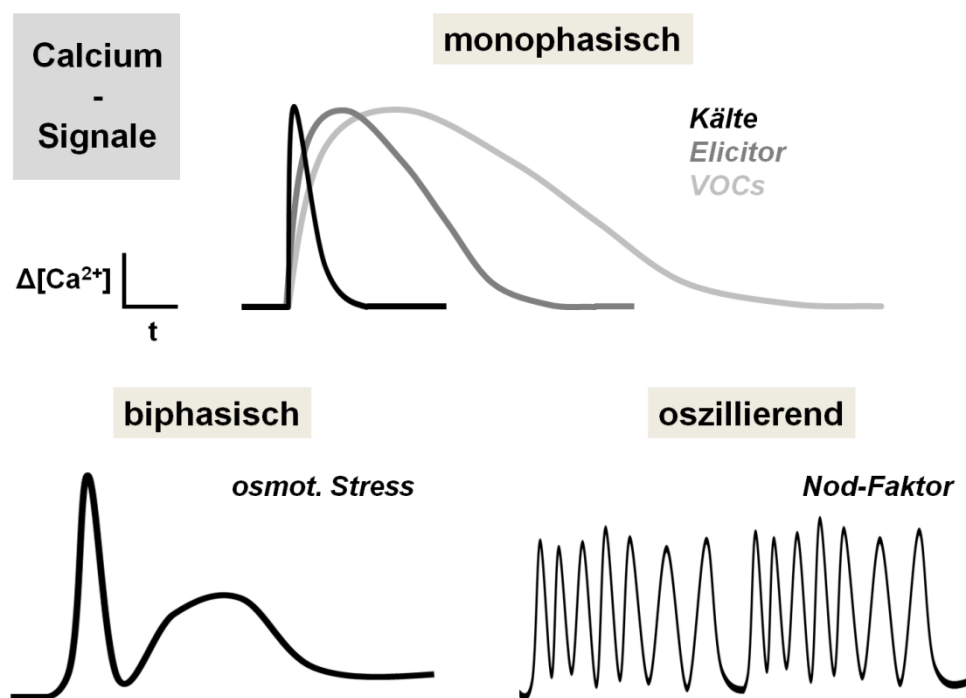


Abb. 1-1: Calcium-Signalformen in Pflanzen – schematisch dargestellt nach Asai et al., 2009; Carpaneto et al., 2007; Cessna et al., 2001, Jeworutzki et al., 2010 und Kosuta et al., 2008: monophasisch z. B. bei Kälte, Elicitorbehandlung bzw. auf volatile Stoffe (VOCs, engl. für volatile compounds) bei Herbivorie; biphasisch z. B. bei osmotischem Stress; oszillierend z. B. bei Symbiosen von Leguminosen

Neben der Hypothese der Calcium-Signatur wird die Spezifität aber vor allem auch über eine Vielzahl an zellulären Calcium-Sensor-Molekülen (siehe 1.4.2) gewährleistet, welche die in Calcium-Signaturen kodierte Information in Proteinmodifikation/-interaktion/-aktivität bzw. transkriptionelle Modulation umsetzen (Batistic & Kudla, 2004). Diese setzen sich zum einen aus Proteinfamilien wie den Calmodulinen (CaMs) zusammen, die aus dem tierischen System bekannt sind, zum anderen jedoch auch aus Familien, die spezifisch für Pflanzen oder Protisten sind. Hierzu gehören Calmodulin-ähnliche Proteine (CMLs, engl. für CaM-like proteins), Calcium abhängige Proteinkinasen (CDPKs, engl. für Calcium dependent protein kinases) und Calcineurin B-ähnliche

Proteine (CBLs, engl. für Calcineurin-B like proteins) (Batistic & Kudla, 2009; Harper et al., 2004).

Eine weitere Ebene der Spezifität des Calcium-Signals resultiert aus dessen Lokalisation. Die Existenz eines extrazellulären Calciums-Speichers (Zellwand) in Kombination mit verschiedenen intrazellulären Calcium-Speichern der Zelle (siehe 1.4.1.1) bildet die Herkunfts-spezifische Basis für die Spezifität der Calcium-Änderungen. Die ortsaufgelöste Perzeption von $[Ca^{2+}]$ kann über Membran-assoziierte Calcium-Sensoren dekodiert werden. Darüber hinaus existieren aber auch Calcium-Signale in den Organellen selbst, die teilweise unabhängig vom cytosolischen Signal generiert werden. Dies wird unterstützt durch die Erkenntnis, dass Calcium-Sensoren in diesen Zellorganellen lokalisiert sind. Dieses relativ neue Feld der Calcium-basierten Signaltransduktion wurde in Stael et al. (2012) detailliert beschrieben und zusammengefasst.

1.2 ΔV_m und $\Delta[Ca^{2+}]_{cyt}$ als Komponenten der Signaltransduktion „nicht-erregbarer“ Pflanzen

Die in zahlreichen pflanzlichen Prozessen beobachtete Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ wird meist auch von einer Änderung im Membranpotential begleitet, welches seinerseits über (spannungsabhängige) Calcium-Kanäle (siehe 1.3.2.2) gesteuert werden kann.

Neben Calcium-Signalen weisen auch Membranpotentialänderungen Unterschiede in ihrer Kinetik, also Amplitude und Dauer auf. Die folgenden Punkte sollen beispielhaft eine Übersicht über die Prozesse in “nicht-erregbaren“ Pflanzen geben, an denen Membranpotentialänderungen und/oder Calcium-Signale beteiligt sind. Da diese häufig in Kombination auftreten, werden sie im folgenden Abschnitt auch gemeinsam in Bezug auf den zugrunde liegenden Stimulus beschrieben.

1.2.1 Stomabewegung in Schließzellen

Calcium-Signale spielen eine essentielle Rolle beim Stomaschluss. Dies wird dadurch deutlich, dass nahezu alle Signale, die diesen induzieren [Abscisinsäure (ABA), MeJA (Methyljasmonat), H_2O_2 , Kälte, hohe pCO_2 oder $[Ca^{2+}]_{ext}$] eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ hervorrufen (Allen et al., 2001; Young et al., 2006). Auch Änderungen im Membranpotential stimulieren Calcium-Signale in Schließzellen (Grabov, 1998). Allen et al. untersuchten 2001 die Abhängigkeit des Schließverhaltens der Stomata vom zugrunde liegenden Calcium-Signal. Artifizielle Calcium-Signale wurden hierbei durch veränderte

extrazelluläre Kalium-Konzentrationen und daraus resultierende Membranpotentialänderungen erzeugt. Dabei stellte sich heraus, dass das langanhaltende Schließen, welches auch einer Inhibierung des „Wiederöffnens“ bedarf, von einer definierten oszillierenden Calcium-Signatur abhängig ist. Dahingegen war der schnelle Stomaschluss davon unabhängig und benötigt wahrscheinlich lediglich eine Erhöhung über einen bestimmten Schwellenwert. *cpk3/cpk6*-Doppelmutanten, die Verlustmutanten zweier Calcium-abhängiger Proteinkinasen darstellen, zeigten eine beeinträchtigte Aktivierung von S-Typ Anionen-Kanälen (siehe 1.3.2.1) und waren zwar noch zum langanhaltenden Schließen der Stomata, jedoch nicht mehr zum schnellen Stomaschluss fähig (Mori et al., 2006). Während der Stomaschluss Depolarisations-induziert ist, liegt dem Öffnen eine Hyperpolarisation zugrunde, welche auch Calcium-abhängig zu sein scheint, da ein niedriger $p\text{CO}_2$ hochfrequente Calcium-Oszillationen hervorruft (Young et al., 2006). Die genannten Arbeiten konnten die Bedeutung der von Webb et al. (1996) postulierten Calcium-Signatur für die physiologische Antwort zeigen.

1.2.2 Blaulicht

Blaulicht (BL) ist ein essentieller Faktor für pflanzliches Wachstum und Entwicklung, bedingt ein Öffnen der Stomata und löst sowohl Calcium-Signale als auch Membranpotentialänderungen in der Pflanze aus. In Untersuchungen an *Pisum sativum* unterschieden sich die durch BL ausgelösten Membranpotentialänderungen in Mesophyllzellen von der in Epidermiszellen, wobei dies zudem abhängig vom direkten Kontakt zu Mesophyllzellen war (Elzenga et al., 1995). Während ein Blaulichtstimulus im Mesophyll sowie verbundenen Epidermiszellen zu einer Depolarisation führt, wird in Schließzellen eine Hyperpolarisation des Membranpotentials ausgelöst, welche durch die Aktivierung der Protonen-ATPase generiert wird (Assmann et al., 1985). Blaulicht induziert hier zudem eine schnelle cytosolische Calcium-Erhöhung, welche auf einer Aktivierung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen in Mesophyllzellen basiert (Stoelzle et al., 2003).

1.2.3 Polares Pollenschlauch- und Wurzelhaarwachstum

Calcium scheint im polaren Wachstum von Pollen und Wurzelhaaren eine entscheidende Rolle einzunehmen, da Pollenschläuche einen stark ausgebildeten Calcium-Gradienten besitzen, der sein Maximum an der Spitze der Zelle hat (Rathore et al., 1991). Aufgrund der Phasen-Verschiebung der Calcium-Oszillationen mit der Oszillati-

on des Pollenschlauchwachstums wurde die Existenz von mechanosensitiven (Streckungs-aktivierten) Calcium-Kanälen im Pollen vermutet (Dutta & Robinson, 2004). Zudem konnte in *Medicago*-CDPK-Mutanten ein Verlust der Polarität beobachtet werden, was auf eine wichtige Rolle sowohl des Calcium-Gradienten als auch dessen Dekodierung hinweist (Ivashuta et al., 2005; Yoon et al., 2006). Weitere Forschungsansätze ergaben ein oszillierendes Calcium-Signal an der Spitze des Pollenschlauchs, welches bei Selbstinkompatibilität nicht auftritt (Pierson et al., 1996). Obwohl die Ausbildung des Calcium-Gradienten schon oft beschrieben wurde, konnte erst 2011 eine Gruppe von Calcium-Kanälen identifiziert werden, die diesem zugrunde liegt (Michard et al., 2011). Es wurde nachgewiesen, dass Glutamatrezeptoren (Glutamate-Like-Receptors, engl. für Glutamatrezeptor-ähnliche Proteine) (siehe 1.4.1.2) Calcium-permeable Kanäle bilden, die das Pollenschlauchwachstum kontrollieren. Die Aktivierung dieser Kanäle erfolgt über die Aminosäure D-Serin. Pollen, der auf das Pistill von D-Serin defizienten Mutanten appliziert wurde, zeigte ein beeinträchtigtes Wachstum. Neben einem Calcium-Gradienten bilden Pollenschläuche auch einen Membranpotentialgradienten aus. Diesem liegt die Tatsache zugrunde, dass Chlorid-Ionen nur im basalen Teil des Pollenschlauchs in die Zelle fließen, während sie an der Spitze wieder austreten, wobei für Protonenflüsse ein inverser Effekt beobachtet wurde. Basierend auf der polaren Verteilung von Ionentransportern und -kanälen spielt die Ausbildung Ionen- bzw. Membranpotentialgradienten eine Signal-gebende Rolle z. B. in der Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle (Michard et al., 2009).

Ebenso wie Pollenschläuche zeigen Wurzelhaare während ihres Wachstums einen oszillierenden Calcium-Gradienten an der Spitze der Zelle, der mit einer Oszillation Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) einhergeht. Da die dort lokalisierte, ROS-produzierende NADPH-Oxidase (RHD2) durch EF-Hände Calcium-reguliert ist, eine Inhibition von Calcium-Kanälen zum Platzen der Zellen und die Applikation eines Calcium-Ionophors zu einem Wachstumsstillstand führt, wurde ein positiver Feedback-Mechanismus für Calcium und ROS postuliert, um ein konstantes Wurzelhaarwachstum aufrechtzuerhalten (Monshausen et al., 2008; Takeda et al., 2008). Da im Wurzelhaar ebenfalls hyperpolarisationsaktivierte Calcium-Kanäle existieren, könnte eine Änderung im Membranpotential grundlegend für die Calcium-Signale sein (Very & Davies, 2000).

1.2.4 Symbiose von Leguminosen mit Rhizobien/Mykorrhiza

Leguminosen gehen eine Symbiose mit Rhizobien, den sogenannten Knöllchenbakterien ein. Sie bilden in ihren Wurzelhaaren einen Erkennungsmechanismus basierend auf pflanzlichen, membranständigen Rezeptorkinasen einerseits sowie bakteriellen Signalmolekülen (Nod-Faktoren) andererseits aus. Nod-Faktoren induzieren im Wurzelhaar sowohl ein biphasisches Calcium-Signal als auch eine Depolarisation des Membranpotentials (Kurkdjian et al., 2000; Shaw & Long, 2003). Die durch Nod-Faktoren induzierte Depolarisation in *Medicago* basiert in der frühen Phase einerseits auf einer Erhöhung der Kalium-Einwärts- sowie Anionenauswärtsströme und andererseits auf der Inhibition der Protonen-ATPase. Der initialen Depolarisation folgt eine Repolarisation, gefolgt von einer Hyperpolarisation, die durch einen Stopp der Kalium-Einwärtsströme und eine Aktivierung der Protonenpumpe begründet ist (Kurkdjian et al., 2000).

Das biphasische Ca^{2+} -Signal setzt sich einerseits aus einem initialen Ca^{2+} -Anstieg im Cytosol und andererseits aus einer Oszillation (auch als Calcium-Spiking bezeichnet) im Perinukleus, die erst ca. 10min nach Stimulusgabe auftritt, zusammen. Ob beide Teile des Signals auftreten, ist abhängig von der Konzentration des applizierten Nod-Faktors (Shaw & Long, 2003). Werden Ca^{2+} -Kanäle unspezifisch durch Lanthan geblockt, ist das elektrische Signal stark beeinträchtigt (Kurkdjian et al., 2000). Bei konstitutiver Aktivität einer kernlokalisierten C_{Ca}MK (Calcium Calmodulin abhängige Kinase, siehe 1.4.2.1) in Wurzelhaaren werden spontan Knöllchen gebildet sowie die Nod-Faktor-stimulierte Genexpression auch ohne Vorhandensein des Nod-Faktors induziert. Dies bedeutet, dass das Calcium-Signal Grundlage dieser Prozesse ist (Gleason et al., 2006). Zudem konnten Miwa et al. im gleichen Jahr feststellen, dass die Induktion eines frühen Nodulationsgens (*ENOD11*) nur von einem mind. 60-minütigen Calcium-Spiking (was einer Anzahl von 36 Spikes entspricht) hervorgerufen werden konnte. Dass die Geninduktion von der Anzahl der Spikes abhängig ist, wurde weiterhin durch die Tatsache untermauert, dass durch die Applikation von Jasmonsäure zwar die Zeit zwischen den einzelnen Spikes verlängert wird, jedoch auch mind. 36 Spikes nötig waren, um die Expression zu induzieren (Miwa et al., 2006).

In der Ausbildung der Symbiose von Leguminosen mit Mykorrhiza kommt es ebenfalls zu Ca^{2+} -Spiking. Obwohl bekannt ist, dass beide Symbiosen teilweise gleiche Komponenten der Signaltransduktion nutzen, besteht das Muster hier aus Spikes kleinerer Amplitude und kürzerer Periode (Kosuta et al., 2008).

1.2.5 Pathogenabwehr: Elicitor-Perzeption und Herbivorie

Elicitoren sind Substanzen, die Abwehrmechanismen gegen pflanzliche Pathogene also Fraßfeinde oder Krankheitserreger auslösen. Bei den Elicitoren wird zwischen den sogenannten MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) und DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) unterschieden. Während MAMPs Fragmente mikrobieller Bestandteile darstellen, bestehen DAMPs aus pflanzeneigenen Molekülen, die bei Pathogenbefall im Intrazellularraum auftreten. Elicitoren induzieren sowohl im Cytosol als auch im Zellkern Calcium-Signale, die mit einer Depolarisation der PM einhergehen. Die Perzeption von DAMPs basiert auf membranständigen Rezeptorkinasen, die bei Bindung des Elicitors eine Konformationsänderung durchführen, welches zu einer Aktivierung der cytosolischen Kinasedomäne führt. Die in der Folge initiierte Abwehrantwort ist vielschichtig und beinhaltet u. a. die Produktion von ROS und Ethylen sowie die Expression von Abwehrgenen (Zipfel, 2009).

Interessanterweise ähneln sich die Signalkomponenten auf unterschiedliche bakterielle Elicitoren sehr, können sich jedoch im Zellkern unterscheiden, was auf eine unabhängige Rolle des Zellkerns in der Ca^{2+} -induzierten Signaltransduktion schließen lässt (Lecourieux et al., 2005). Sowohl in Mesophyllzellen als auch in Wurzelhaaren von *Arabidopsis* findet man als Reaktion auf das *Pseudomonas* MAMP flg22 (konservierte Sequenz in Flagellin) und das *E. coli* MAMP elf18 (konservierte Sequenz in bakteriellem Elongationsfaktor EF-Tu) eine starke Depolarisation, welche mit einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ einhergeht. Die daran beteiligten Ionenkanäle sind auf molekularer Ebene unbekannt. Mit Hilfe Ionen-selektiver Elektroden konnte jedoch eine essentielle Rolle für Chlorid-Ionen und damit Anionen-Kanäle für die Depolarisation beschrieben werden (Jeworutzki et al., 2010).

Endogene DAMPs wie *AtPep1* lösen ebenfalls sowohl cytosolische Ca^{2+} -Signale als auch die Aktivierung von Chlorid-Kanälen aus, was zu einer Depolarisation der Plasmamembran führt. Sie ähneln in ihrer Antwort daher sehr der MAMP-ausgelösten Pathogenabwehr. Jedoch wurde gezeigt, dass diese Elicitoren eine schwächere Abwehrreaktion zeigen, was sich zum einen in einer schwächeren Depolarisationsamplitude als auch in einem geringeren Ca^{2+} -Signal widerspiegelt (Krol et al., 2010).

Symbiontische Bakterien und Pathogene stimulieren folglich sehr ähnliche Signalkomponenten. Bei der Symbiose werden jedoch entweder Teile der Pathogenerkennung

entweder unterdrückt oder spezifische Komponenten dominieren, so dass keine Abwehrreaktion ausgelöst wird (Lopez-Gomez et al., 2012).

Herbivorie, die durch Fraßfeinde verursacht wird, führt zu einer komplexen Abwehrreaktion in Pflanzen, die wie bei der mikrobiellen Pathogenabwehr eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ sowie eine Depolarisation beinhaltet (Bos et al., 2010; Reddy et al., 2011). Pflanzen nutzen diese Signalformen jedoch zusätzlich in der Kommunikation mit anderen Pflanzen: Der Herbivoren-Befall führt zu einer Freisetzung von flüchtigen organischen Stoffen (engl. volatile compounds, VOCs), die von benachbarten Pflanzen detektiert werden und in diesen wiederum sowohl eine Depolarisation als auch eine Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration auslösen. Interessanterweise konnten Forscher erst kürzlich feststellen, dass einige dieser VOCs beide Signale stimulierten, während andere nur zur elektrischen Antwort führten (Zebelo et al., 2012).

1.2.6 Abiotische Stressantworten

Neben biotischen Stressstimuli erzeugt auch eine Vielzahl von abiotischen Stressfaktoren eine Calcium- bzw. elektrische Antwort. Cessna et al. zeigten, dass die Applikation von Kälte-, Salz- sowie hypoosmotischem Stress zu einer Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration in *Nicotiana tabacum*-Zellkultur führt (Cessna et al., 2001). Carpaneto et al. beobachteten zudem, dass mit der in Arabidopsis-Mesophyllzellen durch Kälte hervorgerufenen cytosolischen Calcium-Änderung durch die Aktivierung Calcium-permeabler Kanäle auch eine Depolarisation des Membranpotentials einhergeht (Carpaneto et al., 2007). Diese konnte auch im Mais als Reaktion auf Hitze gezeigt werden (Grams et al., 2009). Monshausen et al. wiesen 2008 eine Calcium-Antwort in Arabidopsis-Wurzeln auf mechanische Reize nach, die sich je nach Stimulus unterschied, so dass Berührung ein monophasisches, ein Biegen der Wurzel jedoch ein biphasisches Signal hervorrief (Monshausen et al., 2008).

2012 wurde von Short et al. die Regulation der Ozonantwort von Arabidopsis-Keimlingen durch ein spezifisches biphasisches Calcium-Muster entdeckt. Die Expression der durch Ozon induzierten Gene konnte weder durch die Applikation von H_2O_2 noch durch Kälte stimuliert werden, welche wie bereits dargestellt ebenso ein Ca^{2+} -Signal hervorrufen (Short et al., 2012). Die Applikation von Ozon führt in Schließzellen neben dem Ca^{2+} -Signal auch zu einer elektrischen Antwort, indem Anionen-Kanäle aktiviert werden, was nachfolgend zum Stomaschluss führt (Vahisalu et al., 2010).

1.2.7 Circadiane Calcium-Oszillationen

Die cytosolische Calcium-Konzentration weist in Blättern keinen über 24h konstanten Wert auf, sondern unterliegt definierten Schwankungen, die abhängig von Lichtintensität und Photoperiode sind. Daher wurde für Calcium auch eine Rolle als Botenstoff im circadianen Rhythmus postuliert, der die photoperiodische Information vermittelt (Love et al., 2004). Dass infolgedessen auch abiotische Ca^{2+} -Signale eine veränderte Calcium-Antwort je nach Tageszeit zeigen, haben Dodd et al. anhand von Messungen an Arabidopsis-Pflanzen nachgewiesen: Durch Kälte ausgelöste Ca^{2+} -Signale waren in der Mitte der Photoperiode signifikant höher als zu deren Beginn oder Ende (Dodd et al., 2006).

1.3 Grundlage elektrischer Signale in „nicht-erregbaren“ Pflanzen

Das Membranpotential selbst ebenso wie Depolarisationen und Hyperpolarisationen basieren auf einer ungleichen Verteilung von Ionen über einer Membran. Diese können wie für Calcium beschrieben als Signalmoleküle dienen und die Modulation cytosolischer Proteine bewirken. Auch eine weitere Form der Signaltransduktion über spannungsgesteuerte Kationen- und Anionen-Kanäle ist möglich.

Obwohl die Existenz elektrischer Signale in Pflanzen schon lange bekannt ist, weiß man noch sehr wenig über deren Bedeutung, welche sehr kontrovers diskutiert wird. ΔV_m wurde auch in sogenannten „nicht-erregbaren“ Pflanzen als Komponente der Signalantwort auf diverse Stimuli entdeckt, welche sich jedoch wie z. B. bei der Elicitorperzeption je nach Art in deren Amplitude unterscheiden kann (siehe 1.2.5). Es stellt sich daher die Frage, ob ΔV_m eine eigenständige, ubiquitäre Rolle in der pflanzlichen Signaltransduktion zukommt und welche Mechanismen diese Signale entschlüsseln.

1.3.1 Kodierung elektrischer Signale: Generierung von ΔV_m

1.3.1.1 Das Membranpotential

Membranpotentialänderungen gehen von einem nahezu konstanten Ruhepotential aus, welches in Pflanzen je nach Zelltyp zwischen -80mV und -200mV liegt und auf der durch Transporter vermittelten ungleichen Verteilung von Kalium und Anionen zwischen Cytosol und Apoplast basiert. Aufrechterhalten wird dieses unter ATP-Verbrauch durch die Aktivität der in der Plasmamembran lokalisierten Protonenpumpe. Stimula-

tion oder Inhibierung der Pump-Aktivität führt zu Änderungen des Membranpotentials, wodurch wiederum die Aktivität spannungsgesteuerter Ionenkanäle moduliert werden kann (Ward et al., 2009). Somit spielen Protonenpumpen neben ihrer wichtigen Funktion in der Energetisierung der Nährstoffaufnahme und deren Verteilung in der Pflanze (Sondergaard et al., 2004) auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. Diese ist in Schließzellen besonders gut untersucht, in denen die Blaulicht-aktivierte Protonenpumpe bei der Stomaöffnung durch Hyperpolarisation spannungsgesteuerte Kaliumkanäle öffnet (siehe auch 1.2.2). Eine Inhibition der Protonenpumpaktivität wird dahingegen auf Pathogenbefall induziert, um ein Eindringen der Pathogene über die Stomata zu verhindern (Melotto et al., 2006). Eine konstitutiv aktive Mutante der Protonen-ATPase führt zu einer verminderten ROS-Produktion (Keinath et al., 2010). Eine weitere Funktion in der Signaltransduktion wird für diese Pumpen in der Langstrecken-Informationenübermittlung über die Modulation des Membranpotentials bzw. des pH-Werts in Pflanzen postuliert (Zimmermann et al., 2009).

Das Membranpotential bildet also die Basis für einen schnellen, passiven Ionentransport über Membranen entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Mit der Bestätigung der Existenz von Ionenkanälen in Pflanzen durch Schroeder et al. (1984) begann die Identifikation und Charakterisierung dieser Proteine, die die Grundlage für die Generation einer schnellen elektrischen Antwort schaffen.

In höheren Pflanzen wurde die Existenz von Kalium-, Calcium- und Anionen-Kanälen beschrieben. Eine Vielzahl an Daten wurde im Modellsystem der Schließzelle generiert, da viele der Kanäle hier exprimiert sind und aufgrund ihrer elektrischen Entkopplung (keine Plasmodesmata) als Einzelzellen messbar sind.

1.3.1.2 Anionen-Kanäle

Neben ihrer Rolle im Nährstofftransport nehmen Anionen-Kanäle höchstwahrscheinlich eine Rolle in der durch verschiedenste abiotische/biotische Signale induzierten Depolarisation des Membranpotentials ein (siehe 1.2) (Ward et al., 2009). Hinweise hierauf lieferten Ergebnisse aus Untersuchungen der Pathogenantwort, in der Chlorid-Efflux Teil der Depolarisation ist und sich die Pathogenantwort durch die Applikation von Anionen-Kanalblockern inhibieren ließ (Jabs et al., 1997). Jedoch konnte die molekulare Identität einiger Anionen-Kanäle erst in den letzten Jahren definiert werden. In Arbeiten an Schließzellen wurde schon Ende der 90er Jahre die Beteiligung von Anionen-Kanälen am Stomaschluss beschrieben (Keller et al., 1989; Schroeder & Hagiwara,

1989). Dieser Anionenstrom gliedert sich in einen sogenannten R-Typ („rapid“, engl. für schnell) mit einer schnellen und einen S-Typ („slow“, engl. für langsam) mit einer langsamen Aktivierungskinetik auf, welche beide den Efflux von Chlorid und Malat vermitteln (Keller et al., 1989; Schmidt & Schroeder, 1994). 2008 wurde SLAC1 (slow anion channel associated 1) als putativer Anionen-Kanal in Schließzellen identifiziert (Meyer et al., 2010; Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008) und konnte kurze Zeit später als solcher funktionell bestätigt werden (Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2009). Zudem wurde eine Aktivierung des Kanals durch sowohl Calcium-abhängige als auch -unabhängige Kinasen nachgewiesen. Ein weiteres Mitglied dieser Anionen-Kanal-Familie ist SLAH3 (SLAC1 Homolog 3), welcher eine hohe Permeabilität für Nitrat aufweist und in Schließzellen im Gegensatz zu SLAC1 nur über Calcium-abhängige Proteinkinasen reguliert wird (Geiger et al., 2011). Da dieser Kanal anders als SLAC1 auch im Mesophyll exprimiert wird, wird hier eine Rolle in der Pathogenantwort vermutet. Neben dieser Gen-Familie, die eine langsame Aktivierungskinetik aufweist, existiert auch eine Familie, die sich durch schnelle Kinetik auszeichnet. Diese werden daher als QUACs (quick activating anion channels, engl. für schnell aktivierende Anionenkanäle) bezeichnet. Als erstes Mitglied wurde ein sogenannter ALMT (Aluminium aktivierter Transporter) identifiziert, der hauptsächlich den Al^{3+} -vermittelten Efflux von Malat vermittelt. Malat komplexiert im sauren Boden Aluminium und verhindert somit dessen toxischen Effekt auf die Pflanze (Delhaize et al., 2007). In Schließzellen konnte in Messungen an Mutanten von ALMT12 ein beeinträchtigter Stomaschluss sowie eine Reduktion des QUAC-typischen Stroms beobachtet werden (Meyer et al., 2010).

Bisher ist abgesehen von Messungen an Schließzellen noch sehr wenig über die Identität der Anionen-Kanäle in der Signaltransduktion bekannt, da zum einen deren molekulare Identität noch nicht lange identifiziert ist und zum anderen z. B. definierte Messungen im Spannungsklemmenmodus (siehe 2.9) im Mesophyll aufgrund deren elektrischer Kopplung nicht möglich sind. Dennoch ist gerade eine Beteiligung der Anionen-Kanal-vermittelten Depolarisation an der Signalweiterleitung in Mesophyllzellen durch die Existenz von Plasmodesmata wahrscheinlich (Ward et al., 2009).

1.3.1.3 Kalium-Kanäle

Die dominierende Größe der Membranleitfähigkeit in pflanzlichen Zellen stellen hauptsächlich spannungsabhängige Kalium-Kanäle dar (Hedrich, 2012). Kalium-Kanäle vom Shaker-Typ bilden hierbei die größte Gruppe. Diese Genfamilie besteht sowohl aus

Einwärts- (KAT1, KAT2, AKT1, AKT2 und KC1) als auch Auswärtsgleichrichtern (GORK, SKOR) und besitzt einen Spannungssensor, über welchen die Aktivität der Kanäle reguliert werden kann. Die in Schließzellen exprimierten, hyperpolarisationsaktivierten KAT1- und KAT2-Kanäle vermitteln die hoch-affine Kalium-Aufnahme und sind an der Stomaöffnung beteiligt. Eine Kombination der verschiedenen Einwärtsgleichrichter in Heteromeren stellt die Basis für eine zelltyp- bzw. gewebespezifische Charakteristik in Bezug auf Spannungs-/Calcium- und pH-Abhängigkeit dar. Im Gegensatz zu Einwärtsgleichrichtern werden die Auswärtsgleichrichter vom Shaker-Typ durch Depolarisation des Membranpotentials aktiviert. Dabei ist die Aktivierungsschwelle zusätzlich von der externen Kalium-Konzentration abhängig (Hedrich, 2012). Im Gegensatz zur ABA-abhängigen Inhibierung des KAT1-Kanals durch die Calcium-unabhängige Kinase SnRK2.6 (Snf1-related protein kinase 2.6, auch OST1) (Sato et al., 2009) können spannungsabhängige Kalium-Kanäle auch einer Aktivierung durch Calcium-abhängige Proteinkinasen unterliegen, wie am Beispiel von AKT1 in Wurzelhaaren gezeigt werden konnte (Lee et al., 2007; Li et al., 2006).

Neben Kalium-Kanälen vom Shaker-Typ existiert auch die Familie der TPKs (tandem pore K^+ channels, engl. für Tandem-Pore-Kalium-Kanäle), welche jedoch (mit Ausnahme von TPK4) in der Vakuole lokalisiert sind und auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird (zur Übersicht siehe Hedrich et al., 2012).

1.3.1.4 Calcium-Kanäle

Eine dritte Klasse an Kanälen stellen die Calcium-Kanäle dar. Wie bereits beschrieben generieren diese Kanäle eine Vielzahl an Calcium-Signalen in Pflanzen, wobei deren molekulare Identität bisher nicht bekannt ist. Zusätzlich zu der Tatsache, dass Calcium als Botenstoff fungiert, kann der Influx von Calcium über die Plasmamembran aber auch zur Depolarisation des Membranpotentials beitragen. Calcium-Kanäle scheinen in nahezu allen Membranen zu existieren und werden durch Membranpotentialänderungen, mechanischen Druck oder Liganden wie Glutamat, Inositol-3-Phosphat (IP₃), zyklische ADP-Ribose (cADPR) sowie zyklische Nukleotide (cNMPs) aktiviert (Hetherington & Brownlee, 2004; Sanders et al., 2002; White & Broadley, 2003). Sequenzbasierte Homologie-Analysen mit tierischen Sequenzen ermöglichten in Arabidopsis die Identifikation verschiedener Genfamilien: CNGCs (cyclic nucleotide gated channels, engl. für cNMP gesteuerte Kanäle) und GLRs (glutamate receptor like genes, engl. für Glutamatrezeptor-ähnliche Gene). Jedoch konnte mit Ausnahme der Arbeiten

zur Pollenschlauchentwicklung (Michard et al., 2011) sowie Messungen mit *AtGLR3.4* in HEK (human embryonic kidney cells, engl. für humane embryonale Nierenzellen)-Zellen (Vincill et al., 2012) keine direkte Calcium-Kanalaktivität nachgewiesen werden. In Abschnitt 1.4.1.2 werden diese putativen Calcium-Kanäle und deren Phänotypen näher beschrieben.

1.3.2 Dekodierung von elektrischen Signalen

Die Dekodierung der Membranpotentialänderungen auf Signaltransduktionsebene könnte über drei Mechanismen realisiert werden: Zum einen durch spannungsgesteuerte Kationen- und Anionen-Kanäle und einer Weiterleitung des Signals auf elektrischer Ebene; zum anderen über die Generierung eines Calcium-Signals durch die Aktivierung spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle. Eine dritte Form wurde bisher nur im tierischen System identifiziert und basiert auf der Entdeckung spannungsaktivierter, membranständiger Enzyme: Im tierischen System konnte gezeigt werden, dass nicht nur Ionenkanäle Spannungssensoren besitzen und so über ΔV_m reguliert werden können, sondern auch einige G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs, engl. für G-Protein coupled receptos) und Phosphatasen. Während die Aktivität einer Phosphatase durch Depolarisation induziert wird (Horn, 2005; Murata & Okamura, 2007), kann diese bei GPCRs je nach Rezeptor entweder stimulierende oder inhibierende Wirkung haben (Ben-Chaim et al., 2006; Mahaut-Smith et al., 2008). In Pflanzen wurden bisher wenige Homologe zu tierischen GPCRs entdeckt, wodurch die Kenntnisse über die Aktivität dieser Rezeptoren gegenwärtig noch sehr gering ist (Tuteja, 2009). Sie scheinen eine Rolle in der ABA-Signaltransduktion in Arabidopsis-Schließzellen zu spielen (Pandey & Assmann, 2004). Die Möglichkeit einer Regulation von Komponenten der Signaltransduktion durch ΔV_m wurde neben Ionenkanälen noch wenig in Pflanzen untersucht. Allerdings könnte hier ebenfalls eine direkte Signaltransduktionsfunktion des Membranpotentials existieren. Dabei könnte eine Form der Spezifität auch über die Lokalisation des Signals an der Membran und dessen Assoziation zu dekodierenden Proteinen generiert werden.

1.3.2.1 Spannungsgesteuerte Anionen-/Kationenkanäle

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle spielen neben ihrer Rolle in der Repolarisation des Membranpotentials zurück auf das Ruhepotential nach einem Stimulus auch eine Rolle als Komponente der Signaltransduktion selbst, wie im Beispiel der schon genannten Pathogenantwort. Kalium-Kanäle vom Shaker-Typ werden je nach Gleichrichtung

durch Hyperpolarisation bzw. Depolarisation des Membranpotentials aktiviert und besitzen eine definierte Aktivierungsschwelle (Hedrich et al., 2012). Auch die Aktivität von Anionen-Kanälen wird durch Membranpotentialänderung moduliert: Die langsamen, durch SLAC1 vermittelten Anionenströme werden durch lang anhaltende Hyperpolarisationspulse induziert (Linder & Raschke, 1992; Schroeder & Keller, 1992), wohingegen sich die Aktivierung der schnellen Anionenströme über QUACs als Depolarisations- bzw. Hyperpolarisations-inhibiert zeigt (Hedrich et al., 1990; Kolb et al., 1995).

1.3.2.2 Spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle

Veränderungen im Membranpotential können Calcium-Signale auslösen und sind somit auch direkt in die Calcium-basierte Signaltransduktion involviert. Eine direkte Regulation besteht hierbei durch Depolarisations-/Hyperpolarisations-aktivierte Calcium-Kanäle, sogenannte DACCs und HACCs (depolarization/hyperpolarization activated Calcium channel, engl. für Depolarisations-/Hyperpolarisations-aktivierter Calcium-Kanal). Obwohl deren molekulare Identität unklar ist, konnte ihre Aktivität durch zahlreiche Messungen belegt werden (genauer in 1.4.1.2).

In Pflanzen wird eine Depolarisation des Membranpotentials, wie schon beschrieben, aufgrund verschiedenster biotischer bzw. abiotischer Stimuli ausgelöst (Ward et al., 1995). Die Bedeutung von Transportern bzw. Ionenkanälen, die diese hervorrufen können, wurde durch die Entdeckung von DACCs evident, die durch unter physiologischen Bedingungen auftretende Depolarisationen aktiviert werden (Miedema et al., 2008; Thuleau et al., 1994). Es wird diskutiert, dass die Stimulus-bedingte Aktivierung von Anionenkanälen zu einer Depolarisation des Membranpotentials führt, welche wiederum spannungsabhängige Calcium-Kanäle aktivieren kann und infolgedessen zu einer cytosolischen Erhöhung des Botenstoffs Calcium führt (Ward et al., 1995). Dieser Mechanismus ist stark an das tierische Modellsystem angelehnt. Tatsächlich zeigen die meisten in Pflanzen gemessenen Calcium-Kanäle eine Aktivierung durch Hyperpolarisation (Ward et al., 2009). Deren physiologische Funktion wurde zuerst in der Calcium-Antwort von Schließ- bzw. Wurzelhaarzellen gezeigt (Hamilton et al., 2000; Levchenko et al., 2008; Roelfsema et al., 2001; Very & Davies, 2000).

Stange et al. (2010) beobachteten, dass die Calcium-abhängige Aktivierung von Anionen-Kanälen in Schließzellen durch Hyperpolarisation, die zum Stomaschluss führt, über eine lange, vorangehende Depolarisationsphase verstärkt werden kann. Dies lässt

vermuten, dass die Depolarisation als eine Art Sensibilisierung für Hyperpolarisations-induzierte Signale als eine Art „Priming“ genutzt werden könnte.

1.3.3 Beispiele ΔV_m -vermittelter Genregulation

Die ersten der bisher nur sehr wenigen Daten bezüglich einer möglichen Genregulation durch ΔV_m , wurden durch Arbeiten an Tomate erzielt. Hierbei konnte ein durch Verwundung bzw. Hitze erzeugtes elektrisches Signal die Expression eines Proteinase-Inhibitors induzieren. Da diese Induktion nicht nur lokal erfolgte, sondern auch in benachbarten Blättern gemessen wurde, konnte aufgrund der schnellen Ausbreitungsgeschwindigkeit ein chemisches Signal ausgeschlossen und ein propagierendes elektrisches Signal als Ursache postuliert werden (Pena-Cortes et al., 1995; Wildon et al., 1992).

Auch in Studien an *Bidens pilosa* (behaarter Zweizahn) konnte eine durch Verwundung induzierte Genexpressionsänderung beobachtet werden. Während ein nicht zur Verwundung führender Stimulus eine lokale ΔV_m herbeiführte, wurde durch Verletzung eine propagierende, auch in den Nachbarblättern messbare ΔV_m aufgezeichnet. Dies korrelierte mit der Expression eines CaMs, welches im ersten Fall nur lokal exprimiert, bei Verletzung jedoch auch in anderen Blättern induziert wurde (Vian et al., 1996).

In Studien über den hochaffinen Kaliumt-Transporter HAK5 (high affinity K^+ -transporter 5) in Tomate wurde eine mögliche Genregulation durch das Membranpotential in der Wurzel postuliert. Diese war Hyperpolarisations-induziert, während eine Depolarisation eine Inhibierung der Expression bewirkte (Nieves-Cordones et al., 2008).

2012 konnte von Bricchi et al. gezeigt werden, dass eine funktionelle Trennung von Depolarisation und Calcium-Erhöpfung als Komponenten einer Signalkaskade möglich ist. In dieser Arbeit wurde die Depolarisation grundlegend für die Aktivierung von Genexpression bestimmt. Hierbei wurde die Aktivität von Plasmodesmata-Proteinen in der JA-vermittelten Signaltransduktion auf Herbivore untersucht. PDLP-(plasmodesmata located proteins, engl. für Plasmodesmata lokalisierte Proteine)-Mutanten zeigten eine Reduktion der Depolarisation um ca. 85%. Interessanterweise waren in diesen Mutanten weder Calcium- noch ROS-Antwort wesentlich beeinträchtigt. Eine Untersuchung der VOC-Produktion sowie JA-Konzentration ergab eine Reduktion im Vergleich zum Wildtyp nach Herbivorenbehandlung. Dies war im Fall von JA auf eine verringerte Expression einiger JA-Synthesegene zurückzuführen (Bricchi et al., 2012).

1.4 Calcium-basierte Signaltransduktion und -spezifität

Eine Vielzahl an Calcium-Sensoren sind daran beteiligt, die gesamte Bandbreite an Ca^{2+} -Signalen in spezifische Signale wie Phosphorylierung, Proteininteraktionen, Enzymaktivität oder Genregulation umzusetzen (Batistic & Kudla, 2011). Die hohe Anzahl an Calcium-Sensoren in Pflanzen einerseits verbunden mit der großen Diversität an Prozessen, in denen Calcium-Signale und -Sensoren eine Rolle spielen, setzen andererseits die Existenz streng regulierter Mechanismen voraus, um sowohl eine Calcium-Homöostase zu gewährleisten als auch spezifische Calcium-Signaturen erzeugen zu können.

1.4.1 Kodierung des Calcium-Signals

Um Toxizität durch Calcium zu vermeiden und ein schnelles, spezifisches Ca^{2+} -Signal zu ermöglichen, muss $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ im Ruhezustand möglichst gering (ca. 100nM) gehalten werden. Um dies zu gewährleisten, wird Calcium durch Calcium-ATPasen oder Transporter in verschiedene Zellorganellen bzw. den Apoplasten transportiert (Sanders et al., 2002). Dies ermöglicht die Generierung eines schnellen cytosolischen Calcium-Signals bei Stimulusgabe, das zudem noch eine Spezifität über den „Herkunftsort“ enthält. Durch die Aktivität von Calcium-Kanälen und -transportern kann die Form des Signals zusätzlich gesteuert werden, so dass eine definierte Calcium-Signatur entsteht.

1.4.1.1 Kompartimentierung

Die Hauptspeicherorte der Zelle für Calcium stellen die Vakuole, der Apoplast und das Endoplasmatische Reticulum (ER) dar. Die Vakuole besitzt eine freie Calcium-Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{F}}$) von ca. 0.2-5mM (Conn & Gilliam, 2010). Im Apoplast liegt die größte Menge an Calcium in der Zellwand gebunden vor, so dass $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{F}}$ hier auf ca. 0.33mM geschätzt wird (Conn et al., 2011). Für das ER existieren nur wenige genaue Daten, weshalb $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{F}}$ hier in Anlehnung an Daten aus dem tierischen System auf 50-500 μM postuliert wird (Coe & Michalak, 2009).

Auch Chloroplasten und Mitochondrien tragen wahrscheinlich zur Calcium-vermittelten cytosolischen Signaltransduktion bei. Im Chloroplast liegt $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{F}}$ bei ca. 150nM, wobei ein Großteil des gesamten Calciums (ca. 15mM) an die Thylakoidmembran bzw. Proteine im Stroma gebunden vorliegt (Gross & Hess, 1974). Es besteht die Hypothese, dass $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ durch Chloroplasten wahrgenommen und beeinflusst werden kann, da für das mit der Thylakoidmembran assoziierte Calcium-bindende Protein *AtCAS* eine Rolle in

der durch externes Calcium ausgelösten Ausbildung von cytosolischen Calcium-Oszillationen beschrieben wurde (Stael et al., 2012). Knockout-Mutanten zeigen eine Beeinträchtigung des $[Ca^{2+}]_{ext}$ -induzierten Stomaschlusses und ein verzögertes Wachstum (Friso et al., 2004; Nomura et al., 2008; Vainonen et al., 2008; Weinl et al., 2008).

In Mitochondrien liegt der Großteil des vorhandenen Calciums ebenfalls in gebundener Form vor, so dass $[Ca^{2+}]_F$ bei ca. 200nM liegt (Logan & Knight, 2003). In Mais wurde gezeigt, dass Hypoxia zu einer Calcium-Freisetzung aus den Mitochondrien führt (Subbaiah et al., 1994; Subbaiah et al., 1998). Weiterhin scheint mitochondriales Calcium eine Rolle in der Ausbildung des Calcium-Gradienten im Wurzelhaarwachstum zu spielen, da eine Beeinträchtigung der Aktinpolymerisation in diesen Zellen eine Ca^{2+} -Freisetzung aus den Mitochondrien verursacht, bei denen zudem ein Ca^{2+} -Gradient zwischen Mitochondrien an der Spitze und Basis dieser Zellen existiert (Wang et al., 2010).

Durch die Kompartimentierung wird folglich eine lokale Spezifität erreicht, welche in Kombination mit der sehr geringen cytosolischen Diffusionsrate von Calcium und der hohen cytoplasmatischen Pufferkapazität eine definierte, örtliche Generation von Calcium-Signalen in der Zelle erlaubt (Hashimoto & Kudla, 2011; White & Broadley, 2003).

1.4.1.2 Calcium-Homöostase und Signal-Generierung

Definierte Calcium-Signale werden durch das hoch kontrollierte Zusammenspiel von Calcium-Transportern, -Pumpen und -Kanälen, die Ca^{2+} -Efflux bzw. -Influx ermöglichen, generiert. Der Influx erfolgt über Calcium-Kanäle entlang des elektrochemischen Gradienten, während der Efflux über Energie-abhängige Ca^{2+} -ATPasen bzw. Ca^{2+}/H^+ -Antiporter gewährleistet wird (Sanders et al., 2002).

In Pflanzen wurde bereits eine Vielzahl von Calcium-transportierenden Proteinen entdeckt und charakterisiert. Im Laufe dieser Untersuchungen wurde jedoch klar, dass Calcium-Pumpen nicht nur eine Rolle in der Homöostase spielen, sondern auch wichtige regulatorische Funktionen haben können (Dodd et al., 2010). Calcium-Export aus dem Cytosol wird generell durch die sogenannten P-Typ ATPasen vermittelt, von denen in Arabidopsis ER-Typ Ca²⁺-ATPasen (ECAs) und autoinhibitorische Ca²⁺-ATPasen (ACAs) existieren, welche sich in zwei Kriterien unterscheiden: Zum einen haben nur ACAs eine N-terminale CaM-Bindestelle, über die die Pumpaktivität Calcium-reguliert stimuliert wird. Zum anderen existieren Unterschiede in Membran-ständigen Aminosäuregruppen, bei denen eine Rolle in der Calcium-Bindung vermutet wird (Baekgaard et

al., 2005). ECA-Insertionsmutanten zeigen Calcium-abhängige Phänotypen z. B. im Wachstum, aber gleichzeitig auch eine erhöhte Mangantoleranz (Li et al., 2008; Mills et al., 2008; Wu et al., 2002). Daher wird diesen Proteinen eher eine Funktion als Transportsysteme für Kationen in Zellkompartimente und damit als Regulatoren von Enzymkofaktoren zugeschrieben (Dodd et al., 2010). Im Gegensatz dazu nehmen ACAs vermutlich eine wichtige Rolle in der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion ein, da sich ihre Expression als stark Stress-abhängig darstellt (Cerana et al., 2006). Phänotypen von Mutanten in der Pollen- und Blütenentwicklung und die vielseitigen posttranslationalen Modifikationen sowie Lokalisationsunterschiede der ACAs innerhalb der Zelle als auch gewebespezifischer Art, legen eine komplexe Funktion und Regulation dieser Proteine in der Calcium-basierten Signaltransduktion nahe (Boursiac et al., 2010; George et al., 2008; Hepler et al., 2001; Schiott et al., 2004).

Im Gegensatz zu Ca^{2+} -ATPasen haben $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter eine geringe Calcium-Affinität und sind energetisch an einen entgegengesetzten Protonenfluss gekoppelt, der dem durch Protonen-ATPasen aufgebauten elektrochemischen Gradienten folgt (Shigaki & Hirschi, 2006). Sie werden posttranslational durch Autoinhibition bzw. Protein-Interaktionen moduliert (Cheng & Hirschi, 2003; Cheng et al., 2005; Mei et al., 2009; Mei et al., 2007). Die vakuolären Kationenaustauscher CAX1 und CAX3 (cation exchanger, engl. für Kationenaustauscher) scheinen die Hauptrolle in der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase zu spielen. Mutanten zeigten Phänotypen wie eine Beeinträchtigung des Wurzelwachstums, der Infloreszenzentwicklung sowie einer Erhöhung der Kältetoleranz, welche auf eine Aufhebung der Inhibierung der CBF/DREB-Expression durch CAX1 zurückzuführen ist (Catala et al., 2003). Kürzlich wurde zudem festgestellt, dass deren Funktion auch eine Rolle für die Ausbildung des apoplastischen pH-Wertes spielt, da Mutanten eine aufgrund eines erhöhten extrazellulären pH-Werts beeinträchtigte Auxin-Aufnahme in die Schließzellen zeigten (Cho et al., 2012).

Trotz der Vielzahl an Arbeiten zu Calcium-Signalen bleibt die molekulare Identität der Calcium-Kanäle, wie bereits in 1.3.1.4, beschrieben immer noch unklar. IP_3 und cADPR triggern die Calcium-Freisetzung aus der Vakuole und dem ER und steuern so z. B. die Induktion von Genen wie *RD29A*, die eine Rolle in der Antwort auf abiotischen Stress spielen (Muir & Sanders, 1997; Navazio et al., 2001; Wu et al., 1997; Xiong et al., 2002). Sanchez et al. beobachteten zudem die Induktion von ABA-responsiven Genen aufgrund der Aktivierung der ADPR-Cyklase durch ABA (Sanchez et al., 2004). Auch eine Beteiligung von cADPR am circadianen Rhythmus wurde beschrieben (Dodd et

al., 2007). Obwohl bisher noch keine Rezeptoren für diese Signalmoleküle identifiziert werden konnten und keine homologen Sequenzen zu tierischen IP₃-Rezeptoren bzw. Ryanodin-Rezeptoren (Rezeptoren für cADPR) im Arabidopsis-Genom kodiert sind, ist eine Existenz dieser Rezeptoren aufgrund der Tatsache, dass sie Calcium-Signale induzieren können bzw. nachweislich eine Rolle in verschiedenen pflanzlichen Prozessen spielen, durchaus möglich (Dodd et al., 2010).

Den in Abschnitt 1.3.1.4 beschriebenen DACCs wird eine Rolle in der Calcium-vermittelten Stressantwort zugeschrieben, da die Depolarisation des Membranpotentials eine der frühen Reaktionen der Pflanze auf die unterschiedlichsten Stresssignale ist. Jedoch gibt es bisher keinen direkten Beweis, der DACCs direkt mit der Calcium-Antwort verknüpft (McAinsh & Pittman, 2009). Studien, die die Aktivität von HACCs belegen, wurden an Schließzellen und Wurzelhaaren durchgeführt. In Schließzellen wurden diese Kanäle durch ABA und ROS aktiviert (Pei et al., 2000), wobei NADPH-Oxidase-Mutanten eine gestörte HACC-Aktivität auf ABA sowie eine veränderte Ca²⁺-Antwort und Stomaöffnung zeigten (Kwak et al., 2003; Very & Davies, 2000). In der Wurzel war Aktivität auf die Spitze beschränkt, weshalb eine Funktion in der Generierung des Ca²⁺-Gradienten vermutet wird (Very & Davies, 2000). Mutanten der Wurzel-NADPH-Oxidase zeigten eine Inhibierung der Ausbildung des Ca²⁺-Gradienten sowie der Wurzelhaarbildung, was hier ebenfalls auf eine direkte Regulation der Kanäle durch ROS schließen lässt (Foreman et al., 2003). HACCs wurden zudem im Pollen entdeckt und unterliegen dort der Regulation durch CaMs (Shang et al., 2005a).

Klassische Calcium-Kanäle, wie sie aus dem tierischen System bekannt sind, scheinen in Pflanzen nicht vorzukommen. Vielmehr deutet die Existenz von CNGC-Kanälen bzw. GLRs auf die Generation von Calcium-Signalen in Pflanzen über nicht-selektive Kationenkanäle hin (Lacombe et al., 2001; Wheeler & Brownlee, 2008).

Die GLR-Familie aus Arabidopsis wurde über Homologien zu tierischen Glutamatrezeptoren (GluRs) identifiziert (Davenport, 2002; Lacombe et al., 2001). Ein direkter Zusammenhang zwischen GLRs und Calcium konnte 2000 von Dennison und Spalding hergestellt werden, die eine Depolarisation in Verbindung mit einer cytosolischen Calcium-Erhöhung als Reaktion auf die Applikation von Glutamat feststellen konnten (Dennison & Spalding, 2000). GLRs spielen eine Rolle im Kältestress (Meyerhoff et al., 2005), der Regulation des C- und N-Metabolismus (Kang & Turano, 2003) sowie bei Stomaschluss (Cho et al., 2009) und Pollenschlauchentwicklung (Michard et al., 2011).

In der Arbeit an Pollenschläuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht Glutamat, sondern Serin als Hauptagonist der GLR-Aktivierung wirkten.

CNGC-Kanäle bilden nicht-selektive Kationenkanäle (Leng et al., 1999; Maser et al., 2001; Urquhart et al., 2007) und besitzen neben einer cNMP-Bindestelle eine CaM-Bindestelle (Arazi et al., 2000; Gobert et al., 2006; Urquhart et al., 2007). Mutanten zeigen Phänotypen im Pollenschlauchwachstum (Frietsch et al., 2007), in der Pathogenabwehr (Balague et al., 2003; Clough et al., 2000; Ma & Berkowitz, 2011; Yoshioka et al., 2006) sowie im cAMP-induzierten Calcium-Einstrom in Schließzellen (Ali et al., 2007). 2012 konnte für *AtCNGC6* eine wesentliche Rolle in der Calcium-vermittelten Reaktion auf Hitzestress beschrieben werden (Gao et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass GLRs und CNGC-Kanäle durch die große Anzahl an Mitgliedern der jeweiligen Genfamilien und der Möglichkeit von Heteromerbildung ein großes Potential tragen, für unterschiedliche Calcium-Kanäle zu kodieren, die in verschiedenste pflanzliche Prozesse involviert sind. Jedoch könnte die durch diese Kanäle vermittelte Depolarisation auch dazu führen, dass spannungsabhängige Calcium-Kanäle aktiviert werden, die die Grundlage für den eigentlichen Calcium-Einstrom bilden (Dodd et al., 2010).

Ein weiterer potentieller Kandidat für die Generierung von Calcium-Signalen ist TPC1, der zur Familie der TPCs (Two Pore Channels, engl. für 2-Poren-Kanäle) gehört, im Tonoplast lokalisiert ist und über Calcium selbst, 14-3-3 Proteine und das Membranpotential reguliert wird. *tpc1*-Mutanten fehlt die Stromantwort, die über sogenannte SV (Slow Vacuolar, engl. für langsame vakuoläre)-Kanäle vermittelt wird (Peiter et al., 2005) und bei hohen $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ einen möglichen Calcium-Einstrom in die Vakuole steuern (Hedrich & Kurkdjian, 1988; Pottosin et al., 2009). In elektrophysiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass TPC1 sowohl Calcium-reguliert als auch -permeabel ist, was ihn zu einem Kandidaten für die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung macht (Ward & Schroeder, 1994). Funktionell ist dieser Kanal sowohl an der Keimung als auch an der Stomabewegung beteiligt (Peiter et al., 2005). Jedoch gibt es Zweifel an dessen Rolle in der Calcium-Signaltransduktion, da weder bei Knock-Out noch Überexpression ein Effekt auf verschiedenste Stressantworten beobachtet werden konnte (Ranf et al., 2008). Dennoch wies die TPC1-Mutante *fou2* ein retardiertes Wachstum sowie eine erhöhte JA-Produktion im Vergleich zum Wildtyp auf (Beyhl et al., 2009; Bonaventure et al., 2007).

1.4.2 Dekodierung – Spezifität durch Expression, Affinität und Lokalisation der Calcium-Sensoren

Neben der Spezifität der verschiedenen Calcium-Signale über die Calcium-Signatur selbst erfordert die große Anzahl an Prozessen, in denen Calcium eine zentrale Rolle spielt, ein komplexes Maß an Dekodierung und Übersetzung dieser Signale in definierte molekulare und biochemische Antworten der Zelle. Daher existieren Calcium-Sensoren, die (fast ausschließlich über EF-Hände) verschiedene Calcium-Affinitäten sowie eine gewebe- bzw. zellspezifische Expression aufweisen und in unterschiedlicher Konzentration vorliegen können (Hashimoto & Kudla, 2011). Eine zusätzliche Variante stellt aber auch die über posttranslationale Modifikation veränderbare Lokalisation von Calcium-Sensoren dar. Am Beispiel von CBL2 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein nur im Falle einer S-Acetylierung an der Vakuolenmembran (VM) lokalisiert ist und dort seine Funktion ausübt. CBL2-Mutanten, die diese Modifikation unterbinden, reagieren hypersensitiv auf ABA im Zuge der Keimung (Batistic et al., 2012).

1.4.2.1 Calmoduline

Die universellste Klasse der Calcium-Sensoren stellen die Calmoduline dar, welche keine direkte enzymatische Aktivität besitzen, sondern ihre Funktion über Protein-Protein-Interaktionen und somit Modifikation der Aktivität von Zielproteinen ausüben. Zusätzlich dazu gibt es in Pflanzen jedoch noch die sogenannten CaM-ähnlichen Proteine (CMLs), die im Gegensatz zu CaMs eine variable Anzahl an EF-Händen besitzen können (McCormack et al., 2005). Während die meisten CMLs im Cytosol lokalisiert sind, gibt es dennoch einige, die in anderen Zellkompartimenten wie z. B. der Vakuole vorkommen (Yamaguchi et al., 2005). Sie steuern ein weites Spektrum an Reaktionen der Pflanze, wie die Regeneration der Zellwand (Sun et al., 1995) und das Pollenschlauchwachstum (Shang et al., 2005b). Eine bedeutende Funktion nehmen CaMs/CMLs in der direkten Genregulation über die Modulation von Transkriptionsfaktoren (TFs) ein, die z. B. in der Pathogenabwehr sowie bei abiotischem Stress eine Rolle spielen (Doherty et al., 2009; Du et al., 2009; Galon et al., 2008; Journot-Catalino et al., 2006; Yoo et al., 2005). Kürzlich wurde zudem eine Rolle für CaMs in der Abwehr von Viren entdeckt, indem diese direkt an sogenannte RSS (RNA silencing suppressor)-Proteine des Virus binden und hierdurch der viralen Unterdrückung des pflanzlichen RNA-Silencings entgegenwirken (Nakahara et al., 2012; Tadamura et al., 2012).

In Leguminosen, die Symbiosen mit Rhizobien oder Mykorrhiza eingehen (siehe 1.2.4), wurden zudem Kinasen entdeckt, mit denen CaMs interagieren: Diese sogenannten CCaMKs (Ca²⁺/CaM-abhängige Kinasen) besitzen ein zweifaches Calcium-Sensorsystem, indem sie neben einer Bindestelle für CaMs eine direkte Calcium-Bindedomäne besitzen (Gleason et al., 2006; Patil et al., 1995).

1.4.2.2 Calcium-abhängige Proteinkinasen

CDPKs, in Arabidopsis auch als CPKs bezeichnet, besitzen intramolekular sowohl eine Calcium-Sensordomäne als auch eine Kinasedomäne. Letztere ist im „Ruhezustand“ autoinhibiert, was durch eine nach Ca²⁺-Bindung verursachte Konformationsveränderung aufgehoben wird. Hierdurch wird ein Calcium-Signal direkt in eine Autophosphorylierung als auch Phosphorylierung von Zielmolekülen umgesetzt (Chandran et al., 2006). Bei einem Großteil dieser Kinasen wird eine N-terminale Modifikation durch Myristylierung bzw. S-Acetylierung postuliert (Cheng et al., 2002; Hrabak et al., 2003; Mehlmer et al., 2010), welche nicht nur eine lokalisierende Funktion einnehmen, sondern auch die Kinaseaktivität selbst modulieren können (Farmer & Choi, 1999).

CDPKs spielen ebenso wie CaMs eine Rolle in diversen physiologischen Prozessen wie im Kohlenstoff-Metabolismus (Kulma et al., 2004; McMichael et al., 1995), bei der Pathogenabwehr (Boudsocq et al., 2010; Coca & San Segundo, 2010; Kobayashi et al., 2007), im Pollenschlauch- und Wurzelwachstum (Ivashuta et al., 2005; Myers et al., 2009) sowie bei abiotischen Stressantworten (Ma & Wu, 2007; Saijo et al., 2000). Weiterhin regulieren CDPKs den ABA-induzierten Stomaschluss (siehe 1.2.1) durch Modulation von Anionenkanälen (Geiger et al., 2011; Geiger et al., 2010; Mori et al., 2006) bzw. Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (Choi et al., 2005; Uno et al., 2000; Zhu et al., 2007). Im Gegensatz zum ABA-vermittelten Stomaschluss, an dem CPK3 und CPK6 beteiligt sind, scheint das Schließen auf MeJA, welches ebenfalls Calcium-basiert ist, allein durch CPK6 vermittelt zu werden. Interessanterweise sind *cpk6*-Mutanten zwar nicht zum Stomaschluss fähig, zeigen aber dennoch die typische MeJA induzierte ROS-Produktion (Munemasa et al., 2011). Allein dieses Beispiel zeigt, dass CDPKs einem hohen Grad an Spezifität und Regulation unterliegen müssen, um definierte Signale spezifisch übermitteln zu können.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Beteiligung von CDPKs sowie CaMs an der Ausbildung der Calcium-Signatur selbst. Während z. B. die Aktivierung der Ca²⁺-ATPase

ACA2 durch CaMs vermittelt wird (Harper et al., 1998), bewirkt deren Phosphorylierung durch CPK1 die Inhibierung des Enzyms (Hwang et al., 2000).

1.4.2.3 Calcineurin-B ähnliche Proteine und Ca²⁺-unabhängige Kinasen

CBL-Proteine gehören zur CaM-Superfamilie und besitzen wie CaMs keine direkte enzymatische Aktivität, unterscheiden sich jedoch von diesen durch ihre Eigenschaft, spezifisch mit sogenannten CBL-interagierenden Proteinkinasen, CIPKs, zu interagieren, welche selbst Calcium-unabhängig sind (Shi et al., 1999). Die Kinase-Domäne der CIPKs liegt im N-Terminus, während der C-Terminus die regulatorische Einheit enthält (Shi et al., 1999), die essentiell für die Interaktion mit CBLs ist; vermutet wird jedoch auch eine autoinhibitorische Funktion, die durch das Binden des CBLs aufgehoben wird und somit die Aktivierung der Kinase herbeiführt (Albrecht et al., 2001). Die Lokalisation der CBL-Proteine wird maßgeblich über deren N-terminale Modifikation durch S-Acetylierung und Myristylierung bestimmt und kann die Lokalisation des CBL/Kinase-Komplexes bzw. der Interaktionspartner festlegen (Batistic et al., 2008; Batistic et al., 2010; Cheong et al., 2007; Waadt et al., 2008). Ein Beispiel hierfür ist die Lokalisation des Kalium-Kanals AKT2, der in Verbindung mit CBL4 und CIPK6 an die Plasmamembran gelangt, was wiederum von S-Acetylierung und Myristylierung des CBLs abhängig ist. Bemerkenswert hierbei ist die Tatsache, dass die Modulation der Kanalaktivität nur über die Lokalisation, jedoch nicht über Phosphorylierung erfolgt (Held et al., 2011). Daher könnte diese Eigenschaft der CBLs bzw. deren Präferenzen für bestimmte CIPKs die Basis für eine sowohl zeitliche als auch örtliche Spezifität der Calcium-Antwort bilden, um lokale Calcium-Signale dekodieren zu können.

CBL/CIPK-Komplexe spielen eine Rolle in abiotischen Stressantworten wie Kälte-, Salz- und Trockenstress (Albrecht et al., 2003; Cuéllar et al., 2010; Huang et al., 2011; Kim et al., 2007; Liu & Altman, 1998; Tripathi et al., 2009) und in Verbindung damit auch in ABA-vermittelten Prozessen (Pandey et al., 2004; Pandey et al., 2008). Zudem sind sie involviert in die Nährstoff-Regulation von Kalium und Nitrat (Ho et al., 2009; Li et al., 2006; Xu et al., 2006) sowie der Pathogenabwehr (Kurusu et al., 2010).

1.4.3 Beispiele der Calcium-Signalspezifität

Die schon in Abschnitt 1.2.1 beschriebene Arbeit von Allen et al. (2001) zur Rolle von Calcium-Oszillation in Schließzellen lieferte den ersten Beweis für eine physiologische Auswirkung von definierten Calcium-Signaturen in Pflanzen. Während für die kurzfris-

tige Schließung der Stomata eine initiale Calciumerhöhung ausreichte, wurden Calcium-Oszillationen einer definierten Frequenz, Anzahl, Dauer und Amplitude benötigt, um ein langanhaltendes Schließen der Stomata herbeizuführen.

Untersuchungen zum Thema Calcium-Signal-Muster und deren Einfluss auf die Genregulation wurden 2006 und 2011 veröffentlicht. Kaplan et al. konnten zeigen, dass artifiziell erzeugte, transiente Calcium-Signale transkriptionelle Veränderungen in Genen mit ABRE-Elementen (ABA responsive element, engl. für ABA-responsives Element) in der Promotorregion induzieren (Kaplan et al., 2006; Whalley et al., 2011). Hierbei wurden die zugrunde liegenden Calcium-Signale durch CaM-Antagonisten erzeugt. Die meisten dieser Gene wurden interessanterweise in vorherigen Arbeiten als frühe, durch Stress induzierte Gene charakterisiert (Kudla et al., 2010) und scheinen allein durch die Generierung der Calcium-Signatur induziert werden zu können.

In der gleichen Arbeitsgruppe nutzten Walley et al. (2011) fünf Jahre später elektrische Impulse, um Calcium-Muster artifiziell zu erzeugen und deren Auswirkung auf die Genregulation in Arabidopsis-Keimlingen zu beobachten. Hierbei wurden drei unterschiedliche Calcium-Muster erzeugt: ein transienter Puls, mehrere oszillierende Calcium-Pulse und ein langer Puls. Es konnten für jede Behandlung spezifisch regulierte Gene identifiziert werden, was die Hypothese der Spezifität des Calcium-Signals durch die Signatur selbst untermauert. Interessanterweise zeigte das oszillierende Signal die größte Anzahl an differenziell regulierten Genen, wobei sich etwa die Hälfte dieser Gene mit denen des Einzelpulses überschneiden. Der lange Puls zeigte den geringsten Effekt. Zudem konnten vier Promotorregionen (CRT/DRE, ABRE, CAM Box und Site II) identifiziert werden, die durch die künstlich generierten Calcium-Pulse reguliert wurden. Bis auf das „Site II“-Element wurden diese Promotorelemente zuvor bereits als durch abiotischen (Kälte-/Trockenstress, ABA) und biotischen Stress (Pathogenabwehr) reguliert charakterisiert (Du et al., 2009; Galon et al., 2010; Galon et al., 2008; Hobo et al., 1999). Somit scheint es tatsächlich möglich zu sein, Genregulation über die Form der Calcium-Signatur zu steuern.

Jedoch bleibt bei den bisher genannten Arbeiten zu bedenken, dass die artifiziell erzeugten Calcium-Signale auf chemischen bzw. elektrischen Signalen basierten und somit eine direkte Beteiligung dieser an der Genregulation nicht ausgeschlossen werden kann.

Auch im tierischen System gibt es Beispiele für Genregulation aufgrund spezifischer Calcium-Signaturen: In Rattenleukämiezellen konnte gezeigt werden, dass die Genex-

pression eines TFs durch repetitive Calcium-Muster optimierbar war (Li et al., 1998). In einer anderen Arbeit wurde eine erhöhte Effizienz sowie Spezifität der Genexpression durch Calcium-Oszillationen festgestellt (Dolmetsch et al., 1998). Einerseits konnte beobachtet werden, dass ein oszillierendes Calcium-Signal den benötigten $[Ca^{2+}]$ -Schwellenwert zur Aktivierung der TFs herabsetzt. Andererseits wurde auch eine Korrelation zwischen der Frequenz des Calcium-Signals und deren spezifischer Aktivierung festgestellt: Während eine schnelle Frequenz zur Aktivierung von drei untersuchten TFs führte, konnten langsame Oszillationen lediglich einen der TFs stimulieren.

1.5 Channelrhodopsin-2 als molekulares Werkzeug zur Generierung von ΔV_m und $\Delta[Ca^{2+}]_{cyt}$

1.5.1 Struktur und Funktion von ChRs

Rhodopsine sind Proteine mit sieben transmembranen Domänen (TMs), welche lichtgesteuert eine Signalkaskade initiieren (Nagel et al., 2005b). Sie bestehen aus einer Proteineinheit, dem sogenannten Opsin und dem kovalent gebundenen Chromophor Retinal. Hierbei wird eine kovalente Bindung durch eine Schiffsbasis zwischen dem Protein und dem Photoisomer in der 7. TM geformt. Es wird postuliert, dass eine lichtgesteuerte Isomerisierung von Retinal durch Konformationsänderung zu einer Aktivierung des Proteins führt (Nagel et al., 2005b). Opsine werden in zwei Klassen eingeteilt: Typ-I Opsine findet man in Archaeobakterien, Eubakterien, Pilzen und Algen, während Opsine vom Typ-II in Tieren exprimiert werden (Kato et al., 2012). Die Signaltransduktion bei Typ-II-ChRs wird durch G-Proteine vermittelt, wohingegen Proteine vom Typ-I entweder als Pumpen (Halo-/Bakteriorhodopsin) oder Ionenkanäle, sogenannte Channelrhodopsine (ChRs) direkt lichtgesteuert Einfluss auf das Membranpotential der Zellen nehmen. Sie bestehen aus dem Apoprotein Chop (Channelopsin), welches durch die kovalente Bindung von Retinal den funktionellen Ionenkanal ChR bildet. Channelrhodopsine bilden die einzigen bisher bekannten Ionenkanäle, die direkt durch Licht aktiviert werden (Lin, 2011).

In der Grünalge *Chlamydomonas* wurde die Aktivität von Rhodopsinen als Ursprung der Phototaxis bereits 1984 bestätigt (Foster et al., 1984). Da die lichtvermittelte Stromantwort unmittelbar ($<30\mu s$) auf die Photostimulation erfolgte, wurde bei diesen Rhodopsinen eine direkte Kopplung des Photorezeptors mit einem Ionenkanal postuliert

(Holland et al., 1996). Dies wurde 2002/2003 durch die erste erfolgreiche heterologe Expression der Apoproteine Channelopsin1 (Chop1) und Channelopsin2 (Chop2), die Sequenzhomologien zu mikrobiellen Rhodopsinen aufwiesen, bestätigt (Nagel et al., 2002; Nagel et al., 2003). Zudem wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Phototaxis in *Chlamydomonas* durch zwei unterschiedliche Rhodopsine gesteuert wird. Während ChR1-defiziente Mutanten keine Photoströme bei hohen Lichtintensitäten aufwiesen, konnte bei Mutanten, die keine ChR2-Expression mehr zeigten, ein Fehlen der Stromantwort unter Schwachlichtbedingungen festgestellt werden (Sineshchekov et al., 2002). Nagel et al. (2003) beobachteten, dass beide Proteine unter Starklichtbedingungen degradiert wurden, was besonders in Bezug auf die hohen Photoströme, welche durch ChR2 induziert werden, einen natürlichen Schutzmechanismus in der Alge darstellen könnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass ChR1 einen Blaulicht-gesteuerten Protonenkanal bildet, während ChR2 einen nicht-selektiven Kationenkanal darstellt (Nagel et al., 2002; Nagel et al., 2003). Bereits in diesen ersten Arbeiten unter heterologer Expression der ChRs in tierischen Expressionssystemen entstand die Idee, diese Proteine als molekulare Werkzeuge zu nutzen, um optogenetisch, d.h. durch die heterologe Expression dieser lichtaktivierten Proteine, ΔV_m bzw. $\Delta[Ca^{2+}]$ nicht invasiv manipulieren zu können.

1.5.2 Channelrhodopsin-2 – Charakterisierung

Das ChR2-Protein aus *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt eine Länge von 737 AS. Für viele heterologe Anwendungen wird jedoch eine verkürzte Version aus 315 AS verwendet, da diese bereits alle 7 TMs enthalten und ein funktionelles Protein bilden. 2003 konnte ChR2 erstmals heterolog in *Xenopus*-Oozyten sowie HEK-Zellen exprimiert werden (Nagel et al., 2003). Hierbei konnten nach Inkubation der Zellen mit Retinal Ströme durch Blaulichtstimulation (Optimum bei 460nm) aufgezeichnet werden, welche unter kontinuierlichem Licht desensitivierten und das Protein durch seine passive Leitfähigkeit als Kanal auswies. Patch-Clamp-Experimente an HEK-Zellen bewiesen, dass ChR2 selbst als lichtgesteuerter Ionenkanal fungiert und nicht wie Rhodopsine im tierischen System die Aktivierung von Kanälen durch Botenstoffe steuert. ChR2 zeigt neben einer schnellen Öffnungskinetik eine hohe Permeabilität für monovalente Kationen. Die Desensitivierungsphase kann durch einen erhöhten pH_{ext} sowie ein hyperpolarisiertes Membranpotential verkürzt werden (Nagel et al., 2003).

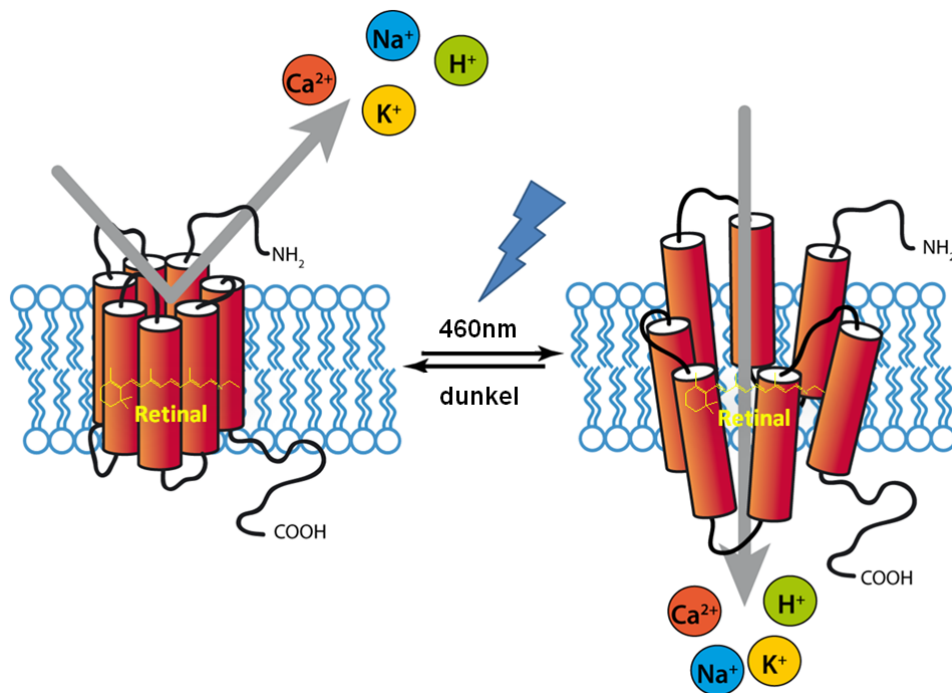


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Struktur von ChR2 (Retinal-gebundenes Chloperid) – Öffnung des Kanals durch Blaulicht-aktivierte Isomerisierung des Chromophors Retinal

ChR2 ist nicht nur für monovalente Kationen permeabel, sondern auch für divalente wie Calcium, was in Messungen an Oozyten unter hoher $[Ca^{2+}]_{ext}$ getestet wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Blaulicht unter diesen Bedingungen eine hohe Stromantwort mit biphasischem Charakter stimuliert. Dies erklärt sich durch einen ChR2-gesteuerten Ca^{2+} -Einstrom, der daraufhin intrinsische Ca^{2+} -abhängige Chlorid-Kanäle in Oozyten aktivierte (Nagel et al., 2003). Jedoch bleibt zu beachten, dass dieses Experiment unter unphysiologischen Calcium-Bedingungen sowie alkalischem pH durchgeführt wurde und somit keine „driving force“ für Protonen existierte. Dies bedeutet, dass ChR2 unter physiologischen Bedingungen eine eher geringe Calcium-Leitfähigkeit besitzt und eine starke Erhöhung der Calcium-Konzentration daher hauptsächlich auf der Stimulation endogener spannungsabhängiger Calcium-Kanäle basierte (Yizhar et al., 2011). Später durchgeführte Experimente an HEK-Zellen, in denen die $[Ca^{2+}]_{ext}$ herabgesetzt wurde, zeigten folglich nur einen geringen Calcium-Strom (Lin et al., 2009).

1.5.3 ChR2 als optogenetisches Werkzeug im tierischen System

Zwei Jahre nach dessen Identifizierung und Charakterisierung wurde Channelrhodopsin-2 erstmals als genetisches Werkzeug zur Erzeugung von Depolarisationen in Neuronen eingesetzt, um lichtinduzierte, definierte Aktionspotentiale zu generieren (Bi et al., 2006; Boyden et al., 2005; Ishizuka et al., 2006; Li et al., 2005; Nagel et al., 2005a;

Zhang et al., 2006). Seit den ersten Erfolgen auf diesem Gebiet wurden eine Vielzahl an ChR2-Mutanten generiert, die sich hinsichtlich ihrer Selektivität, Kinetik oder ihres lichtabhängigen Aktivierungsspektrums unterscheiden (Lin, 2011) und so den verschiedenen Anforderungen auf unterschiedlichen Forschungsgebieten Folge leisten. Obwohl der wissenschaftliche Fokus auf der Neurobiologie liegt, wurde ChR2 auch bereits zur Stimulation kardialer Muskelzellen eingesetzt (Bruegmann et al., 2010). Zudem wurden artifiziell erzeugte cytosolische Calcium-Änderungen genutzt, um physiologische Prozesse zu beeinflussen. Caldwell et al. setzten ChR2 ein, um über eine lichtinduzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ die Calcium-abhängige Aktivität eines metabotropen Glutamat-rezeptors nachzuweisen, der über eine CaM-Bindestelle an der präsynaptischen Membran als eine Art Detektor für Calcium-Influx und Glutamatfreisetzung wirkt (Caldwell et al., 2008). Zudem wurde die Leitfähigkeit des Kanals auch zur Generierung von pH-Änderungen benutzt, die in Astrozyten eine Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration induzieren (Gourine et al., 2010).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Pflanzenforschung konnte innerhalb der letzten Jahrzehnte einen immensen Fortschritt in der Aufschlüsselung und Dekodierung von Calcium-Signalen verzeichnen. Jedoch fehlt bisher fast gänzlich das Wissen über die Bedeutung definierter Calcium-Signaturen für die mögliche Spezifität eines Calcium-Signals. Bis dato wurde vor allem in der Arbeitsgruppe von Marc Knight an der Spezifität von Calcium-Signalen durch die Calcium-Signatur selbst und deren Auswirkung auf transkriptioneller Ebene erforscht. Hierbei konnten bestimmte Promotorelemente für spezifische Calcium-Signaturen ermittelt werden (Kaplan et al., 2006; Whalley et al., 2011) (siehe 1.4.3). Dieser Ansatz birgt jedoch den entscheidenden Nachteil, dass stets die gesamte Pflanze dem elektrischen bzw. chemischen Signal ausgesetzt wurde und daher keine Möglichkeit bestand, die Signalspezifität in unterschiedlichen Organen, Geweben, Zelltypen oder Organellen zu berücksichtigen. Weiterhin ergibt sich im chemischen Ansatz das Problem der Zugänglichkeit der Zellen. Neben möglicherweise unbeabsichtigten Nebenwirkungen kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass den erzielten Ergebnissen von Walley et al. (2011) auch eine Signaltransduktion über elektrische Signale zugrunde lag. Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, spielen eben auch elektrische Signale eine wesentliche Rolle in Pflanzen. Dessen ungeachtet wurde bisher kaum untersucht, wel-

che Rolle diese Signalform als Komponente innerhalb von Signalkaskaden abseits der Funktion von Ionenkanälen (z. B. in der Osmose oder der Nährstoffversorgung) spielt.

Für ein umfassendes Wissen pflanzlicher Signaltransduktionsprozesse ist es daher wichtig, die Rolle elektrischer Signale in diesen Netzwerken unabhängig von Calcium entschlüsseln zu können. Zur Lösung dieser Fragestellung entstand die Idee, ChR2 als optogenetische Werkzeug für eine sowohl lokal als auch temporal definierte Generierung bzw. Modulation von elektrisch- bzw. Calcium-basierten Signalen in Pflanzen einzusetzen.

Ziel dieser Arbeit war daher die funktionelle Expression und Charakterisierung des lichtgesteuerten Kationenkanals ChR2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* in Pflanzen. Dadurch sollten in transgenen Pflanzen, wie in Abb. 1-3 schematisch dargestellt, spezifische Muster in ΔV_m und $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ (getrennt und in Kombination) erzeugt werden. Schließlich sollte der Frage nachgegangen werden, ob definierte Signaturen in ΔV_m und $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ zu spezifischen zellulären Antworten auf der Ebene transkriptioneller Veränderungen führen.

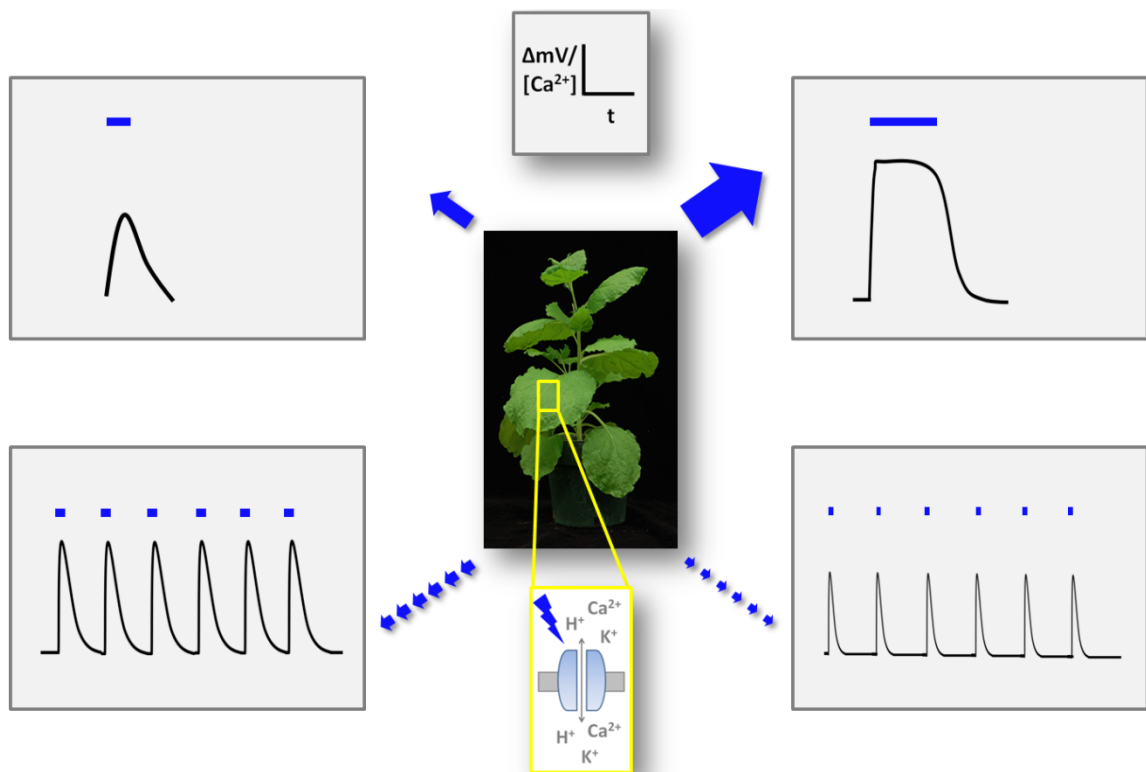


Abb. 1-3: ChR2 als molekulares Werkzeug – Schematische Darstellung Blaulicht-vermittelter Calcium/Membranpotentialänderungen in transgenen Channelrhodopsin2-Pflanzen

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden I - Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.1.1 Extraktion von Nukleinsäuren

2.1.1.1 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen

Die Isolation genomischer DNA wurde durch Mörsern von ca. 50mg Pflanzengewebe (FW) unter flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen in 400µl Lysis-Puffer gestartet.

Tab. 2-1: Zusammensetzung Lysis-Puffer

Lysis-Puffer
200mM Tris-HCl, pH 7.5
250mM NaCl
25mM EDTA, pH 8.0
0.5 % SDS

Die Abtrennung von Zellwandbestandteilen, Lipiden und Proteinen erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt für 5min. Der Überstand wurde anschließend in 300µl Isopropanol aufgenommen und die DNA 5min bei Raumtemperatur gefällt. Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt wurde die gefällte DNA pelletiert. Die Resuspension der DNA erfolgte in 50µl *ddH*₂O. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.1.1.2 RNA-Extraktion

Für die RNA-Isolation wurde das „RNeasy Plant Mini Kit“ von Qiagen verwendet, welches auf der reversiblen Bindung von RNA an eine Silicamatrix basiert, deren Bindungskapazität 100µg beträgt.

Eingesetzt wurden 100mg Blattmaterial, das in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer Kugelmühle (Retsch) zerkleinert wurde.

Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die erhaltene RNA wurde in 40µl DEPC-H₂O gelöst und bei -80°C gelagert.

Um Verunreinigungen durch genomische DNA zu entfernen, wurden die Proben einem DNase-Verdau unterzogen. Hierbei wurden ca. 2.5µg RNA mit 1µl DNaseI (Fermentas) versetzt. Zusätzlich diente die Zugabe von 1µl RNase-Inhibitor dem Schutz der RNA vor Degradation. Die Reaktion wurde bei 37°C für 30min durchgeführt.

Anschließend musste die RNA durch eine Fällung für die cDNA-Synthese aufgereinigt werden. Dazu wurde der Reaktionsansatz des DNase-Verdaus mit DEPC-H₂O auf 100µl aufgefüllt, 75µl Isopropanol, 10µl Ammoniumacetatlösung (5M in 100mM EDTA) sowie 1µl Glycogen hinzugefügt und 20min bei 4°C und 10000xg zentrifugiert. Ein Auswaschen von Salzen erfolgte mit 500µl 70%-igem Ethanol. Nachdem die RNA bei 37°C getrocknet worden war, wurde sie in 7µl DEPC-H₂O gelöst und konnte so für die cDNA-Synthese eingesetzt werden.

2.1.2 Reverse Transkription (RT)

Zum Nachweis von mRNA (messenger DNA, engl. für Boten-RNA) musste diese in komplementäre DNA (cDNA, „copy DNA“) umgeschrieben werden, um eine Amplifikation zu ermöglichen. Dazu wurde die virale Reverse Transkriptase M-MLV (Promega) verwendet, die, ausgehend von einem Oligo-dT-Primer, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet, mRNA-Moleküle in cDNA umschreibt. Eingesetzt wurden ca. 2.5µg aufgereinigte und DNase-verdaute Gesamt-RNA (siehe 2.1.1).

Tab. 2-2: Reaktionsansatz für RT

RNA (~2.5µg)	6.7 µl
Oligo-dT-Primer (100µM)	0.4 µl
dNTPs 10mM	0.5 µl
5X RT-Puffer	2.0 µl
MMLV RT	0.4 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Vor Zugabe der Reversen Transkriptase erfolgte ein zweiminütiger Denaturierungsschritt bei 70°C, um Sekundärstrukturen in der mRNA zu lösen, mit anschließender zweiminütiger Inkubation des Reaktionsansatzes auf Eis, um eine Renaturierung zu verhindern. Die cDNA-Synthese erfolgte für 1h bei 42°C.

2.1.3 Gelelektrophorese

Eine Möglichkeit, DNA- bzw. RNA-Fragmente in einem elektrischen Feld der Größe nach aufzutrennen, stellt die Gelelektrophorese dar. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Wird ein elektrisches Feld angelegt, wandern sie zum Pluspol (Anode). Durch die porenartige Struktur des Agarose-Gels permeieren kleinere Fragmente schneller als größere. Über die Agarosekonzentration kann der Vernetzungsgrad des Agarosepolymers beeinflusst werden: Mit einem 3%-igen Gel werden kleine Fragmente (< 500bp) sehr gut aufgetrennt, während größere Fragmente (>500bp) in niedriger konzentrierten Gelen besser vereinzelt werden können. Nach der Gelelektrophorese wurden die Banden zur Dokumentation fotografiert („Intas UV Imager“, Intas UV-Systeme). Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte über die Fluoreszenzfarbstoffe GelGreen bzw. bei 3%-igen Gelen über GelRed (Biotium, Inc.), die mit den Nukleinsäuren interkalieren. Diese wurden über UV-Licht angeregt und waren bei DNA-Gelen im Gel selbst enthalten, während sie bei RNA-Gelen dem Probenpuffer zugefügt wurde.

2.1.3.1 DNA-Gel

Um ein DNA-Gel herzustellen, wurden 1% bis 3% Agarose mit 1x TBE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle so lange aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurden GelGreen/GelRed im Verhältnis 1:20000/1:10000 hinzugefügt.

Tab. 2-3: Zusammensetzung DNA-Probenpuffer und TBE-Puffer

DNA-Probenpuffer 5X	TBE-Puffer 10X
0.25% Bromphenolblau	0.9M Tris
0.25% Xylen Cyanol FF	0.9M Borsäure
100mM EDTA	20mM EDTA
50% Glycerin	

Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und sanken durch das darin enthaltene Glycerin beim Beladen des Gels in die Geltaschen. Anhand des im Probenpuffer enthaltenen Farbstoffs konnte der Fortgang der Gelelektrophorese bestimmt werden. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine Spannung von 100mV angelegt.

2.1.3.2 RNA-Gel

Ribonukleinsäuren wurden in einem 1%-igen Agarosegel in 1X MEN-Puffer aufgetrennt.

Tab. 2-4: Zusammensetzung RNA-Probenpuffer und MEN-Puffer

RNA-Probenpuffer	MEN-Puffer 10X
10µl Bromphenolblau	200mM MOPS
160µl MEN-Puffer	10mM Na ₂ EDTA
260µl Formaldehyd	50mM NaAc
100µl 80% Glycerin	
720µl Formamid	
250µl ddH ₂ O	
1µl GelRed	

Zu jeweils 2µl RNA und 2µl DEPC-H₂O wurde RNA-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 zugegeben, so dass sich ein Endvolumen von 8µl ergab. Sekundärstrukturen wurden durch zehnmütiges Erhitzen der Proben auf 70°C gelöst. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 2h bei 70mV in 1X MEN-Puffer.

2.1.3.3 Größenmarker

Um die Größe von DNA-Fragmenten im Gel abschätzen zu können, wurde ein Marker mit aufgetragen, der ein Bandenmuster an Fragmenten mit bekannter Größe aufweist (siehe Abb. 2-1, http://www.taq-dna.com/phage-lambda-dna-psti-digest-ready-to-use-_144.html). Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür die mit PstI verdaute DNA des Phagen λ (Fermentas) verwendet.

Zur Herstellung des Markers wurden 100µg λ-DNA mit 10U PstI über Nacht verdaut und anschließend mit DNA-Probenpuffer versetzt. Im Gel wurden 5µl des Marker aufgetragen. Dies entspricht einer Menge von 1µg DNA.

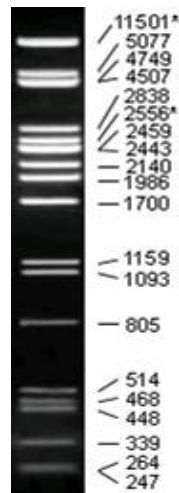


Abb. 2-1: λ -PstI Marker

2.1.3.4 Gelextraktion von DNA

Um ein bestimmtes DNA-Fragment aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurde dieses auf einem UV-Tisch mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Quiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Eluation der DNA erfolgte in 30 μ l *ddH*₂O.

2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mittels UV-Photospektrometrie ermittelt. Das hierbei verwendete Gerät (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific) misst die Absorption von Licht der Wellenlängen 260nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren), 280nm (Absorptionsmaximum für Proteine) und 230nm (Absorptionsmaximum für Kohlehydrate) der jeweiligen Probe. Über den Quotienten der Extinktion von 260nm/280nm bzw. von 260nm/230nm kann der Grad der Verunreinigung einer DNA-/RNA-Probe ermittelt werden.

2.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion, kurz PCR (engl.: Polymerase Chain Reaction), ist eine Methode zur Selektion und Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz aus einer Vielzahl an Sequenzen. Für die Selektivität sorgt ein sequenzspezifisches Primerpaar. Die PCR ist eine Reaktion, in der die Menge an Produkt in jedem Zyklus idealerweise exponentiell ansteigt. Ein solcher Zyklus bestand aus drei Schritten: Zuerst erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 98°C, um die DNA-Doppelstränge voneinander zu trennen. Darauf folgte die Hybridisierungstemperatur der Primer, die idealerweise nur

knapp unter deren Schmelztemperatur lag, was die Spezifität der Bindung erhöht. Der Primer-Bindung folgte ein Elongationsschritt, in dem die DNA-Polymerase von den Primern ausgehend die DNA-Stränge aus dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) synthetisiert. DNA-Polymerasen sind hitzestabile Enzyme aus Archaeobakterien (z. B. *Thermus aquaticus*), deren Temperaturoptimum je nach Art ungefähr bei 72°C liegt. Über die Anzahl an Zyklen kann die Menge an PCR-Produkt bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde die Phusion Polymerase mit Proofreading-Funktion von Finnzymes eingesetzt. Mit dieser Polymerase ist eine Denaturierung bei 98°C möglich. Sie besitzt ein Temperaturoptimum von 72°C und eine Elongationsgeschwindigkeit von 15s/kb.

Die folgende Tabelle stellt das Standardprotokoll einer PCR-Reaktion dar:

Tab. 2-5: Standard-Reaktionsansatz einer PCR

5X HF-Puffer	10µl
dNTPs (10mM)	1µl
Primer fwd (10µM)	1µl
Primer rev (10µM)	1µl
DMSO	1.5µl
DNA-Polymerase	1µl
Template-DNA	ca. 100ng
	add ddH ₂ O
Gesamtvolumen	50µl

Alle PCRs wurden im „Mastercycler“ von Eppendorf durchgeführt. Hierbei wurde das in Tab. 2-6 aufgelistete Standardprogramm verwendet. Je nach Anforderung der einzelnen Reaktionen wurde dieses entsprechend modifiziert. Die verwendeten Primer sowie deren Schmelztemperaturen sind in 7.3 aufgeführt.

Tab. 2-6: Standard-Temperaturprogramm einer PCR

Initiale Denaturierung	2min	98°C	} 30x
Denaturierung	30s	98°C	
Primer-Hybridisierung	30s	spezifisch für Primerpaar	
Elongation	15-30s/kb	72°C	
Finale Elongation	5min	72°C	

Vom PCR-Ansatz wurden anschließend entweder 5µl zur Kontrolle oder der gesamte

Ansatz zur Eluation einzelner Banden (bei unspezifischer Primerbindung) auf ein Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese mit Hilfe des „Intas UV Imager“ (Intas UV-Systeme) dokumentiert.

2.1.6 Gerichtete *In-vitro* Mutagenese

Innerhalb dieser Arbeit wurden verschiedene ChR2-Mutanten hergestellt, die zu einer Substitution wildtypischer Aminosäuren führten. Hierfür wurden Primer designt, die die Nukleotidsequenz der zu mutierenden Aminosäure möglichst in der Mitte trugen. Die *In-vitro* Mutagenese-Reaktion fand dann ähnlich zu einer PCR statt, wobei ca. 500ng Template-DNA eingesetzt wurden. Nach Kontrolle der Reaktion mittels Gelelektrophorese wurden 10µl des Ansatzes für 1.5h bei 37°C mit 1µl DpnI-Enzym versetzt. Dieses Restriktionsenzym schneidet nur methylierte DNA und verdaut so lediglich Template-DNA, wodurch gewährleistet wird, dass anschließend nur mutierte DNA in Bakterien transformiert und amplifiziert wird. Die Überprüfung der Mutation erfolgte mittels Sequenzierung.

2.2 Molekularbiologische Arbeiten II - Klonierungen

2.2.1 Vektoren

Innerhalb dieser Arbeit wurden verschiedene Vektorsysteme je nach Art der Anwendung eingesetzt. Diese besaßen neben einem Replikationsursprung aus *Escherichia coli* (*E.coli*) ein Resistenzgen zur Selektion in Bakterien (R_{Bak}) sowie eine sogenannte „Multiple Cloning Site“, die durch die hohe Dichte an Restriktionsschnittstellen die Insertion einer gewünschten Sequenz erleichtert. Zudem wurden USER- (siehe 2.2.3) bzw. Gateway[®]-Vektoren (siehe 2.2.4) benutzt, deren Klonierungsmethode in den folgenden Abschnitten näher beschrieben wird. Binäre Vektoren wurden für Agrobakterienvermittelte Transformationen in Pflanzen genutzt und enthielten neben T-DNA-Bordersequenzen ein Resistenzgen für die Selektion in Pflanzen (R_{Pfl}) sowie einen Replikationsursprung aus Agrobakterien (siehe 2.7).

Tab. 2-7: Verwendete Vektorsysteme

Vektor	Quelle	R _{Bak}	R _{Pfl}	Prom	Term
pENTR™	life technologies™	Amp	-	-	-
pGEMHE	pGEM3Z, Promega modifiziert in AG Hedrich	Amp	-	-	-
pSAT	T. Tzfira	Amp	-	2xCaMV35S	2xCaMV35S
pUBQ10	pSAT modifiziert in AG Hedrich	Amp	-	UBQ10	RBC
pCAMBIA-35S	H.H. Nour-Eldin	Kan	Kan	2xCaMV35S	CaMV35S
pCAMBIA leer	pCAMBIA-35S H.H. Nour-Eldin	Kan	Kan	-	-
pCAMBIA-UBQ	pCAMBIA-35S modifiziert in AG Hedrich	Kan	Kan	UBQ10	RBC
pMDC32	M. D. Curtis	Kan	Hyg	2xCaMV35S	nos
pER8	N. H. Chua	Spec	Hyg	ER	nos

(Amp: Ampicillin, Kan: Kanamycin, Spec: Spectinomycin, Hyg: Hygromycin; Prom: Promotor, Term: Terminator)

Die Expression der Transgene erfolgte über Vektoren, die sich vor allem im jeweiligen Promotor unterschieden. Einerseits wurde die Expression von einem doppelten 35S-Promotor gesteuert, welcher aus dem Blumenkohlmosaikvirus stammt, grundsätzlich nicht durch die Pflanze reguliert werden kann und für eine konstitutive Expression des Transgens in der Pflanze sorgt (Benfey & Chua, 1990). Da jedoch bei stabilen Transformanten insbesondere auch im transienten Ansatz Silencing-Effekte durch Methylierung der Promotorsequenz bzw. Abbau der mRNA des Transgens beobachtet werden konnten (Campanoni et al., 2007; Elmayan & Vaucheret, 1996; Mishiba et al., 2005), wurden im Rahmen dieser Arbeit zudem Vektoren generiert, die die Promotorsequenz des Ubiquitin-10-Gens und die Terminatorsequenz des RuBisCo-Gens aus *Arabidopsis thaliana* enthielten. Da es sich hier um intrinsische pflanzliche Sequenzen handelt, sollte ein Promotor-Silencing stark minimiert werden (Grefen et al., 2010).

In einer weiteren Variante wurde das Östrogen-induzierbare System des pER8-Vektors genutzt (Zuo et al., 2000). Hierbei wird die Expression des Transgens bei externer Zugabe von Östrogen (Sigma-Aldrich) induziert, welches innerhalb dieser Arbeit in einer Konzentration von 1 µM verwendet wurde.

2.2.2 Klonierung über Restriktionsschnittstellen

DNA kann an definierten, meist palindromischen Stellen durch Endonukleasen geschnitten werden. Durch diese Enzyme werden die Phosphodiesterbindungen im DNA-Strang gespalten. Hierbei entstehen je nach Restriktionsenzym glatte Enden ohne Überhang („blunt ends“) oder mit Überhangsequenzen („sticky ends“). Tab. 2-8 zeigt den verwendeten Reaktionsansatz.

Tab. 2-8: Reaktionsansatz eines Restriktionsverdau

	Kontrollverdau	Klonierungsansatz
DNA	ca. 0.5µg	ca. 5µg
Enzym	5 U	20 U
Puffer 10X	1µl	2µl
	add ddH ₂ O	add ddH ₂ O
Gesamtvolumen	10µl	25µl

Ein Kontrollverdau erfolgte für 1-2h bei 37°C, während ein Klonierungsansatz über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Die Restriktion wurde anschließend im Agarosegel überprüft, und das entsprechende Fragment ausgeschnitten und eluiert. Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von Fermentas.

Zur Ligation der durch Restriktion vorbereiteten Insert-Sequenzen sowie Vektoren wurde eine Ligase aus dem Phagen T4 (Fermentas) verwendet. Diese katalysiert die ATP- und Mg²⁺-abhängige Verknüpfung der 3'-OH-Gruppen mit dem 5'-Phosphat-Ende der Basen. In Tab. 2-9 ist der Reaktionsansatz hierfür dargestellt.

Tab. 2-9: Reaktionsansatz für eine Ligation

Vektor-DNA	ca. 1.5µg
Insert-DNA	>3x m (Vektor)
T4-Ligase	1µl
10X Ligase-Puffer	1µl
	add ddH ₂ O
Gesamtvolumen	10µl

2.2.3 USER™-Klonierung

Die von Nour-Eldin et al. etablierte Methode der USER™-Klonierung (engl. uracil-specific excision reagent) basiert auf kompatiblen Überhang-Sequenzen, die im USER-Vektor durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym PacI (NEB) bzw. durch das „Nicking“-Enzym Nt.BbvCI generiert werden und zu einem Überhang von 8bp an beiden Enden des linearisierten Vektors führen (Nour-Eldin et al., 2006). Diese Klonierungsmethode hat gegenüber der Klonierung über Restriktion/Ligation den Vorteil, dass über die Verwendung der komplementären Sequenzen keine geeigneten Schnittstellen existieren müssen. Stattdessen kann ein PCR-Ansatz durch geeignetes Primer-Design in verschiedene vorbereitete Vektoren kloniert werden.

Tab. 2-10: Vorbereitung USER-Vektoren

	Tag 1	Tag 2
Vektor-DNA	10µg	
PacI	70 U	20 U
Nt.BbvCI	-	40 U
PacI-Puffer 10X	20µl	
	add ddH ₂ O	
Gesamt-Volumen	200µl	

Der Reaktionsansatz aus Tag 1 wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach erneuter Zugabe von PacI sowie Nt.BbvCI erfolgte die Reaktion für weitere 2h. Zur Überprüfung des Verdau wurden ca. 5µl des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel (siehe 2.1.3.1) aufgetragen und der restliche Reaktionsansatz mit Hilfe des „Qiagen PCR Purification Kits“ aufgereinigt.

Durch eine PCR mit Primern (Bedingungen analog zu 2.1.5), die komplementär zu den durch PacI/Nt.BbvCI generierten Überhang-Sequenzen sind, wird das PCR-Produkt für die USER-Reaktion vorbereitet. Die hierfür verwendete Polymerase Pfu C_x (*Pyrococcus furiosus*, Pfu) wurde eigens im Institut hergestellt und besaß zusätzlich zur Proofreading-Funktion der kommerziell erhältlichen Pfu-Polymerase eine Mutation, die den Kettenabbruch bei Uracilerkennung verhinderte (Norholm, 2010). Hierbei befindet sich ein Uracil am 3'-Ende der komplementären Sequenz. Dieses wird in der USER™-Reaktion durch das USER™-Enzym (Mix aus Uracil-DNA-Glykosylase und DNA-Glykosylase-Lyase Endo VIII) erkannt und entfernt, was im PCR-Produkt zu einer komplementären 7bp-Überhang-Sequenz führt. Anschließend können Vektor- und

PCR-Überhangsequenzen hybridisieren. Die Transformation in MRF⁻-Bakterien erfolgte mit 5 µl des USERTM-Ansatzes (siehe 2.3.1.1).

Tab. 2-11: Reaktionsansatz einer USER-PCR bzw. USER-Reaktion

USER-PCR		USER-Reaktion	
Pfu C _x	1 µl	PCR-Produkt	4 µl
dNTPs (10mM)	1 µl	Vektor (PacI/ Nt.BbvCI)	2 µl
Puffer 5X HF	10 µl	USER TM -Enzym	1 µl
DMSO	1.5 µl	EB-Puffer	8 µl
Primer fwd	1 µl	Gesamt-Volumen	15 µl
Primer rev	1 µl		
DNA	ca. 100ng	Reaktionsbedingungen:	
	add ddH ₂ O	37°C	30min
Gesamt-Volumen	50 µl	25°C	30min

Für den Fall, dass die Template-DNA der USERTM-PCR die gleiche Antibiotika-Resistenz wie der USER-Vektor besaß, wurde diese durch die Zugabe von 1 µl DpnI für 1h bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Restriktionsenzym für 20min bei 80°C, wodurch der Reaktionsansatz direkt in die USERTM-Reaktion eingesetzt werden konnte.

2.2.4 Gateway[®]-Klonierung

Mittels der Gateway[®]-Klonierungs-Methode von Life TechnologiesTM wurden binäre Konstrukte hergestellt, mit denen stabil exprimierende Chop2-Pflanzen generiert werden sollten. Hierbei wurde der Vektor pMDC32 verwendet, der die konstitutive Expression des Transgens gewährleistet (Curtis & Grossniklaus, 2003). Im ersten Schritt wurden die Chop2-YFP-Sequenzen zunächst in einen sogenannten pENTR-Vektor kloniert. Die in diesem Vektor vorhandenen „attachment-sites“ dienen dann zur Klonierung der Sequenzen in sogenannte „destination“-Vektoren (pMDC32/30) durch ein „LR-Clonase“-Reaktion. Alle Ansätze wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5 Klonierung der verwendeten Konstrukte

Um eine heterologe Expression der Chop2-YFP-Varianten in Pflanzen zu ermöglichen, wurden die kodierenden Sequenzen der Fusionskonstrukte ausgehend vom bereits vorhandenen Oozyten-Konstrukt des WT-Chop2 (pGEMHE/Chop2₃₁₅-YFP, bereitgestellt

von Dr. Ronnie Gueta, Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg) in unterschiedliche pflanzliche Vektorsysteme kloniert. Hierbei handelte es sich um die bereits in der Einleitung erwähnte Chop2₃₁₅-Version, die C-terminal verkürzt war und nur die korrespondierende cDNA-Sequenz der AS 1-315 enthielt. Die Mutation L132C wurde über *in-vitro* Mutagenese (*I/M*) in den entsprechenden Konstrukten erzeugt. Tab. 2-12 zeigt eine Übersicht der erfolgten Klonierungen.

Zusätzlich wurde ein DsRed-Remorin-Konstrukt als Plasmamembran-Marker (siehe 3.2.2.1) für Kolokalisationsexperimente sowie ein Aequorin-Konstrukt für transiente Kotransformationen in Calcium-Messungen generiert (siehe 3.4).

Tab. 2-12: Klonierungen der verwendeten Konstrukte (RE für Restriktionsenzyme)

Konstrukt	Klonierungsart	Primer	Template	RE	Insertquelle	Vektorquelle
pENTR/WT-YFP C128T-YFP	Gateway-MCS Restriktion/ Ligation	-	-	BamHI/ HindIII	pGEMHE/ WT-YFP	pENTR™
pMDC32/ C128A-YFP D156A-YFP D156C-YFP L132C-YFP	<i>I/M</i>	C128A fwd/rev D156A fwd/rev D156C fwd/ rev L132C fwd/rev	pMDC32/ WT-YFP	-	-	-
pUBQ10/ WT-YFP C128A-YFP C128T-YFP D156A-YFP	USER	Chop2 USER fwd GFP CT rev	pGEMHE/ WT-YFP C128A-YFP C128T-YFP D156A-YFP	-	-	pUBQ10 (USER- Vektor)
pUBQ/ L132C-YFP	<i>I/M</i>	L132C fwd/rev	pUBQ/ WT-YFP	-	-	-
pCAMBIA-35S/ DsRed- <i>AtRem1.3</i>	USER	DSRed USER fwd <i>AtRem1.3</i> USER rev	pSAT/ DsRed/ <i>AtRem1.3</i>	-	-	pCAMBIA- 35S (USER- Vektor)
pCAMBIA-UBQ/ C128A-YFP C128T-YFP D156A-YFP	USER	UBQ10 prom user fwd RBC terminator rev	pUBQ10/ C128A-YFP C128T-YFP D156A-YFP	-	-	pCAMBIA ohne Prom/Term USER- Vektor
pER8/ C128A-YFP C128T-YFP D156A-YFP	Restriktion/ Ligation	-	-	ApaI/ SpeI	pGEM-T-Easy/ C128A-YFP C128T-YFP D156A-YFP	pER8
pGEMHE/ L132C-YFP	<i>I/M</i>	L132C fwd/rev	pGEMHE/ WT-YFP	-	-	-
pUBQ10/ Aeq	USER	Aeq USER fwd Aeq USER rev	Aequorin cDNA aus stabilen Col0_Aeq- Pflanzen	-	-	pUBQ10 USER- Vektor

2.3 Mikrobiologische Methoden - Arbeiten mit Bakterien

2.3.1 *Escherichia coli*

Innerhalb dieser Arbeit wurden in allen Applikationen außer Gateway-Klonierungen, für die der *DH5 α* -Stamm (Invitrogen) benutzt wurde, *E.coli*-Bakterien des Stammes *XL-1 Blue MRF'* (Stratagene/Agilent Technologies) verwendet. Diese sind Laborstämme, die vom WT-Stamm des im menschlichen Darmtrakt lebenden *E.coli* Bakteriums abstammen.

Tab. 2-13: Genotypen der verwendeten *E.coli*-Stämme

Stamm	Genotyp
XL1-Blue MRF'	SupE44, lac U 169 (lacZ M15) hsd R17 rec A1 EndA1 gyrA96 thi-1 rel A1
DH5 α	Δ (mcrA)183; Δ (mcrCB-hsdSMRmrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Lac

Die Bakterien dienen der schnellen Vermehrung der durch Transformation künstlich in die Zellen eingebrachten Plasmid-DNA. Diese wird von den Bakterien repliziert, wobei deren Generationszeit ca. 20min beträgt.

2.3.1.1 Kultivierung und Transformation

Nach der Klonierung der Plasmidkonstrukte wurden diese in chemisch kompetente MRF'-Bakterien transformiert. 5 μ l des Ligationsansatzes wurden zu 50 μ l der auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme des Plasmids erfolgte durch einen Hitzeschock über 45s bei 42°C. Nach Zugabe von 300 μ l SOC-Medium wurden die Bakterien für 1h bei 37°C unter Schütteln regeneriert.

Tab. 2-14: Zusammensetzung LB- und SOC-Medium

LB-Medium	Antibiotika in LB	SOC-Medium
10g/l Trypton	Ampicillin (50 μ g/ml)	20g/l Trypton
5g/l Hefeextrakt	Kanamycin (50 μ g/ml)	5g/l Hefeextrakt
10g/l NaCl	Spectinomycin (100mg/ml)	0.5g/l NaCl
		5g/l MgSO ₄ x7H ₂ O
für Platten: 1.5% Agar		+ 0.4% Glukose nach Autoklavieren

Die Selektion derjenigen Bakterien, welche das gewünschte Plasmid enthielten, wurde durch Aufzucht in einem Inkubator (BE600, Memmert) bei 37°C auf Antibiotikahaltigen LB-Agarplatten gewährleistet. Einzelne Klone wurden in flüssiges, Antibiotikumhaltiges LB-Medium überführt und wiederum über Nacht bei 37°C unter Schütteln (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) kultiviert.

2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA

2.3.2.1 Plasmid Mini-Präparation

Die schnelle Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Zhou et al., 1990). Hierfür wurden Bakterienklone in 3ml Antibiotikumhaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Hiervon wurden 1.5ml für die Plasmid-DNA Präparation eingesetzt.

Tab. 2-15: Zusammensetzung des TE- und TENS-Puffers

TE-Puffer	TENS-Puffer, 10ml
10mM Tris-HCl, pH 7.5	9.4mL TE
1mM EDTA	500µl SDS (20%)
	100µl NaOH (10M)
	200µl RNase (10mg/ml)

Die Bakterienzellen wurden bei 12000xg pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet resuspendiert. Durch die denaturierenden Bedingungen des TENS-Puffers (300µl) wurde die Plasmid-DNA von chromosomaler DNA und Proteinen abgetrennt. Bei der chromosomalen DNA trennen sich hierbei die komplementären DNA-Stränge, während diese bei ringförmiger Plasmid-DNA aufgrund deren Überspiralisierung verbunden bleiben. Durch die anschließende Behandlung mit 150µl Natriumacetat (3M, pH 5.2) wurde der Reaktionsansatz neutralisiert, wobei die einzelsträngige chromosomale DNA und die Proteine mit SDS durch Zentrifugation bei 12000xg ausgefällt wurden. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde bei 12000xg mit 600µl Isopropanol gefällt, nachfolgend mit 500µl 70%-igem EtOH gewaschen sowie für 15min bei 37°C im Heizblock getrocknet und in 50µl TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3.2.2 Plasmid Midi-Präparation

Erforderte die Anwendung hohe Ausgangsmengen an reiner Plasmid-DNA, musste eine Präparation in größerem Maßstab mit einer höheren Bakterienzahl durchgeführt werden. Hierzu diente das „Qiagen Plasmid MIDI Kit“ (Qiagen). Eingesetzt wurden 50ml Bakterienzellkultur. Die Plasmid Midi-Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Konzentration und Reinheit der DNA wurden anschließend photometrisch (siehe 2.1.4) bestimmt.

2.3.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Eine häufig verwendete Methode, Pflanzen transient oder stabil zu transformieren, stellt die Agrobakterien-vermittelte Transformation dar (Liu et al., 2002). Das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* verursacht natürlicherweise Wurzelhalstumore in Pflanzen. Diese Bakterien besitzen sogenannte Ti- (Tumor-induzierende) Plasmide, auf denen Gene für die Übertragung eines Teilstücks, der sogenannten T- (Transfer) DNA, ins Pflanzengenom enthalten sind. Auf dieser befinden sich wiederum Gene, welche die Zellteilung anregen bzw. die Produktion des Aminosäurederivats Opine, das nur vom Bakterium als Nährstoffquelle verwendet werden kann, steuern. Durch die Entdeckung, dass dieser Mechanismus unabhängig von der Gensequenz innerhalb der T-DNA abläuft und nur sogenannte Border-Sequenzen als Erkennungsmotive an deren Ende benötigt werden, konnten Agrobakterien als Vehikel benutzt werden, um DNA ins pflanzliche Genom zu integrieren. Um kleinere Plasmide zu erlangen bzw. die für den Transfer benötigten Gene von denen der T-DNA zu trennen, werden die ursprünglich in einem Plasmid enthaltenen Sequenzen auf zwei Plasmide aufgeteilt. In dieser Arbeit wurden Bakterien vom Stamm GV3101 verwendet, die ein Helferplasmid mit Virulenzgenen enthielten (Hamilton et al., 1996). Diese wurden mit einem binären Vektor, auf dem sich die T-DNA befand, transformiert.

Um Gene-Silencing, welches Pflanzen als Abwehrmechanismus gegen Fremd-DNA verwenden, zu verhindern, wurden dem Transformationsansatz zusätzlich 19K-Agrobakterien beigemischt. Das 19K-Gen stammt aus dem Weizenmosaik-Virus und kodiert für ein Suppressorprotein, welches posttranskriptionales Gen-Silencing inhibiert (Liu et al., 2002; Voinnet et al., 1999).

2.3.3.1 Kultivierung und Transformation

Die Transformation von Agrobakterien mit einem entsprechenden binären Vektor erfolgte durch Elektroporation. Hierbei werden Membranen durch ein elektrisches Feld kurzzeitig permeabilisiert.

Tab. 2-16: Zusammensetzung YEB-Medium

YEB-Medium (1l):	Antibiotika
5g Hefeextrakt (0.5%)	Gentamycin (30µg/ml)
5g Trypton (0.5%)	Rifampicin (10µg/ml)
5g Saccharose (0.5%)	Kanamycin (100µg/ml)
12.3g MgSO ₄ (50mM)	Spectinomycin (100µg/µl)
Für Platten: 1.5% Agar	

Hierfür wurde eine Vorkultur in 15ml YEB-Medium (mit Rifampicin und Gentamycin) bei 28°C unter Schütteln (inova 4230, New Brunswick Scientific) für ca. 16h kultiviert. Am folgenden Tag wurden diese in 400mL YEB-Medium überimpft und für ca. 3h bei 28°C inkubiert (bis OD₆₀₀~0.5). Nach 10min bei 4°C wurde die Kultur für 15min bei 2500xg und 4°C pelletiert und anschließend in 200ml 1mM HEPES-Puffer (pH7) resuspendiert. Durch wiederholte Zentrifugation wurde das Resuspensionsvolumen schrittweise von 200ml über 100ml auf 10ml verringert, wobei dem Endvolumen 10% Glycerin zugesetzt wurden. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Bakterienkultur auf 800µl in HEPES-Puffer mit 10% Glycerin aufkonzentriert. Die hergestellten kompetenten Agrobakterien wurden zu 40µl aliquotiert und auf Eis für die Elektroporation verwendet bzw. alternativ in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Elektroporation wurden die Elektroporationsküvetten (Durchmesser 2mm, BIO-RAD) ebenfalls auf Eis gekühlt und anschließend mit der DNA-haltigen Bakteriensuspension befüllt (150ng DNA/Ansatz). Der Elektroporator (Elektroporator 2510, Eppendorf) wurde auf 25µF, 200Ω und 2500V eingestellt. Über die Zeitkonstante (optimal 4.5-5.5ms), welche die Entladungszeit widerspiegelt, ließ sich der Erfolg der Elektroporation bestimmen. Danach wurde die Küvette erneut auf Eis gekühlt und die Bakterien sofort in 500µl kaltem SOC-Medium (siehe 2.3.1.1) aufgenommen und in ein 1.5ml-Reaktionsgefäß überführt, welches unter leichtem Schütteln für 1h bei 28°C inkubiert wurde. Die Kultivierung und Selektion von 200µl der Bakteriensuspension erfolgte durch Ausplattieren auf YEB-Platten mit entsprechenden Antibiotika.

2.3.4 Kryokonservierung

Zur längerfristigen Erhaltung eines Bakterienklons wurde eine Glycerinkultur angelegt. Hierfür wurde die entsprechende Kolonie in 5ml LB-/YEB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen bei 2500xg für 4min pelletiert und in 200µl LB-/YEB-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl 80%-igem Glycerin wurden die Bakterien ausreichend vermischt und unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.4 Sequenzierung

Grundlage der Sequenzierung ist das Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger & Coulson, 1975). Zur Detektion der Nukleotide dienen hierbei an diese gekoppelte Fluorophore. Die Sequenzierungen wurden entweder im Sequenzierlabor der Botanik I des Julius-von-Sachs-Instituts (ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyser, Applied Biosystems) oder von der Firma GATC durchgeführt. Eingesetzt wurden aufgereinigte Plasmid-DNA/PCR-Fragmente („Qiagen Gel Extraction Kit/QIAquick PCR Purification Kit“). Die Auswertung der Sequenzierergebnisse erfolgte mit Vector NTI (Invitrogen).

Die Sequenzen der zur Sequenzierung verwendeten Primer (Metabion) sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tab. 2-17: Primer-Sequenzen für die Sequenzierung

Primer	Sequenz 5' - 3'
CHOP2-C fwd	GGCTGGATTGAGTCGCGTGGC
CHOP2-C rev	CATACCCCATGATACGAAGAAGAGCC
Chop2 320 fwd	CCTACCAAACATGGAAGTCAACC
Chop2 620 fwd	GCCACCGGATACGTCAAGG
Chop2 seq 60 rev	TACAGAGCCATTGACGACTACT
YFP CT SEQ FWD	GATCACATGGTCCTGCTGGAGTTC
YFP CT fwd	GGCTTAAUATGGACAAGCAGAAGAACGGCATC
YFP-NT seq rev	GCTCGACCAGGATGGGCACC
pUBQ seq fwd	GGTGTTAGTTTCTAGTTTGTGCG
pUBQ seq rev	GTAGGATTCTGGTGTGTGCGC
RBC seq rev	GTGCGCAATGAAACTGATGC

2.5 Pflanzen und Anzuchtbedingungen

2.5.1 Verwendete Pflanzen

In Experimenten dieser Doktorarbeit wurden folgende Pflanzen verwendet: *Arabidopsis thaliana* der Ökotypen Columbia und Landsbergis sowie *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana plumbagenifolia*.

Die für Calcium-Messungen (siehe 2.10.1) vorgesehenen transgenen *A. thaliana*- bzw. *N. plumbagenifolia*-Pflanzen, die konstitutiv Apoaequorin exprimieren, wurden von Prof. A.J. Trewawas (Universität Edinburgh) bzw. Prof. P. Dietrich (Universität Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt.

Tab. 2-18: Verwendete Pflanzen und Abkürzungen

Pflanzenbezeichnung	Abkürzung
<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia-0	Col-0
<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia-0, Aequorin	Col-0 Aeq
<i>Arabidopsis thaliana</i> Landsberg erecta	Ler
<i>Nicotiana benthamiana</i>	N. benth.
<i>Nicotiana tabacum</i> SR1	SR1
<i>Nicotiana plumbagenifolia</i> , Aequorin	N. plumb. Aeq

2.5.2 Anzuchtbedingungen

Die Versuchspflanzen wurden sowohl unter sterilen Bedingungen auf Agarplatten als auch nicht-steril in Erde angezogen. Die hierfür eingesetzten Parameter sind in Tab. 2-19 aufgelistet.

Tab. 2-19: Anzuchtbedingungen der Versuchspflanzen

	Nicotiana_{Erde}	Arabidopsis_{Erde}	Nicotiana_{Agar}	Arabidopsis_{Agar}
Licht/Dunkel	12h/12h	16h/8h (Langtag) 8h/16h (Kurztag)	12h/12h	16h/8h LT 8h/16h KT
T (Tag/Nacht)	26/22°C	22/16°C	26/22°C	22/16°C
Photonenfluxdichte	600µmol m ⁻² s ⁻¹	100µmol m ⁻² s ⁻¹	600µmol m ⁻² s ⁻¹	100µmol m ⁻² s ⁻¹
Luftfeuchte	ca. 60%	ca. 60%	100%	100%
„Medium“	Einheitserde Typ P (Klasmann)	Einheitserde Typ P (Klasmann)	MS, 1.5% Agar (Kobel)	MS, 1% Agar (Kobel)
Ort	Gewächshaus	Gewächshaus/ Klimakammer	Phytotron	Phytotron

2.6 Arbeiten mit pflanzlicher Zellkultur

Die Kultivierungsarbeiten mit pflanzlichen Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Folgende Medien wurden hierfür eingesetzt:

Tab. 2-20: Zellkultur-Medien für Arabidopsis und BY2

Arabidopsis	BY2
1X MS (+Vit.)	1X MS (-Vit.)
20g/l Saccharose	30g/l Saccharose
0.2mg/l 2,4D	0.2 mg/l 2,4D
20ml/l Eisenstammlsg. (0.7g FeSO ₄ x7H ₂ O, 0.95 g EDTA/ 500ml H ₂ O)	0.1g/l Myo-Inositol
pH 5.7 mit KOH	0.2g/l KH ₂ PO ₄
0.2mg/l 2,4 D nach dem Autoklavieren	pH 5.8 mit KOH
unter Schütteln bei 24°C	unter Schütteln bei 24°C

Die Kultivierung der Arabidopsis- und Tabak BY2-Zellkulturen erfolgte bei 24°C unter Schütteln (180rpm), wobei hierfür 250ml-Erlenmeyerkolben mit ca. 50ml Kultur befüllt waren. Jede Woche wurde zum Erhalt der Zellen ein Mediumwechsel vorgenommen, indem ca. 10% der Arabidopsis- und 5% der BY2-Kultur in neues Medium überführt wurden.

Für die Kalli-Kultivierung auf Agarplatten wurde den Medien 0.4% Phytigel zugefügt. Die Kalli wurden bei 24°C im Dunkeln gelagert und ca. alle vier Wochen auf neues Medium umgesetzt.

Die Kultivierung der transformierten Zellen erforderte die Zugabe von Selektionsantibiotika (siehe 2.7.6).

2.7 Transformationen von Pflanzen

Innerhalb dieser Arbeit wurden sowohl transiente als auch stabile Methoden angewendet, um Arabidopsis- und Tabak-Zellen bzw. -Pflanzen mit Chop2-YFP zu transformieren. Hierbei existieren verschiedene Methoden, die in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben werden. Verwendet wurde in allen Fällen ein Fusionskonstrukt aus Chop2 und einem C-terminal lokalisierten YFP, um eine optische Kontrolle über den Erfolg der Transformation zu erhalten.

2.7.1 Transiente Transformation von Arabidopsis-Protoplasten

Protoplasten sind Pflanzenzellen, bei denen die Zellwand verdaut wurde. Diese können durch eine PEG-Transformation mit Plasmid-DNA transformiert werden. Hierfür wurde ein auf der im Labor von Jen Sheen etablierten Methode basierendes, modifiziertes Protokoll verwendet (Yoo et al., 2007). Folgende Reagenzien wurden verwendet:

Tab. 2-21: Zusammensetzung der Lösungen für die Protoplasten-Transformation

Enzymlösung	MMG Lösung	PEG Lösung	W5-Lösung	W10-Lösung
20mM MES, pH 5.7	4mM MES, pH5.7	40% PEG4000 (Sigma)	4mM MES, pH5.7	4mM MES, pH5.7
1.5% Cellulase R10	0.4M Mannitol	0.2M Mannitol	154mM NaCl	10mM CaCl ₂
0.4% Macerozym	15mM MgCl ₂	0.1M CaCl ₂	125mM CaCl ₂	20mM KCl
0.4M Mannitol			5mM KCl	0.5M Mannitol
20mM KCl				
10mM CaCl ₂				
0.1% BSA				

Für die Vorbereitung der Enzymlösung (Enzyme von Yakult) wurde die MES-Stocklösung für 2min auf 70°C erhitzt. Vor Zugabe von Calcium-Chlorid und BSA war eine weitere Erhitzung der Lösung auf 55°C für ca. 10min zur Denaturierung eventueller Proteasen nötig. Nach Abkühlung der Lösung auf RT erfolgte die Zugabe der oben genannten Komponenten, gefolgt von einer Filtration der Enzymlösung durch einen 0.45µm-Sterilfilter (Membrex 25 CA, MembraPure GmbH).

Die angesetzte PEG-Lösung wurde für mindestens 3h auf einem Magnetrührer gelöst.

Für die Protoplastierung wurden im Kurztag angezogene Arabidopsis Col-0-Pflanzen (siehe 2.5) im Alter von ca. 6 Wochen verwendet. Es wurden ausschließlich Pflanzen ausgesucht, die keine erkennbaren Verletzungen aufwiesen. Deren Blätter wurden mittels einer Rasierklinge in ca. 1mm breite Streifen geschnitten und jeweils sofort in die sich in einer Petrischale befindlichen 20ml Enzymlösung überführt. Der anschließende Vakuuminfiltrationsschritt für 10min erleichterte das Eindringen der Enzymlösung in die Blattstreifen und somit den Verdau für ca. 3h bei RT im Dunkeln. Das Abtrennen der Protoplasten wurde durch die Filtration der Lösung durch ein 50µm-Netz erreicht. Vor der Aufkonzentration der Zellen durch Zentrifugation (100xg, 2min, ohne Bremse/Beschleunigung) und Resuspension auf ca. 2×10^5 Zellen/ml W5-Lösung, wurden sie mit eben dieser auf 40ml verdünnt. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Überprüfung der Intaktheit der Protoplasten. Eine Regenerationszeit von 0.5-1h auf Eis sorgte für die Erholung der Zellen vor der Transformation. Innerhalb dieser Zeit setzen sich die Protoplasten am Boden des Falcons ab, wodurch es möglich war, den Überstand durch ca. 2ml MMG-Lösung zu ersetzen.

Für einen einfachen Transformationsansatz wurden 20µg DNA, für eine Kotransformation jeweils 15µg DNA verwendet. Diese wurden mit 200µl (ca. 2×10^4 Zellen) der vorbereiteten Protoplastensuspension versetzt. Anschließend erfolgte die Transformation der Zellen durch Zugabe von 220µl PEG-Lösung für 15min bei RT. Die Protoplasten wurden in 0.8ml W5-Lösung resuspendiert und bei 100xg für 1min abzentrifugiert, danach erneut mit 2ml W5 gewaschen und die zentrifugierten Protoplasten in 2ml W5/W10-Lösung o/n bei RT gelagert.

Bei Protoplasten, die für Calcium-Messungen vorgesehen waren, wurde die o/n-Lösung zusätzlich mit 5µM Coelenterazine (Synchem) und 10-100nM *all-trans* Retinal (Sigma-Aldrich) versetzt.

2.7.2 Transiente Transformation von Arabidopsis-Kotyledonen

Die transiente Transformation von Arabidopsis-Kotyledonen erfolgte modifiziert nach Marion et al. (Marion et al., 2008).

Tab. 2-22: Zusammensetzung des Induktionsmediums

Induktionsmedium
10mM MgCl ₂
2.5% Sucrose
1.25% Glucose
100µM Acetosyringon
5mM MES, pH 5.6

Hierfür wurden *Arabidopsis thaliana*-Samen vom Ökotyp Landsberg erecta auf MS-Platten mit 1% Saccharose auf einem Filterpapier steril ausgesät und im Phytotron im Langtag drei Tage angezogen.

Aus einer transformierten Agrobakterien-Vorkultur wurden 100ml Hauptkultur angeimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln ca. 16h inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend mit ddH₂O gewaschen, in 30ml Induktionspuffer aufgenommen und 2h unter Schütteln inkubiert. Die Agrobakterien wurden auf eine OD₆₀₀=2 eingestellt und im Verhältnis 6:1 mit dem 19K-Stamm (siehe 2.3.3) gemischt.

Die Arabidopsis-Keimlinge wurden mit je 30ml der Bakteriensuspension überschichtet und bei ~20mbar im Exsikkator zwei Mal für ca. 1min infiltriert. Anschließend wurden die Bakterien abgezogen und die Pflanzen unter Langtagbedingungen inkubiert.

Der Erfolg der Transformation konnte durch die Verwendung von YFP-Fusionsproteinen überprüft werden.

2.7.3 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*-Blättern

Transformiert wurden vier bis sechs Wochen alte *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen (siehe 2.5). 19K-Bakterien (siehe 2.3.3) sowie Agrobakterien, die das gewünschte binäre Plasmid enthielten wurden am Abend vor der Infiltration in 15ml YEB-Medium unter Antibiotika-Selektion angeimpft, über Nacht bei 28°C unter Schütteln inkubiert und am Morgen nach ca. 16h pelletiert.

Tab. 2-23: Zusammensetzung des Agro-Mix-Puffers

Agro-Mix-Puffer
10mM MgCl ₂
10mM MES, pH 5.6
150µM Acetosyringon, steril filtriert

Auf einen Waschschrift mit *ddH*₂O folgte die Resuspension der Bakterien im Agro-Mix-Puffer, welcher ein Mangelmedium für die Bakterien darstellt und sie so für die Transformation von Pflanzen induziert. Nach einer Inkubationszeit von mind. 2h wurde die Dichte der Zellen mittels eines Photometers bei OD₆₀₀ bestimmt, um anschließend eine Verdünnung auf OD₆₀₀=1 einstellen zu können. Das Mischungsverhältnis zu 19K-Bakterien war 6:1. Um die Infiltration der Bakterien zu erleichtern, wurden die Tabakpflanzen 3h zuvor gewässert und belichtet, um die Stomaöffnung zu induzieren. Es wurden je drei Blätter pro Pflanze mit einer 1ml-Einwegspritze an je zwei gegenüberliegenden Stellen infiltriert, so dass ein Hof von ca. 1.5-2cm entstand.

Der Erfolg und Verlauf der Transformation konnte anhand der Fluorophor-Markierung (C-terminale Fusion von YFP/GFP/DsRed) der Proteine verfolgt werden.

2.7.4 Stabile Transformation von Arabidopsis-Pflanzen - „Floral Dipping“

2.7.4.1 Methode

Die Transformation von Arabidopsis-Pflanzen erfolgte nach der Methode von Clough und Bent, welche Transformationsraten von ca. 1% generiert (Clough & Bent, 1998). Transformiert wurden sowohl Col-0 und Col-0 Aeq Pflanzen. Für das sogenannte „Floral Dipping“ (engl. für Eintauchen der Blüte) sind Pflanzen optimal, die einen verzweigten Blütentrieb aufweisen, an dem sich bereits erste Blüten entwickelt haben. Es wurden Agrobakterien verwendet, die zuvor mit einem das Zielgen tragenden binären Plasmid transformiert wurden (siehe 2.3.3.1). Die Anzucht dieser Bakterien erfolgte in YEP-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) über Nacht bei 28°C unter Schütteln. Nach dem Ernten am folgenden Tag durch 15-minütige Zentrifugation bei 3000xg wurden die Zellen in einer 5%-ige Saccharose-Lösung mit 0.02% Silwet L-77 (Lehle Seeds) als Detergenz resuspendiert und auf eine OD₆₀₀=0.8 verdünnt. Nun wurde der Blütenstand in die Agrobaktériensuspension getaucht und horizontal liegend für 24h bei ca. 22°C im Dunkeln inkubiert und anschließend zurück in Gewächshaus (Langtag) ge-

stellt. Nach drei bis vier Tagen wurden die Pflanzen erneut dem „Floral Dipping“ unterzogen. Nach Inkubation im Gewächshaus bis zur Schotenbildung wurden die Blütenteile der Pflanzen mit Papiertüten umschlossen und für weitere ein bis zwei Wochen im Gewächshaus angezogen. Danach erfolgte das Ausreifen der Schoten unter Trockenbedingungen.

2.7.4.2 Samen-Sterilisation und -Selektion

Die Samen der transgenen Pflanzen wurden geerntet und ca. vier Wochen bei 4°C im Kühlraum gelagert, bevor sie sterilisiert wurden. Hierfür erfolgte eine Inkubation der Samen in 100% EtOH für ca. 20min im Überkopfschüttler. Das EtOH wurde anschließend unter der Sterilbank vollständig abgenommen und durch 500µl Hypochloridlösung (5% Hypochlorid, 0.2% Triton-X) ersetzt. Die Inkubationszeit betrug hierbei maximal 5min, woraufhin die Samen fünf Mal mit jeweils 500µl sterilem Wasser gewaschen wurden. In einem letzten Schritt wurden sie in 1ml Wasser aufgenommen und auf steriles Whatman (PROTRAN[®])-Papier zum Trocknen unter der Sterilbank aufgebracht.

Die Selektion der transgenen Pflanzen erfolgte steril auf Agarplatten mit Selektionsantibiotikum (1/2X MS-Medium, 1% Agar, Hygromycin 50µg/ml bzw. Kanamycin 100µg/ml). Zusätzlich enthielten diese Platten Cefotaxim (250µg/ml), um eventuell überlebende Agrobakterien abzutöten. Die Anzucht der Keimlinge für vier Wochen unter KT-Bedingungen im Phytotron (siehe 2.5) gewährleistete das Absterben der nicht transgenen Pflanzen. Die selektierten Keimlinge wurden auf Erde pikiert und weiter analysiert.

2.7.5 Stabile Transformation von *Nicotiana SR1*-Blattscheiben: Regeneration von stabilen Transformanten

Um stabil transgene Tabak-Pflanzen zu generieren, bedient man sich einer Transformationsmethode, welche auf der Regeneration von Pflanzen aus einem transformierten Blattstück basiert. Hierfür mussten SR1-Tabaksamen sterilisiert (siehe 2.7.4.2) sowie die entstehenden Keimlinge für fünf Wochen in Magenta-Boxen (Magenta Cooperation) auf MS-Medium (siehe 2.5) angezogen werden.

Tab. 2-24: Zusammensetzung der Anzucht- und Transformationsmedien

MS-Medium	Kallus-Medium	Wurzel-Medium
1X MS	1X MS	1X MS
2% Saccharose	2% Saccharose	1% Saccharose
pH 5.8 mit KOH	pH 5.8 mit KOH	pH 5.8 mit KOH
1% Kobe Agar	0.8% Kobe Agar	0.8% Kobe Agar
	nach Autoklavieren zugegeben:	nach Autoklavieren zugegeben:
	Cefotaxim (500µg/ml)	Cefotaxim (500µg/ml)
	Selektionsantibiotika: Basta (20µg/ml)/ Kanamycin (100µg/ml)/ Hygromycin (50µg/ml)	Selektionsantibiotika: Basta (20µg/ml)/ Kanamycin (100µg/ml)/ Hygromycin (50µg/ml)
	1-NAA (100µg/l)	
	6-BAP (1mg/l)	

Einen Tag vor der Transformation wurden die transformierten Agrobakterien in 15ml YEP-Medium unter Selektionsdruck über Nacht steril angezogen (siehe 2.3.3.1), anschließend bei 2500xg für 15min bei RT zentrifugiert und mit MS-Medium gewaschen. Nach erneutem Pelletieren der Bakterien wurde diese in 10ml MS-Medium aufgenommen und in 25ml MS auf eine $OD_{600} = 0.1$ eingestellt. Die Tabakblättchen wurden steril in ca. 0.5cm große Stücke geschnitten und für ca. 20min in der Agrobakteriensuspension inkubiert. Nachdem die Blattstücke mit der Blattunterseite nach unten auf MS-Agar-Platten ausgelegt und für 2d im Dunkeln bei RT inkubiert wurden, erfolgte ein Umsetzen auf Kallus-Medium, das einerseits das Selektionsantibiotikum und andererseits Cefotaxim zum Abtöten der Agrobakterien enthielt. Nach Kallusbildung, (nach ca. zwei bis drei Wochen im LT) wurden diese in Magentas mit Kallus-Medium umgesetzt. Nach weiteren zwei Wochen entwickelten sich Sprosse, die dann auf Wurzel-Medium umgesetzt werden konnten. Nach Ausbildung der Wurzeln konnten diese in Erde eingepflanzt werden.

2.7.6 Stabile Transformation pflanzlicher Zellkultur

BY2- bzw. Arabidopsis-Zellkultur (transgene Aequorin-Kalli, siehe 2.6) wurde 2-3d nach dem Umsetzen transformiert. Über Nacht in 5ml YEP-Selektionsmedium kultivierte, transformierte Agrobakterien wurden pelletiert, in 5ml BY2-Medium resuspendiert, erneut pelletiert und im gleichen Volumen Medium aufgenommen. In einer Petri-schale wurden daraufhin 4ml der Zellkultur mit 100µl der Agrobakteriensuspension für

2d im Dunkeln bei 24°C inkubiert, um die Transformation zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen mit 10ml Medium verdünnt und für 1min bei 200xg pelletiert. Dieser Waschschrift wurde fünf Mal wiederholt. Die letzte Resuspension erfolgte in ca. 3ml Medium, worin die Zellen auf eine Phytigel-Platte (1/2X Selektionsantibiotikum) ausgebracht wurden. Das Medium wurde daraufhin wieder abgenommen. Die nach ca. drei bis vier Wochen Anzucht (siehe 2.6) gebildeten Kalli konnten nun auf Phytigel-Platten mit 1X konzentriertem Selektionsantibiotikum umgesetzt werden. Nach weiterem Überführen der Kalli auf Selektionsplatten und zwei Wochen Wachstum wurden diese in ca. 10ml Flüssigkultur (siehe 2.6) übernommen, welche wiederum Cefotaxim und Selektionsantibiotikum enthielt. Der einwöchigen Anzucht folgte ein Auffüllen auf 50ml Gesamtvolumen. Die weitere Kultivierung erfolgte wie bereits für Zellkulturen beschrieben (siehe 2.6) unter permanenter Antibiotikaselektion.

2.8 Biochemische Arbeiten

Der Erfolg der Expression von Chop2-YFP in Pflanzen konnte anhand eines YFP-Tags mittels Fluoreszenz-Mikroskopie getestet werden. Um jedoch eine genauere Information über die Expressionslevel bzw. -lokalisation zu erhalten, wurde die mikrosomale Fraktion aus transient bzw. stabil transformierten *N. benthamiana*-Blättern bzw. *A. thaliana*-Blättern isoliert, deren Proteinfraction in einer SDS-PAGE aufgetrennt sowie die Expression des Transgens mittels YFP-Antikörper im Western-Blot nachgewiesen.

2.8.1 Protein-Extraktion aus Pflanzengewebe

Eingesetzt wurden ca. 200mg Blattmaterial pro Ansatz. Bei Tabak wurden hierfür lediglich Blattscheiben ausgestanzt, die sich im mit Agrobakterien transformierten Teil des Blattes befanden. Diese wurden nach dem Ausstanzen in einem Retinal-haltigen Puffer inkubiert und anschließend in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff gemörsert, während sukzessiv ca. 5ml Homogenisationspuffer zugesetzt wurden.

Tab. 2-25: Zusammensetzung des Homogenisationspuffers

Homogenisationspuffer
330mM Saccharose
50mM Tris-HCl, pH 7.4
3mM EDTA
77mg DTT
Proteinase-Inhibitor Tablette, EDTA-frei
4% PVPP (bei Extraktion portionsweise zugegeben)

Die Suspension wurde anschließend bei 10000xg für 15min bei 4°C zentrifugiert und die groben Zellbestandteile durch ein Filternetz (Miracloth, Calbiochem) abgetrennt. Durch eine Ultrazentrifugation bei 100000xg für 1h (4°C) erhielt man ein mikrosomales Pellet, welches aus sämtlichen Membranen bestand. Hierbei wurden 100µl vom ÜS abgenommen, der die löslichen Proteine enthielt. Das Pellet wurde im gleichen Volumen Homogenisationspuffer resuspendiert.

2.8.2 SDS-PAGE

Die Größenauftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE (engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Laemmli, 1970). Die Ladung von Proteinen ist stark von deren AS-Zusammensetzung geprägt sowie pH-abhängig. Daher wird sowohl dem Gel als auch den Proben SDS zugefügt, welches als anionisches Detergenz Proteine proportional zu deren Größe bindet. Zusätzlich werden durch SDS Tertiär- sowie Sekundärstrukturen durch das Lösen hydrophober sowie Wasserstoffbrückenbindungen zerstört. Durch den Zusatz des Reduktionsmittels β-Mercaptoethanol im Probenpuffer lassen sich Disulfidbrücken an Cysteinen lösen. So wird ermöglicht, dass sich Proteine in der SDS-PAGE lediglich proportional zu ihrer Größe im elektrischen Feld bewegen. Innerhalb dieser Arbeit wurden ausschließlich vorgefertigte Tris-Glycin-Gradienten-Gele (8-16% Polyacrylamid) von Thermo Scientific verwendet.

Tab. 2-26: Zusammensetzung des Laufpuffers für SDS-Gele

Laufpuffer	6X SDS Probenpuffer _{ox}	6X SDS-Probenpuffer _{red}
0.025M Tris	0.035M Tris-HCl	0.035M Tris-HCl
0.192M Glycin	1.2 % (w/v) Bromphenolblau	1.2 % (w/v) Bromphenolblau
0.1% SDS	3% Glycerol	3% Glycerol
pH 8.5	1% (w/v) SDS	1% (w/v) SDS
		0.6% (w/v) DTT

Vom extrahierten Proteinansatz wurden je 10µl mit reduzierendem bzw. oxidierendem Ladepuffer versetzt, bei 95°C für 5min denaturiert und anschließend pelletiert. Der ÜS wurde abgenommen und aufgetragen. Vom Marker („Protein Ladder prestained plus“, Fermentas) wurden 6µl eingesetzt. Das Proteingel lief ca. 45min bei 120V (ca. 20mA).

2.8.3 Coomassie-/Silberfärbung

Um die Banden im Proteingel anzufärben, wurden sowohl eine Coomassie- als auch eine Silberfärbung durchgeführt. Coomassie-Brilliantblau ist ein Farbstoff, der sich an basische AS-Seitenketten anlagert und hierdurch ein unspezifisches Anfärben von Proteinen bewirkt. Für die Silberfärbung müssen die Proteine im Gel zunächst fixiert sowie das Detergenz aus dem Gel ausgewaschen werden. Anschließend folgt eine Bindung von Silbernitrat an negativ geladene AS-Reste. Die Färbung des Gesl entsteht durch die Reduktion von AgNO₃ zu elementarem Silber durch alkalisches Formaldehyd.

Tab. 2-27: Zusammensetzung der Coomassie-Lösung

Coomassie-Lösung
50% MeOH
10% Essigsäure
0.1% Brilliantblue R250

Für eine Coomassie-Färbung wurde das Gel in der Coomassie-Lösung über Nacht auf einem Schüttler inkubiert und am folgenden Tag mit 10%-iger Essigsäure bis zur Entfärbung ungebundenen Farbstoffs gewaschen.

Tab. 2-28: Zusammensetzung der Silberfärbungs-Lösungen

Lösung I	30ml 50% (v/v) Aceton	0.75ml 50% (w/v) TCA	12.5µl 37% Formaldehyd
Lösung II	30ml 50% (v/v) Aceton		
Lösung III	50µl 10% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ x5H ₂ O		
Lösung IV	0.4ml 20% (w/v) AgNO ₃	0.3ml 37% Formaldehyd	
Lösung V	0.6g Na ₂ CO ₃	12.5µl 37% Formaldehyd	12.5µl 10% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ x5H ₂ O

Um eine sensitivere Färbung der Banden zu erhalten (100-1000x sensitiver im Vergleich zu Coomassie), wurde die Methode der Silberfärbung nach Wray et al. angewendet (Wray et al., 1981). Nach der SDS-PAGE wurde das Gel unter fließendem Wasser abgespült und anschließend für 5min unter Schwenken in Lösung I inkubiert. Nach 3x-igem Waschen in *dd*H₂O wurde das Gel für 5min in *dd*H₂O geschwenkt und danach für weitere 5min in Lösung II inkubiert. Auf eine Zugabe von Lösung III für 1min folgte wiederum ein 3x-iger Waschschrift mit *dd*H₂O, woraufhin das Gel für 10min in Lösung IV inkubiert wurde. Die Entwicklung der Silberfärbung nach ausreichender Spülung mit *dd*H₂O wurde durch die Inkubation des Gels in Lösung V ermöglicht, welche durch Zugabe von 2%-iger Essigsäure gestoppt werden konnte.

2.8.4 Western-Blot

Um das Chop2-YFP-Fusionsprotein spezifisch über Antikörperdetektion nachweisen zu können, erfolgte der Transfer der Proteine vom Proteingel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran mittels eines sogenannten „Wet-Blotters“ (REL-SB-10, Roth). Diese wurde zuvor für ca. 5min in Methanol aktiviert und anschließend, wie auch das Gel, im Blot-Puffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran fand für 1h bei 90V statt, wobei deren Bindung über hydrophobe bzw. polare Wechselwirkungen mit der Membran erfolgte. Der Erfolg des Proteintransfers konnte über die farbigen Markerbanden kontrolliert werden.

Tab. 2-29: Zusammensetzung der Western-Blot-Lösungen

Blotpuffer	10X TBS	1X TBS-T	Blocklösung	PBS
0.025M Tris	500mM Tris	1X TBS	TBS-T	137mM NaCl
0.192M Glycin	2M NaCl	0.05% Tween	5% Milchpulver	2.7mM KCl
20% MeOH	pH 7.6 mit HCl			10mM Na ₂ HPO ₄
				2mM KH ₂ PO ₄

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde der Blot über Nacht bei 4°C mit in der Blocklösung enthaltenem Milchpulver abgesättigt. Am folgenden Tag wurde die Membran für 2h bei 4°C mit dem primären Antikörper (ab6556/Rabbit-Anti-GFP, Abcam) behandelt, der im Verhältnis 1:2000 (in Blocklösung) zugesetzt wurde. Auf dessen Entfernung durch dreimaliges Waschen mit TBS-T folgte die Inkubation mit dem 1:10000 eingesetzten sekundären Antikörper (ImmunoPure[®] Antibody Goat Anti-rabbit HRP, Pierce, Thermo Scientific) für ca. 2h bei 4°C in TBS-T. Zur Entfernung überschüssigen sekundären Antikörpers wurde der Blot vier Mal mit TBS-T für je 10min gewaschen. Ein letzter Waschschrift vor der Entwicklung erfolgte in PBS.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem „SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate“ (Thermo Scientific). Hierbei wurden 3ml Luminol-Lösung mit 3ml H₂O₂-Lösung gemischt und ca. 5min mit der Membran im Dunkeln inkubiert. Die Detektion des YFP-markierten Proteins erfolgte auf diese Weise über Lumineszenz, da die an den sekundären Antikörper gekoppelte Horse Raddish Peroxidase die Oxidation von Luminol durch H₂O₂ katalysiert. Die durch diese Reaktion entstandene Lumineszenz wurde mittels einer CCD (Charge Coupled Device)-Kamera (Visiluxx, Visitron Systems GmbH) detektiert. Diese wurde 2h vor Benutzung mit flüssigem Stickstoff gekühlt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu maximieren.

2.9 Mikroelektroden- Einstich in intaktes Pflanzengewebe

Zur Untersuchung von Membranpotentialänderungen, die durch die Funktion von Channelrhodopsin-2 in transformierten Pflanzen durch Blaulicht ausgelöst werden, wurde die Einstichttechnik verwendet. Hierfür wurde mit einer über einen Mikromanipulator gesteuerten einkapillaren Mikroelektrode in das Cytoplasma von Blatt-/Kotyledonengewebe von Tabak-/Arabidopsis-Pflanzen, die zuvor mittels Agrobakterien transient transformiert worden waren (siehe 2.7.2 und 2.7.3), eingestochen und das

freilaufende Membranpotential aufgezeichnet. Eine weitere Elektrode, die in der Badlösung platziert wurde, diente als Referenz.

2.9.1 Theorie

Die angegebenen Spannungen in dieser Arbeit folgen der Konvention nach Bertl et al. (Bertl et al., 1992). Das Membranpotential wird hierbei als das Potential der cytosolischen Seite relativ zur extrazellulären Seite angegeben, welches auf 0 gesetzt wird. Daher ergibt sich eine Depolarisation durch einen Kationeneinstrom bzw. Anionenausstrom, wohingegen eine Hyperpolarisation durch einen Kationenausstrom bzw. Anioneneinstrom ausgelöst wird. Die Bezeichnungen Depolarisation bzw. Hyperpolarisation beschreiben also Membranpotentialänderungen zu positiveren bzw. negativeren Werten im Bezug zum Ruhepotential.

Das Ruhepotential bezeichnet das Membranpotential, bei dem sich die Zellen in einem „nicht erregten“ Zustand befinden, und basiert in Pflanzenzellen hauptsächlich auf dem Nernst-Potential von Kalium, für das die höchste Leitfähigkeit in Pflanzenzellen besteht, sowie der Aktivität der Protonenpumpe, durch die das Ruhepotential mit bis zu -200mV deutlich negativer liegen kann als in tierischen Zellen. Das Nernst-Potential stellt ein Gleichgewichtspotential dar, bei dem der Konzentrationsgradient eines Ions exakt durch den elektrischen Gradienten ausgeglichen wird. Während die Kaliumkonzentration im Cytosol bei ca. 100mM liegt, kann die externe Konzentration mikromolare Werte betragen (Walker et al., 1996). Als Gegenionen im Cytosol dienen Nitrat, Chlorid und organische Säureanhydride wie Malat (Roberts, 2006).

$$E_x = \frac{R * T}{F * z_x} * \ln \frac{[x]_{ext}}{[x]_{in}}$$

Abb. 2-2: Nernst-Gleichung zur Berechnung des Gleichgewichtspotential von Ionen (E_x = Nernstpotential des Ions x, R = allgemeine Gaskonstante, T = absolute Temperatur, F = Faradaykonstante, z_x = Wertigkeit des Ions x, $[x]_{in/ext}$ = interne/externe Konzentration der Ions x)

Durch die Goldman-Hodgkin-Gleichung (Goldman, 1943) kann das Membranpotential für mehrere permeierende Ionen berechnet werden. Sie stellt eine Verallgemeinerung der Nernst-Gleichung dar und basiert auf der Tatsache, dass eine Membran für verschiedene Ionen permeabel ist und deren Nettofluss im Ruhezustand 0 ist. Außerdem wird die Annahme getroffen, dass Ionen unabhängig voneinander agieren und sich ΔV_m über

die gesamte Membran gleichmäßig ausbreitet. Es wird also die Tatsache vernachlässigt, dass sich bestimmte Ionen beeinflussen bzw. lokale ΔV_m 's durch die Lokalisation der Ionenkanäle entstehen.

2.9.2 Herstellung der Elektroden

Die zum Einstich verwendeten Mikroelektroden wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (Durchmesser_{außen}=1.0mm, Durchmesser_{innen}=0.58 mm, Hilgenberg) mittels eines „Laser-Pullers“ (P2000, Sutter Instrument Co) sich nach vorne hin verjüngend angefertigt. Sie wurden für die Messung mit 300mM KCl befüllt und es wurde eine Ag/AgCl-Elektrode inseriert. Zur Herstellung der Elektroden wurde eine Elektrolyse mit einem Silberdraht in 1M KCl durchgeführt. Diese führt dazu, dass sich Silberchlorid an der Anode und somit am Draht abscheidet. Die Verbindung mit dem Verstärker erfolgte über einen Vorverstärker. Eine weitere Ag/AgCl-Halbzelle diente als Referenzelektrode, die mit der Erde des Verstärkers verbunden wurde. Diese wurde in eine nicht ausgezogene, mit 300mM KCl befüllte Kapillare getaucht, die am vorderen Ende mit einem Agarosestück (2% Agarose, in 300mM KCl) verschlossen wurde, um einen Austritt cytotoxischer Silberionen bzw. der KCl-Lösung zu verhindern.

2.9.3 Aufbau des Messplatzes

Die „äußere“ Messapparatur bestand aus einem schwingungsgedämpften Tisch, auf dem ein aufrechtes Mikroskop (ZEISS Axioskop) platziert und der von einem Faradayschen Käfig umgeben war. Der Mikroskoptisch enthielt die Halterung für die Probenschälchen. Um einen exakten Abstand zwischen Probe und Mikromanipulator (Kleindiek Nanotechnik) gewährleisten zu können, wurde dieser ebenfalls am Mikroskoptisch montiert und konnte über einen Joystick (Sony) gesteuert werden. Die leitenden Bestandteile der Messapparatur wurden geerdet. Die Verbindung zwischen Messelektrode und Vorverstärker (HS-2A x 0.01, Axon Instruments) wurde über einen Kupferdraht gewährleistet. Die über den Vorverstärker gemessene Spannung wurde an einen Verstärker (IPA-2 Ion/Polarographic Amplifier, Axon Instruments) außerhalb des Käfigs weitergeleitet. Mit Hilfe eines A/D (Analog/Digital)-Wandlers (NI USB-6259, National Instruments) konnten die Daten mit Hilfe eines Computers aufgezeichnet werden, wobei das Programm WinEDR V3.1.2 (Strathclyde) verwendet wurde.

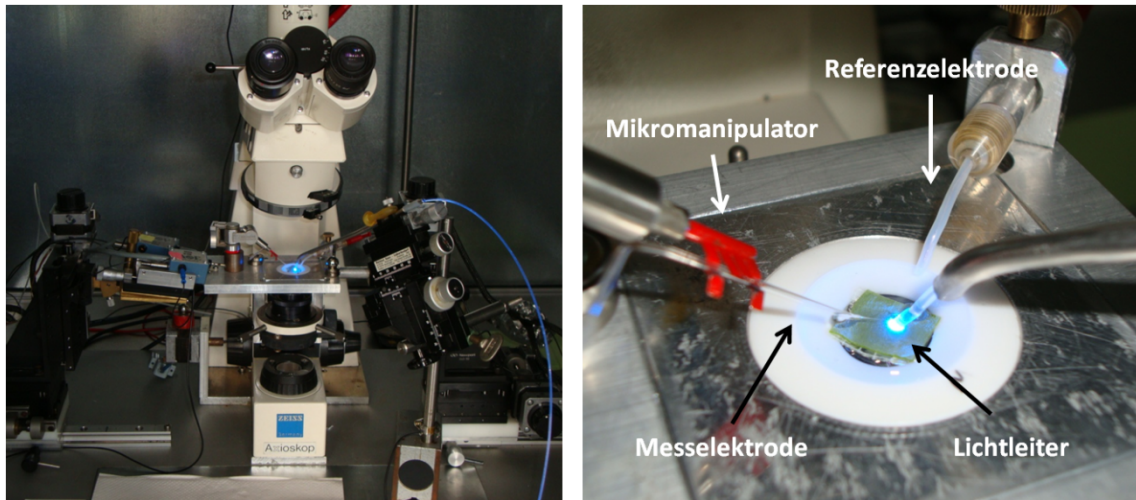


Abb. 2-3: Aufbau des Einstich-Messplatzes

Die Aktivierung von ChR2 wurde über einen durch einen Mikromanipulator steuerbaren Lichtleiter (Laser Components GmbH) durch einen Blaulicht-Laser (Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., 473nm) vermittelt. Hierfür wurde der Lichtleiter so nah wie möglich an die Blattunterseite herangeführt.

2.9.4 Messlösungen

Es wurden verschiedene Messlösungen eingesetzt, um die Aktivität von ChR2 in Pflanzen messen und charakterisieren zu können. Diese variierten einerseits im pH-Wert und andererseits in der Kalium- bzw. Calcium-Konzentration. Deren Zusammensetzung ist im Einzelnen in Tab. 2-30 aufgeführt:

Tab. 2-30: Zusammensetzung der Einstich-Messlösungen

Lösung I	Lösung II	Lösung III	Lösung IV	Lösung V
5mM KCl	1mM KCl	1mM KCl	1mM KCl	1mM KCl
1mM CaCl ₂	1mM CaCl ₂	1mM CaCl ₂	1mM CaCl ₂	10mM CaCl ₂
10mM MES/BTP, pH6	10mM MES/BTP, pH6	10mM MES/BTP, pH5	10mM MES/BTP, pH4	10mM MES/BTP, pH6

Um die Rekonstitution von Chop2 mit Retinal zu gewährleisten, wurden der Inkubationslösung (Standard=Lösung II) des präparierten Blattmaterials 10 μ M Retinal (Sigma-Aldrich) zugesetzt.

2.9.5 Präparation des Pflanzenmaterials

Die Einstichmessungen erfolgten an isolierten Blattstücken von *N. benthamiana* bzw. Kotyledonen von *A. thaliana* (Landsbergis). Die infiltrierten Blattregionen der Tabakblätter wurden auf Fluoreszenz überprüft und mittels einer Rasierklinge ausgeschnitten, so dass die verletzte Injektionsstelle ausgespart blieb. Die Blattstücke wurden nachfolgend in Messlösung I/II überführt und mit 10 μ M Retinal entweder über Nacht oder mindestens 3h „zur Erholung“ im Dunkeln inkubiert, bevor sie zur Messung herangezogen wurden. Im Fall des Retinalaufnahme-Experiments wurden die Blattstücke ohne Retinal inkubiert und dies erst während der Messung zugegeben. Bei Messungen an Arabidopsis-Kotyledonen wurden diese über Nacht mit doppelseitigem Klebeband auf den Messschälchen befestigt und mit Retinal-haltiger Messlösung überschichtet.

2.9.6 Durchführung und Auswertung

Zur Anregung der ChR2-Aktivität wurden die Blattstücke bzw. Kotyledonen über einen durch einen Mikromanipulator steuerbaren Lichtleiter durch einen Laser belichtet. Der Lichtleiter hatte einen Durchmesser von 1.5mm.

Tab. 2-31: Eigenschaften der Lichtquellen

Lichtquelle	Wellenlänge λ	Leistung (100%)
Laser blau	473nm	9mW/mm ²
Laser grün	556nm	12mW/mm ²

Die angegebene Laser-Leistung entspricht der direkt am Lichtleiterende gemessenen, weshalb nur indirekte Rückschlüsse auf die Lichtintensität des Lichtstrahls im Meso-phyll gezogen werden können. Eingesetzt wurden Laser-Transmissionen von 1-100%.

Die Auswertung der generierten Datensätze erfolgte mit Origin Pro 8 (OriginLab[®]).

2.10 Aequorin-basierte Calcium-Messungen

2.10.1 Theorie

Aequorin ist ein Calcium-sensitives Photoprotein, das aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert werden konnte (Blinks & Moore, 1986; Shimomura et al., 1962). Dieses besteht aus einem Apoprotein, welches drei Calcium-Bindestellen besitzt, und einer prostheti-

schen Gruppe, dem sogenannten Coelenterazin. Die Bindung von Calcium-Ionen bewirkt eine Konformationsänderung, in der Coelenterazin unter Sauerstoff-Einfluss zu Coelenteramid oxidiert und die kovalente Bindung zerstört wird. Bei dieser Reaktion kommt es zudem zur Emission eines Photons (466nm). Aequorin besitzt einen Sensitivitätsbereich, der zwischen 10nM und 10µM liegt und somit mit in Pflanzen hervorgerufenen Calcium-Signale korreliert.

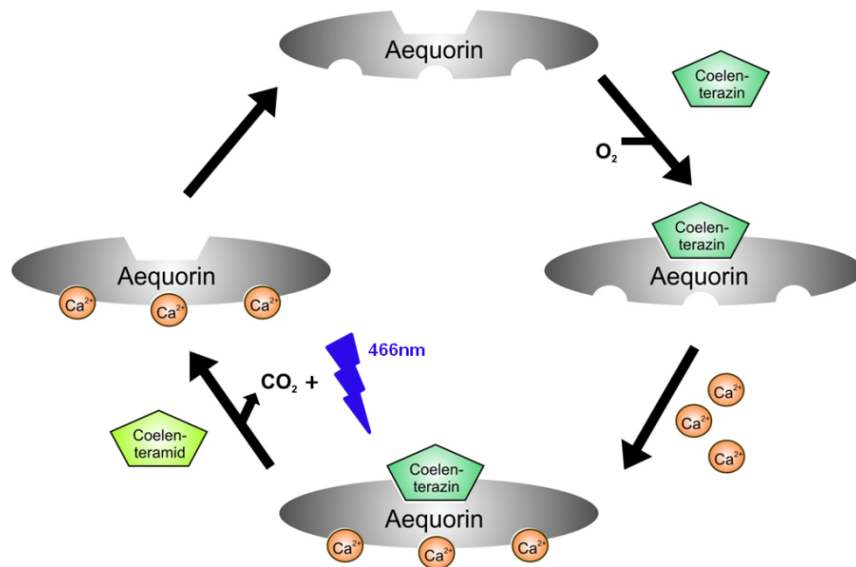


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der Calcium-basierten Aequorin-Lumineszenz

Seit der Klonierung der Aequorin-cDNA wurde Aequorin in einer Vielzahl von Anwendungen im „Calcium-Imaging“ genutzt (Inouye et al., 1985). Aequorin besitzt gegenüber Calcium-Fluorophoren den entscheidenden Vorteil, dass es in Zellen heterolog exprimiert werden kann und somit keine Mikroinjektion nötig ist. Da Coelenterazin Membran-permeabel ist, kann es extern zugegeben werden. Weiterhin kann Aequorin durch den Zusatz von „Targeting-Sequenzen“ auch intrazellulär in bestimmten Zellkompartimente lokalisiert werden, wodurch Messungen in Organellen ohne Hintergrund möglich sind. Einen dritten Aspekt stellt die Lichtemission selbst dar: Im Gegensatz zu Fluoreszenzproteinen basieren Aequorin-vermittelte Calcium-Messungen auf Lumineszenz und benötigen demzufolge keine Anregung durch Licht. Hierdurch entsteht jedoch gleichzeitig der Nachteil, dass die Signalstärke deutlich kleiner ist.

Vor dem Hintergrund, dass die Expressionslevel von Aequorin nicht konstant sind, kann am Ende der Messung zur Quantifizierung ein sogenannter „Discharge“ durchgeführt werden, indem die Zellen mit einer 1M CaCl_2 -Lösung mit 20% EtOH behandelt werden. Dies führt zu einer Zerstörung der Membran und demnach zu einer Freisetzung des

gesamten Aequorin-Proteins, auf die aufgrund der hohen Calcium-Konzentration eine maximale Lumineszenz folgt. Addiert man dieses Signal zur Summe der zuvor gemessenen Lumineszenz, ergibt sich das maximal mögliche Signal aus jedem Ansatz, das nachfolgend ins Verhältnis zum gemessenen Signal gesetzt wird.

2.10.2 Luminometer Set-Up

Luminometer basieren allgemein auf einem Licht-undurchlässigen Gehäuse, in dem eine Probe in naher Distanz zu einem Photomultiplier platziert wird. Der Photomultiplier generiert über die Anregung durch Photonen freie Elektronen an der Kathode, die über Amplifikation im Vakuum auf die Anode treffen und dadurch Lumineszenz in ein Stromsignal umsetzen.

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein eigens in der Werkstatt des Lehrstuhls angefertigtes Luminometer verwendet, um eine direkte Lumineszenz-Messung auf die Anregung von ChR2 durch Blaulicht zu gewährleisten. Hierbei wurde ein Photomultiplier (Photo Counting Modul MP 1983 RS CPM, Perkin Elmer) so über der Probenhalterung positioniert, dass dieser von je zwei blauen (447nm, $6.7\text{mW}/\text{cm}^2$) und zwei grünen (wurden in den angegebenen Messungen nicht verwendet) LEDs umgeben war, die durch Linsen auf eine fixe Fläche von ca. 2.5cm^2 fokussiert waren. Durch diese Anordnung war es möglich, die Probe optimal auszuleuchten und die Lumineszenz der gleichen Fläche anschließend mit dem Photomultiplier zu detektieren. Um eine Belichtung des Photomultiplier-Elements durch die LEDs zu verhindern, wurde zusätzlich ein Shutter (Uniblitz, VCM-D1) eingebaut, welcher für die Dauer der Belichtung geschlossen war (Luminometeranzeige gibt die Messwerte „0“ aus) und direkt nachfolgend öffnete.

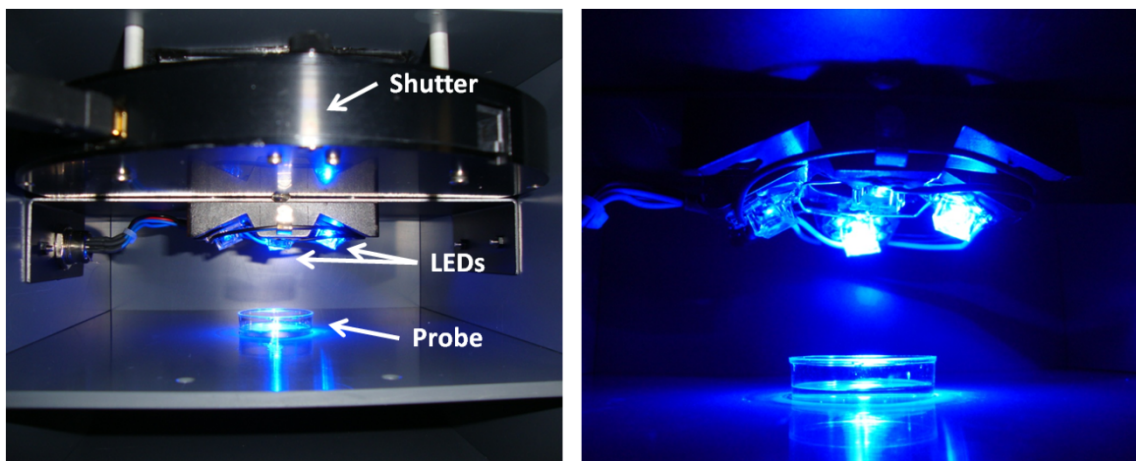


Abb. 2-5: Aufbau des Luminometer-Messplatzes

Die Steuerung der Messung über Shutter und LEDs erfolgte mit der Software Labview (National Instruments). Zur Aufzeichnung der Lumineszenz-Daten wurde die Software IGI-MPRS232 (IGI Systems) verwendet. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Origin Pro durchgeführt.

2.10.3 Durchführung der Messungen

Für die Protoplasten-Messungen aus Arabidopsis Col-0-Pflanzen wurde Aequorin-cDNA transient mit Chop2-YFP-cDNA einer der Mutanten kotransformiert (siehe 2.7.1).

Tab. 2-32: Zusammensetzung der W10-1K-Lösung

W10-1K-Lösung
4mM MES, pH5.7
10mM CaCl ₂
1mM KCl
0.52M Mannitol

Ein bis drei Tage nach der Transformation (dpt) wurden die Zellen auf Fluoreszenz überprüft, in der Messlösung gewaschen und mind. 3h vor der Messung im Messraum unter Dunkelheit inkubiert. Nach den Messungen musste auf die Quantifizierung des Calcium-Signals durch einen Discharge verzichtet werden, da das selbst gebaute Lumimeter keine Applikation von Messlösungen erlaubte und die Messung nach der manuellen Applikation der Lösung nur zeitverzögert erfolgen konnte.

2.11 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Aufnahmen der Fluorophor-Fusionskonstrukte (transient transformiert in Pflanzenzellen) erfolgten mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops (Leica TCS SP5) mit aufrechtem Mikroskopaufsatz. Als Anregungsquelle für Fluoreszenzproteine wurde ein Argon- und Helium/Neon-Laser verwendet.

2.11.1 Methode

Der Vorteil dieser Art der Mikroskopie im Gegensatz zur herkömmlichen Epifluoreszenz-Mikroskopie liegt in der definierten Bildakquisition aus einer Ebene, was einerseits durch die Eigenschaft des Laserlichts, das sowohl parallel ist als auch eine hohe

Intensität aufweist, und andererseits durch die Filterung des emittierten Lichts durch ein sogenanntes variabel verstellbares „Pinhole“ gewährleistet werden kann. Dies ermöglicht ein punktuell Abescannen der Probe, wobei die Lichtemission hauptsächlich aus einer definierten Ebene detektiert wird. Durch die Applikation von Bandpass- (BP) Filtern, durch die nur Licht einer bestimmten Bandbreite an Wellenlängen passieren kann, ist es zudem möglich, verschiedene Fluoreszenzemissionen (z. B. die von YFP und DsRed) zu trennen und in getrennten Kanälen aufzunehmen, um z. B. eine Kollokalisierung bestimmen zu können.

2.11.2 Bildakquisition

Für die Bildakquisition wurden, wie in Tab. 2-33 zu sehen, zwei verschiedene Objektive verwendet. Die Anregungswellenlängen (λ_{Ad}) bzw. die dazugehörigen Bandpassfiltereinstellungen sind ebenfalls der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 2-33: Technische Daten zur konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie

Objektive	Fluorophore	Laser (λ_{Ad})	BP-Filter
HCX PL APO CS 63.0x1.20 WATER UV	YFP	Argon (514nm)	520nm - 565nm
HCX PL APO CS 20.0x0.70 IMM UV	DsRed	Argon (514nm)	565nm - 660nm
	Autofluoreszenz (Chlorophyll)	Argon (514nm)	650nm - 700nm

Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software „Leica AF Lite 2.4.1“.

2.12 RNA-Sequencing

Um transkriptionelle Änderungen, die durch ChR2-Aktivität in transient transformierten Pflanzen entstehen, nachweisen und analysieren zu können, wurde innerhalb dieser Arbeit die Methode des RNA-Sequencings (RNA-Seq) angewendet. Diese hat im Gegensatz zu Microarray-Analysen die Vorteile, dass es hierbei nicht essentiell ist, die entsprechenden Genomsequenzen zu kennen, keine hohen Background-Level durch Cross-Hybridisierung entstehen und zudem eine quantitative Aussage über die Expressionslevel möglich ist (Wang et al., 2009).

2.12.1 Methode

Sowohl Organismen mit als auch ohne sequenziertes Genom konnten bisher erfolgreich durch Next Generation Sequencing (NGS) sowohl auf genomischer als auch auf transkriptioneller Basis untersucht werden. Im Gegensatz zur Sanger-Sequenziermethode ist es beim NGS möglich, DNA-Sequenzen direkt ohne vorherige Klonierung in Vektoren (cDNA-Bibliothek) zu sequenzieren. Den gängigen NGS-Methoden (454, Illumina, SOLiD, Ion Torrent) liegt eine Amplifikation der Ausgangsmoleküle durch „Emulsions- bzw. Festphasen-basierte PCR“ mit Fluoreszenz-markierten Oligo-/Terminator-Nukleotiden zugrunde, wodurch die Signalstärke erhöht wird (Brautigam & Gowik, 2010).

Im Tabakansatz dieser Arbeit wurde mit dem „Illumina Genome Analyzer“ sequenziert. Mittels dieser Methode werden über 100 Millionen sogenannter „short reads“ von bis zu 150 Nukleotiden generiert, mit denen eine Abdeckung von ca. 3-6 Gb pro Lauf geschaffen wird. Hiermit wird eine Genauigkeit von über 98.5% erreicht (Brautigam & Gowik, 2010). Diese Methode basiert auf der sogenannten „Bridge-PCR“, mit der fragmentierte, Adaptor-markierte DNA-Stücke, die über „Capture-Oligos“ an eine planare Oberfläche („flow cell“) gebunden wurden, amplifiziert werden. Hierbei dient die erste Kopie als Matrize, die erneut mit der Oberfläche durch ein komplementäres Oligo hybridisiert. Da die Primer an eine feste Oberfläche gebunden sind, kommt es so zu einem Cluster von bis zu 1000 Kopien. Nach Linearisierung werden die Cluster mit vier verschiedenen Fluorophoren markierten Nukleotiden sequenziert. Da diese am 3`-Ende terminiert sind, kann pro Zyklus nur ein Nukleotid eingebaut werden. Nach erfolgter Fluoreszenz-Messung wird das Fluorophor abgetrennt, wodurch das erneute Hinzufügen eines Nukleotids möglich wird. Hierdurch entstehen mehrere Millionen Cluster an definierten Flächen auf der Flow-Cell, die acht Spuren besitzt, um die Sequenzierung von acht Libraries gleichzeitig zu ermöglichen (Shendure & Ji, 2008).

Beim RNA-Sequencing wird Poly(A)-RNA aufgereinigt und in 200bp-Fragmente hydrolysiert. Nach Zugabe von Adapter-Molekülen erfolgt die cDNA-Synthese mit degenerierten Primern. Im Anschluss daran erfolgt die Sequenzierung wie oben beschrieben. Eine Sequenzierung ausgehend von sowohl 5`- als auch 3`-Adaptoren dient der Verifizierung der Daten. Diese können anschließend entweder mit bereits existierenden Genom-Daten bzw. mit Sequenzen von Spezies hoher Homologie (hier Tabak auf Tomate) gemappt werden (Simon et al., 2009).

2.12.2 Durchführung bzw. experimentelles Design

Um eine differentielle Expression von Genen aufgrund von artifiziell generierten Depolarisations-/Calcium-Mustern bestimmen zu können, wurden transient Chop2-exprimierende Tabakblattstücke generiert (siehe 2.7.3). Diese wurden am Vorabend des jeweiligen Experiments wie zur Vorbereitung für Einstichmessungen behandelt (siehe 2.9.5), wobei Lösung V als Inkubations- und Messlösung (+10 μ M Retinal) verwendet wurde.

Zwei unterschiedliche Blaulichtprotokolle, welche im Ergebnisteil eingehend beschrieben werden wurden mittels LEDs appliziert (siehe Tab. 2-31).

Tab. 2-34: Übersicht der BL-Behandlungen für Tabakblattscheiben

Bezeichnung	Lichtpulse
LP	1x 12min 45s (15s BL – 15s dunkel)
SPs	6x (15s BL – 10min dunkel)

Pro Behandlung wurden je drei Probensätze mit verschiedenen Pflanzen an unterschiedlichen Tagen gesammelt. Die Proben wurde jeweils 1.5h nach Beginn der Behandlung in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur RNA-Extraktion bei -80°C gelagert.

2.12.3 RNA Präparation

2.12.3.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem „RNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Eingesetzt wurden je Probe ca. 100mg Tabak-Blattmaterial.

2.12.3.2 DNase-Verdau

Da die RNA-Proben potentiell noch mit DNA kontaminiert sein können, wurde nach der RNA-Extraktion ein DNase-Verdau durchgeführt. Tab. 2-35 zeigt den hierfür verwendeten Reaktionsansatz:

Tab. 2-35: Ansatz für DNase-Verdau

RNA	2µg
DNase (Fermentas)	1µl
10X DNase Puffer (mit MgCl ₂)	2µl
DEPC-H ₂ O	
Gesamtvolumen	20µl

Die Proben wurden bei 37°C für 30min mittels einer DNase verdaut. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte mit 2.5mM EDTA (1µl, 50mM Stocklösung) bei 65°C für 10min.

Die Vollständigkeit des DNase-Verdau wurde durch eine PCR mit Tabak-Aktin-Primern ermittelt.

2.12.3.3 Qualitätskontrolle der RNA-Proben

Die Qualität der gewonnenen RNA-Proben wurde mit Hilfe der Kapillarelektrophorese ermittelt. Dies erfolgte unter Verwendung des „Experion™ RNA HighSens Analysis Kit“ (Bio-Rad Laboratories GmbH) mit Hilfe des Experion™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories GmbH, Software Version 3.0). Da die Sensitivität dieses Systems mit einer Untergrenze von 100pg/µl sehr hoch ist, reicht es aus, eine sehr geringe Menge der RNA-Probe einzusetzen. Die Messung erfolgte hierbei nach Angaben des Herstellers. Mit einem Auftrennungsbereich von 100-6000 Basen Länge konnte sowohl die Konzentration (relativ zum Marker) als auch die Qualität der RNA-Probe ermittelt werden, da hier im Gegensatz zur herkömmlichen Konzentrationsbestimmung (siehe 2.1.4) eine mögliche Degradation der RNA sichtbar wird. Zudem gaben die Größenverhältnisse der ribosomalen Peaks einen Aufschluss über die Qualität der RNA. Das Verhältnis dieser geht in die Berechnung des sogenannten RQI (RNA Quality Indicator, engl. für RNA-Qualitätsindikator) -Werts, der von der Software bestimmt wird, ein: Während ein Wert von 10 eine völlig intakte RNA anzeigt, stellt ein Wert von 1 eine stark degradierte RNA dar.

2.12.4 cDNA-Bibliothek und RNA-Seq

Sowohl die Herstellung der cDNA-Bibliothek als auch die Sequenzierung der RNA-Proben erfolgte durch die AG Weber (Universität Düsseldorf).

2.12.5 Bioinformatische Auswertung der RNA-Seq Daten

Die bioinformatische Auswertung der gewonnenen Datensätze wurde ebenfalls von der AG Weber (Universität Düsseldorf) durchgeführt.

Die durch RNA-Seq entstandenen Tabak-Sequenzen wurden auf *Solanum lycopersicum* (Tomate) mit einer theoretischen Homologie von mind. 80% gemappt.

Hierfür wurden die Sequenzen (Reads) mit Hilfe der Software BLAT (Kent, 2002) mit folgenden Parametern gemappt: $q=dnax$, $t=dnax$, $minIdentity=80$. Um die kodierenden Sequenzen von *S. lycopersicum* funktionell annotieren zu können, wurden diese nachfolgend mittels „blastx“ gegen Arabidopsis geblastet (Grenzwert: E-04). Von 28640 Loci konnten 1922 nicht annotiert werden. Die restlichen Sequenzen zeigten Treffer in Arabidopsis und wurden mittels TAIR10_Aug2012 annotiert.

Um die Expressionslevel zu ermitteln, wurden die Illumina Reads auf *S. lycopersicum* CDS (coding sequence, engl. für kodierende Sequenz) gemappt, wobei eine Übereinstimmung von 60-70% erreicht werden konnte, und deren Anzahl bestimmt. Um vergleichbare Probenwerte zu erhalten, wurden daher die daraus resultierenden absoluten Expressionslevel als „Reads per mappable million“ normalisiert.

Die statistische Evaluierung der Daten wurde mittels „DESeq package for R“ (Wang et al., 2009) durchgeführt, welches Wahrscheinlichkeitswerte (p-Werte) für die Signifikanz der differentiellen Genexpression liefert.

Da hier in einer Versuchsanordnung gleichzeitig tausende Genexpressionswerte verglichen werden, wurden außerdem sogenannte q-Werte angegeben, die nach Benjamini die Signifikanz für multiple Hypothesentests korrigieren (Benjamini & Yekutieli, 2005). Das Signifikanzlevel wurde auf $q < 0.01$ festgelegt. Der q-Wert bezeichnet den sogenannten korrigierten p-Wert, wird im Englischen auch als „False Discovery Rate“ (FDR) benannt und definiert die Rate an Falsch-Positiven, die als akzeptabel angesehen wird.

Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Enrichment-Analysen basieren auf Referenzdaten aus Navarro et al. (2004b), Thilmony et al. (2006) und Walley et al. (2011). Das Enrichment wurde mit Hilfe des Fisher's Exact Tests (Fisher, 1922) mit Bonferroni-Korrektur (Dunn, 1961) berechnet.

3 Ergebnisse

Um sowohl elektrische als auch Calcium-basierte Signale artifiziell in Pflanzen erzeugen zu können, wurden neben dem ChR2-Wildtypprotein vier weitere ChR2-Varianten verwendet, die sich durch jeweils einen Aminosäureaustausch unterschieden: C128T (Cystein zu Threonin), C128A (Cystein zu Alanin), D156A (Aspartat zu Alanin) und L132C (Leucin zu Cystein). Die angegebene Zahl zwischen den ausgetauschten Aminosäuren kennzeichnet die Position der AS in der Proteinsequenz. Durch die Mutationen wurden die Eigenschaften des Blaulicht-gesteuerten Kanals moduliert. Während der praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation wurden die Mutanten C128A/T 2009 (Berndt et al., 2009), D156A 2010 (Bamann et al., 2010) und die sogenannte CatCh (Calcium translocating ChR)-Mutante L132C 2011 (Kleinlogel et al., 2011a) veröffentlicht. Mit Hilfe der L132C-Mutante sollte das Spektrum der artifiziell erzeugten, BL-induzierten Signalmuster in Pflanzen erweitert werden, um die mögliche Generierung von Calcium-Signalen zu verbessern. Ein Strukturmodell, das die Positionen dieser Aminosäuren im ChR2-Protein beschreibt, ist in Kato et al. (2012) dargestellt.

3.1 Vorarbeiten – Oozyten

Die Vorarbeiten zur Charakterisierung der innerhalb dieser Arbeit verwendeten ChR2-Mutanten in *Xenopus*-Oozyten wurden von Dr. Ronnie Gueta und Sabrina Förster (Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg) durchgeführt. Die Messungen an *Xenopus*-Oozyten wurden mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (TEVC, engl. two electrode voltage clamp) durchgeführt. Hierbei wurde cRNA (copy-RNA) der Chop2-YFP-Sequenz in Oozyten injiziert und diese 3-4d zur Expression mit 10 μ M Retinal inkubiert. In den anschließenden Messungen wurde ein BL-Puls appliziert und die Strom-Amplitude am Ende dieses Pulses für die statistische Auswertung abgegriffen.

3.1.1 Expression und Lokalisation von ChR2-YFP in Oozyten

Die Expression von ChR2 in Oozyten wurde durch eine aminoterminal translationale Fusion der Chop2-CDS mit YFP visualisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression des WT-Chop2-Proteins die Anwesenheit von Retinal erforderte, während

die Expression der Chop2-Mutanten grundsätzlich unabhängig von einer zusätzlichen Retinal-Gabe war (siehe Abb. 3-1).

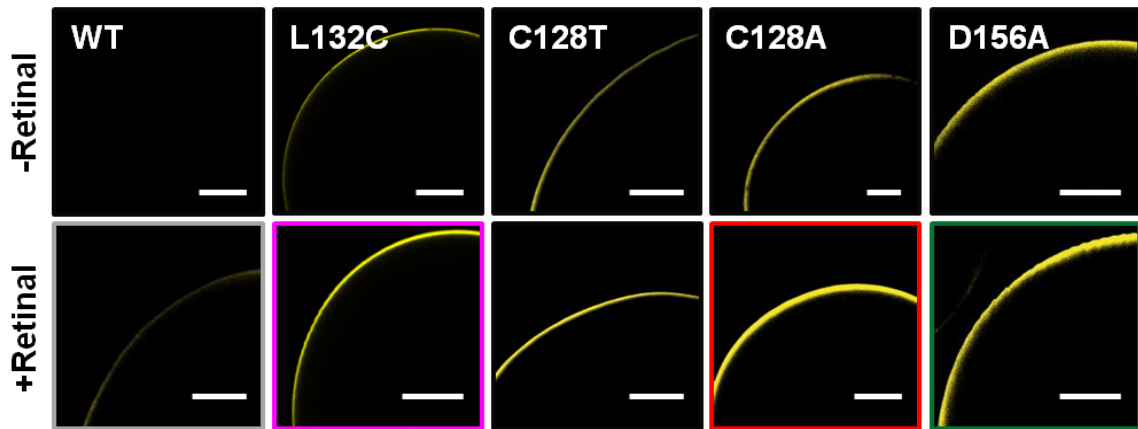


Abb. 3-1: ChR2-YFP Fluoreszenz in Xenopus-Oozyten: WT-ChR2 (grau), L132C (pink), C128T (schwarz), C128A (rot) und D156A (grün); +/- 10 μ M Retinal (zusätzlich); 3d nach RNA-Injektion (Fluoreszenzaufnahmen von Dr. Ronnie Gueta und Sabrina Förster, Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg)

Grundsätzlich konnte zudem eine höhere Fluoreszenz der ChR2-Mutanten im Vergleich zum WT-Protein bei Retinal-Applikation beobachtet werden. Die farbliche Umrandung der Fluoreszenzaufnahmen korreliert hierbei mit den in Abb. 3-3 gezeigten elektrophysiologischen Daten.

3.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der ChR2-Mutanten in Xenopus-Oozyten

Nachdem die Expression der ChR2-Proteine in Xenopus-Oozyten erfolgreich gezeigt werden konnte, erfolgte die elektrophysiologische Charakterisierung dieser mit der TEVC-Technik.

Die Beschreibung der elektrophysiologischen Eigenschaften der ChR2-Mutanten basiert auf der in Abb. 3-2 schematisch dargestellten Stromantwort des WT-ChR2-Proteins: Die schnelle, Blaulicht-initiierte Aktivierung des Kanals führt zu einem Peakstrom (grün), der noch während des Lichtpulses inaktiviert (gelb) und so auf einen stationären, sogenannten Steady-State-Strom abfällt. Nach Beendigung des Blaulichtpulses deaktiviert (rot) ChR2 (WT) sofort, was zu einem vollständigen Schließen des Kanals führt.

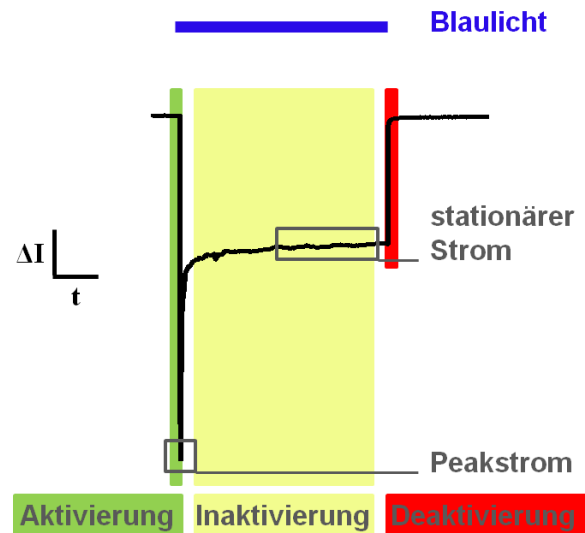


Abb. 3-2: Schematische Darstellung der Phasen der Blaulicht-aktivierten Stromantwort von ChR2 (WT, Stromspur in schwarz) in Xenopus-Oozyten

Basierend auf der stabilen Expression der C128T/A und D156A Mutanten, wurden diese zunächst im direkten Vergleich zum WT-Protein elektrophysiologisch charakterisiert. Hierbei konnte eine maximale initiale Stromantwort direkt nach Belichtung für C128A, gefolgt von D156A und C128T gemessen werden (siehe Abb. 3-3). Sowohl beim WT-ChR2 als auch der L132C-Mutante konnte ein hoher Peakstrom beobachtet werden, welcher jedoch nach wenigen Millisekunden inaktivierte. In den Mutanten C128A und D156A war dieser Peakstrom fast gänzlich verschwunden, während C128T diesen noch verlangsamt zeigte, um dann ebenfalls auf einen Gleichgewichtsstrom (engl. steady-state) abzufallen. Die CatCh-Mutante L132C wies eine zum WT vergleichbare Kinetik auf, jedoch zeigte sich der stationäre Strom als ca. 2.5-fach erhöht.

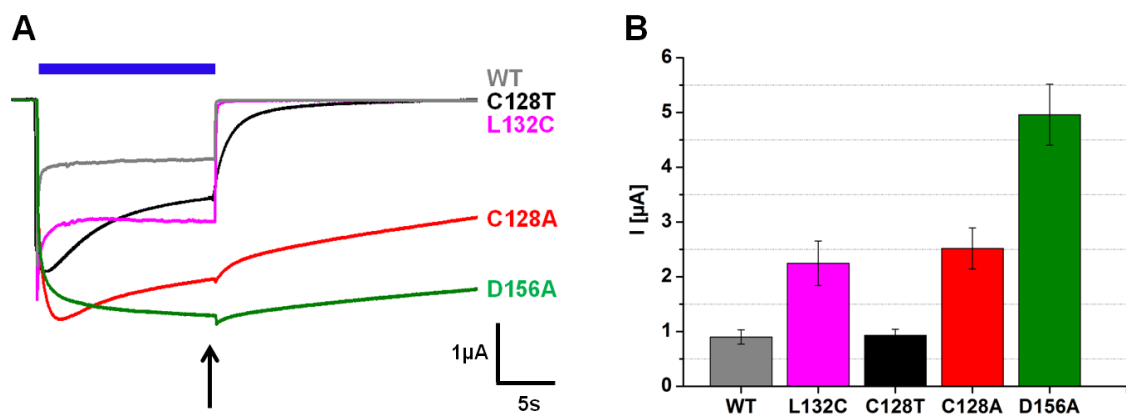


Abb. 3-3: TEVC-Messungen an Xenopus-Oozyten – WT, L132C, C128T/A, D156A (mit C-terminalem YFP); 15s BL; in Ringerlösung (CaCl₂ ersetzt durch 2mM BaCl₂); Haltepotential bei -100mV: A) Rohspuren und B) Statistische Auswertung: angegeben wurden Stromwerte kurz vor Abschalten des BLs, siehe Pfeil in A) (Sabrina Förster, Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg)

Aus der obigen Abbildung ist bereits erkennbar, dass C128T eine im Vergleich zum WT verlangsamte Schließkinetik aufwies, hier in Tab. 3-1 als τ_{off} dargestellt. Dies entspricht der Zeitdauer, in der $1/e$ (ca. 70%) aller Kanäle geschlossen sind. Die Mutanten C128A und D156A schlossen noch sehr viel langsamer mit τ_{off} -Werten von 39s bzw. über 150s, während sich L132C in dieser Hinsicht nur gering vom WT unterschied. Daher erreichten die Mutanten C128A/T und D156A während der Blaulichtgabe von 15s im Vergleich zum WT-ChR2 sowie L132C nur eine Art „quasi-stationären“ Strom, der auf keinen konstanten Wert inaktivierte.

Die veränderte Kinetik der „langsameren“ Mutanten spiegelte sich auch in deren Blaulichtsensitivität wider, die negativ mit der Schließkinetik korrelierte und deren $J_{0.5}$ -Werte (halb-saturierende Lichtintensität), im Vergleich zum WT, ungefähr 20-70x erhöht waren.

Tab. 3-1: Gegenüberstellung WT-ChR2 und Mutanten
(aus Bamann et al., 2010; Kleinlogel et al., 2011a)

ChR2	τ_{off} [ms]	$J_{0.5}$ [mW/mm ²]
WT	10	0.7
C128T	1.7*10 ³	0.03
C128A	3.9*10 ⁴	0.01
D156A	>1.5 *10 ⁵	0.01
L132C	16	0.7

Die Mutationen C128A/T und D156A führen demzufolge zu einer erhöhten Lichtsensitivität bei verzögerter Schließkinetik (Bamann et al., 2010; Berndt et al., 2009). Diese Eigenschaft ist für neurologische Experimente von Nachteil, da diese Mutanten keine Generierung definierter, kurzer Membranpotential-Spikes (ms-Bereich) ermöglichen. Für die Forschungsarbeiten dieser Doktorarbeit bot diese Eigenschaft jedoch folgenden Vorteil: Elektrische Signale in Pflanzen finden, im Vergleich zum tierischen System, auf einer langsameren Zeitskala statt. Dadurch sollte es möglich sein, über diese Mutanten mit wenigen Lichtpulsen lang-andauernde Signale zu erzeugen. Zum anderen sollte besonders das langsame Schließverhalten der Mutanten C128A und D156A nützlich für die geplanten Calcium-Messungen sein. Da diese an Aequorin-Pflanzen erfolgen sollten (siehe 3.4), ergab sich ohnehin die Schwierigkeit einer Signaldetektion über Lumineszenz („photon counting“), aufgrund der möglichen Überlappung der Lichtaktivierung von ChR2 mit der Aequorin-basierten Lichtemission. Als Folge dessen

waren eine simultane Stimulusapplikation und Messungen der Calcium-Änderung nicht möglich. Dies sollte durch die Verwendung von Mutanten mit langsamer Schließkinetik umgangen werden, die auch nach Beendigung der Blaulichtgabe noch aktiv sind und somit eine Aequorin-Messung nach BL-Applikation ermöglichen. Zusätzlich war die erhöhte Lichtsensitivität von Vorteil, da Pflanzenzellen eigene Blaulicht-Rezeptoren und -Signalwege besitzen. Die Verwendung möglichst geringer Lichtintensitäten sollte die Aktivierung pflanzenspezifischer Signalwege minimieren. Aber auch für geplante Calcium-Messungen an intakten, transgenen Chop2-Pflanzen könnten Licht-sensitive Mutanten von Vorteil sein, da hierdurch eine größere Anzahl von Zellschichten durch die externe Blaulicht-Applikation stimuliert werden könnte.

Darüber hinaus konnte durch Bamann et al. festgestellt werden, dass das Schließen der Mutanten C128A und D156A durch die Applikation von Grünlicht beschleunigt werden konnte (Bamann et al., 2010; Bamann et al., 2008). Dies beruht auf der Tatsache, dass im Offenstatus sogenannte spektrale Photointermediate entstehen. Diese bilden einen Photozyklus, in dem ChR2 nach der Anregung durch Blaulicht, vom Grundstadium P_0 ausgehend, zyklisch die Stadien P_{1-4} durchläuft (Bamann et al., 2008). Dabei bildet die Umwandlung von P_4 zum Grundstadium von ChR2 mit 5s den zeitkritischsten Schritt. Über eine Art „short-cut“-Mechanismus lässt sich dieser durch die Applikation von Grünlicht umgehen, wodurch P_3 direkt in den geschlossenen, wieder anregbaren Grundzustand überführt werden kann. Auch diese Eigenschaft könnte in der exakten Simulation von elektrischen bzw. Calcium-Signalen in Pflanzen hilfreich sein.

3.2 Transiente Transformation in Pflanzen – Lokalisation von Chop2/ChR2

Zu Beginn dieses Projektes stellten sich grundlegende Fragen in Bezug auf die Expression von Chop2 in Pflanzen:

- Ist eine Expression von Chop2 in Pflanzen generell möglich?
- Ist hierbei die Anwesenheit von Retinal essentiell?
- In welcher Form lässt sich Retinal applizieren?

ChRs benötigen *all-trans* Retinal für ihre Funktion. Hierbei erwies sich sogar deren Expression Retinal-abhängig, was sich in der heterologen Expression des WT-ChR2 in *Xenopus*-Oozyten zeigte (siehe 3.1.1). Bestimmte Mutationen scheinen diesen Effekt

jedoch zu verringern bzw. zu verhindern. Die Problematik der Retinal-Applikation stellt sich im tierischen System nicht, da bisher alle getesteten Gewebetypen von Vertebraten intrinsisches Retinal in ausreichender Menge enthielten und eine externe Zugabe somit unnötig war (Yizhar et al., 2011). Da die Existenz von Retinal in Pflanzen jedoch nicht bekannt ist, musste auf eine externe Zugabe von Retinal zurückgegriffen werden.

In Anlehnung an die Oozyten-Experimente sollte die Lokalisation von Chop2 bzw. der Mutanten mit Hilfe einer C-terminalen YFP-Fusion sowohl in *Arabidopsis* als auch in Tabak untersucht werden. Für Calcium-Messungen (basierend auf einer Kotransformation mit Aequorin) wurde die PEG-vermittelte Transformation von Mesophyll-Protoplasten (siehe 2.7.1) eingesetzt. Da deren weitere elektrophysiologische Untersuchung jedoch nur im Einzelzellsystem möglich ist, wurde zum anderen die Methode der Agrobakterien-vermittelten Transformation von *Arabidopsis*-Keimlingen (siehe 2.7.2) und Tabak-Blättern (siehe 2.7.3) angewendet. Hierbei werden Epidermis- und Mesophyllzellen der Kotyledonen bzw. Blätter transformiert, welche sich zur elektrophysiologischen Untersuchung mittels der Einstich-Technik eignen (siehe 2.9).

3.2.1 Lokalisation von Chop2/ChR2 in *Arabidopsis*

Die Ergebnisse der Transformationen von *Arabidopsis* sind in Abb. 3-4 dargestellt.

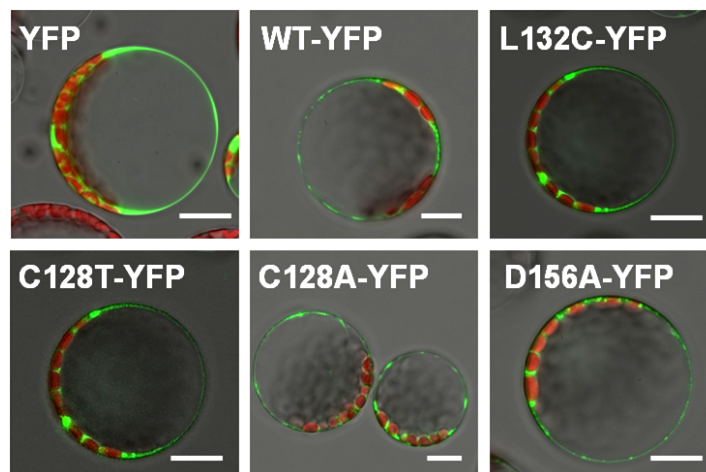


Abb. 3-4: Mesophyll-Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* Col-0-Pflanzen (5 Wochen) – transformiert mit YFP, WT-Chop2-YFP, L132C-YFP, C128T-YFP, C128A-YFP, D156A-YFP (alle in pUBQ10); 1dpt; YFP-Fluoreszenz in grün, Autofluoreszenz der Chloroplasten in rot dargestellt (Maßstab 10µm)

Die Expression aller Chop2-Konstrukte in *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten war erfolgreich, wobei die Applikation von Retinal (10µM) in der Übernacht-Lösung keinen verstärkenden Effekt auf das Expressionsniveau aller Konstrukte aufwies (Daten nicht

gezeigt). In diesem Zusammenhang war besonders interessant, dass eine Expression des WT-Chop2-Proteins in Protoplasten auch ohne zusätzliche Retinal-Gabe nachgewiesen werden konnte. Typisch für viele Membranproteine zeigten alle Chop2-Proteine eine deutlich geringere Expression im Gegensatz zur YFP-Kontrolle.

Auch in Arabidopsis-Keimlingen konnte Chop2/ChR2-YFP exprimiert werden. Im Gegensatz zu Mesophyll-Protoplasten wurde diese Methode nur für das Konstrukt pMDC32/C128T-YFP angewandt.

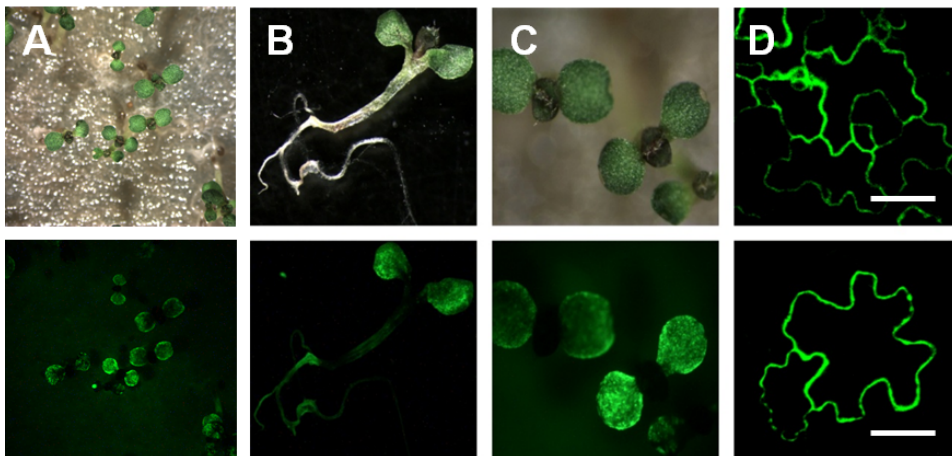


Abb. 3-5: Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* Landsbergis, transformiert mit C128T-YFP (in pMDC32), 5dpt; A), B) und C) Durchlicht (oben) und Fluoreszenzaufnahme (unten, YFP-Fluoreszenz in grün dargestellt) mit Binokular; D) LSM-Aufnahmen von Epidermiszellen der Kotyledonen (Maßstab 10µm)

Mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie konnte eine deutliche, von Retinal unabhängige Expression des Fusionsproteins C128T-YFP in Epidermiszellen beobachtet werden.

Infolge der Überexpression war mit beiden Methoden und allen Chop2-Varianten eine starke Überladung des Translokationsapparats (Golgi und ER) ersichtlich, so dass wahrscheinlich nur ein geringer Proteinanteil tatsächlich in der Plasmamembran lokalisierte. Die zusätzliche Applikation von Retinal (100µM, gesprüht) hatte weder einen Einfluss auf die Expressionsstärke noch auf die Lokalisation.

3.2.2 Lokalisation von Chop2/ChR2-YFP in Nicotiana

Da Expressionsqualität und -quantität zwischen pflanzlichen Systemen variieren können, wurde die Expression und Lokalisation von Chop2 ebenfalls im Tabak untersucht.

3.2.2.1 Expression und Kolokalisation mit Remorin

Nicotiana benthamiana-Blätter eignen sich besonders gut für eine Transformation durch Agrobakterien mittels Infiltration (siehe 2.7.3). Hierbei entstehen lokal runde Bereiche, in denen die Transformation von Epidermis und Mesophyllzellen stattfindet (siehe Abb. 3-6).

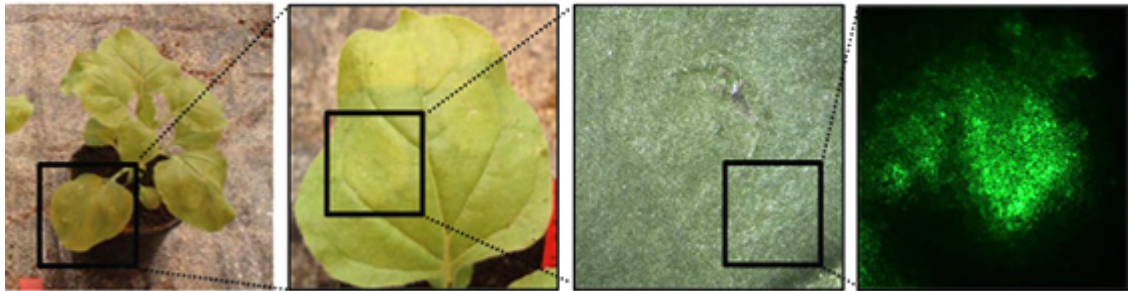


Abb. 3-6: Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*-Blättern (5 Wochen) mit Agrobakterien (Konstrukt: pMDC32/C128T-YFP), 3dpi

Zwei bis sechs Tage nach der Infiltration (2-6dpi) konnte die Expression des Chop2-Fusionsproteins anhand der YFP-Fluoreszenz detektiert werden. Nach dieser Zeit wurden die infiltrierten Blattteile nekrotisch. Die höchste Fluoreszenz (und damit beste Proteinexpression) war 3-4dpi sichtbar. Abb. 3-7 zeigt die mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop angefertigten Fluoreszenzaufnahmen von Blattscheiben 3dpi. Infiltriert wurden die Chop2-YFP Konstrukte des WTs, C128T, C128A, D156A und YFP als Kontrolle. Die untere Reihe der Abbildung zeigt eine Kolokalisation der Konstrukte mit DsRed-*AtRem1.3* durch Koinfiltration, um die Lokalisation von Chop2 in der Plasmamembran zu verifizieren. *AtRem1.3* ist ein Remorin-Protein aus Arabidopsis, welches in sogenannten „Lipid Rafts“, also Membrandomänen angereichert ist und somit als PM-Marker diente (Mongrand et al., 2004).

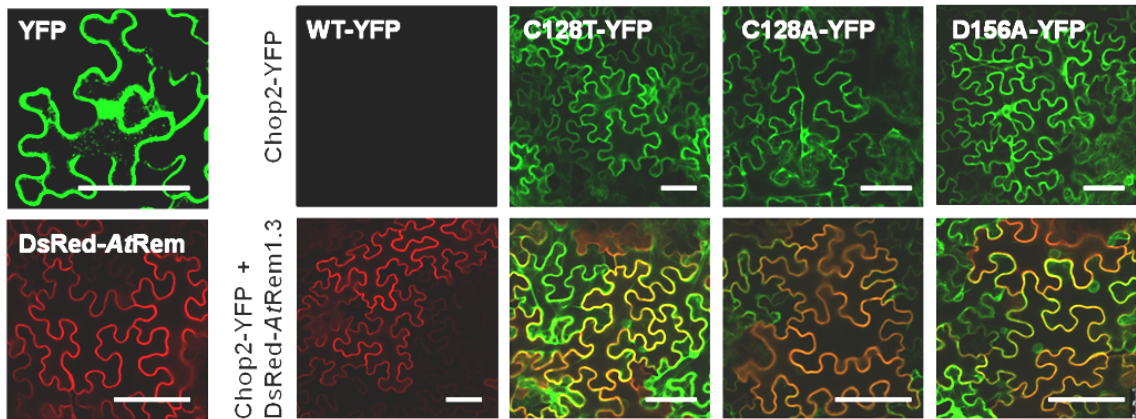


Abb. 3-7: *Nicotiana benthamiana*-Blattbereiche, transformiert mit Agrobakterien (Konstrukte: YFP, WT, C128T, C128A, D156A: alle als YFP-Fusionskonstrukte in pMDC32); 3dpi; untere Reihe: Kotransformation der Konstrukte mit pCAMBIA/DsRed-*AtRem1.3* (Maßstab = 50 μ m)

Auffällig bei diesen Untersuchungen war, dass ein Unterschied im Expressionslevel zwischen den Mutanten im Tabak im Gegensatz zu Arabidopsis-Protoplasten bestand: C128T und D156A zeigten eine deutliche Fluoreszenzintensität, während bei C128A nur eine schwache Fluoreszenz detektiert werden konnte. Bei allen Chop2-Mutanten wurde jedoch eine im Vergleich zur YFP-Kontrolle deutlich schwächere Fluoreszenz beobachtet. In Abwesenheit von Retinal konnte die Expression des WT in diesem Expressionssystem nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund deckte sich mit Ergebnissen aus Arbeiten an Oozyten (siehe 3.1.1). Die in Abb. 3-8 dargestellte Kolo­kalisierung der Fluoreszenzintensitäten von DsRed-*AtRem1.3* und D156A-YFP in einem Durch­schnitt durch Membranen zeigt zum einen die Plasmamembran-Lokalisation von Chop2, zum anderen aber auch deutlich die Überladung des Translokationsapparats, wie schon in Arabidopsis-Protoplasten beobachtet.

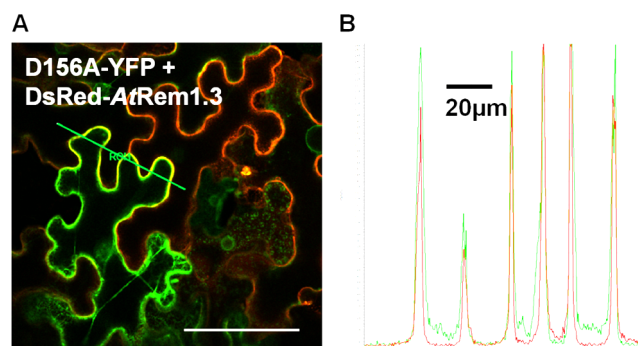


Abb. 3-8: Kolo­kalisierung von D156A-YFP mit DsRed-*AtRem1.3* in transformierten *N. benthamiana*-Blättern (3dpi); A) Fluoreszenzaufnahme mit kLSM (Maßstab 50 μ m) und B) Grafik der Fluoreszenzintensitäten aus der mit grüner Linie in A) gekennzeichneten ROI (region of interest), von links nach rechts aufgetragen: grün=D156A-YFP, rot= DsRed-*AtRem1.3*

3.2.2.2 Proteinnachweis in mikrosomaler Fraktion

Um neben der Fluoreszenz einen weiteren Nachweis für die Expression der Chop2-Varianten und deren Lokalisation im Tabak zu erhalten, wurde die mikrosomale Fraktion, d. h. Proteine der gesamten Membranfraktion aus infiltrierten Tabak-Blattstücken, aufgereinigt (siehe 2.8). Als Positiv-Kontrolle diente die lösliche cytosolische Fraktion der mit YFP infiltrierten Pflanzen. Die Proben wurden über SDS-Gele aufgetrennt, um anschließend eine Coomassie- sowie eine sensitivere Silberfärbung als auch einen Western-Blot anfertigen zu können, welche in Abb. 3-9 zu sehen sind. Die Detektion der Proteine im Western-Blot erfolgte über einen YFP-Antikörper, an welchen ein sekundärer, HRP-gekoppelter Antikörper band, wodurch die Proteinbanden über Lumineszenz durch Zugabe von Luminol und H_2O_2 sichtbar gemacht werden konnten (siehe 2.8.4).

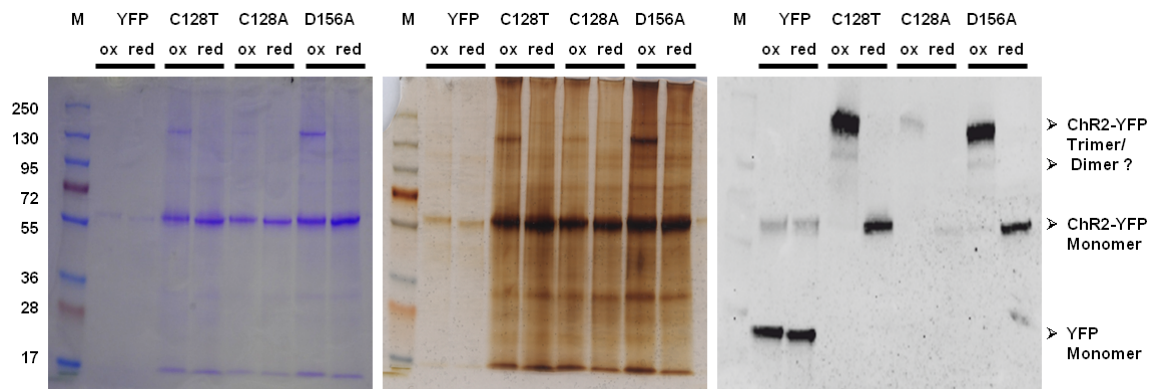


Abb. 3-9: SDS-Gele: Coomassie-(links)/Silberfärbung (Mitte) und Western-Blot (rechts) – aufgetragen wurden 20 μ l Probenmaterial aus transformierten *N. benthamiana* Blattstücken (3dpi): YFP, C128T, C128A, D156A (alle in pMDC32, mit C-terminalem YFP), +10 μ M Retinal, mit ox./red. Probenpuffer, Antikörper gegen YFP, sekundärer Antikörper HRP-gekoppelt; Marker (M) in kDa

Sowohl auf dem Coomassie- als auch auf dem Silbergel waren die YFP-Dimer- (54kDa) sowie Chop2-YFP-Monomer- (62kDa) und Chop2-YFP-Homomer-Banden (Dimer 124kDa bzw. Trimer 186kDa) bereits deutlich zu sehen, wohingegen Banden intrinsischer Proteine im Coomassiegel nur sehr schwach und im Silbergel in geringer Stärke im Vergleich zu den überexprimierten Proteinen detektierbar waren. Die in Abb. 3-7 beobachteten Fluoreszenzunterschiede manifestierten sich auch in der Signalintensität der Proteinbanden im SDS-PAGE: Während C128T und D156A eine vergleichbare Bandenstärke aufwiesen, waren bei C128A deutlich schwächere Banden detektierbar. Dieser Unterschied wurde noch deutlicher im Western-Blot.

Die bei YFP beobachtete Dimerisierung wurde durch SDS weitgehend zerstört. Im Gegensatz dazu bildete Chop-YFP unter oxidierenden Verhältnissen ein sehr stabiles Di-

mer bzw. möglicherweise sogar Trimer aus, was durch die Applikation von reduzierenden Reagenzien im Probenpuffer verhindert wurde. Die Banden im Western-Blot weisen auf eine Dimer-/Trimerbildung über Cysteinbrücken hin und zeigen, dass ChR2 wahrscheinlich als Homomer fungiert. Eine genaue Analyse, die einen Aufschluss über eine Dimer- oder Trimerbildung geben könnte, war jedoch mit dieser Art von Gel nicht möglich. Ein Einfluss von YFP im Fusionsprotein kann ausgeschlossen werden, da bei der YFP-Kontrolle kein Einfluss des Probenpuffers auf die Multimerisierung festgestellt werden konnte. Hierbei war jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen Coomassie-/Silbergel und Western-Blot zu beobachten: Während das Monomer (27kDa) im Western-Blot stark gegenüber der Dimerbande (54kDa) dominierte, war diese im Coomassie- bzw. Silbergel nicht detektierbar.

3.3 ChR2-Funktion in Pflanzen

Nachdem die erfolgreiche Expression der Chop2/ChR2-Mutanten C128A/T und D156A gezeigt werden konnte, sollte nun die Funktion von ChR2 in Pflanzen nachgewiesen werden bzw. die bereits in Oozytenexperimenten bestimmten Eigenschaften der Mutanten untersucht werden. Folglich wurden transient mit Chop-YFP-Fusionskonstrukten transformierte Arabidopsis-Kotyledonen sowie infiltrierte Tabakblattstücke elektrophysiologisch durch Einstichmessungen an Mesophyllzellen untersucht. Da Mesophyllzellen elektrisch durch Plasmodesmata gekoppelt sind, konnte keine Spannungsklemme durchgeführt werden, weshalb in diesen Messungen das freilaufende Membranpotential aufgezeichnet wurde.

Durch die Lokalisationsexperimente wurde bereits ersichtlich, dass die Anwesenheit von Retinal für die Expression von Chop2 lediglich beim WT-Protein essentiell war. Daher stellten sich folgende Fragen:

- Wie kann Retinal, das für die Funktion von ChR2 essentiell ist, appliziert werden, um eine funktionelle Rekonstitution von Chop2 mit Retinal zu ermöglichen?
- Spiegeln sich die unterschiedlichen Expressionsniveaus der Mutanten in den Messungen wider?
- Welchen Effekt hat die Applikation von BL auf Kontrollen?

- Ist es möglich, mit unterschiedlichen BL-Pulsen definierte Depolarisationen zu erzeugen? Falls ja, können einheitliche, repetitive Pulse erzeugt werden?
- Ist darüber hinaus eine Simulation von Depolarisationen als Bestandteil der pflanzlichen Reaktion auf abiotische/biotische Stimuli möglich?
- Welche Ionen bilden die Basis der möglichen Depolarisation?

In allen folgenden Einstichmessungen wird die Blaulicht (BL)-Applikation durch einen blauen Balken über der Messung angezeigt.

3.3.1 Funktionsbeweis in Arabidopsis-Keimblättern

Die ersten Einstichmessungen wurden an transient mit C128T-YFP transformierten Arabidopsis-Keimblättern (siehe 2.7.2) durchgeführt. Diese wurden 3-4dpt auf YFP-Fluoreszenz untersucht, mit doppelseitigem Klebeband auf den Messschälchen befestigt und o/n in 100 μ M Retinal-haltiger Lösung im Dunklen inkubiert (siehe 2.9.5). Bei den am folgenden Tag erfolgten elektrophysiologischen Messungen konnte eine sehr schnelle Depolarisation des Membranpotentials um ca. 13mV bei Applikation von BL festgestellt werden (siehe Abb. 3-10 B). Entsprechende Kontrollen zeigten diese schnelle Antwort nicht, allerdings konnte eine langsamere Depolarisation um ca. 3mV beobachtet werden (siehe Abb. 3-10 A).

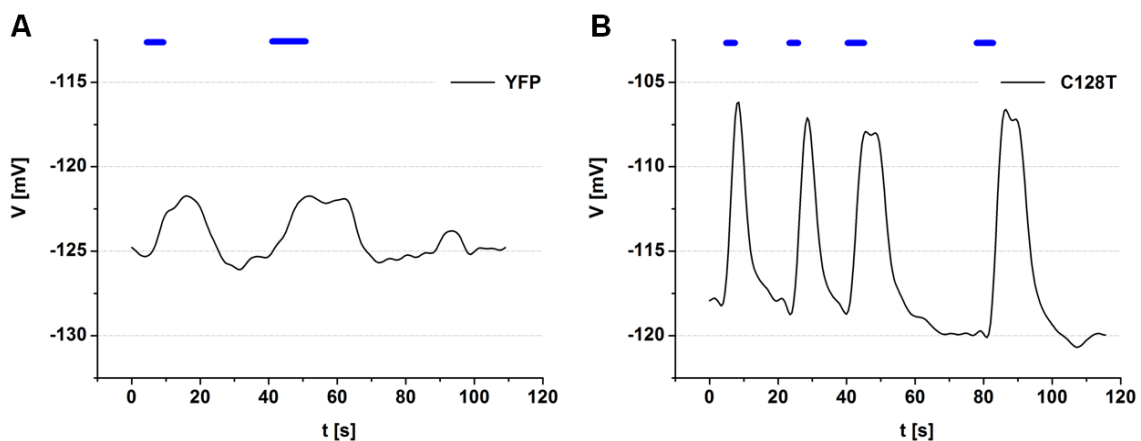


Abb. 3-10: BL-induzierte Membranpotentialänderung in mit A) YFP und B) C128T-YFP transient transformierten *A. thaliana*-Kotyledonen (Agrobakterieninfiltration, pMDC32), Retinal (100 μ M); 5dpi; in 5mM KCl/1mM CaCl₂/10mM MES, pH 6

Leider wies die durch ChR2 induzierte Depolarisation nur eine geringe Amplitude auf, weshalb keine weiteren Mutanten in diesem System getestet wurden. Jedoch konnte hiermit erstmalig gezeigt werden, dass ChR2 in Pflanzen funktionell war und somit

auch die Rekonstitution von Retinal zumindest partiell erfolgreich war. In Messungen mit C128T konnte ohne Retinal-Gabe ein zu YFP-Kontrollen vergleichbares Ergebnis beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Funktionsnachweis im Tabak

Die infiltrierten Blattstücke der transformierten *N.benthamiana*-Blätter wurden ebenfalls elektrophysiologisch untersucht. Auch hier wurden die Proben zu Anfang o/n in einer 100 μ M-Retinal-haltigen Lösung (siehe 2.9.5) inkubiert und am Folgetag gemessen. Nach Expression der C128A-Mutante konnten in Tabak-Mesophyllzellen BL-vermittelte Depolarisationen des Membranpotentials gemessen werden, die im Maximum einen Spitzenwert von nahezu 120mV aufwiesen (siehe Abb. 3-11). Diese Experimente zeigten auch, dass das Tabak-Expressionssystem wesentlich besser geeignet war als das Arabidopsis-Kotyledonen-System. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass exogen appliziertes Retinal für die gemessenen maximalen Depolarisationen erforderlich war, da in C128A-YFP exprimierenden Kontrollzellen ohne Applikation von Retinal eine weitaus geringere Depolarisation von lediglich 10mV gemessen werden konnte (siehe Abb. 3-11).

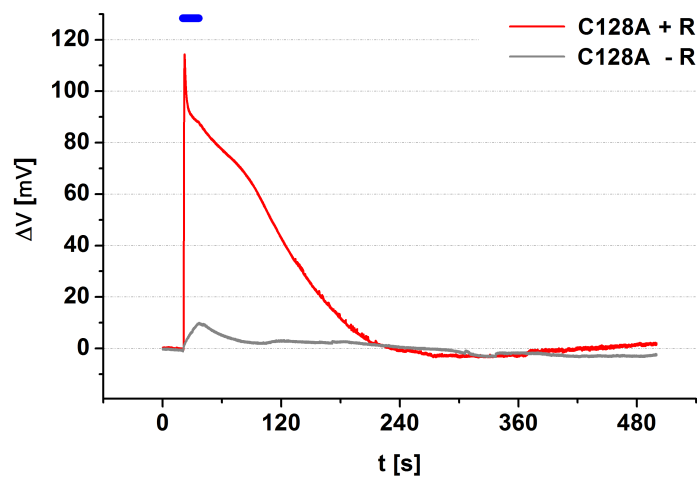


Abb. 3-11: BL-induzierte Membranpotentialänderung in mit C128A-YFP transformierten *N.benthamiana*-Blattstücken; Retinal +/- 100 μ M; 3dpi; 15s BL; in 1mM KCl/1mM CaCl₂/10mM MES, pH6

Weitere Messungen zeigten, dass die Konzentration von Retinal, wie in Oozyten-Experimenten, von 100 μ M auf 10 μ M bei gleichbleibender Depolarisationsamplitude gesenkt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Um herauszufinden, welche Zeitdauer zur vollständigen Rekonstitution des Retinals im Chop2-Protein nötig war, wurden Blattstücke ausgeschnitten und für 3h in Standardlösung vorinkubiert. Anschließend wurde Retinal zugesetzt und in definierten Abständen BL-induzierte Depolarisationen erzeugt, um die „Reifung“ des ChR2-Proteins nachvollziehen zu können.

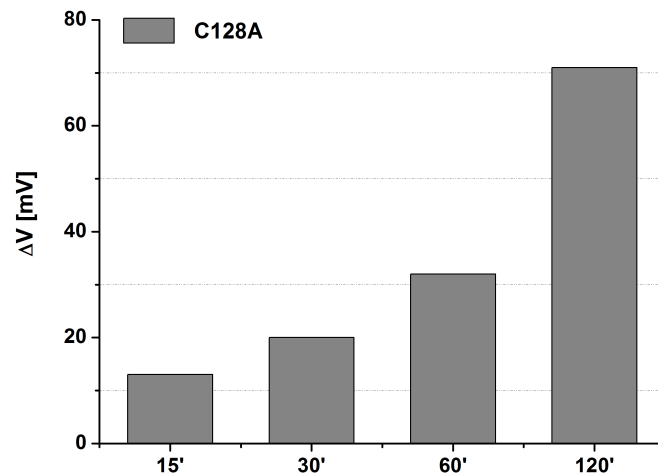


Abb. 3-12: Zugabe von Retinal bei Messung – BL-Applikation nach 15min, 30min, 1h und 2h Inkubation; BL-induzierte Membranpotentialänderung in mit C128A-YFP transformierten *N.benthamiana*-Blattstücken (dargestellt ist ΔV_{\max}); 10 μ M Retinal; 3dpi; je 15s BL; in 1mM KCl/1mM CaCl₂/10mM MES, pH6. Da das Experiment nur zwei Mal durchgeführt wurde, fehlen in dieser Abbildung Fehlerbalken.

Hierbei konnte beobachtet werden, dass eine Inkubation für mind. 2h erforderlich war, um eine ausreichende Menge an Chop2-Protein zu rekonstituieren.

3.3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung der ChR2-Mutanten im Tabak

Nachdem die grundlegende Funktion von ChR2 in Pflanzen bestätigt werden konnte und sich das Tabaksystem gut für elektrophysiologische Messungen eignete, wurden die Mutanten C128A/T und D156A in diesem System näher untersucht.

3.3.3.1 Höhe des Signals - Amplitude der Membranpotentialänderung

Um die durch BL ausgelöste Depolarisation in allen Mutanten gegenüberzustellen, wurden diese 15s mit BL behandelt und die maximal induzierte Amplitude gemessen. Abb. 3-13 und Abb. 3-14 zeigen das Ergebnis dieser Messungen:

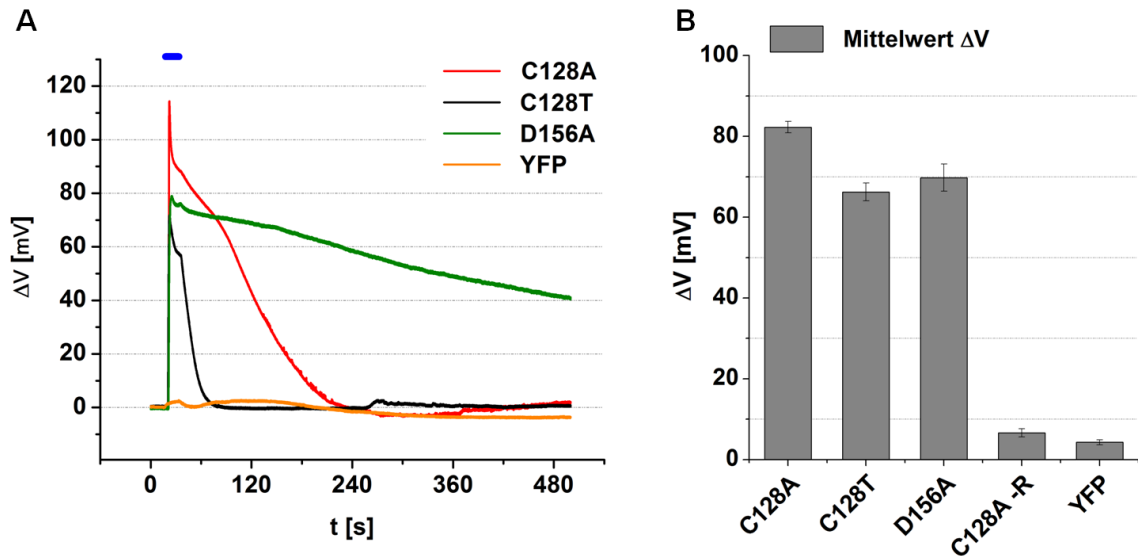


Abb. 3-13: BL-induzierte Depolarisation in transformierten Tabakblattstücken – ChR2-Mutanten (ChR2-YFP) mit YFP-Kontrolle; 3dpi; in 1mM KCl/1mM CaCl₂/10mM MES, pH6; A) Rohspuren von C128A, C128T, D156A und YFP; B) Statistische Auswertung der Einstichmessungen der Proben von A) plus C128A ohne Retinal-Zusatz (vgl. Abb. 3-11) (dargestellt sind Mittelwerte von ΔV_{\max} mit Standardfehlern: n(C128A)=53, n(C128T)=21, n(D156A)=9, n(C128A -R)=8, n(YFP)=13)

Für C128A konnte ein Mittelwert von 82mV±1mV, ein Maximalwert von 113mV und ein Minimalwert von 64mV festgestellt werden. Die C128T-Mutante erzielte im Durchschnitt einen Wert von 66mV±2mV, wobei das Minimum bzw. Maximum bei 46mV bzw. 89mV lag. Bei der dritten Chop2-Variante D156A konnte eine durchschnittliche Depolarisationsamplitude von 70mV±3mV gemessen werden. Hier ergaben sich maximale/minimale Werte von 79/52mV.

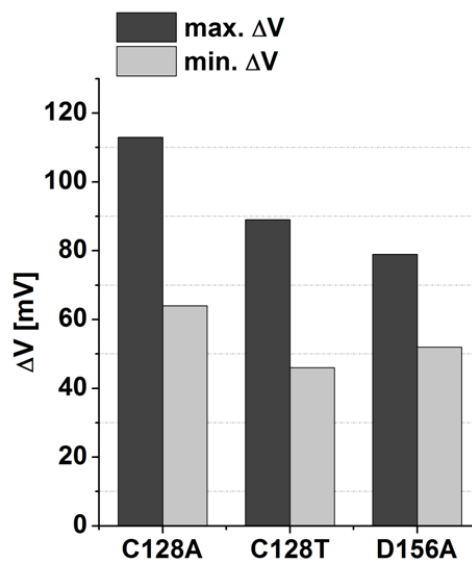


Abb. 3-14: Maximal- und Minimalwerte aus ΔV_{\max} der verwendeten ChR2-Mutanten C128A, C128T und D156A; 3dpi; in 1mM KCl/1mM CaCl₂/10mM MES, pH6

Die Kontrollen C128A ohne Retinal und YFP (Abb. 3-11 und Abb. 3-13) mit Retinal ergaben lediglich Depolarisationen von $7\text{mV}\pm 1\text{mV}$ bzw. $4\text{mV}\pm 1\text{mV}$. Diese Messungen zeigten, dass die höchste Depolarisation mit der Mutante C128A erzielt werden konnte. Interessanterweise wies diese Chr2-Mutante allerdings das geringste Expressionsniveau auf (siehe Abb. 3-8 und Abb. 3-9).

Die im Zuge der Einstichmessungen erzielten Ergebnisse zeigten, dass es möglich war, BL-induzierte Chr2-vermittelte Depolarisationen in Pflanzen zu erzeugen, die in ihrer Höhe vergleichbar zu beschriebenen, physiologische relevanten elektrischen Signalen waren (siehe Referenzen in 1.2). Darüber hinaus waren die Depolarisationen in Kontrollexperimenten nur gering und deuteten darauf hin, dass durch die verwendete BL-Intensität und -Dauer nur minimale Effekte ausgelöst wurden.

3.3.3.2 Lichtsensitivität der Chr2-Mutanten

Aufgrund der Unterschiede der verwendeten Mutanten bezüglich ihrer Blaulicht-Sensitivität in Oozytenmessungen wurde auch im Tabaksystem mit verschiedenen Filtern gearbeitet, um die benötigte Lichtintensität der einzelnen Mutanten auf ein Minimum reduzieren zu können. Eingesetzt wurden Filter mit Transmissionen von 50%, 10% und 1% der maximalen Lichtintensität (für 100% siehe Material und Methoden, Absatz 2.9.6). Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abb. 3-15 dargestellt.

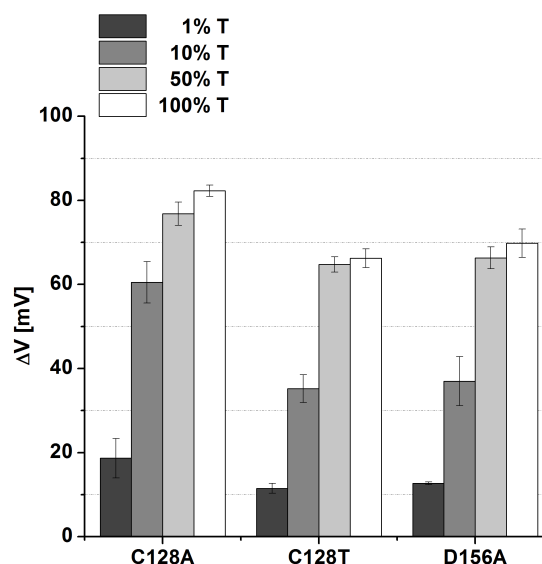


Abb. 3-15: Lichtsensitivität der Chr2-Mutanten – BL-induzierte Depolarisation in transformierten Tabakblattproben – Chr2-YFP-Mutanten; 3dpi; in 1mM KCl/1mM CaCl_2 /10mM MES, pH6 (dargestellt sind Mittelwerte von ΔV_{max} mit Standardfehlern für 100/50/10/1%: $n(\text{C128A})=53/6/4/3$, $n(\text{C128T})=21/4/5/4$, $n(\text{D156A})=9/3/3/3$)

Hierbei wurde deutlich, dass C128A (zusätzlich zur Tatsache, dass mit dieser Mutante die höchste Depolarisationsamplitude erzielt werden konnte) ebenfalls die größte Lichtsensitivität im Vergleich zu C128T und D156A besaß. Bereits 10% Transmission reichten aus, um 75% der maximalen Antwort zu generieren.

Weiterhin zeigten diese Messungen, dass eine Modulation der Depolarisationsamplitude durch ein definiertes Einstellen der Blaulichtintensität möglich war.

3.3.3.3 Länge des Signals - Repolarisation

Um das Schließverhalten der Kanäle indirekt über die durch BL ausgelöste Depolarisation darzustellen, wurde die Zeitdauer gemessen, die für die Repolarisation zum Ruhepotential benötigt wurde. In Übereinstimmung mit den in Abschnitt 3.1.2 gezeigten Oozytendaten, zeigte C128T die schnellste Repolarisation, gefolgt von C128A und D156A (siehe Abb. 3-16).

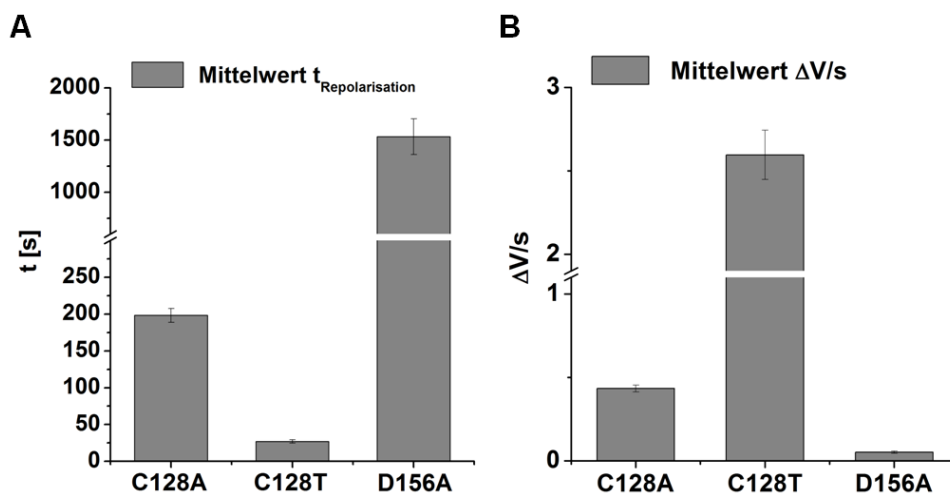


Abb. 3-16: Repolarisation der ChR2-Mutanten C128A, C128T und D156A im Tabak – A) Repolarisationszeiten der ChR2-Mutanten nach BL-Aktivierung (15s); B) Repolarisation der ChR2-Mutanten pro Sekunde; 3-4dpi; in 1mM KCl/1mM CaCl₂/10mM MES, pH6 (dargestellt sind Mittelwerte von ΔV_{max} mit Standardfehlern: n(C128A)=23, n(C128T)=7, n(D156A)=7)

Im Durchschnitt wurden in Messungen mit C128T 27s±2s für eine Rückkehr zum anfänglichen Ruhepotential benötigt, wohingegen bei C128A deutlich längere Zeiten von 198s±10s gemessen wurden. Die in Oozyten-Experimenten im Bezug auf das Schließverhalten äußerst langsame Mutante D156A zeigte eine Repolarisationszeit von durchschnittlich 1533s±171s und somit im Mittel mehr als 25min. Ergänzend zu den bisherigen Messungen konnte somit nachgewiesen werden, dass auf Basis dieser Mutanten Depolarisationen unterschiedlicher Zeitdauer bei konstantem Blaulicht-Puls erzeugt

werden konnten. Da die Zeitdauer bis zur vollständigen Repolarisation deutlich von der Höhe der erzeugten Depolarisation abhing, wurde die Repolarisation in mV pro Sekunde als weiteres Maß für die Charakterisierung der Mutanten dargestellt (siehe Abb. 3-16). Dabei ergab sich für C128T ein Wert von $2.60\text{mV/s} \pm 0.15\text{mV/s}$, für C128A $0.43\text{mV/s} \pm 0.02\text{mV/s}$ und für D156A ein durchschnittlicher Wert von $0.05\text{mV/s} \pm 0.01\text{mV/s}$.

In einigen Fällen war die Repolarisationskinetik durch eine überschießende, nachfolgende Hyperpolarisation um ca. 20mV charakterisiert, welche erst im Anschluss daran zum Ruhepotential zurückkehrte (beispielhaft gezeigt in Abb. 3-17).

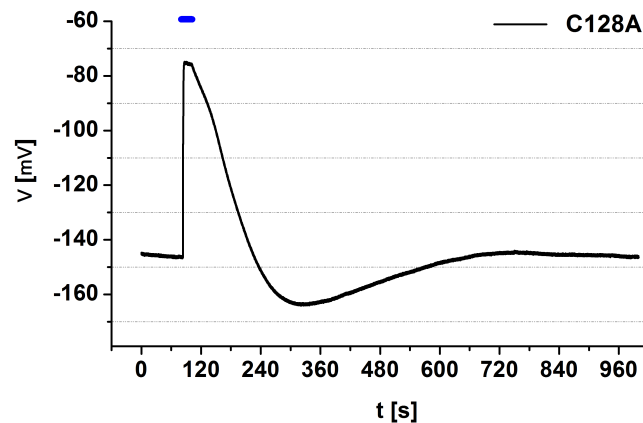


Abb. 3-17: Repolarisation gefolgt von Hyperpolarisation – BL-induzierte Depolarisation von C128A im Tabak; 3dpi; in 1mM KCl/1mM CaCl₂/10mM MES, pH6

Die Hyperpolarisation zeigt, dass an der Rückkehr zum Ruhepotential nach BL-Gabe nicht nur die schließenden ChR2-Kanäle, sondern auch endogene Mechanismen wie Pumpen, Transporter oder Kanäle beteiligt sind, die z. B. über den Blaulichtpuls selbst oder über Spannungs-Signale aktiviert werden könnten.

3.3.3.4 Einfluss des pH-Werts auf das ChR2-vermittelte Signal

Da für ChR2 in Oozyten eine hohe Permeabilität für Protonen bestimmt wurde, sollte festgestellt werden, ob eine Veränderung des externen pH-Werts einen Einfluss auf die Höhe der Depolarisation hat. In den hierzu gezeigten Messungen an Tabakblattproben war die Epidermis am Abend vor der Messung bei der Präparation der Proben mit einer Uhrmacherpinzette entfernt worden, um einen schnellen Austausch der externen Lösung zwischen den Mesophyllzellen und der Badlösung zu gewährleisten. Diese Messungen wurden ausschließlich mit der C128A-Mutante durchgeführt, da diese die höchste Depolarisations-Amplitude bei geringster BL-Intensität zeigte.

Abb. 3-18 zeigt die Amplitude der durch 15s BL erzeugten Depolarisation in C128A-exprimierenden Tabak-Blattstücken: Die Messungen bei pH4, pH6 und pH7 ergaben keinen signifikanten Unterschied zueinander.

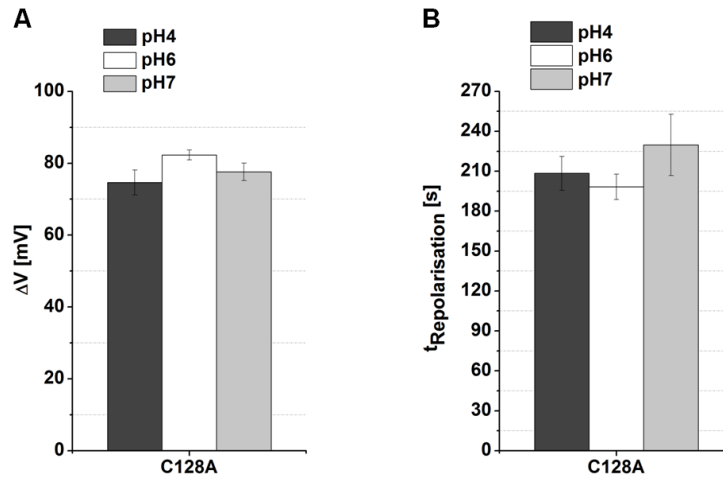


Abb. 3-18: Einfluss des pH-Werts auf die ChR2 (C128A)-vermittelte Depolarisation im Tabak – A) Einfluss auf ΔV -Amplitude und B) Repolarisationszeiten der ChR2-Mutanten bei veränderten pH-Bedingungen; 1mM KCl/1mM CaCl₂/10mM MES, pH4/6/7 (dargestellt sind Mittelwerte von ΔV_{max} bzw. die Repolarisationszeit mit Standardfehlern für pH4/6/7: $n(\Delta V_{\text{max}})=9/53/10$ und $n(t_{\text{Repolarisation}})=5/23/7$)

Bei Betrachtung der Repolarisationszeit konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Somit lassen diese Ergebnisse vermuten, dass der pH-Wert in diesen Messungen keinen Einfluss auf die Form der Depolarisation nahm.

3.3.3.5 Einfluss von $c[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ bzw. V_m auf die ChR2-vermittelte Depolarisation

Aufgrund des fehlenden Einflusses der extrazellulären Protonenkonzentration auf die Depolarisationsamplitude, wurde die Abhängigkeit der Signalhöhe von der Konzentration an Kalium-Ionen bzw. des sich daraus bestimmenden Ruhepotentials untersucht. Durch die Applikation von Messlösungen mit 1mM bzw. 5mM KCl wurde eine Absenkung des Membranpotentials von durchschnittlich $-116\text{mV} \pm 2\text{mV}$ auf $-55\text{mV} \pm 1\text{mV}$ erreicht (siehe Abb. 3-19).

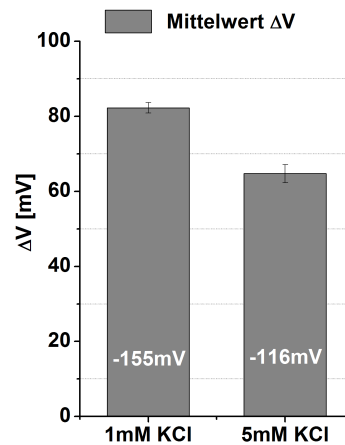


Abb. 3-19: ChR2 (C128A)-induzierte Membranpotentialänderung im Tabak – Vergleich der KCl-Konzentration in der Messlösung; 3-4dpi; 1mM bzw. 5mM KCl/1mM CaCl_2 /10mM MES, pH6 (dargestellt sind Mittelwerte von ΔV_{max} mit Standardfehlern für $n(1\text{mM KCl})=65$ und $n(5\text{mM KCl})=8$)

Die durch BL induzierte Depolarisation erhöhte sich in Gegenwart von 1mM KCl um $21\text{mV} \pm 1\text{mV}$ im Vergleich zu einer Badlösung, die 5mM KCl enthielt. Dies entsprach einer Steigerung der Amplitude um ca. 20%.

Folglich spielten zwar Kaliumionen keine wesentliche Rolle für die ChR2-vermittelte Depolarisation, jedoch führte die Absenkung des Ruhepotentials zu einer Signalerhöhung.

3.3.3.6 Einfluss von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ auf die ChR2-vermittelte Depolarisation

Da für ChR2 eine zwar geringe, jedoch existente Calcium-Permeabilität beschrieben wurde (Nagel et al., 2003), könnte auch der Einstrom von Calcium-Ionen ins Cytosol ursächlich für die Depolarisation sein. Abb. 3-20 zeigt eine Messung, in der versucht wurde, den Effekt von Calcium durch die Chelatierung der apoplastischen Calcium-Ionen zu untersuchen: Hierbei wurden 1mM EGTA während eines Blaulichtpulses zur Messlösung appliziert. Dies führte zu einer weiteren Erhöhung des Membranpotentials um ca. 15mV.

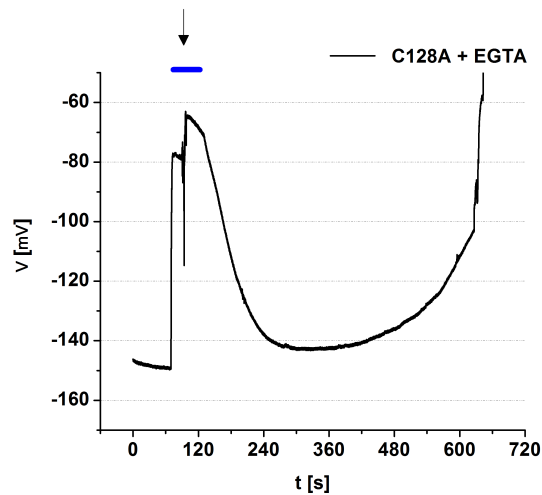


Abb. 3-20: Einfluss von $[Ca^{2+}]_{ext}$ auf die C128A-vermittelte Depolarisation – EGTA-Gabe (markiert durch Pfeil) während BL-Stimulation in transformierten Tabakproben; 3dpi; 1mM KCl/1mM $CaCl_2$ /10mM MES, pH6

Allerdings war es in Einstichmessungen an intakten Blättern sehr schwierig, das apoplastische Calcium, welches in großer Menge gebunden in der Zellwand vorliegt, durch Puffer wie EGTA zu chelatieren, ohne die Zellintegrität zu zerstören: Nach Beendigung des Lichtpulses und darauffolgender Repolarisation konnte sehr schnell ein „Verlust“ der Zelle beobachtet werden, der einen „Zusammenbruch“ des Membranpotentials in diesem Zellverbund anzeigte.

Mit der Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration von 1mM auf 10mM sollte zudem untersucht werden, ob durch die damit erreichte Steigerung des elektrochemischen Gradienten für Calcium eine höhere Signalamplitude erreicht werden kann. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden, da kein Unterschied in Bezug auf die Depolarisationshöhe zwischen Messungen mit 1mM bzw. 10mM Calcium beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

3.3.3.7 Grünlichtinhibition der ChR2-Aktivität

Wie bereits in den Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit beschrieben wurde, kann die Schließkinetik einiger ChR2-Mutanten durch die Applikation von Grünlicht über einen Short-Cut im Photozyklus beschleunigt werden (Bamann et al., 2010). Da diese Anwendung auch in Pflanzen eingesetzt werden könnte, um die durch Blaulicht ausgelösten, ChR2-vermittelten Signale zusätzlich zu modulieren, wurden die „langsamen“ Mutanten C128A und D156A hinsichtlich des Effekts von Grünlicht auf die Depolarisation getestet. Hierbei konnte im Tabak bei beiden Mutanten eine Verminderung der durch BL ausgelösten Membranpotentialänderung durch Grünlicht um ca. 40% festgestellt

werden (siehe Abb. 3-21 A und B). Infolgedessen konnte die Repolarisationszeit bei C128A um ca. 30% und bei D156A um ca. 40% verkürzt werden.

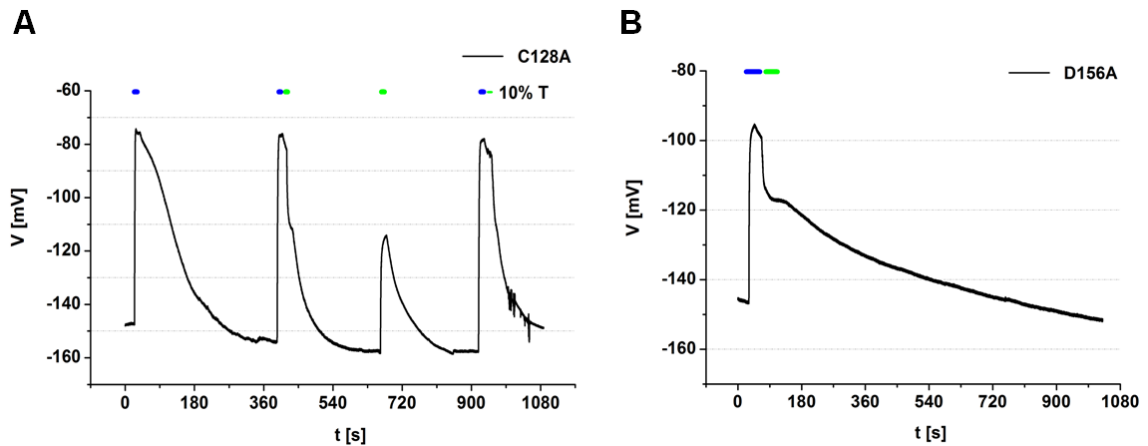


Abb. 3-21: Grünlicht-Inhibition der ChR2-Aktivität in transformierten Tabakproben I – A) C128A und B) D156A; 3dpi; 1mM KCl/1mM CaCl₂/10mM MES, pH6

Darüber hinaus zeigt Abb. 3-21 A, dass Grünlicht alleine einen stimulierenden Effekt auf ChR2 ausübt. Das Ausmaß der Inhibition durch Grünlicht war außerdem stark abhängig von der Intensität des Grünlichts. Eine Abschwächung des Grünlichts auf 10% bewirkte zwar nur eine geringe Verminderung der durch BL ausgelösten Depolarisation, verkürzte dennoch die Repolarisationszeit (siehe Abb. 3-21).

In Abb. 3-22 wurden nach bzw. während der Grünlicht-Inhibition erneute BL-Pulse gesetzt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass durch einen BL-Puls nach der Grünlichtgabe die Wiederherstellung der maximalen Depolarisation möglich war, wohingegen die Applikation von BL während der Grünlichtphase nur eine geringe erneute Depolarisation auslöste.

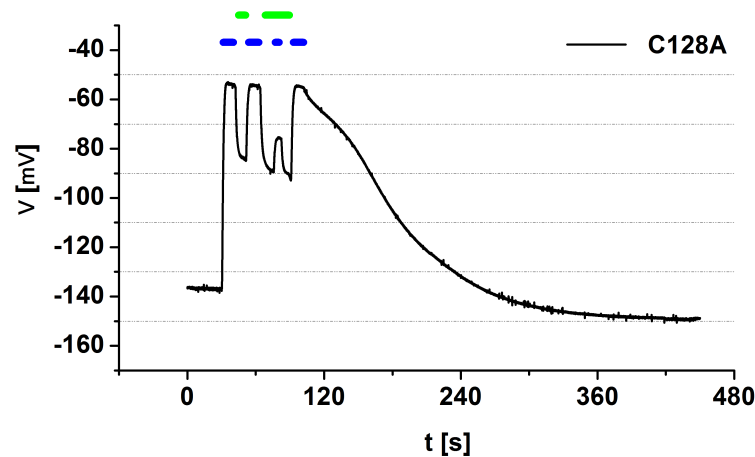


Abb. 3-22: Grünlicht-Inhibition der ChR2 (C128A)-Aktivität in transformierten Tabakproben II; 3dpi; 1mM KCl/1mM CaCl₂/10mM MES, pH6

Die Applikation von Grünlicht kann folglich ebenfalls in Pflanzen dazu verwendet werden, die über ChR2 durch BL ausgelöste Depolarisation zu modulieren. Eine vollständige sofortige Repolarisation durch Grünlicht konnte allerdings nicht erreicht werden.

3.3.3.8 Generierung elektrischer Muster durch Variation der Blaulicht-Pulse

Zusätzlich zur Tatsache, dass sich die Amplitude der Depolarisation über die Wahl der Lichtintensität steuern lässt, besteht weiterhin die Möglichkeit, die Dauer und somit die Form des Signals über das Muster der applizierten BL-Pulse zu regulieren. Abb. 3-23 A zeigt dies anhand der Mutante C128T: Hierbei wurde ersichtlich, dass die Länge des maximalen Depolarisationsplateaus durch die Länge des Blaulichtpulses bestimmt werden kann. Dabei musste jedoch beachtet werden, dass sich bei kürzeren Pulsen auch die Amplitude der Depolarisation verringern konnte.

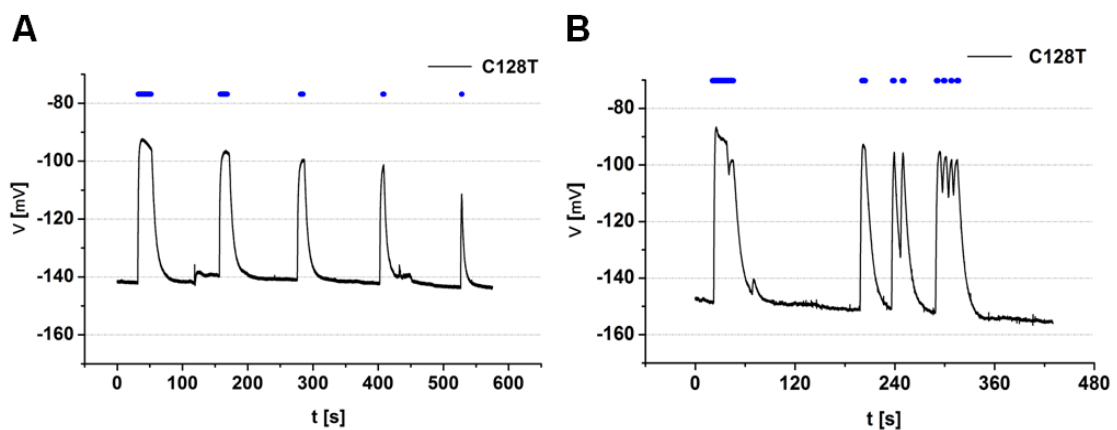


Abb. 3-23: BL induzierte Depolarisations-Muster in mit C128T transformierten Tabakproben – A) BL-Applikation für 20s, 15s, 10s, 5s und 1s; B) BL für 30s, 10s, 5s-5s, 5s-1s-1s-1s

Die zweite Messung (Abb. 3-23 B) verdeutlicht, dass hierbei ebenfalls die Möglichkeit bestand, kurze, aufeinander folgende Pulse zu applizieren, um die Blaulichtintensität zu verringern und trotzdem ein bestimmtes Depolarisationsniveau zu erhalten.

Die in Abb. 3-24 dargestellten Messungen mit C128A und C128T zeigen die Wiederholbarkeit der Depolarisationen in Bezug auf Amplitude und Repolarisationszeit durch repetitive BL-Muster.

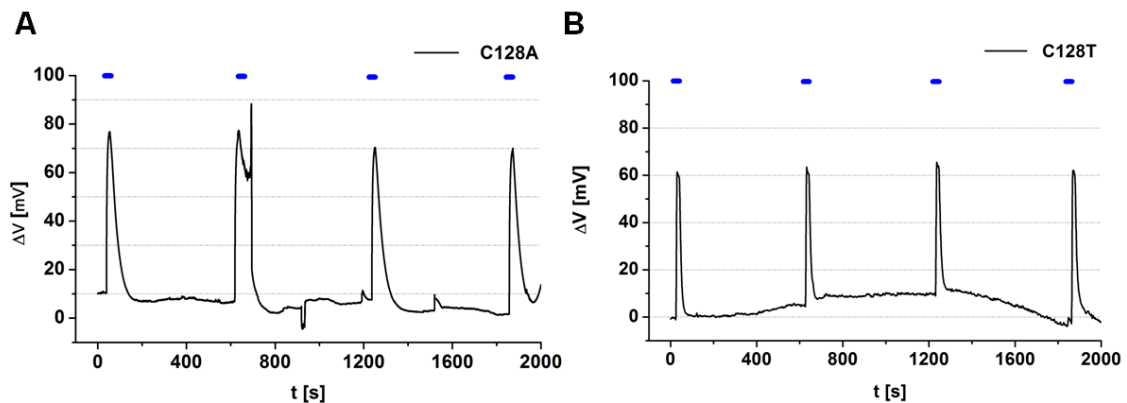


Abb. 3-24: BL induzierte Depolarisations-Muster in mit A) C128A und B) C128T transformierten Tabakproben – wiederholbare Pulse: vier BL-Pulse von 15s Dauer mit jeweils 10min Dunkelphase

Hierbei wurden jeweils vier BL-Pulse mit einer Dauer von 15s appliziert, welche durch eine 10-minütige Dunkelphase voneinander getrennt waren. Sowohl in Abb. 3-24 A als auch in B) war es möglich, vier vergleichbare Depolarisationspulse durch den gleichen, wiederkehrenden Lichtstimulus zu erzeugen.

3.4 Aequorin-basierte Calcium-Messungen

Die Erforschung von Calcium-Signalen in Pflanzen wurde durch die Identifizierung und Klonierung des ersten natürlichen Calcium-Sensors Aequorin aus Leuchtquallen deutlich erleichtert (Inouye et al., 1985; Prasher et al., 1985). Diese Methode wurde zuerst von Trewavas und Knight in Pflanzen eingesetzt, um Calcium-Änderungen als Reaktion auf Umweltsignale in Echtzeit messen zu können (Johnson et al., 1995; Knight et al., 1991). Um einen durch ChR2 vermittelten Calcium-Einstrom ins Cytosol detektieren zu können, wurde Aequorin als proteinogener, auf Lumineszenz basierender Calcium-Indikator auch innerhalb dieser Arbeit eingesetzt. Der entscheidende Vorteil gegenüber Fluoreszenz-basierten Calcium-Farbstoffen lag hierbei darin, keine Anregungsenergie

in Form von Blaulicht applizieren zu müssen, welches eventuell zur Aktivierung von ChR2 hätte führen können. Da Aequorin-Messungen an mit Chop2 infiltrierten, stabilen *N. plumbagenifolia* Aequorin-Pflanzen aufgrund der Infiltrationsmethode scheiterten, wurden hierfür transient mit Chop2 und Aequorin transformierte Arabidopsis-Mesophyll-Protoplasten verwendet. Diese wurden nach erfolgter Transformation in W5/W10-Lösung o/n bzw. je nach Messung weitere 1-2d zur Expression und Regeneration (1/2/3 dpt) mit 5 μ M Coelenterazin im Dunkeln bei RT inkubiert. Am Tag der Messung wurden die Zellen im jeweiligen Messpuffer gewaschen, zweifach konzentriert und ca. 3h vor Beginn der Lumineszenz-Messungen im Dunkeln inkubiert (siehe 2.7.1).

3.4.1 Artefakt direkt nach BL

Schon zu Beginn der Messreihe wurde festgestellt, dass direkt nach der Belichtung ein hohes Signal detektierbar war, welches sich jedoch innerhalb von 10-20s wieder auf das Niveau der Basislinie absenkte. Vergleichsmessungen zwischen Messschälchen mit und ohne Protoplasten ergaben, dass dieses Signal nicht durch Chlorophyll-Autofluoreszenz entstand, da sich die Signale kaum unterschieden.

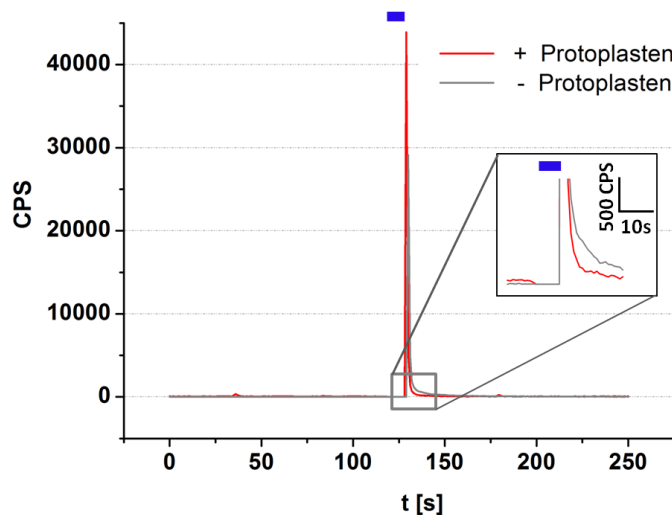


Abb. 3-25: Artefakt in Lumineszenz-Messung – Messungen an Messschälchen mit und ohne Protoplastensuspension, 15s BL

Wahrscheinlich basierte dieses Artefakt auf einem Nachleuchten der LEDs, weshalb die auf den Lichtpuls folgenden 20s in den nachfolgend gezeigten Messungen mit durch den BL-anzeigenden blauen Balken ausgespart wurden.

Gleichzeitig bedeutete dies jedoch auch, dass es aufgrund dieses Artefakts nicht möglich war, innerhalb dieser Zeit sehr schnelle und kurze, durch den Lichtpuls induzierte Calcium-Signale zu detektieren.

3.4.2 Blaulicht-basierte Calcium-Signale

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, interferiert die Messung ChR2-basierter Signale aufgrund der Lichtstimulation mit der Aktivierung BL-abhängiger endogener Prozesse in Pflanzen. 2009 konnte hierzu in Schließzellprotoplasten gezeigt werden, dass die Applikation von Blaulicht bei geringer externer Kaliumkonzentration (≤ 0.1 mM KCl) zu einer langsamen (Peak bei ca. 3min), Phototropin-abhängigen Calcium-Antwort führt, welche durch die Aktivierung von HACCs (Hyperpolarisations-aktivierte Calcium-Kanäle, siehe 1.3.2.2) durch die H^+ -ATPase vermittelt wird. Diese Antwort fehlt in Mesophyllprotoplasten. Eine schnelle Antwort kurz nach dem BL-Puls (Peak bei ca. 8s nach BL-Puls) konnte sowohl in Schließzellprotoplasten als auch in Mesophyllzellen beobachtet werden (Harada & Shimazaki, 2009). Stoelzle et. al. stellten 2003 fest, dass BL in Mesophyllzellen im Gegensatz zu Schließzellen eine Depolarisation und keine Hyperpolarisation des Membranpotentials auslöst (Stoelzle et al., 2003). Dies wurde auch in Kontrollmessungen innerhalb dieser Arbeit anhand von Einstich-Messungen an YFP-infiltrierten Tabakblättern beobachtet. Auch hier konnte eine schwache, durch BL induzierte Depolarisation detektiert werden (siehe 3.3.3.1). Da dieses schnelle Signal in Mesophyllzellen jedoch nahezu unmittelbar auf den BL-Puls folgt, bestand die Möglichkeit, dass es durch das Artefakt in den gezeigten Lumineszenz-Messungen nicht detektierbar war.

3.4.3 ChR2-vermittelte Calcium-Signale

Zur Vorbereitung der Calcium-Messungen wurden die Chop2/Aequorin-transformierten Arabidopsis-Protoplasten in W10-K-Lösung inkubiert (siehe 2.7.1). Diese enthielt im Gegensatz zur o/n-Lösung mit 20mM KCl lediglich 1mM KCl und sollte dadurch der Ausbildung eines hyperpolarisierten Membranpotentials dienen. Um die treibende Kraft für die Calcium-Aufnahme zu erhöhen, enthielt dieser Puffer zudem 10mM $CaCl_2$.

Zu Beginn der Calcium-Experimente konnte beobachtet werden, dass keine ruhige Basislinie detektierbar war, sondern diese immer wieder durch Spikes unterbrochen wurde, wie in Abb. 3-26 (graue Spur) beispielhaft zusehen. Dabei konnte ein weitaus unruhigeres Spiking in mit Chop2-transformierten Protoplasten (Abb. 3-26 A) im Vergleich zu

YFP-Kontrollzellen (Abb. 3-26 B) beobachtet werden. Dieser Effekt wurde an allen Messtagen (1-3dpt) detektiert. Um ein klares Signal unter diesem Rauschen herausfiltern zu können, wurden die Messdaten mit der Glättungsfunktion „FFT-Tiefpass-Filter, 50 Punkte“ mittels der Software Origin Pro gefiltert. Der eingezeichnete blaue Balken bezieht sich einerseits auf die Belichtungszeit von 15s, während welcher der Lumineszenzdetektor „blind“ war, und andererseits auf die nachfolgenden 20s Messzeit, in denen das Artefakt detektiert wurde. Abb. 3-27 zeigt ausschließlich gefilterte Messungen von C128A-YFP und YFP Protoplasten (mit Aequorin kotransformiert). Die Methode der Kotransformation wurde gewählt, um ausschließlich Calcium-Signale aus den Zellen zu erhalten, die mit Chop2 transformiert worden waren. Hierdurch sollte die Sensitivität des Experiments erhöht werden. In Abb. 3-26 und Abb. 3-27 ist zu sehen, dass ein Calcium-Signal mit einem Peak nach 4-8min in Messungen an C128A-transformierten Protoplasten durch die Applikation von BL induziert wurde. Dieses Calcium-Signal startete jedoch erst ca. 2min nach Stimulus-Gabe. Hierbei ergab sich eine Erhöhung der Calcium-Konzentration um das Drei- bis Fünffache. Dies blieb bei mit YFP transformierten Kontroll-Zellen aus. Ein direkt auf den Lichtpuls folgendes Calcium-Signal konnte folglich nicht beobachtet werden.

Die gezeigten Einzelmessungen stammen von Protoplasten aus unterschiedlichen Transformationsansätzen (Transformationseffizienz 60-80%), die 2-3dpt mehrmals gemessen wurden. Hierbei wurde stets die 1. Messung für die Auswertung verwendet. Da, wie im Material- und Methodenteil unter 2.10 beschrieben, keine Quantifizierung der Messungen durch einen Discharge der Zellen möglich war, basieren die hier gezeigten Auswertungen auf Rohdaten und werden damit in der Einheit CPS (engl. counts per second) angegeben, die die Anzahl an Photonen pro Sekunde darstellt, die vom Detektor erfasst wurde.

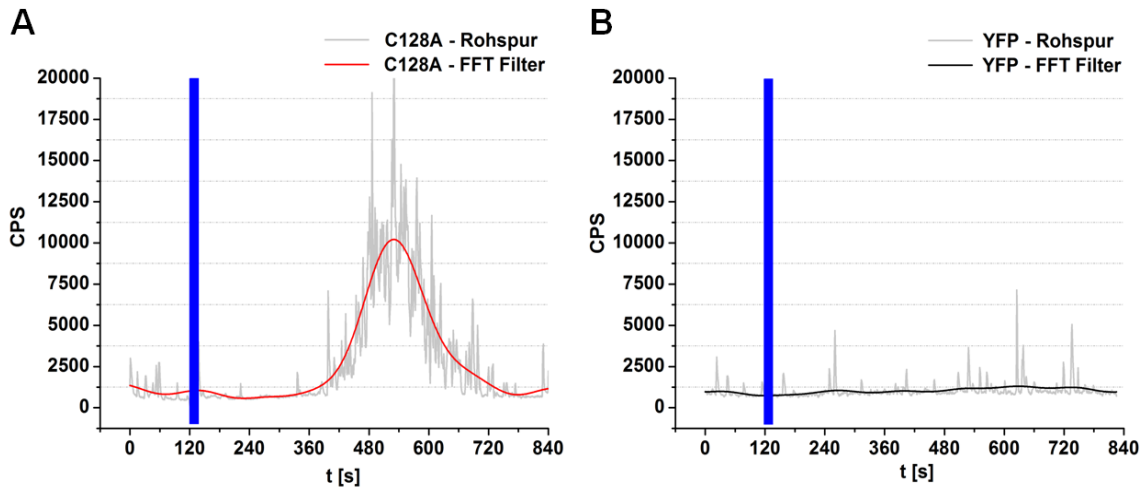


Abb. 3-26: Beispielhafte Aequorin-Messungen an transient transformierten Arabidopsis-Mesophyll-Protoplasten, 2dpt, in W10-K – A) C128A-YFP/Aeq, B) YFP/Aeq (alle in pUBQ): Rohspuren vs. geglättete Kurven mit FFT, 50Pkt., Origin Pro; Lumineszenz angegeben in CPS (counts/s)

Aus Abb. 3-27 A ist deutlich ersichtlich, dass sich einerseits das Einsetzen des Calcium-Signals und somit auch dessen Peak sowie Höhe in den Einzelmessungen unterscheiden. Hierbei konnte jedoch kein Einfluss der Expressionsdauer (2dpt bzw. 3dpt) festgestellt werden. Andererseits fiel auf, dass die Basislinie bei Messungen mit Kontrollzellen im Durchschnitt höher war als bei mit Chop2-transformierten Protoplasten. Dies könnte auf einer besseren Transformationseffizienz der Kontrollzellen und somit möglicherweise erhöhten Aequorin-Konzentration in den Protoplasten basieren und somit möglicherweise eine höhere Grund-Aequorinlumineszenz bedingen.

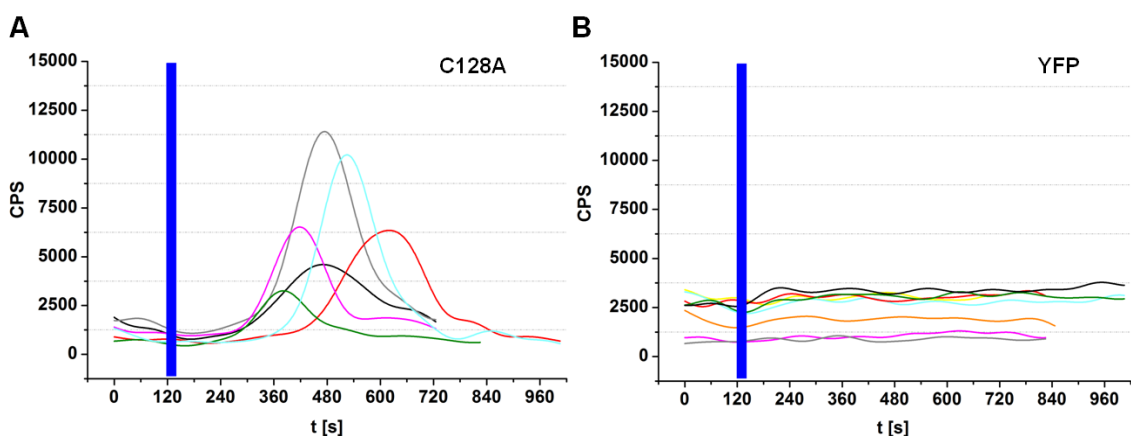


Abb. 3-27: Aequorin-Messungen an transient transformierten Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten, 2-3dpt, in W10-K – A) C128A-YFP/Aeq, B) YFP/Aeq (alle in pUBQ) (Kurven geglättet mit FFT, 50 Pkt., Origin Pro)

Weiterhin wurde die Wiederholbarkeit der durch BL induzierten Calcium-Signale getestet: Die mehrfache Applikation der Lichtpulse (Dunkelphasen von 40min und 15min)

ergab eine Abnahme des Calcium-Signals in mit C128A-transformierten Protoplasten um ca. ein Drittel (siehe Abb. 3-28). In dieser Abbildung sind wiederum die Rohdaten in grau zu sehen, während die gefilterte Spur in rot dargestellt wurde. Dieses Ergebnis konnte in allen Messungen mit C128A beobachtet werden. Eine Dunkelphase über mehrere Stunden führte wieder zur Ausbildung der initialen Peak-Amplitude (Daten nicht gezeigt).

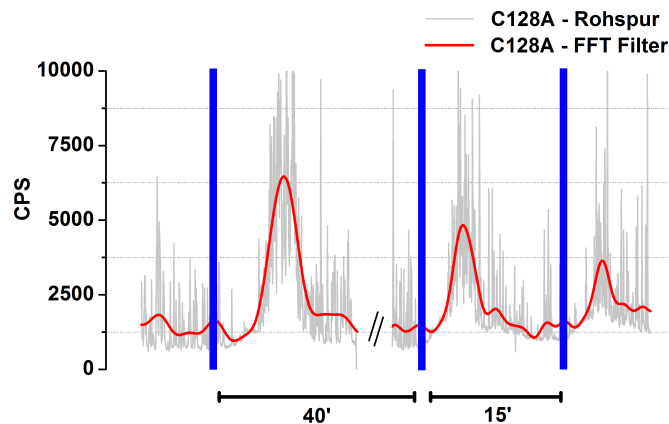


Abb. 3-28: Aequorin-Messungen an transient transformierten Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten, 2dpt, in W10-K – C128A-YFP/Aeq (in pUBQ) (Kurven geglättet mit FFT, 50 Pkt., Origin Pro): 15s BL-Pulse im Abstand von 40min bzw. 15min

Neben C128A wurden auch Calcium-Experimente mit der L132C-Mutante, für die eine erhöhte Calcium-Permeabilität beschrieben wurde (Kleinlogel et al., 2011a), durchgeführt. Mit Hilfe dieser gelang es 2012, Calcium-Signale in Astrozyten (Gliazellen) zu erzeugen, die nur eine geringe Menge an VGCC (Spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle, siehe 1.3.2.2) exprimieren (Li et al., 2012). Die gezeigten Messungen erfolgten ebenfalls an transient transformierten Protoplasten nach Kotransformation mit Aequorin. Die in Abb. 3-29 dargestellten Messungen zeigten nicht das bei C128A beobachtete Calcium-Signal beginnend ca. 2min nach Licht-Applikation. Lediglich in einer der Messungen (Abb. 3-29 B und rote Spur in Abb. 3-29 A) konnte ein leichter Anstieg der Lumineszenz direkt auf den BL-Puls folgend beobachtet werden (rote Spur in Abb. 3-29 A). Dieses Signal konnte allerdings mit diesem Ansatz in mehreren Messungen wiederholt gezeigt werden. Das Ansteigen der Kurven bereits vor BL-Applikation ist, wie in Abb. 3-29 B im Vergleich zwischen Rohspur und geglätteter Kurve zu sehen, auf die Glättung selbst zurückzuführen, da hier auch das Artefakt nach der Lichtgabe (siehe Abb. 3-25) mit einberechnet wird.

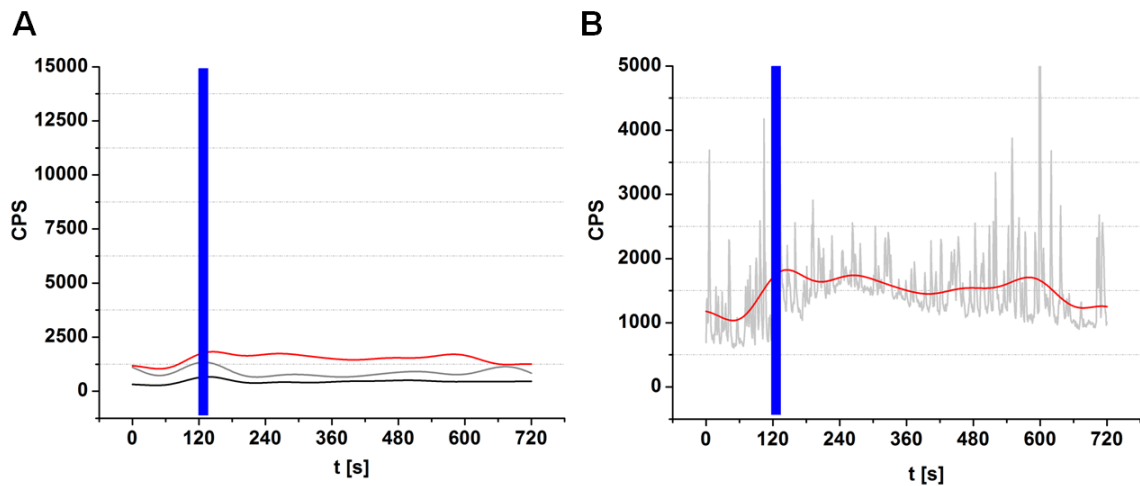


Abb. 3-29: Aequorin-Messungen an transient transformierten Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten, 2-3dpt, in W10-K, L132C-YFP/Aeq (in pUBQ) – A) Kurven geglättet mit FFT, 50 Pkt. Origin Pro; B) vergrößerte Darstellung von roter Spur aus A): Rohspur (grau) und geglättete Funktion (rot)

Da die Messungen mit L132C insgesamt nur mit zwei getrennten Ansätzen durchgeführt wurden, muss deren Aussagekraft bzw. eine Wiederholbarkeit des beobachteten Calcium-Signals noch durch weitere Experimente untersucht werden.

Die Calcium-Messungen mit C128A wurden anfänglich in W10-Lösung (20mM KCl) durchgeführt. Hierbei wurde allerdings ein weitaus schwächeres Calcium-Signal beobachtet, so dass ein ausreichend negatives Membranpotential essentiell für das gemessene Calcium-Signal zu sein scheint. Zudem zeigten Messungen sowohl mit C128A als auch L132C ein deutlich abgeschwächtes, bis überhaupt kein Signal 1dpt, was auf eine Reaktionsfähigkeit der Zellen erst 2dpt hinwies.

3.5 Differentielle Genregulation durch ΔV_m – RNA Sequencing

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine transiente, funktionelle Expression von ChR2 in Pflanzen möglich ist, sollte untersucht werden, ob die artifizielle Generierung von elektrischen Signalen einen Einfluss auf die Genregulation ausübt. Zu diesem Zweck wurden auf Basis von ChR2 elektrische Signale unterschiedlicher Signatur erzeugt und anschließend das Transkriptionsprofil ChR2-exprimierender Zellen mit Hilfe der RNA-Sequencing (RNA-Seq) Technik untersucht. Im Gegensatz zur Hybridisierungs-basierten Methode des Microarrays besteht beim RNA-Seq auch die Möglichkeit, Transkriptsequenzen zu identifizieren, für welche keine unmittelbare Genomreferenz existiert (Wang et al., 2009).

Als Testsystem für diese Untersuchungen wurden transient mit C128A-YFP transformierte Blattscheiben (Mesophyll und Epidermis) von *N.benthamiana*-Pflanzen gewählt. Die Expression von ChR2 in diesem System wurde vorab mit Hilfe zellbiologischer (konfokale LSM-Untersuchungen) und elektrophysiologischer Verfahren (Einstichmessungen) verifiziert. Anhand dieser Experimente konnte bestätigt werden, dass es möglich ist, durch ChR2 elektrische Signale (Depolarisationen) mit definierter Kinetik in den transformierten Tabakzellen zu erzeugen. Zwar konnte eine Funktion des lichtgesteuerten Kanals basierend auf Calcium-Messungen auch in Arabidopsis-Protoplasten nachgewiesen werden. Es konnte in diesen Studien jedoch kein direkter Calcium-Einstrom nach Blaulichtgabe durch ChR2-C128A beobachtet werden. Stattdessen traten die Calcium-Signale mit einer zeitlichen Verzögerung auf. Dies lässt darauf schließen, dass ChR2 selbst nicht zu einer signifikanten Erhöhung des cytosolischen Calciums führt. Vielmehr scheint die ChR2-vermittelte Änderung der Membranspannung zu einer quasi sekundär basierten Aktivierung endogener Calcium-permeabler Ionenkanäle zu führen. Daten zur Generierung von Calcium-Signalen durch ChR2 im Tabak liegen nicht vor, da die transiente Koexpression von Aequorin im Tabak keine Signale lieferte. Insgesamt muss in der Betrachtung der folgenden Ergebnisse die Wahrscheinlichkeit in Betracht gezogen werden, dass der beobachteten transkriptionellen Änderungen nicht nur elektrische Signale, sondern auch Calcium-Signale zugrunde liegen könnten.

In diesem Versuch wurde ausschließlich die C128A-Mutante verwendet, da diese zum einen die höchsten Membranpotentialänderungen im Tabaksystem hervorrief und zum anderen aufgrund ihrer erhöhten BL-Sensitivität die geringsten Lichtintensitäten benötigte. Als Messlösung wurde ein Puffer mit einer erhöhten, apoplastischen Calcium-Konzentration von 10mM eingesetzt (1mM KCl/10mM CaCl₂/10mM MES/pH6).

3.5.1 Wahl der Blaulicht-Pulse

Diesem Experiment lagen folgende Fragestellungen zugrunde:

- 1) Initiieren durch ChR2 induzierte elektrische Signale Änderungen auf transkriptioneller Ebene und wenn ja, hängt die Genregulation von der Form des gewählten Stimulus ab?
- 2) Ist es möglich, durch die alleinige Gabe eines definierten elektrischen Signals, Komponenten eines bestimmten Signalwegs auf transkriptioneller Ebene „nachahmen“/beeinflussen zu können?

Zur Adressierung der ersten Frage wurden zwei Stimuli unterschiedlicher Form ausgewählt. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist in Abb. 3-30 dargestellt:

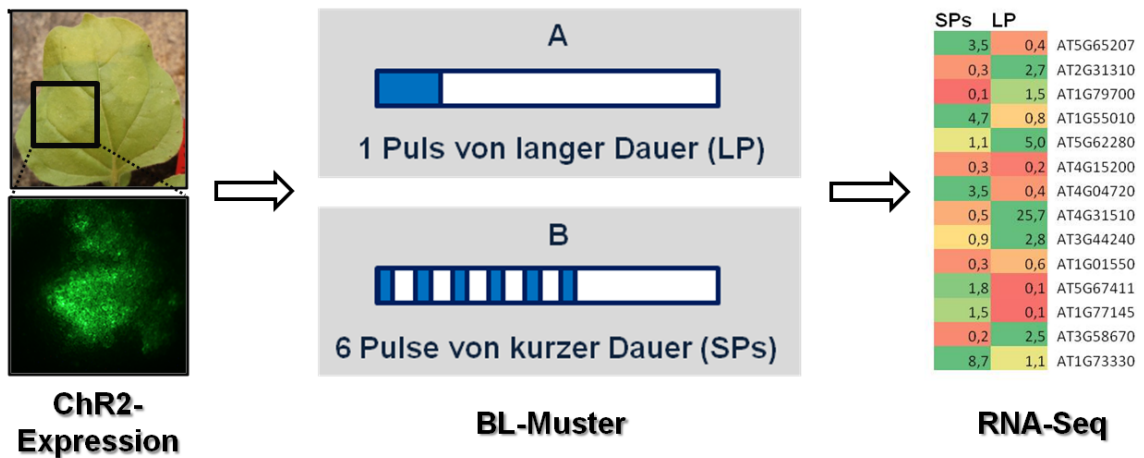


Abb. 3-30: Schema – Versuchsaufbau des RNA-Seq-Experiments: transiente Expression von ChR2-(C128A)-YFP in *N.benthamiana*, 2 Lichtprotokolle: A) LP (engl. für long pulse, langer Puls) und B) SPs (engl. für short pulses, kurze Pulse), RNA-Seq zu Identifizierung signifikant regulierter Gene

Zum einen wurde ein langer Stimulus (**LP** für long pulse, engl. für langer Puls) von ca. 12min Dauer generiert, der auf einer durchgehenden Depolarisation basierte. Ein solches langanhaltendes elektrisches Signal ist unter anderem aus der Pathogenantwort bekannt, wie z. B. bei der Erkennung des *Pseudomonas*-Elicitors flg22 (siehe Abschnitt 1.2.5). Zum anderen wurden kurze Depolarisationen mit 15s Belichtungsdauer als Kontrollstimulus erzeugt, die jedoch mit 10-minütiger Pause zwischen den Stimuli erneut in einem Zeitfenster von 1h somit insgesamt 6 Mal erzeugt wurden (**SPs** für short pulses, engl. für kurze Pulse). Die Summe der Integrale unter den Depolarisationen entsprach dabei der Fläche unter der anhaltenden Depolarisation (LP) und damit in Annäherung einem gleichen Informationsgehalt. Hierdurch sollte die Art der Informationsverschlüsselung durch die Form des Signals selbst untersucht werden.

In Vorversuchen zu den LP-Experimenten wurde deutlich, dass die durch durchgehendes BL erzeugte Depolarisation lediglich für ca. 5min aufrechterhalten werden konnte. Danach erfolgte, wie in Abb. 3-31 A zu sehen, eine Repolarisation auf ca. ein Drittel der ursprünglichen Amplitude. Grund dieser Repolarisation bei anhaltendem Stimulus könnte zum einen die Aktivierung der Protonpumpe durch Blaulicht oder die Aktivierung von Spannungs-abhängigen Kalium-Kanälen über das depolarisierte Membranpotential sein.

Um diesen Repolarisationseffekt zu vermeiden bzw. diesen abzuschwächen, wurde der lange Puls durch wiederholte, kurze 15s lange BL-Pulse mit 15s Intervall über die gleiche Gesamtzeitdauer imitiert. Durch diese schnellen aufeinanderfolgenden Pulse konnte eine maximale Amplitude der Depolarisation über den gesamten Zeitraum der Messung mit nur geringer Repolarisation aufrecht erhalten werden. Um den Einfluss der Lichtstimuli sowie der Transformation als eigenes Signal auf das Versuchssystem vernachlässigen zu können, wurde eine zusätzliche Kontrolle eingesetzt, die aus nur mit YFP transformierten Zellen bestand. Interessanterweise lösten die schnell applizierten BL-Pulse nach ca. 2min in diesen Proben ebenfalls endogen gesteuerte Depolarisationen aus, die in ihren Amplituden jedoch bei maximal 15mV lagen (siehe Abb. 3-31 B).

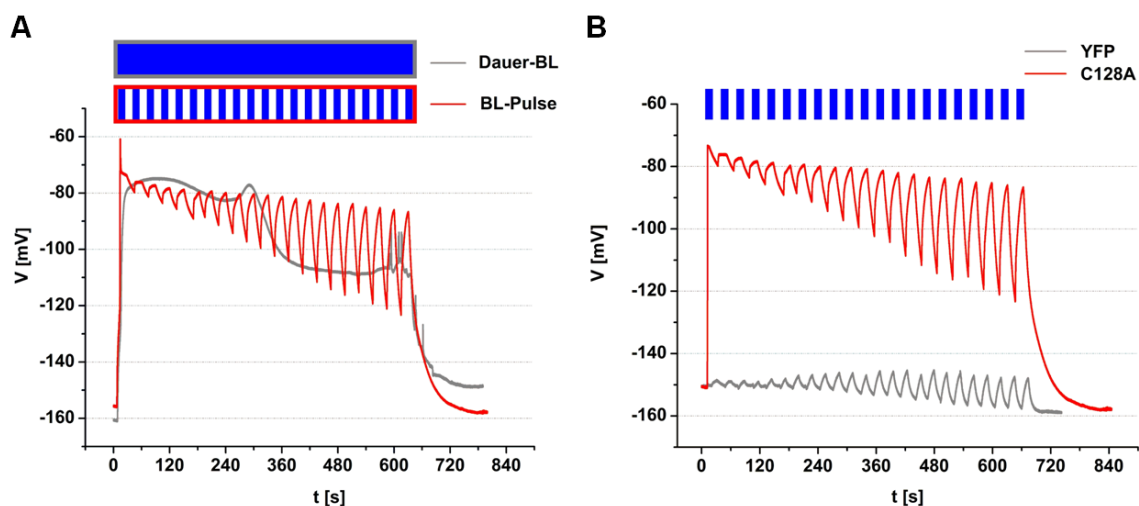


Abb. 3-31: LP-Generierung für RNA-Seq – Einstichmessungen an infiltrierten Tabak-Proben (Konstrukte C128A-YFP und YFP); A) Messung mit Dauer-Blaulicht (grau) vs. gepulste BL-Applikation (rot; 15s BL, alle 30s) über gleiche Zeitdauer; B) C128A-YFP (rot) vs. YFP (grau) mit gepulster BL-Stimulation

Da jedoch auch durch die repetitiven Pulse keine konstante Amplitude erreicht werden konnte, wurde in Näherung errechnet, wie viele Pulse bei einer durchschnittlichen Messung nötig sind, um eine im Intervall mit den 6 Einzelpulsen vergleichbare Depolarisation zu erzielen. Hierfür wurde für das Intervall der Einzel-Depolarisation die Fläche eines Dreiecks angenommen, die sich dann mit Hilfe einer Regressionsgeraden errechnen ließ. Dabei ergab sich ein Wert von 775s für die Gesamtdauer der BL-Behandlung, was unter Berücksichtigung der langen Repolarisationszeit der C128A-Mutante 21 BL-Pulsen von 15s Länge in einem Abstand von 30s entsprach.

3.5.2 Probenvorbereitung

Zur Gewährleistung einer statistischen Absicherung der Ergebnisse wurden für jedes Experiment drei Replikate ($n=3$) gewählt. Nach Blaulichbehandlung der Proben erfolgte die Isolation der RNA aus den transient transformierten Tabakblattstücken. Da hierbei DNA-Kontaminationen auftreten können, wurden die RNA-Proben anschließend DNase-verdaut und der Erfolg dieser Behandlung mittels PCR mit Tabak-Aktin-Primern getestet. Hierfür diente Probenmaterial vor und nach dem DNase-Verdau als Matrize. Anhand des Gelbildes in Abb. 3-32 A ist beispielhaft zu sehen, dass die Existenz von DNA-Kontaminationen in den RNA-Proben ausgeschlossen werden konnte, da hier kein PCR-Produkt gebildet wurde.

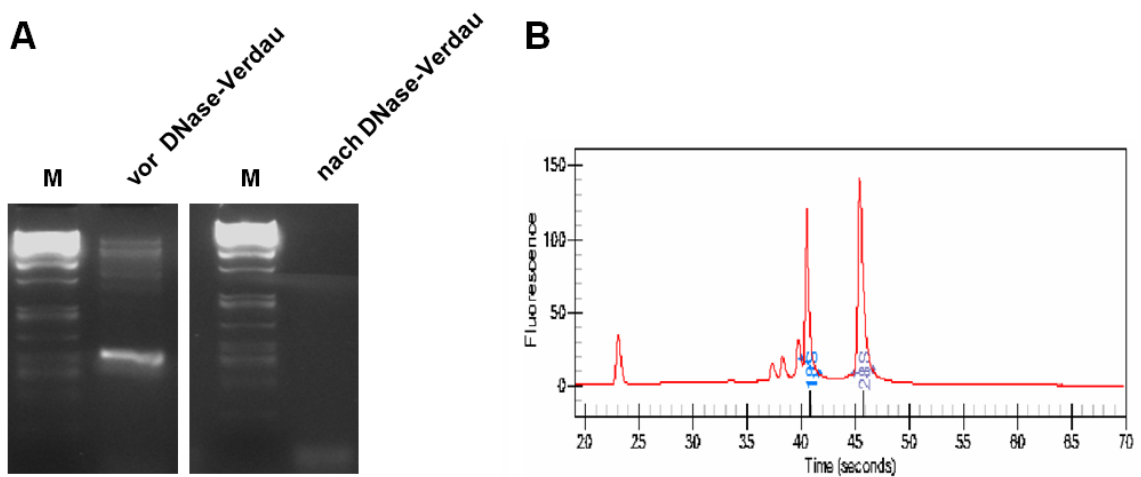


Abb. 3-32: Beispielhafter Qualitätsnachweis der RNA-Proben für RNA-Seq – RNA-Probe: A) Bereinigung von DNA-Kontamination: PCR mit Tabak-Aktin-Primern auf Probe vor und nach DNase-Verdau; B) Elektropherogramm der RNA-Probe nach DNase-Verdau

Um die Intaktheit der RNA nach dem DNase-Verdau zu verifizieren, wurden diese mit Hilfe des ExperionTM über Kapillarelektrophorese überprüft. Hierdurch konnte die Integrität der RNA nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-32 B). Der in Tab. 3-2 aufgeführte RQI-Wert (siehe 2.12.3.3) aus diesen Messungen lieferte zusätzlich eine Aussage über die Qualität der RNA-Proben, welche sich mit Werten von ≥ 8.8 in allen Proben als sehr gut darstellte.

Tab. 3-2: RQI-Werte der RNA-Seq Proben aus *N. benthamiana* (n=3)

Probennr.	Konstrukt	BL-Behandlung	RQI
1_1	YFP	LP	9.7
2_1	C128A	LP	9.2
3_1	YFP	SPs	9.8
4_1	C128A	SPs	9.7
1_2	YFP	LP	9.1
2_2	C128A	LP	9.8
3_2	YFP	SPs	9.4
4_2	C128A	SPs	9.7
1_3	YFP	LP	8.8
2_3	CA	LP	9.1
3_3	YFP	SPs	9.0
4_3	CA	SPs	9.2

3.5.3 Ergebnis der Transkriptionsanalyse I: Chr2-vermittelte elektrische Signale erzeugen Stimulus-spezifische Genregulation in Pflanzen

Die statistische Analyse der signifikant regulierten Gene in den jeweiligen Behandlungen erfolgte auf der Basis eines q-Wertes von 0.01, welcher somit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von „Falsch-Positiven“ (FDR, engl. für false discovery rate) von 1% entsprach.

Tab. 3-3: Auswertung signifikant regulierter Gene: SPs = SPs-Proben zu SPs-Kontrolle; LP = LP-Proben zu LP-Kontrollen; Kontrollen = SPs-Kontrollen zu LP-Kontrollen

q-Wert	signifikant reguliert	SPs	LP	Kontrollen
q < 0.01	gemeinsam in SPs und LP	q < 0.01	q < 0.01	q > 0.01
	in SPs	q < 0.01	q > 0.01	q > 0.01
	in LP	q > 0.01	q < 0.01	q > 0.01

In der Ausführung dieser Auswertung wurden die q-Werte der Gene in den Behandlungen im Verhältnis zur Kontrolle mit $q < 0.01$ als signifikant reguliert definiert. Um eine etwaige Varianz in den Kontrollen selbst mit einzubeziehen, wurden die q-Werte der Kontrollen aus SPs- und LP-Behandlung > 0.01 , also nicht signifikant reguliert gesetzt. Daraus ergab sich folgendes Ergebnis:

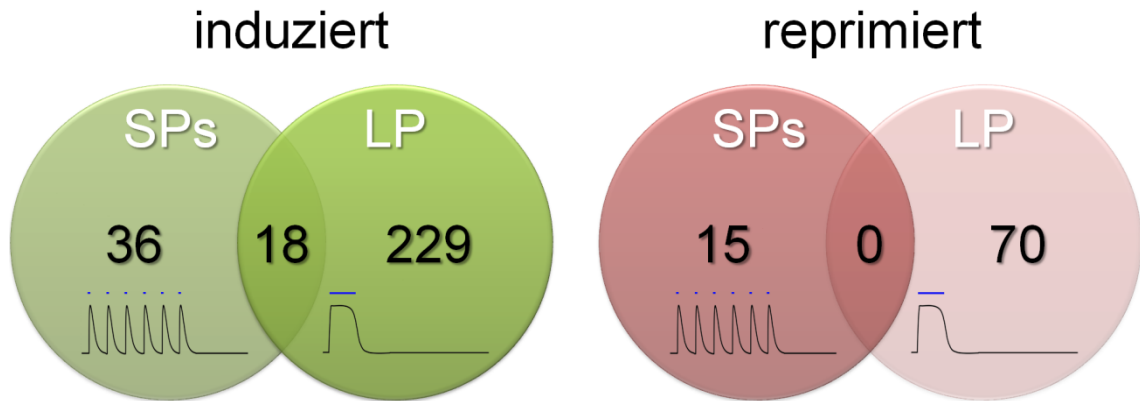


Abb. 3-33: VENN-Diagramm der RNA-Seq basierten Transkriptionsanalysen mit *N.benthamiana* – Ergebnisse für $q < 0.01$ als signifikant regulierte Gene (q -Werte der Kontrollen aus SPs und LP im Verhältnis zueinander wurden > 0.01 für nicht signifikant reguliert gesetzt; grün=induzierte Gene, rot=reprimierte Gene; schematisch dargestellte BL-induzierte, Chr2-vermittelte ΔV s)

Das in Abb. 3-33 dargestellte VENN-Diagramm der RNA-Seq-Analysen für $q < 0.01$ zeigt zwei Punkte deutlich:

- 1) Chr2-vermittelte elektrische Signale beeinflussen das Expressionsprofil in Pflanzen.
- 2) Die Form des elektrischen Signals beeinflusst entscheidend das Genregulationsmuster.

Hierbei wurde ersichtlich, dass die LP-Behandlung der Proben einen deutlich größeren Effekt auf die Genregulation hatte als die Applikation von SPs. Darüber hinaus konnten 18 Gene identifiziert werden, die durch beide Behandlungen reguliert wurden. Die prozentuale Verteilung der Genregulation ist in Tab. 3-4 zu sehen: Gemeinsam regulierte Gene wurden dabei ausschließlich induziert. Auch die in den einzelnen Behandlungen veränderte Genregulation erfolgte mit 71% bei SPs und 77% bei LP hauptsächlich in positiver Richtung.

Tab. 3-4: Verteilung der Genregulation im RNA-Seq Experiment – für gemeinsame, in SPs und in LP signifikant regulierte Gene mit $q < 0.01$

	SPs	LP	gemeinsame
insgesamt	51	299	18
induziert	71%	77%	100%
reprimiert	29%	23%	0%

Um diese Gene nun anhand der Funktion ihrer Genprodukte einordnen zu können, erfolgte (wie in Abschnitt 2.12.5 des Material und Methoden-Teils beschrieben) ein

„Mapping“ der Sequenzdaten auf verfügbare Sequenzen von Tomate (*Solanum lycopersicum*, kurz „Solyc“; <http://solgenomics.net/>), da von *N.benthamiana* keine vollständig sequenzierten und annotierten Genom-Daten existieren. Eine anschließende BLAST-Suche dieser Sequenzen auf Arabidopsis ermöglichte schließlich eine Zuordnung der biologischen Funktion dieser Gene anhand der AGI (Arabidopsis Genom Initiative)-Codes. Daher sind in dieser Betrachtung nur Gene enthalten, die auf Arabidopsis gemappt werden konnten. Auf dieser Basis konnten die so annotierten Gene nun in sogenannte Mapman-BINs (engl. für Tonne) eingeordnet werden, um eine Einteilung in Funktionsgruppen zu erhalten (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm; Mapman Version 3.5.1; TAIR10_Aug2012).

Die resultierenden Genlisten (siehe Tab. 3-6, Tab. 3-7 und Tab. 3-8) enthalten sowohl mehrfach zugeordnete AGI-Codes als auch einen AGI-Code mit zweifacher BIN-Zuteilung. Dies wurde in der Auswertung berücksichtigt, wodurch sich die Gesamtzahl an Genen erhöhte. Tab. 3-5 zeigt eine Übersicht für die einzelnen Behandlungen:

Tab. 3-5: Übersicht der auf Arabidopsis gemappten Solyc-IDs

	SPs	LP	gemeinsame
Solyc-IDs	51	299	18
gemappte Solyc-IDs	50	270	18
Einfache AGI-Codes	46	204	16
AGI-Codes mit doppelten BINs		1	
Gesamtzahl für BIN-Einteilung	50	271	18

Bei SPs konnten 50 der 51 signifikant regulierten Solyc-Gene auf Arabidopsis gemappt und somit AGI-Codes zugeordnet werden. Hiervon wurden vier doppelt auf einen AGI-Code gemappt. Alle Arabidopsis-Gene wurden eindeutig je einem BIN zugeteilt. Von 299 aus der LP-Behandlung resultierenden Genen konnten 270 Solyc-IDs entsprechenden AGI-Codes zugeteilt werden, wobei hier 64 Gene mehrfach auf Arabidopsis-Gene gemappt wurden. Hiervon wurden lediglich einem AGI-Code zwei BINs zugeteilt. Unter 18 gemeinsam regulierten Genen befanden sich zwei Gene, die jeweils auf ein gleiches Arabidopsis-Gen gemappt wurden. Es existierte hier keine mehrfache BIN-Zuweisung.

3.5.3.1 Genlisten

Welche Gene reguliert wurden, ist in den folgenden drei Tabellen gezeigt: Dargestellt werden die Identifikationsnummern, der auf Tabaksequenzen basierend gemappten Tomaten-Gene (Solyc-IDs), der dazugehörige AGI-Code des besten BLAST-Hits in Arabidopsis sowie deren Annotation und BIN-Einteilung (für Zuteilung der BIN-Nr. siehe Tab. 7-6 sowie die logarithmisch dargestellten Verhältnisse der Genexpressionsänderungen (log₂-fach, engl. logfold-change, mit logFC abgekürzt). Neben den in beiden Behandlungen regulierten Genen (Tab. 3-6) sind die durch SPs (Tab. 3-7) und LP (Tab. 3-8) signifikant veränderten Gene gezeigt. Die Gene sind absteigend nach ihrem logFC sortiert.

Tab. 3-6: „gemeinsam“ signifikant regulierte Gene für $q < 0.01$ (absteigend nach logFC, doppelt zugeordnete AGI-Codes in orange)

Solyc ID	AGI Code	TAIR10_Aug2012	BIN Nr.	SPs_logFC	LP_logFC
Solyc08g016720.1.1	AT1G30100.1	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5 (NCED5)	17	3.5	1.8
Solyc07g056320.1.1	AT1G06520.1	glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1)	11	2.9	1.8
Solyc11g066640.1.1	AT5G48930.1	hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/ quinate hydroxycinnamoyl transferase (HCT)	16	2.7	2.3
Solyc01g009330.1.1	AT3G52450.1	plant U-box 22 (PUB22)	27	2.6	1.7
Solyc06g074710.1.1	AT5G48930.1	hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/ quinate hydroxycinnamoyl transferase (HCT)	16	2.6	2.3
Solyc09g082890.1.1	AT3G22910.1	calcium-transporting ATPase, putative (ACA13)	30	2.4	1.7
Solyc09g072700.1.1	AT4G26010.1	Peroxidase superfamily protein	26	2.2	2.7
Solyc05g008360.1.1	AT1G15010.1	unknown protein	35	2.1	1.8
Solyc02g088710.1.1	AT1G62940.1	acyl-CoA synthetase 5 (ACOS5)	16	1.9	2.0
Solyc00g020840.1.1	AT5G23980.1	ferric reduction oxidase 4 (FRO4)	15	1.9	1.8
Solyc04g005480.1.1	AT2G03440.1	nodulin-related protein 1 (NRP1)	33	1.8	1.3
Solyc04g007620.1.1	AT2G01300.1	unknown protein	35	1.7	1.6
Solyc03g093620.1.1	AT3G45070.1	sulfotransferase family protein	11	1.5	2.1
Solyc03g122340.1.1	AT1G17420.1	lipxygenase 3 (LOX3)	17	1.5	1.6
Solyc00g026160.1.1	AT5G23980.1	ferric reduction oxidase 4 (FRO4)	15	1.5	1.8
Solyc10g012080.1.1	AT4G23470.1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	35	1.5	1.3
Solyc06g069130.1.1	AT1G18410.1	kinesin motor protein-related	31	1.4	1.5
Solyc03g117870.1.1	AT1G51680.1	4-coumarate:CoA ligase 1 (4CL1)	16	1.2	1.8

Tab. 3-7: Durch SPs signifikant regulierte Gene für $q < 0.01$ (absteigend nach logFC, doppelt zugeordnete AGIs in orange, k. Z. für keine Zuordnung)

Solyc ID	AGI Code	Annotation TAIR10_Aug2012	BIN Nr.	SPs_logFC
Solyc03g019750.1.1	AT3G08900.1	reversibly glycosylated polypeptide 3 (RGP3)	10	4.4
Solyc02g078130.1.1	AT4G20970.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	27	3.5
Solyc01g090370.1.1	AT2G44840.1	ethylene-responsive element binding factor 13 (ERF13)	17	3.2
Solyc04g074400.1.1	AT4G08950.1	EXORDIUM (EXO)	30	2.8
Solyc06g034410.1.1	AT5G62280.1	Protein of unknown function (DUF1442)	35	2.5
Solyc10g054770.1.1	AT4G38840.1	SAUR-like auxin-responsive protein family	17	2.3
Solyc11g005350.1.1	AT1G68170.1	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein	33	2.2
Solyc02g077590.1.1	AT5G53980.1	homeobox protein 52 (HB52)	27	2.2
Solyc10g006750.1.1	AT4G27310.1	B-box type zinc finger family protein	27	2.0
Solyc07g008250.1.1	AT2G25490.1	EIN3-binding F box protein 1 (EBF1)	29	2.0
Solyc03g118450.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	2.0
Solyc01g090970.1.1	AT4G00165.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/ seed storage 2S albumin family protein	26	2.0
Solyc07g063410.1.1	AT4G27410.2	RESPONSIVE TO DESICCATION 26 (RD26)	33	1.9
Solyc05g008730.1.1	AT2G25490.1	EIN3-binding F box protein 1 (EBF1)	29	1.9
Solyc02g083120.1.1	AT4G35720.1	Protein of unknown function (DUF241)	35	1.8
Solyc07g052610.1.1	AT3G21870.1	cyclin p2	31	1.8
Solyc02g070910.1.1	AT5G46330.1	FLAGELLIN-SENSITIVE 2 (FLS2)	30	1.7
Solyc04g079250.1.1	AT2G26560.1	phospholipase A 2A (PLA2A)	33	1.6
Solyc07g063210.1.1	AT3G15370.1	expansin 12 (EXPA12)	10	1.6
Solyc05g056410.1.1	AT3G14880.2	BEST Arabidopsis thaliana match: transcription factor-related	27	1.6
Solyc09g007080.1.1	AT3G12620.1	Protein phosphatase 2C family protein	29	1.6
Solyc01g098940.1.1	AT3G10720.2	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily	10	1.5
Solyc01g107740.1.1	AT4G34150.1	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	30	1.5
Solyc12g094640.1.1	AT1G42970.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit (GAPB)	1	1.5
Solyc01g006540.1.1	AT1G17420.1	lipoxigenase 3 (LOX3)	17	1.5
Solyc09g007790.1.1	AT5G03230.1	Protein of unknown function, DUF584	35	1.5
Solyc12g013620.1.1	AT4G27410.2	RESPONSIVE TO DESICCATION 26 (RD26)	33	1.5
Solyc02g077050.1.1	AT2G27420.1	Cysteine proteinases superfamily protein	29	1.5
Solyc03g097960.1.1	AT2G27660.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	35	1.4
Solyc03g123750.1.1	AT3G14360.1	lipase class 3 family protein	11	1.4
Solyc02g088690.1.1	AT3G29360.1	UDP-glucose 6-dehydrogenase family protein	10	1.4
Solyc07g054730.1.1	AT4G28240.1	Wound-responsive family protein	20	1.3
Solyc03g118410.1.1	AT4G25050.1	acyl carrier protein 4 (ACP4)	11	1.3
Solyc05g051200.1.1	AT3G23240.1	ethylene response factor 1 (ERF1)	17	1.3
Solyc02g069460.1.1	AT1G31330.1	photosystem I subunit F (PSAF)	1	1.3
Solyc08g013670.1.1	AT5G64040.1	PSAN	1	1.2
Solyc04g008110.1.1	AT1G27320.1	AHK3 (ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3)	17	-1.3
Solyc02g032100.1.1	AT3G12750.1	zinc transporter 1 precursor (ZIP1)	34	-1.4
Solyc03g096770.1.1	AT3G49570.1	RESPONSE TO LOW SULFUR 3 (LSU3)	35	-1.4
Solyc10g052510.1.1	AT4G39230.1	isoflavone reductase, putative	16	-1.5
Solyc04g082120.1.1	AT1G20380.1	Prolyl oligopeptidase family protein	29	-1.5
Solyc03g096780.1.1	AT3G49570.1	RESPONSE TO LOW SULFUR 3 (LSU3)	35	-1.6
Solyc04g007210.1.1	AT1G25440.1	B-box type zinc finger protein with CCT domain	27	-1.6
Solyc01g007620.1.1	ATCG00820.1	ribosomal protein S19 (RPS19)	29	-1.6
Solyc03g112580.1.1	AT1G17230.1	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	30	-1.6
Solyc01g110610.1.1	AT1G75580.1	SAUR-like auxin-responsive protein family	17	-1.9
Solyc03g116480.1.1	AT1G27340.1	F-box family protein	29	-2.0
Solyc09g005110.1.1	AT4G33070.1	Thiamine pyrophosphate dependent pyruvate decarboxylase family protein	5	-2.0
Solyc01g110590.1.1	AT2G21220.1	SAUR-like auxin-responsive protein family	17	-2.0
Solyc12g007160.1.1	AT3G49290.1	ABL interactor-like protein 2 (ABIL2)	35	-3.5
Solyc02g077240.1.1	AT4G33070.1	Thiamine pyrophosphate dependent pyruvate decarboxylase family protein	5	-5.3

Tab. 3-8: Durch LP signifikant regulierte Gene für $q < 0.01$ (absteigend nach logFC, doppelt zugeordnete AGIs in orange, k. Z. für keine Zuordnung, AGI-Code mit zweifacher BIN-Zuordnung in rot)

Solyc ID	AGI Code	TAIR10_Aug2012	BIN Nr.	LP_logFC
Solyc02g085660.1.1	AT3G50740.1	UDP-glucosyl transferase 72E1 (UGT72E1)	16	3.4
Solyc01g080960.1.1	AT4G17800.1	Predicted AT-hook DNA-binding family protein	35	3.2
Solyc09g084440.1.1	AT2G38870.1	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	20	3.2
Solyc11g066420.1.1	AT5G22890.1	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	27	3.1
Solyc01g094240.1.1	AT3G61220.1	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	26	2.8
Solyc09g010960.1.1	AT5G43290.1	WRKY DNA-binding protein 49 (WRKY49)	27	2.7
Solyc04g051180.1.1	AT1G21140.1	nodulin, putative	33	2.7
Solyc10g085370.1.1	AT5G01700.2	Protein phosphatase 2C family protein	29	2.6
Solyc01g094260.1.1	AT3G61220.1	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	26	2.6
Solyc01g094270.1.1	AT2G24190.2	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	26	2.5
Solyc01g094250.1.1	AT3G61220.1	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	26	2.3
Solyc05g052880.1.1	AT5G02020.1	unknown protein	35	2.3
Solyc08g079960.1.1	AT3G14067.1	Subtilase family protein	29	2.2
Solyc08g007560.1.1	AT4G12050.1	Predicted AT-hook DNA-binding family protein	27	2.2
Solyc10g081780.1.1	AT2G35910.1	RING/U-box superfamily protein	29	2.1
Solyc01g010420.1.1	AT1G27100.1	Actin cross-linking protein	35	2.1
Solyc02g077060.1.1	AT3G50450.1	homolog of RPW8 1 (HR1)	20	2.1
Solyc01g079940.1.1	AT1G03220.1	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	29	2.1
Solyc01g079930.1.1	AT1G03220.1	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	29	2.1
Solyc01g079910.1.1	AT1G03220.1	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	29	2.1
Solyc01g079920.1.1	AT1G03220.1	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	29	2.0
Solyc10g086090.1.1	AT2G38870.1	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	20	2.0
Solyc09g014910.1.1	AT5G01750.2	unknown protein	35	2.0
Solyc02g092820.1.1	AT1G28130.1	GH3.17	17	2.0
Solyc01g079900.1.1	AT1G03220.1	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	29	2.0
Solyc10g086100.1.1	AT2G38870.1	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	20	2.0
Solyc12g010980.1.1	AT3G26040.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein	35	2.0
Solyc02g021290.1.1	ATCG00020.1	photosystem II reaction center protein A (PSBA)	1	2.0
Solyc07g009040.1.1	AT1G19610.1	PDF1.4	20	2.0
Solyc06g011590.1.1	AT2G28120.1	nodulin family protein	33	1.9
Solyc01g068380.1.1	AT5G50400.1	purple acid phosphatase 27 (PAP27)	26	1.9
Solyc07g009360.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.9
Solyc10g074840.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.9
Solyc04g076750.1.1	AT1G09930.1	oligopeptide transporter 2 (OPT2)	34	1.9
Solyc00g080750.1.1	AT2G01340.1	unknown protein	35	1.9
Solyc07g008290.1.1	AT3G21190.1	unknown protein	35	1.8
Solyc01g079950.1.1	AT1G03230.1	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	29	1.8
Solyc09g059460.1.1	AT4G27870.1	integral membrane family protein	35	1.8
Solyc06g065530.1.1	AT1G29670.1	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	26	1.8
Solyc03g121190.1.1	AT1G51920.1	unknown protein	35	1.8
Solyc08g067270.1.1	AT5G21280.1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	35	1.8
Solyc11g027690.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.7
Solyc12g039030.1.1	ATCG00020.1	photosystem II reaction center protein A (PSBA)	1	1.7
Solyc01g079970.1.1	AT1G03220.1	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	29	1.7
Solyc01g097530.1.1	ATCG00020.1	photosystem II reaction center protein A (PSBA)	1	1.7
Solyc09g066400.1.1	AT3G26300.1	CYP71B34	26	1.7
Solyc04g008480.1.1	AT1G14600.1	Homeodomain-like superfamily protein	27	1.7
Solyc10g006920.1.1	AT5G53750.1	unknown protein	35	1.7
Solyc09g009980.1.1	AT2G36210.1	SAUR-like auxin-responsive protein family	17	1.7
Solyc01g106200.1.1	AT5G64410.1	oligopeptide transporter 4 (OPT4)	34	1.7
Solyc08g077010.1.1	AT4G17800.1	Predicted AT-hook DNA-binding family protein	35	1.7
Solyc03g094020.1.1	AT3G45940.1	alpha-xylosidase, putative	26	1.7
Solyc12g015920.1.1	AT3G07600.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	15	1.6
Solyc10g047170.1.1	AT1G22150.1	SULTR1;3 SULTR1;3; sulfate transmembrane transporter	34	1.6

Solyc ID	AGI Code	TAIR10_Aug2012	BIN Nr.	LP_logFC
Solyc10g081790.1.1	AT2G35910.1	RING/U-box superfamily protein	29	1.6
Solyc04g011480.1.1	AT2G39518.1	Uncharacterised protein family (UPF0497)	35	1.6
Solyc03g120550.1.1	AT1G52190.1	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	34	1.6
Solyc11g007890.1.1	AT2G36690.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase family protein	26	1.6
Solyc01g017500.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.6
Solyc01g048590.1.1	ATCG00020.1	photosystem II reaction center protein A (PSBA)	1	1.6
Solyc12g055960.1.1	AT5G15050.1	glycosyltransferase family 14 protein	26	1.6
Solyc03g113810.1.1	AT3G48180.1	unknown protein	35	1.6
Solyc08g079970.1.1	AT5G67360.1	ARA12	29	1.6
Solyc11g069220.1.1	AT1G61560.1	MILDEW RESISTANCE LOCUS O 6 (MLO6)	20	1.6
Solyc05g016120.1.1	ATCG00020.1	photosystem II reaction center protein A (PSBA)	1	1.6
Solyc01g079980.1.1	AT1G03220.1	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	29	1.6
Solyc05g008220.1.1	AT2G01340.1	unknown protein	35	1.6
Solyc08g006730.1.1	AT2G39030.1	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	26	1.6
Solyc01g079960.1.1	AT1G03220.1	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	29	1.6
Solyc04g011490.1.1	AT2G39530.1	integral membrane protein, putative	35	1.6
Solyc05g050880.1.1	AT5G05340.1	Peroxidase superfamily protein	26	1.6
Solyc03g006250.1.1	AT1G28590.1	lipase, putative	26	1.6
Solyc02g089720.1.1	AT1G18310.1	glycosyl hydrolase family 81 protein	35	1.6
Solyc11g027650.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.6
Solyc11g051210.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.6
Solyc08g006750.1.1	AT1G43710.1	embryo defective 1075 (emb1075)	13	1.6
Solyc12g088940.1.1	AT5G66850.1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAPKKK5)	30	1.6
Solyc08g016770.1.1	AT1G43710.1	embryo defective 1075 (emb1075)	13	1.6
Solyc10g083230.1.1	AT2G36090.1	F-box family protein	29	1.6
Solyc02g090490.1.1	AT4G37050.1	PATATIN-like protein 4 (PLP4)	33	1.6
Solyc01g065590.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.6
Solyc09g066370.1.1	AT3G26300.1	CYP71B34	26	1.5
Solyc09g065100.1.1	AT4G09820.1	TRANSPARENT TESTA 8 (TT8)	27	1.5
Solyc03g044830.1.1	AT3G18950.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	28	1.5
Solyc07g005400.1.1	AT2G24260.1	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	27	1.5
Solyc12g042460.1.1	AT1G51680.1	4-coumarate:CoA ligase 1 (4CL1)	16	1.5
Solyc09g014740.1.1	AT1G21270.1	wall-associated kinase 2 (WAK2)	30	1.5
Solyc08g006740.1.1	AT1G43710.1	embryo defective 1075 (emb1075)	13	1.5
Solyc11g044620.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.5
Solyc11g021170.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.5
Solyc11g044610.1.1	ATCG01050.1	NDHD	1	1.5
Solyc03g117830.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.5
Solyc05g009310.1.1	AT1G25440.1	B-box type zinc finger protein with CCT domain	27	1.5
Solyc01g096670.1.1	AT2G40890.1	CYP98A3	16	1.5
Solyc00g056680.1.1	AT4G16820.1	lipase class 3 family protein	11	1.5
Solyc06g007690.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.5
Solyc11g066330.1.1	AT2G28120.1	nodulin family protein	33	1.5
Solyc01g095150.1.1	AT2G46140.1	Late embryogenesis abundant protein	33	1.5
Solyc12g044980.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.5
Solyc02g011880.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.5
Solyc00g277510.1.1	ATCG00020.1	photosystem II reaction center protein A (PSBA)	1	1.5
Solyc04g079400.1.1	AT5G66850.1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAPKKK5)	30	1.5
Solyc01g067300.1.1	AT4G15610.1	integral membrane family protein	35	1.5
Solyc02g011990.1.1	ATCG00020.1	photosystem II reaction center protein A (PSBA)	1	1.5
Solyc01g098580.1.1	AT3G05170.1	Phosphoglycerate mutase family protein	4	1.5
Solyc11g044630.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.5
Solyc01g007050.1.1	AT3G11840.1	plant U-box 24 (PUB24)	27	1.5
Solyc01g007730.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.5

Solyc ID	AGI Code	TAIR10_Aug2012	BIN Nr.	LP_logFC
Solyc11g056340.1.1	ATCG00020.1	photosystem II reaction center protein A (PSBA)	1	1.4
Solyc08g068730.1.1	AT2G39030.1	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	26	1.4
Solyc06g043130.1.1	AT5G13930.1	TRANSPARENT TESTA 4 (TT4)	16	1.4
Solyc04g012080.1.1	AT4G14050.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	35	1.4
Solyc06g043020.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.4
Solyc01g017490.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.4
Solyc10g081520.1.1	AT1G45063.1	copper ion binding	35	1.4
Solyc06g068650.1.1	AT1G51680.1	4-coumarate:CoA ligase 1 (4CL1)	16	1.4
Solyc09g090210.1.1	AT2G41970.1	Protein kinase superfamily protein	29	1.4
Solyc01g007700.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.4
Solyc01g005390.1.1	AT1G14860.1	nudix hydrolase homolog 18 (NUDT18)	23	1.4
Solyc05g054250.1.1	AT5G19090.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	35	1.4
Solyc08g068770.1.1	AT2G39030.1	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	26	1.4
Solyc11g013780.1.1	ATCG00020.1	photosystem II reaction center protein A (PSBA)	1	1.4
Solyc07g064720.1.1	AT5G55050.1	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	26	1.4
Solyc04g072020.1.1	AT1G71697.1	choline kinase 1 (CK1)	11	1.4
Solyc05g011880.1.1	AT5G02230.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) family protein	35	1.4
Solyc09g064170.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.4
Solyc09g014710.1.1	AT1G21270.1	wall-associated kinase 2 (WAK2)	30	1.4
Solyc09g014720.1.1	AT1G21270.1	wall-associated kinase 2 (WAK2)	30	1.4
Solyc03g120560.1.1	AT1G52190.1	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	34	1.4
Solyc01g067330.1.1	AT4G15630.1	integral membrane family protein	35	1.4
Solyc08g005330.1.1	AT5G02930.1	F-box/RNI-like superfamily protein	29	1.4
Solyc01g007710.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.4
Solyc08g080310.1.1	AT4G23030.1	MATE efflux family protein	34	1.4
Solyc05g041910.1.1	AT5G47530.1	Auxin-responsive family protein	17	1.4
Solyc10g085360.1.1	AT2G36190.1	cell wall invertase 4 (cwINV4)	2	1.4
Solyc11g051180.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.4
Solyc11g021150.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.4
Solyc06g017930.1.1	ATCG00860.1	YCF2.1	29	1.4
Solyc01g107910.1.1	AT4G34050.1	caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase 1 (CCoAOMT1)	16	1.4
Solyc03g019980.1.1	AT3G47090.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	30	1.4
Solyc04g039760.1.1	ATCG00860.1	YCF2.1	29	1.4
Solyc01g017050.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.4
Solyc01g010080.1.1	AT4G32650.1	potassium channel in Arabidopsis thaliana 3 (KAT3)	34	1.4
Solyc10g083290.1.1	AT2G36190.1	cell wall invertase 4 (cwINV4)	2	1.4
Solyc04g025530.1.1	AT1G65960.2	glutamate decarboxylase 2 (GAD2)	13	1.4
Solyc10g086710.1.1	AT3G54040.1	PAR1 protein	30	1.3
Solyc07g048060.1.1	AT3G59070.1	auxin-responsive protein, putative	17	1.3
Solyc09g011790.1.1	AT3G54040.1	PAR1 protein	30	1.3
Solyc08g007540.1.1	AT1G12420.1	ACT domain repeat 8 (ACR8)	13	1.3
Solyc02g089150.1.1	AT1G13680.1	PLC-like phosphodiesterases superfamily protein	11	1.3
Solyc10g050160.1.1	AT4G34050.1	caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase 1 (CCoAOMT1)	16	1.3
Solyc05g008210.1.1	AT2G01340.1	unknown protein	35	1.3
Solyc05g007940.1.1	AT2G02990.1	ribonuclease 1 (RNS1)	27	1.3
Solyc02g084570.1.1	AT4G36220.1	ferulic acid 5-hydroxylase 1 (FAH1)	16	1.3
Solyc03g058220.1.1	ATCG00860.1	YCF2.1	29	1.3
Solyc07g056400.1.1	AT3G14370.1	WAG2	29	1.3
Solyc09g097850.1.1	AT2G31980.1	cysteine proteinase inhibitor-related	29	1.3
Solyc09g014730.1.1	AT1G21270.1	wall-associated kinase 2 (WAK2)	30	1.3
Solyc02g069250.1.1	AT4G39330.1	cinnamyl alcohol dehydrogenase 9 (CAD9)	16	1.3
Solyc06g024270.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.3
Solyc01g005000.1.1	AT1G65960.2	glutamate decarboxylase 2 (GAD2)	13	1.3
Solyc01g106800.1.1	AT1G58360.1	amino acid permease 1 (AAP1)	34	1.3

Solyc ID	AGI Code	TAIR10_Aug2012	BIN Nr.	LP_logFC
Solyc11g039860.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.3
Solyc07g006280.1.1	AT2G23810.1	tetraspanin8 (TET8)	33	1.3
Solyc03g059080.1.1	AT2G41970.1	Protein kinase superfamily protein	29	1.3
Solyc09g072810.1.1	AT1G17230.1	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	30	1.3
Solyc08g068780.1.1	AT2G39030.1	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	26	1.3
Solyc07g008110.1.1	AT2G32300.1	uclacyanin 1 (UCC1)	26	1.3
Solyc12g010570.1.1	AT2G23810.1	tetraspanin8 (TET8)	33	1.3
Solyc01g099190.1.1	AT1G17420.1	lipoxygenase 3 (LOX3)	17	1.3
Solyc12g056960.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.3
Solyc09g090830.1.1	AT4G26500.1	chloroplast sulfur E (CPSUFE)	18	1.3
Solyc11g072550.1.1	AT4G15093.1	catalytic LigB subunit of aromatic ring-opening dioxygenase family	35	1.3
Solyc01g007330.1.1	ATCG00490.1	RBCL (large subunit of RUBISCO)	1	1.3
Solyc05g054660.1.1	AT2G28710.1	C2H2-type zinc finger family protein	27	1.3
Solyc04g076880.1.1	AT4G37870.1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1)	6	1.3
Solyc05g006340.1.1	AT1G24130.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	35	1.3
Solyc09g009150.1.1	AT5G03700.1	PAN domain-containing protein	35	1.3
Solyc12g062450.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.3
Solyc12g088040.1.1	AT5G02070.1	Protein kinase family protein	30	1.3
Solyc00g018970.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.3
Solyc05g048850.1.1	AT2G45810.1	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein	28	1.3
Solyc01g099680.1.1	AT3G05500.1	Rubber elongation factor protein (REF)	35	1.3
Solyc03g036480.1.1	AT3G10340.1	phenylalanine ammonia-lyase 4 (PAL4)	16	1.3
Solyc02g079500.1.1	AT5G05340.1	Peroxidase superfamily protein	26	1.3
Solyc09g011670.1.1	AT3G53990.1	universal stress protein (USP) family protein	20	1.3
Solyc10g086180.1.1	AT2G37040.1	PHE ammonia lyase 1 (PAL1)	16	1.3
Solyc11g045440.1.1	k. Z.	k. Z.	k. Z.	1.3
Solyc02g085800.1.1	AT5G16080.1	carboxyesterase 17 (CXE17)	24	1.2
Solyc09g010940.1.1	AT5G02230.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	35	1.2
Solyc03g120600.1.1	AT1G52200.1	unknown protein	35	1.2
Solyc03g119980.1.1	AT1G52760.1	lysophospholipase 2 (LysoPL2)	11	1.2
Solyc03g006400.1.1	AT5G58950.1	Protein kinase superfamily protein	29	1.2
Solyc09g007910.1.1	AT2G37040.1	PHE ammonia lyase 1 (PAL1)	16	1.2
Solyc03g071870.1.1	AT3G53260.1	phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2)	16	1.2
Solyc02g078500.1.1	AT4G27450.1	unknown protein	17	1.2
Solyc02g079510.1.1	AT5G05340.1	Peroxidase superfamily protein	26	1.2
Solyc01g081450.1.1	AT5G17650.1	glycine/proline-rich protein	35	1.2
Solyc03g120980.1.1	AT1G15210.1	pleiotropic drug resistance 7 (PDR7)	34	1.2
Solyc10g052880.1.1	AT1G33590.1	disease resistance protein-related / LRR protein-related	20	1.2
Solyc04g080790.1.1	AT1G75410.1	BEL1-like homeodomain 3 (BLH3)	27	1.2
Solyc04g054690.1.1	AT4G39830.1	L-ascorbate oxidase, putative	21	1.2
Solyc03g122360.1.1	AT5G07990.1	TRANSPARENT TESTA 7 (TT7)	16	1.2
Solyc04g054660.1.1	AT4G39830.1	L-ascorbate oxidase, putative	21	1.2
Solyc01g090180.1.1	AT4G15093.1	catalytic LigB subunit of aromatic ring-opening dioxygenase family	35	1.2
Solyc09g010080.1.1	AT2G36190.1	cell wall invertase 4 (cwINV4)	2	1.2
Solyc12g040570.1.1	AT3G02360.1	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	7	1.2
Solyc12g008970.1.1	AT2G19450.1	TRIACYLGLYCEROL BIOSYNTHESIS DEFECT 1 (TAG1)	11	1.2
Solyc12g019890.1.1	AT1G64760.1	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	26	1.2
Solyc07g008120.1.1	AT2G32300.1	uclacyanin 1 (UCC1)	26	1.2
Solyc03g122350.1.1	AT5G07990.1	TRANSPARENT TESTA 7 (TT7)	16	1.2
Solyc08g068870.1.1	AT5G10760.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein	27	1.2
Solyc01g105070.1.1	AT2G41480.1	Peroxidase superfamily protein	26	1.2
Solyc02g062850.1.1	AT2G18480.1	mannitol transporter, putative	34	1.2
Solyc10g083300.1.1	AT1G55120.1	beta-fructofuranosidase 5 (FRUCT5)	3	1.2
Solyc01g099160.1.1	AT1G17420.1	lipoxygenase 3 (LOX3)	17	1.2

Solyc ID	AGI Code	TAIR10_Aug2012	BIN Nr.	LP_logFC
Solyc11g011050.1.1	AT1G66230.1	myb domain protein 20 (MYB20)	27	1.2
Solyc05g007230.1.1	AT1G17230.1	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	30	1.2
Solyc01g099170.1.1	AT1G55020.1	lipoxygenase 1 (LOX1)	17	1.2
Solyc09g011660.1.1	AT3G53990.1	universal stress protein (USP) family protein	20	1.2
Solyc04g082500.1.1	AT1G76360.1	Protein kinase superfamily protein	29	1.2
Solyc03g114100.1.1	AT1G52720.1	unknown protein	35	1.2
Solyc09g007900.1.1	AT2G37040.1	PHE ammonia lyase 1 (PAL1)	16	1.2
Solyc07g048070.1.1	AT4G17280.1	Auxin-responsive family protein	17	1.2
Solyc10g055800.1.1	AT3G12500.1	basic chitinase (HCHIB)	20	1.2
Solyc10g055810.1.1	AT3G12500.1	basic chitinase (HCHIB)	20	1.2
Solyc09g007890.1.1	AT2G37040.1	PHE ammonia lyase 1 (PAL1)	16	1.2
Solyc03g036470.1.1	AT2G37040.1	PHE ammonia lyase 1 (PAL1)	16	1.2
Solyc05g005460.1.1	AT1G60420.1	DC1 domain-containing protein	35	1.1
Solyc03g118470.1.1	AT2G01670.1	nudix hydrolase homolog 17 (NUDT17)	23	-1.1
Solyc02g084740.1.1	AT4G36380.1	ROTUNDIFOLIA 3 (ROT3)	17	-1.2
Solyc02g088560.1.1	AT5G15410.1	DEFENSE NO DEATH 1 (DND1, CNGC2)	34	-1.2
Solyc03g044060.1.1	AT5G67470.1	formin homology 2 domain-containing protein	35	-1.2
Solyc01g100370.1.1	AT3G62550.1	universal stress protein (USP) family protein	17	-1.2
Solyc12g098610.1.1	AT3G23730.1	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 16 (XTH16)	10	-1.2
Solyc03g119540.1.1	AT1G25440.1	B-box type zinc finger protein with CCT domain	27	-1.2
Solyc11g008630.1.1	AT1G65450.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein	26	-1.2
Solyc07g064160.1.1	AT5G54770.1	THI1	18	-1.2
Solyc01g111570.1.1	AT2G16750.1	Protein kinase family protein	29	-1.2
Solyc02g087350.1.1	AT3G28340.1	galacturonosyltransferase-like 10 (GATL10)	3	-1.2
Solyc01g095530.1.1	AT5G41761.1	unknown protein	35	-1.2
Solyc12g099930.1.1	AT2G13360.1	alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT)	1 und 13	-1.2
Solyc02g092560.1.1	AT5G67385.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein	30	-1.2
Solyc01g091530.1.1	AT3G60900.1	FASCICLIN-like arabinogalactan-protein 10 (FLA10)	10	-1.3
Solyc01g080070.1.1	AT3G06130.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	35	-1.3
Solyc12g055840.1.1	AT1G32860.1	Glycosyl hydrolase superfamily protein	26	-1.3
Solyc05g054750.1.1	AT3G55240.1	unknown protein	35	-1.3
Solyc04g024780.1.1	AT1G23710.1	Protein of unknown function (DUF1645)	35	-1.3
Solyc06g059740.1.1	AT1G77120.1	alcohol dehydrogenase 1 (ADH1)	5	-1.3
Solyc02g092600.1.1	AT5G67385.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein	30	-1.3
Solyc07g006910.1.1	AT5G55950.1	transporter-related	35	-1.3
Solyc06g036640.1.1	AT5G28910.2	unknown protein	35	-1.3
Solyc01g110360.1.1	AT2G21330.1	fructose-bisphosphate aldolase 1 (FBA1)	1	-1.4
Solyc12g096080.1.1	AT4G34131.1	UDP-glucosyl transferase 73B3 (UGT73B3)	26	-1.4
Solyc03g093540.1.1	AT5G51190.1	AP2 domain-containing transcription factor, putative	17	-1.4
Solyc03g097380.1.1	AT5G63530.1	farnesylated protein 3 (FP3)	15	-1.4
Solyc11g008680.1.1	AT3G02630.1	Plant stearyl-acyl-carrier-protein desaturase family protein	11	-1.4
Solyc05g009270.1.1	AT1G25450.1	3-ketoacyl-CoA synthase 5 (KCS5)	16	-1.4
Solyc02g064720.1.1	AT5G67385.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein	30	-1.4
Solyc02g094190.1.1	AT3G01930.1	nodulin family protein	33	-1.4
Solyc11g044360.1.1	AT4G38160.1	pigment defective 191 (pde191)	27	-1.4
Solyc09g092500.1.1	AT4G15550.1	indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase (IAGLU)	26	-1.4
Solyc12g099780.1.1	AT1G67870.1	glycine-rich protein	35	-1.4
Solyc03g119550.1.1	AT1G21880.2	lysm domain GPI-anchored protein 1 precursor (LYM1)	35	-1.4
Solyc06g005980.1.1	AT2G29690.1	anthranilate synthase 2 (ASA2)	13	-1.5
Solyc09g014400.1.1	AT5G01260.2	Carbohydrate-binding-like fold	2	-1.5
Solyc07g042100.1.1	AT1G17400.1	unknown protein	35	-1.5
Solyc03g093560.1.1	AT5G51190.1	AP2 domain-containing transcription factor, putative	17	-1.5
Solyc02g069490.1.1	AT3G19820.1	DWARF 1 (DWF1)	17	-1.5
Solyc03g120790.1.1	AT1G15260.1	unknown protein	35	-1.5

Solyc ID	AGI Code	TAIR10_Aug2012	BIN Nr.	LP_logFC
Solyc10g006800.1.1	AT5G54250.1	cyclic nucleotide-gated cation channel 4 (CNGC4)	34	-1.6
Solyc08g078170.1.1	AT4G17500.1	ethylene responsive element binding factor 1 (ERF-1)	17	-1.6
Solyc07g006600.1.1	AT5G57685.1	glutamine dumper 3 (GDU3)	35	-1.6
Solyc00g323130.1.1	AT1G70830.1	MLP-like protein 28 (MLP28)	20	-1.6
Solyc02g078450.1.1	AT2G20740.1	unknown protein	35	-1.6
Solyc05g007690.1.1	AT5G15310.1	myb domain protein 16 (MYB16)	27	-1.7
Solyc09g065660.1.1	AT3G22830.1	heat shock transcription factor A6B (HSFA6B)	27	-1.7
Solyc12g005400.1.1	AT5G15410.1	DEFENSE NO DEATH 1 (DND1, CNGC2)	34	-1.7
Solyc06g051750.1.1	AT5G05690.1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC DWARF (CPD)	17	-1.8
Solyc03g093390.1.1	AT1G65680.1	expansin B2 (EXPB2)	10	-1.8
Solyc04g018090.1.1	AT2G01980.1	SALT OVERLY SENSITIVE 1 (SOS1)	34	-1.8
Solyc01g099260.1.1	AT3G05345.1	heat shock protein binding	20	-1.8
Solyc12g008800.1.1	AT5G56840.1	DNA-binding family protein	27	-1.8
Solyc12g088390.1.1	AT1G27730.1	salt tolerance zinc finger (STZ, ZAT10)	27	-1.8
Solyc00g280110.1.1	AT3G55240.1	unknown protein	35	-1.9
Solyc07g008430.1.1	AT5G57123.1	unknown protein	35	-1.9
Solyc10g085880.1.1	AT2G36780.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	26	-1.9
Solyc11g020860.1.1	AT1G30260.1	unknown protein	35	-1.9
Solyc10g008160.1.1	AT5G44190.1	GOLDEN2-like 2 (GLK2)	27	-2.1
Solyc05g009950.1.1	AT1G26100.1	Cytochrome b561/ferric reductase transmembrane protein family	21	-2.1
Solyc03g093180.1.1	AT3G47430.1	peroxin 11B (PEX11B)	31	-2.1
Solyc02g090990.1.1	AT4G36950.1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 21 (MAPKKK21)	35	-2.2
Solyc10g084430.1.1	AT5G02750.1	RING/U-box superfamily protein	29	-2.2
Solyc07g054750.1.1	AT4G10270.1	Wound-responsive family protein	20	-2.3
Solyc02g081820.1.1	AT5G44730.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	33	-2.3
Solyc03g113460.1.1	AT2G47130.1	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	26	-2.3
Solyc03g113130.1.1	AT5G15120.1	unknown protein	35	-2.5
Solyc01g107460.1.1	AT2G15020.1	unknown protein	35	-2.8
Solyc12g005750.1.1	AT4G15248.1	B-box type zinc finger family protein	28	-4.9

Die Tabellen der jeweiligen Behandlungen mit auf „Reads per Million“ normalisierten Expressionsniveaus bzw. der Qualität der BLAST-Treffer sind im Anhang unter Abschnitt 7.4 aufgeführt.

3.5.3.2 Funktionelle Einordnung der Gene in Mapman-BINs

Die Verteilung der BINs für die spezifisch in SPs und LP bzw. der gemeinsam signifikant regulierten Gene ist in Abb. 3-34 dargestellt.

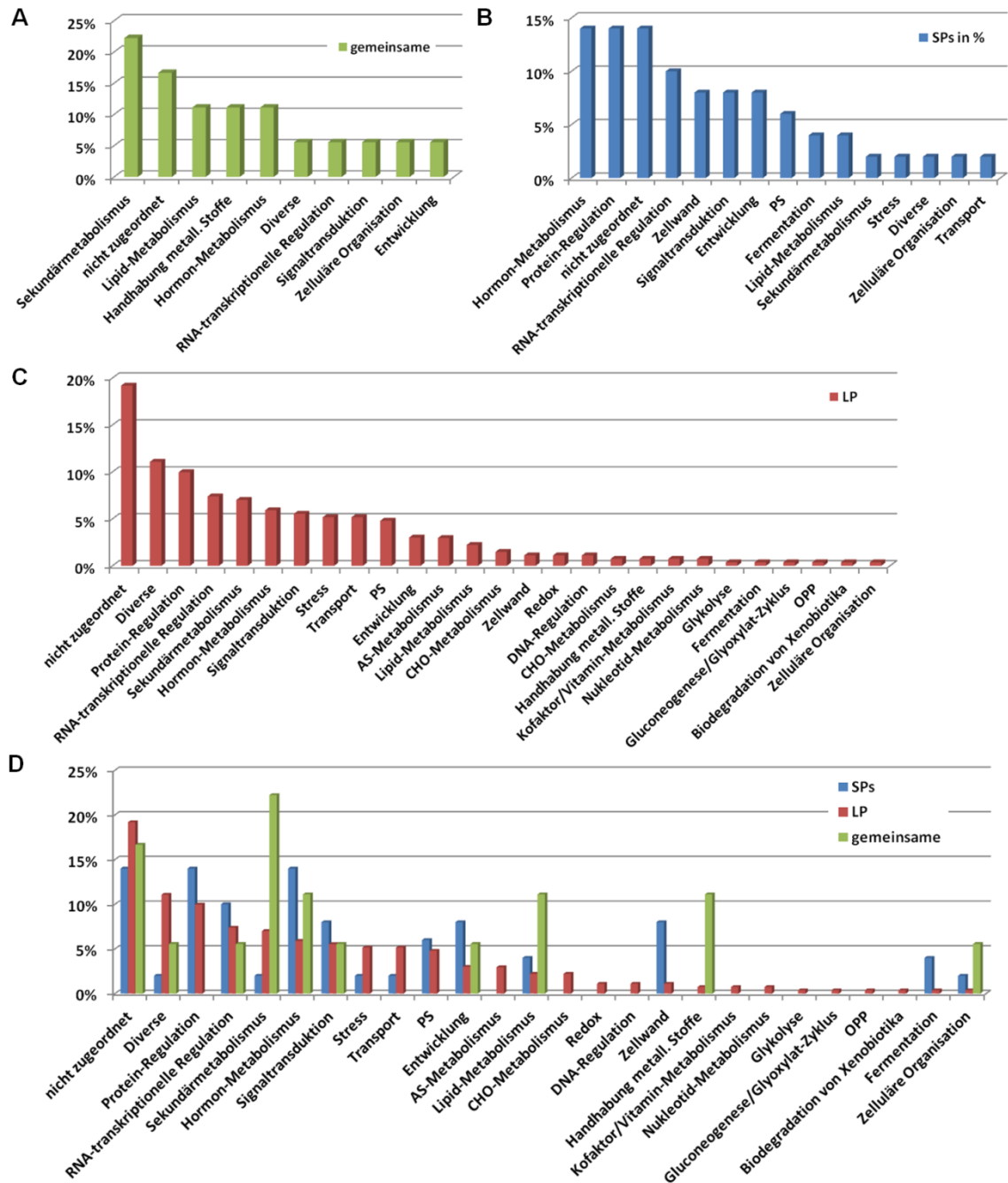


Abb. 3-34: BIN-Verteilung in Prozent für A) gemeinsame Gene (grün), B) spezifisch in SPs (blau) und C) spezifisch in LP (rot) regulierte Gene – absteigend geordnet; D) BIN-Verteilung in Prozent im Vergleich – absteigend geordnet für LP (PS = Photosynthese, AS-Metabolismus = Aminosäure-Metabolismus, CHO-Metabolismus = Kohlenhydrat-Metabolismus, OPP = oxidativer Pentose-Phosphat-Stoffwechsel)

Anhand der obigen Abbildung ist deutlich erkennbar, dass sich die Art der Genregulation stark zwischen LP und SPs unterscheidet. Insgesamt wurden Gene aus 26 verschiedenen BINs gesteuert (15 durch SPs, 26 durch LP und 10 gemeinsam). Da durch LP im Vergleich zu SPs eine etwa sechs Mal höhere Anzahl an Genen reguliert wurde sowie durch SPs keine BINs angesteuert wurden, die nicht auch in LP enthalten waren, zeigen die absoluten Werte immer eine erhöhte Regulation bei LP mit Ausnahme des BINs

Zellwand. Daher wurde der Anteil der Gene in den jeweiligen BINs prozentual für jede Behandlung einzeln dargestellt. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass der prozentuale Anteil eines BINs im Vergleich bei SPs zwar höher sein kann, die absolute Anzahl an Genen jedoch bei LP überwiegt. Des Weiteren ist zu beachten, dass bei dieser Betrachtung keine Berücksichtigung der Art der Genregulation, d. h. positiv bzw. negativ sowie deren Höhe vorliegt. Infolgedessen ist die Richtung der Regulation für eine genauere Betrachtung zusätzlich im Anhang in Tab. 7-6 dargestellt.

Abb. 3-34 A zeigt deutlich, dass die gemeinsam regulierten Gene zu über 20% eine Rolle im Sekundärmetabolismus der Pflanze spielen. Mit jeweils 14% stellen die BINs Hormon-Metabolismus, Protein-Regulation sowie nicht zugeordnete Gene die größten Gruppen der SPs-Behandlung dar (siehe Abb. 3-34 B). Den höchsten Anteil an Genen, die durch LP reguliert wurden, bilden mit 19% nicht zugeordnete Gene (siehe Abb. 3-34 C). Darauf folgen Gene, die dem BIN Diverse zugeteilt werden, da sie sich in keinen anderen, der bestehenden BINs einordnen ließen, sowie Gene, die eine Rolle in der Proteinregulation spielen.

Unterschiede lassen sich in den BINs Zellwand und Hormon-Metabolismus feststellen: Hierbei zeigt sich ein erhöhter prozentualer Anteil für SPs, während die BINs Protein-Regulation, transkriptionelle Regulation, Signaltransduktion, Entwicklung und Fermentation einen lediglich leicht erhöhten Prozentsatz im Gegensatz zu LP aufweisen. Mit 11% im Gegensatz zu 2% stellen Gene des BINs Diverse den größten prozentualen Unterschied in LP zu SPs dar. Neben Gruppen wie z. B. dem Kohlenhydrat-Metabolismus oder der DNA-Regulation, die ausschließlich bei LP auftreten, zeigen Gene, die eine Rolle in der Stressreaktion oder im Transport spielen, sowie keinem BIN zugeordnete Gene eine leichte Erhöhung bei LP. In der Betrachtung der gemeinsam regulierten Gene treten die Bereiche Sekundär-, Lipid-Metabolismus und die Handhabung metallischer Stoffe in Bezug auf deren prozentualen Anteil hervor.

3.5.4 Ergebnis der Transkriptionsanalyse II: Die Nachahmung des Pathogen-spezifischen elektrischen Signals verursacht ein zur Pathogenantwort ähnliches Expressionsmuster

3.5.4.1 Enrichment-Analyse – Vergleich mit Mikroarray-Daten aus flg22/Pseudomonas-Experimenten

Da aus der Mapman-Einordnung noch keine eindeutigen Erkenntnisse gezogen werden konnten, wurden zudem Enrichment-Analysen durchgeführt. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob das durch LP nachgeahmte elektrische Signal der Pathogenantwort ein tatsächlich oder zumindest in Teilen zu dieser ähnliches Expressionsmuster generieren kann, wurde zuerst das „Signature-Tool“ von Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>) (Hruz et al., 2008) eingesetzt. Mit Hilfe dieses Programms kann das Genregulationsergebnis (Signatur) eines durchgeführten Experiments mit dem bereits vorhandener Mikroarrays verglichen werden. Hierbei ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass dieses Programm die Signifikanz der Genregulation nicht mit einbezieht, sondern das Ergebnis lediglich auf dem Muster der Regulation basiert. Daher lieferte dieser Ansatz nur einen ersten Eindruck und musste in folgenden bioinformatischen Analysen mittels Enrichment-Analyse näher überprüft werden. Es wurden im Signature-Tool nur WT-Experimente auf der Basis einer Pearson-Korrelation selektiert. Bei dieser Methode liegt der Fokus auf dem Muster der Genregulation insgesamt und generiert somit Signaturen, in denen eher das Muster als der absolute Wert der lgFCs im Vordergrund steht.

Hierbei ergab sich folgendes Ergebnis: Ein Vergleich der durch lange Signalpulse (LP) generierten Daten mit vorhandenen Microarray-Analysen lieferte eine hohe Anzahl an experimentellen Ansätzen, die biotischen Stress und hier insbesondere Pathogenbefall durch Pseudomonas/Flagellin untersuchten. Dem Genmuster der durch SPs erzeugten Behandlung, welchem kein bisher bekanntes elektrisches Signal zugrunde lag, ließen sich hauptsächlich abiotische Stimuli in Bezug auf Trocken-, Salz- oder auch Lichtstress zuordnen. Zudem konnten hier Ähnlichkeiten zu Nährstoffmanglexperimenten (Phosphat, Sulfat) festgestellt werden.

In der anschließenden Enrichment-Analyse wurde die Übereinstimmung der Anreicherung signifikant regulierter Gene in verschiedenen Experimenten miteinander verglichen sowie die Signifikanz der Ähnlichkeit der Genregulation bestimmt. Die in Abschnitt 3.5 beschriebenen Ergebnisse der Transkriptionsanalyse zeigten, dass ein langer

Puls (LP) im Vergleich zum kurzen, repetitiven mit vergleichbarem Informationsgehalt (SPs) eine wesentlich höhere Anzahl an Genen reguliert. Dabei stellte sich die Anzahl an durch SPs regulierten Genen als zu gering heraus, um eine statistisch signifikante Aussage über die Anreicherung einer bestimmten Gengruppe in diesem Experiment treffen zu können. SPs diente daher hierbei lediglich als Kontrollexperiment.

Für die LP-basierte Enrichment-Analyse wurden jeweils zwei flg22- (nach 1h und 3h flg22-Behandlung) (Navarro et al., 2004a) sowie Pseudomonas DC3000-Experimente (Thilmony et al., 2006) aus den Arrays des Signature-Tool-Ergebnisses als Grundlage herangezogen. Um eine statistische Absicherung der Ergebnisse zu erhalten, wurde unter Verwendung des Multiplen Hypothesentests ein korrigierter p-Wert von $p < 2.5E-03$ ($\alpha = 0.01$) als Signifikanz-Schwellenwert bestimmt. Tab. 3-9 zeigt das Ergebnis dieser Analysen:

Tab. 3-9: Enrichment-Analyse für LP – flg22/Pseudomonas (Navarro et al., 2004a; Thilmony et al., 2006) [(Multipler Hypothesentest: für $\alpha = 0.01$ gilt $p < 2.5E-03$ (Fishers Test mit Bonferroni-Korrektur))]

	LP		Array		Fishers Test
	Gene	Anteil in %	Gene	Anteil in %	
flg22 1h	99	45%	6862	30%	6.3E-07
flg22 3h	112	51%	9608	41%	2.3E-03
DC3000 24h	30	14%	1742	8%	1.0E-03
DC3000 7h	34	16%	1641	7%	1.1E-05
Gesamt	220		23224		

Aus dieser Analyse wurde ersichtlich, dass eine signifikante Anreicherung an Genen für die herangezogenen Arrays für alle Zeitpunkte bestand, da der Fishers Test in allen Fällen Werte $< 2.5E-03$ ergab. Eine Liste dieser überlappenden Gene ist im Anhang ausgewiesen (Tab. 7-7).

3.5.4.2 Enrichment-Analyse – Vergleich mit Mikroarray-Daten aus Whalley et al. (2011)

Wie bereits in der Einleitung dieser Dissertation beschrieben, existieren bisher nur sehr wenige Forschungsarbeiten in Bezug auf artifizielle Generierung und Analyse elektrischer bzw. Calcium-basierter Signale in Pflanzen. Daher war es naheliegend, Datensätze der eingangs genannten Arbeit von Whalley et al. (2011), in welcher die Calcium-Signale mittels eines elektrischen Feldes erzeugt wurden, mit den im Rahmen dieser

Dissertation entstandenen Daten zu vergleichen. Auch hierfür wurde eine Enrichment-Analyse auf Basis der LP-Behandlung durchgeführt. Hierbei ergab sich ein Signifikanz-Schwellenwert bei $\alpha = 0.01$ von $p < 8E-04$.

Tab. 3-10: Enrichment-Analyse für LP – Whalley et al. (2011) [Multipler Hypothesentest: für $\alpha = 0.01$ gilt $p < 8E-04$ (Fishers Test mit Bonferroni-Korrektur); signifikante Anreicherung in rot dargestellt]

	LP		Whalley et al. (2011)		Fishers Test
	Gene	Anteil in %	Gene	Anteil in %	
Transienter Puls	12	5.5%	385	1.7%	3.03E-04
Oszillation	15	6.8%	516	2.2%	1.18E-04
Dauerpuls	2	0.9%	27	0.1%	2.64E-02
Gesamt	220		23224		

Wie in Tab. 3-10 zu sehen ist, wurden in Whalley et al. (2011) drei unterschiedliche Calcium-Pulse mit Hilfe elektrischer Felder erzeugt: Ein einfacher transienter Puls für ca. 30s sowie ein oszillierendes Signal für eine Gesamtdauer von ca. 400s (1s Puls in 40s) mit gleicher Amplitudenhöhe. Ein weiteres Signal (Dauerpuls) enthielt eine in Bezug auf das Calcium-Intervall mit dem Oszillationspuls vergleichbare Information, wurde jedoch durchgängig und mit nur ca. einem Drittel der Amplitudenhöhe für ungefähr 450s (100ms in 1s) gewählt. Aus den durchgeführten Enrichment-Analysen geht hervor, dass LP sowohl eine signifikante Überlappung mit Expressionsdaten des transienten als auch des oszillierenden Pulses, jedoch nicht mit dem Dauerpuls zeigte. Eine Liste der überlappenden Gene befindet sich im Anhang (Tab. 7-8).

3.6 Stabile Transformation von Pflanzen

3.6.1 Transiente Vorversuche

3.6.1.1 Konstitutive Expression mittels 35S- und UBQ10-Promotor

Die überwiegende Mehrheit der Experimente innerhalb dieser Dissertation wurde mit pMDC32-basierten Konstrukten durchgeführt, mit denen eine konstitutive Expression durch einen zweifachen 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus vermittelt wurde. Diese wurden im transienten Ansatz durch Agrobakterien-vermittelte Infiltration in Tabakblättern getestet und deren Genprodukte elektrophysiologisch charakterisiert (siehe 3.2.2 und 3.3.3).

In einem weiteren Ansatz wurden UBQ10-basierte Plasmide eingesetzt, welche auf der konstitutiven Expression von Chop2 durch den Promotor des Ubiquitin-10-Gens aus *Arabidopsis* basierte. Mit diesem Promotor sollten durch dessen pflanzlichen Ursprung mögliche „Silencing“-Effekte verhindert werden. Neben einem stabilen Transformationsansatz in *Arabidopsis* bzw. Tabak erfolgte ein transientser Test dieser Konstrukte (pCAMBIA-UBQ/Chop2-YFP) mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation von *N. benthamiana*-Blättern, dessen Ergebnis in Abb. 3-35 zu sehen ist:

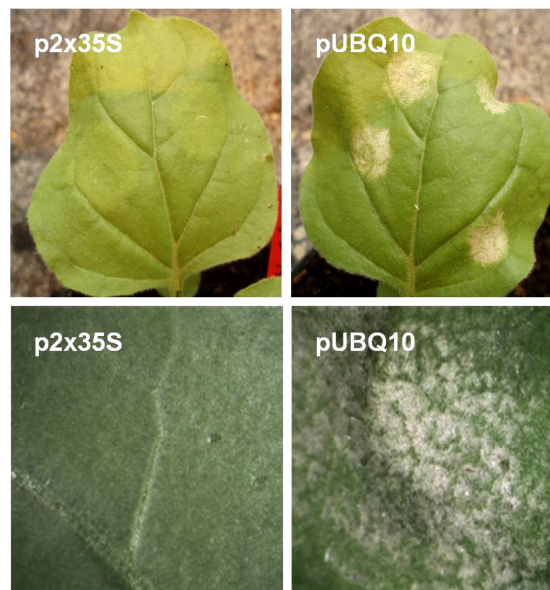


Abb. 3-35: Blätter von *Nicotiana benthamiana* infiltriert mit Agrobakterien (pCAMBIA-UBQ/C128T-YFP, pMDC32/C128T-YFP), 3dpi, p2x35S und pUBQ10 beziehen sich auf die jeweiligen Promotoren

In den mit Chop2 transformierten Pflanzen waren bereits drei Tage nach der Infiltration Läsionen in mit pCAMBIA-UBQ infiltrierten Blattbereichen zu beobachten, während pMDC32-Kontroll-Pflanzen eine gesunde Blattstruktur nach Infiltration zeigten. Dies könnte möglicherweise auf eine für die Pflanze schädliche Akkumulation funktioneller Chr2-Proteine hinweisen. Daher wurde im transienten Ansatz weiterhin mit pMDC32-Konstrukten gearbeitet. Dass die Expression von Chop2 unter Kontrolle des pUBQ10-Promotor jedoch nicht in jedem Fall schädlich ist, konnte durch die transiente Expression der Chop2-YFP-Varianten in Protoplasten gezeigt werden, in denen weder ein Unterschied hinsichtlich der Fluoreszenz noch der Vitalität/Intaktheit der Zellen zwischen p35S- und pUBQ10-Konstrukten beobachtet werden konnte (für pUBQ10 siehe Abb. 3-4 in Abschnitt 3.2.1).

3.6.1.2 Östrogen-induzierbare Expression

Neben den konstitutiven Expressionsansätzen wurde auch ein induzierbares System getestet, welches auf der Expressionsinduktion durch Östrogen basiert und während der stabilen Transformation in Arabidopsis auch im transienten Tabaksystem untersucht wurde (Zuo et al., 2000). In Abb. 3-36 sind Tabakblattscheiben der infiltrierten Blattregionen zu sehen, die 3dpi präpariert und 16h in 1µM Östrogen inkubiert wurden.

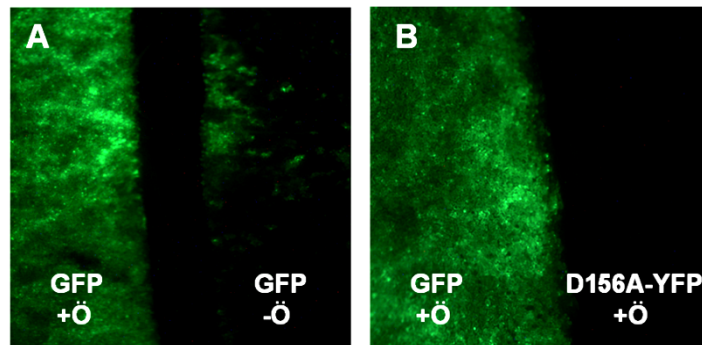


Abb. 3-36: Transient durch Agrobakterien-Infiltration transformierte *N. benthamiana*-Blattscheiben (pER8/GFP, pER8/D156A-YFP), 4dpi, +/- 1µM Östrogen o/n

Im Fall der GFP-Kontrolle (Abb. 3-36 A) war deutlich zu sehen, dass der Östrogen-induzierbare Promotor zumindest im transienten System „durchlässig (leaky)“ war, da die GFP-Expression auch ohne zusätzliche Östrogen-Gabe stattfand. Allerdings konnte bei Blattstücken, die mit pER8/D156A-YFP transformiert wurden, keinerlei Fluoreszenz festgestellt werden (Abb. 3-36 B).

3.6.2 Stabile Expression

3.6.2.1 Konstitutive Expression durch p35S – in pMDC32

Um stabil Chop2-exprimierende Pflanzen zu generieren, wurden einerseits *A. thaliana* Col-0 und *A. thaliana* Col-0 Aequorin mit Hilfe der „Floral Dipping“-Methode (siehe 2.7.4) und andererseits *N. tabacum* SR1 mittels der Regeneration von Pflanzen über Agrobakterien-infiltrierte Blattscheiben transformiert.

In Arabidopsis wurden hierfür folgende Konstrukte eingesetzt: Chop2-YFP, C128T-YFP, C128A-YFP, D156A-YFP und YFP als Kontrolle (alle in pMDC32).

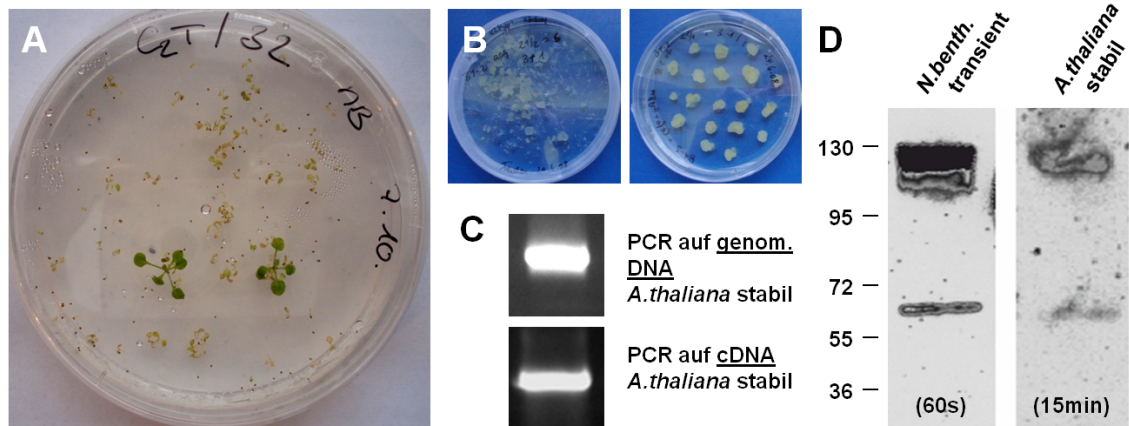


Abb. 3-37: Selektierte, stabile Chop2-Transformanten – A) *A. thaliana Col-0*, 4 Wo. nach Aussähen auf Selektionsmedium; B) BY2-Kalli, nach 4-wö. Selektion; C) T-DNA- und mRNA-Nachweis per PCR auf genom. DNA bzw. cDNA; D) Protein-Detektion: Western-Blot, YFP-Antikörper, ox. PPP, Belichtungszeit des Blots bei *N. benthamiana* 60s (transiente Expression als Kontrolle), bei Arabidopsis 15min

Es ergaben sich bei allen Konstrukten Transformanten (siehe beispielhaft Abb. 3-37 A und B), welche über Hygromycin selektiert wurden. Beim anschließenden Test auf Fluoreszenz zeigte jedoch keine der durchmusterten Chop2-Pflanzen Fluoreszenz. YFP-Transformanten hingegen zeigten eine starke Fluoreszenz in der gesamten Pflanze. Daher wurde die Insertion der T-DNA mit Hilfe einer PCR mit Chop2-spezifischen Primern auf genomischer DNA sowie deren Transkription auf cDNA-Ebene untersucht. Wie in Abb. 3-37 C zu sehen, konnte in beiden Fällen Chop2 nachgewiesen werden. Dies bestätigte nicht nur die erfolgreiche Insertion der T-DNA, sondern auch die Transkription der mRNA. Nicht transformierte Kontrollen zeigten kein PCR-Produkt (Abbildung nicht gezeigt). Daher wurde die Expression des Fusionsproteins auch auf Proteinebene untersucht. Als Kontrolle diente Proteinextrakt aus transient transformierten *N. benthamiana*-Blattstücken (siehe Abb. 3-9). Auf ein SDS-Gel wurde Probenmaterial mit oxidierendem Proteinprobenpuffer (PPP) aufgetragen. Im anschließenden Western-Blot (siehe Abb. 3-37 D) waren nach 60s Belichtungszeit deutliche Banden in Höhe des Chop2-YFP-Monomers (~62kDa) und eines möglichen Dimers bzw. Trimers im Falle der Tabakkontrollproben zu erkennen. Bei Proben der selektierten Arabidopsis-Transformanten hingegen musste die Belichtungszeit auf 15min erhöht werden, um überhaupt ein schwach über dem Hintergrund sichtbares Signal detektieren zu können. Dies bedeutete, dass die Expression der Chop2-Proteine vermutlich auf posttranskriptionaler Ebene „gesilenced“ wurde.

3.6.2.2 Konstitutive Expression durch pUBQ10 – pCAMBIA-UBQ

Um ein mögliches Silencing der Chop2- Expression auf Promotorebene zu verhindern, wurden *N. tabacum* SR1 und *A. thaliana* Col-0 Pflanzen (wie schon in Abschnitt 3.6.1 im transienten System getestet) mit den Chop2-Mutanten C128T, C128A, D156A und YFP als Kontrolle im pCAMBIA-UBQ Hintergrund mit C-terminaler YFP-Fusion stabil transformiert. Allerdings konnte auch unter Kontrolle dieses intrinsischen Promotors zunächst keine Proteinexpression auf Basis der Chop2-YFP-Fluoreszenz in Arabidopsis nachgewiesen werden. Wie im Fall der pMDC32-Konstrukte konnte jedoch die Insertion der T-DNA im Genom nachgewiesen werden. Abb. 3-38 A zeigt dieses Ergebnis beispielhaft: In diesem Ansatz war deutlich zu sehen, dass die Chop2-YFP-Mutanten (hier am Beispiel von C128T dargestellt) ein im Vergleich zu YFP-transformierten Kontroll-Pflanzen inhibiertes Wachstum zeigten, während nicht-transformierte Pflanzen auf Selektionsmedium verkümmerten. Auch die Insertion der T-DNA konnte bei den positiven Transformanten nachgewiesen werden (Abb. 3-38 B).

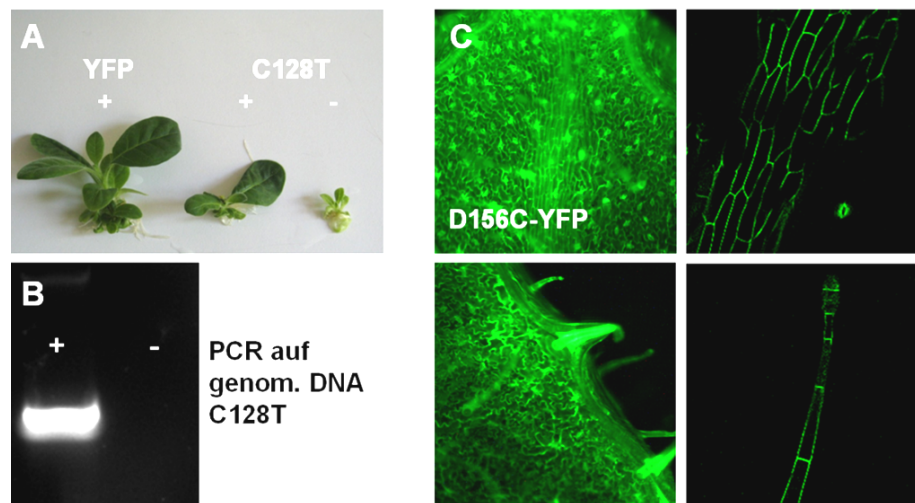


Abb. 3-38: *Nicotiana tabacum* SR1, Regeneration von Pflanzen aus Agrobakterien-infiltrierten Blattscheiben – A) YFP-Kontrolle, C128T-YFP: +/- = positive/negative Transformanten (in pCAMBIA-UBQ); B) Nachweis der T-DNA Insertion per PCR auf genom. DNA aus C128T-YFP von positiver und negativer Probe; C) stabiler *N. tabacum* Transformant: D156C-YFP/pCAMBIA-UBQ: Fluoreszenzaufnahmen von Epidermis und Trichomen

Lediglich der Test der neuen Mutante D156C (Dr. Ronnie Gueta, Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg), die sehr ähnliche Eigenschaften zu D156A besitzt, jedoch in Oozytenexperimenten eine höhere Stromantwort zeigte, führte zur Etablierung eines Transformanten mit detektierbarer YFP-Fluoreszenz (siehe Abb. 3-38 C). Diese wurde anschließend durch Selbstbefruchtung

vermehrt. In Übereinstimmung mit einem möglichen Silencingeffekt zeigte allerdings keine der Pflanzen der T1-Generation Fluoreszenz.

3.6.2.3 Östrogen-induzierbares System – pER8

Parallel zu konstitutiven Expressionsansätzen wurde das Östrogen-induzierbare System des pER8-Vektors getestet. Zu diesem Zweck wurden die Chop2-Mutanten C128T, C128A und D156A in pER8 als YFP-Fusionsproteine wiederum sowohl in *N. tabacum* SR1 als auch in *Arabidopsis thaliana* Col-0 stabil transformiert. Hierbei konnte ebenfalls in keinem der beiden Expressionssysteme bei keiner der Transformanten nach Selektion eine Östrogen-induzierbare Proteinexpression anhand von Fluoreszenzmessungen detektiert werden, während die GFP-Kontrolle diese zeigte (in Abb. 3-39 am Beispiel von Arabidopsis gezeigt). Auch hier konnte die Insertion der T-DNA über PCR nachgewiesen werden.

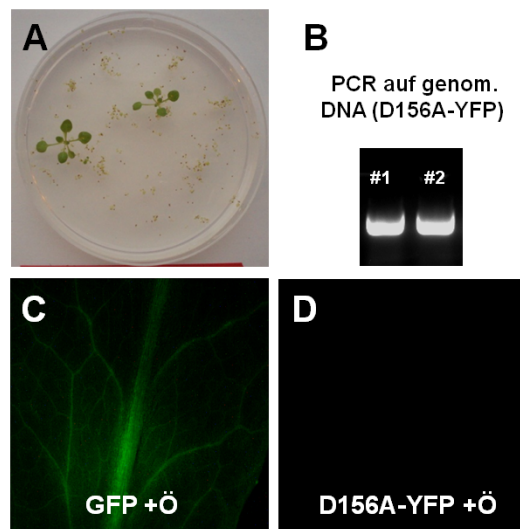


Abb. 3-39: Stabile Arabidopsis-Transformanten –pER8/GFP und pER8/D156A-YFP: A) zwei D156A-Transformanten nach 4 wöchiger Selektion; B) T-DNA-Nachweis auf genom. DNA von A); C) und D) Blätter positiver Transformanten der GFP-Kontrolle (C) und D156A-YFP (D), o/n in 1 μ M Östrogen

4 Diskussion

4.1 ChR2-Expression in Pflanzen

4.1.1 Chop2-Targeting

Die Expression und das Targeting der Chop2-Mutanten in Pflanzenzellen wurde über die C-terminale YFP-Fusion nachverfolgt. Die Fluoreszenzaufnahmen der Fusionsproteine in *Nicotiana* und *Arabidopsis* zeigten ein unvollständiges Targeting der Proteine an die Plasmamembran. Ein Großteil des Gesamtproteins war deutlich erkennbar im Golgi bzw. ER lokalisiert. Dies ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei der Überexpression von Membranproteinen, welches auch bei der heterologen Expression von ChR2 im tierischen System festgestellt wurde. Grund hierfür könnte u. a. ein sogenanntes „Codonbias“ sein. In Neuronen konnte z. B. eine Verbesserung der Expression bzw. des Targetings durch das Anpassen der Algensequenz in Mammalia-Codons erreicht werden (Gradinaru et al., 2010; Zhang et al., 2006). In diesen Studien wurde darüber hinaus festgestellt, dass eine moderate Überexpression die Vitalität der Zellen deutlich verbesserte. Eventuell könnte ein verbessertes Targeting in Pflanzenzellen einerseits durch die Sequenzanpassung von Chop2 auf ein pflanzliches „Codon-Usage“ erzielt werden. Andererseits könnte jedoch auch der Einsatz weniger starker Promotoren den beobachteten Überexpressionseffekt verhindern oder diesen zumindest verringern.

Da die Applikation von Retinal zur Inkubationslösung weder in *Arabidopsis*-Protoplasten noch in Tabakblattproben einen Einfluss auf die Lokalisation hatte, konnte der Effekt von extern appliziertem Retinal auf das korrekte Targeting der Chop2-Mutanten an die Plasmamembran ausgeschlossen werden. Durch die Kollokationsexperimente mit dem Plasmamembranmarker Remorin konnte die Lokalisation eines Teils des Gesamtproteins in der Plasmamembran bestätigt werden. Zudem zeigten die Ergebnisse der Einstichmessungen, dass zumindest im Tabak eine ausreichende Menge an funktionellem Chop2-Protein in der Plasmamembran lokalisiert war, da in diesem System Blaulicht-abhängige Membranpotentialänderungen von bis zu $\pm 110\text{mV}$ generiert werden konnten.

4.1.2 Expressionsunterschiede im transienten Expressionssystem: WT-ChR2 vs. ChR2-Mutanten

Im Tabak-Expressionssystem konnten deutliche Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den verwendeten Mutanten auf Basis der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. So wurde beispielsweise die Mutante C128A deutlich schwächer exprimiert als die Mutanten C128T und D156A. Diese Unterschiede konnten jedoch weder in Oozyten noch in Arabidopsis-Protoplasten festgestellt werden. Übereinstimmend mit den mikroskopischen Analysen wurde in Western-Blot-Untersuchungen weniger C128A-Protein in der mikrosomalen Fraktion infiltrierter Tabakblätter detektiert. Durch den Protein-Blot zeigte sich darüber hinaus, dass Chop2-YFP als stabiles Dimer vorlag. Die Existenz einer dritten Bande ließe theoretisch sogar die Existenz eines Trimers vermuten. Untersuchungen von Müller et al. (2011) an ChR2 mittels Kryo-Elektronen-Mikroskopie konnten zeigen, dass ChR2 als stabiles Dimer in SDS-haltiger Lösung vorliegt. Die Trennung der Chop2-Dimere in Monomere konnte nicht wie für YFP gezeigt durch SDS, aber durch den Einsatz eines Reduktionsmittels erreicht werden (siehe Abb. 3-9). Ob ChR2 auch als Trimer vorliegen könnte, ist aus Müller et al. (2011) nicht ersichtlich, da das SDS-Gel im Bereich größerer Molekulargewichte abgetrennt wurde. Mit dem Einsatz niedrig-prozentiger SDS-Gele könnte man im Bereich von 120kDa bis 180kDa eine bessere Größenfraktionierung erreichen und darüber die Existenz eines Trimers prüfen.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des WT-Chop2-YFP-Proteins in Arabidopsis-Protoplasten zeigten einen weiteren Unterschied zwischen den verwendeten Expressionssystemen auf: Während bei transientscher Transformation im Tabaksystem keine Fluoreszenz – und somit keine Expression – des Chop2-WT-Proteins beobachtet werden konnte, war die Expression in Arabidopsis-Protoplasten deutlich erkennbar. In beiden Systemen wurde ohne die externe Applikation von Retinal gearbeitet. Aus Vorarbeiten in Oozyten war bereits bekannt, dass die Expressionseffizienz von WT-Chop2 positiv mit der Retinal-Gabe korrelierte. Nach derzeitigem Kenntnisstand bewirkt das Chromophor, welches über eine „Schiffsche Base“ kovalent an einen Lysinrest des Apoproteins gebunden wird, eine korrekte Faltung bzw. Stabilisierung des Proteins in der Membran. Für die Expression der Mutanten war die Anwesenheit des Chromophors jedoch nicht essentiell. Aus diesem Grund besteht die Hypothese, dass die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen zu einer Stabilisierung des Chop2-Proteins in der Membran führen und Retinal somit hauptsächlich für die sensorische Funktion benötigt wird.

(Ullrich & Nagel, 2012). Zudem konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Fluoreszenzintensität zwischen den verwendeten Mutanten in Protoplasten beobachtet werden. Interessanterweise konnten in C128A-exprimierenden Tabakproben auch ohne vorherige Retinal-Applikation Blaulicht-induzierte, schwache Depolarisationen gemessen werden. Diese unterschieden sich eindeutig von YFP-Kontrollen und werfen die Frage nach der Präsenz von Retinal bzw. Retinal-ähnlichen Verbindungen in Pflanzen auf.

Foster et al. konnten 1989 zeigen, dass es möglich war, die Rhodopsin-abhängige Phototaxis in einer Retinal-defizienten *Chlamydomonas*-Mutante durch die Zugabe von *Trans*-2-Hexenal wiederherzustellen (Foster et al., 1989; Foster et al., 2011). In Pflanzen wird volatiles 2-Hexenal im Zuge eines Pathogenbefalls mit Herbivorie produziert (Asai et al., 2009). Es wäre daher zu prüfen, ob 2-Hexenal beispielsweise beim enzymatischen Verdau der Zellwand im Zuge der Protoplastierung entstehen könnte und somit möglicherweise die stabile Expression des WT-Proteins gewährleistet. Die Tatsache, dass kein Unterschied bezüglich der Fluoreszenzintensität der ChR2-Mutanten in Arabidopsis-Protoplasten im Gegensatz zum Tabaksystem beobachtet werden konnte, weist möglicherweise ebenfalls auf eine Rolle von Retinal bzw. Retinal-substituierenden Substanzen, die bei der Protoplastierung entstehen, hin. Somit kann möglicherweise Retinal durch Retinal-ähnliche Stoffe wie 2-Hexenal in seiner Funktion als „Chop2-Stabilisator“ ersetzt werden. Die beobachtete Funktion der C128A-Mutante im Tabaksystem auch ohne externe Retinalgabe spricht allerdings dafür, dass Retinal entweder in geringen Mengen in Pflanzen nicht-enzymatisch aus β -Carotin, endogen entsteht oder Retinal-Substituenten dieses zu einem gewissen Grad funktionell ersetzen können.

Um zukünftig vollständig auf eine externe Applikation von Retinal verzichten zu können, könnte Retinal möglicherweise über das pflanzeigene β -Carotin synthetisiert werden. Im sogenannten „Golden Rice Projekt“ soll die Anreicherung von Provitamin A im Reis-Endosperm dem Vitamin A-Mangel im asiatischen Raum entgegenwirken. Für diesen Zweck wurden Enzyme des β -Carotin-Synthesewegs, welche unter natürlichen Bedingungen nur in photosynthetisch aktiven Organen exprimiert werden, transgen im Endosperm überexprimiert. Dies führte zu einer Anreicherung von β -Carotin in den Samen dieser Pflanzen (Ye et al., 2000). Diese Arbeiten bewiesen, dass es prinzipiell möglich ist, β -Carotin in der gesamten Pflanze herzustellen. Um Retinal aus β -Carotin zu generieren, fehlt nur ein enzymatischer Schritt. Die heterologe, trans-

gene Expression des pilzlichen Enzyms CarX, welches β -Carotin zu Retinal spaltet, könnte hierfür eine Lösung bieten (Prado-Cabrero et al., 2007).

4.1.3 Stabile Expression von Chop2 in Pflanzen

Transformationsansätze mit dem Ziel, Chop2 stabil in Pflanzen zu exprimieren, waren im Rahmen der experimentellen Arbeiten zunächst nicht erfolgreich. Weder die konstitutive Expression von Chop2 unter Kontrolle des intrinsischen Promotors pUBQ10 noch das Östrogen-induzierbare System über den pER8-Vektor führten zum Erfolg. Obwohl die Chop2-YFP-Sequenz sowohl auf genomischer als auch auf mRNA-Ebene in selektierten transgenen Pflanzen sowie in pflanzlicher Zellkultur nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3-37, Abb. 3-38 und Abb. 3-39), war dennoch keine Fluoreszenz bzw. nahezu kein Protein (Western-Blot) detektierbar. Es ist daher anzunehmen, dass diese Beobachtung auf ein posttranskriptionelles Gen-Silencing zurückzuführen war. Hierfür könnte es mehrere Gründe geben: Zum einen wäre es denkbar, dass die Anwesenheit von Retinal als Photoisomer auch in Chop2-Mutanten essentiell ist, um eine Expression des Proteins über einen längeren Zeitraum (also länger als zwei bis drei Tage bei einem transientem Ansatz in Pflanzen bzw. Oozyten) zu gewährleisten. Da über die Existenz von Retinal in Pflanzen keine Daten vorliegen, könnte eine Degradation der Chop2-Mutanten bzw. des WT-Proteins in Abwesenheit von Retinal die Ursache der fehlenden Fluoreszenz bzw. Proteindetektion im Western-Blot sein. Falls, wie bereits in Abschnitt 4.1.2 diskutiert, Retinal-ähnliche Substanzen dieses substituieren können, besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Aktivität von ChR2 selbst in transgenen Pflanzen zu einem erhöhten Silencing der Expression führt. Die Lichtintensität unter den gewählten Anzuchtbedingungen könnte hier bereits ausreichen, um die lichtsensitiven Mutanten zu aktivieren und damit die Pflanze zu stressen. Da eine leichte Aktivierung von ChR2-C128A auch ohne Retinalzugabe in Tabakblattscheiben beobachtet werden konnte (siehe 3.3.2), wäre diese Erklärung durchaus denkbar. Aufschluss darüber könnte die Anzucht der Pflanzen unter Rotlichtbedingungen geben. Einen weiteren Ansatz liefert die von Nagel et al. (2003) beobachtete Degradation des WT-Proteins unter Starklichtbedingungen in *Chlamydomonas*. Möglicherweise war die Lichtintensität unter den gegebenen Anzuchtbedingungen in dieser Arbeit mit (Arabidopsis: $100\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ /Tabak: $600\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zu hoch. Daher wäre eine Selektion der transgenen Keimlinge unter Schwachlichtbedingungen zu überprüfen.

Aufgrund der genannten möglichen Schwierigkeiten bei der stabilen Expression von Chop2 in Pflanzen, hätten zudem eine noch höhere Anzahl an Pflanzen gemustert werden müssen, da sich alle T1-Pflanzen in Bezug auf deren T-DNA-Lokalisation unterscheiden und daher auch einem unterschiedlichem Einfluss durch flankierende DNA-Regionen (genomischer Kontext) unterliegen. Weiterhin kann jede Pflanze eine unterschiedliche Anzahl an T-DNA-Insertionen besitzen. Daher wäre es möglich, dass einige wenige Transformanten existierten, die unter optimalen Anzuchtbedingungen eine konstitutive Expression der Chr2-Mutanten aufwiesen und innerhalb dieser Arbeit nicht selektiert wurden. Einen Beweis dafür, dass durch die Überprüfung einer weitaus größeren Anzahl an selektierten Transformanten doch einige wenige Chop2-exprimierende Arabidopsis-Pflanzen entdeckt werden konnten, lieferten neue, nicht mehr innerhalb der praktischen Arbeiten dieser Dissertation erzielte Ergebnisse der Arbeitsgruppe von PD Dr. Dirk Becker/ Prof. Georg Nagel. Hierbei konnten stabile Arabidopsis-Linien der in Abschnitt 3.6.2.2 beschriebenen Chop2-Mutante D156C (Transformanten im Zuge dieser Doktorarbeit generiert), positiv hinsichtlich ihrer YFP-Fluoreszenz selektiert und anschließend elektrophysiologisch analysiert werden:

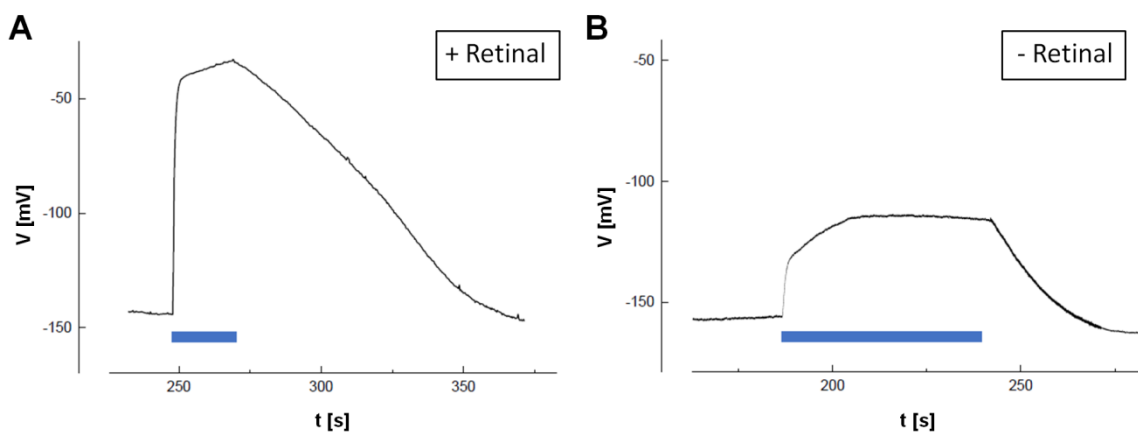


Abb. 4-1: Einstichmessung an stabil Chop2-D156C-YFP exprimierenden Arabidopsis-Blattscheiben – mit (A) und ohne (B) Retinal; o/n in $10\mu\text{M}$ Retinal; in 5mM KCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MES/BTP (pH6); Laser blau $8\text{mW}/\text{mm}^2$ für A) 25s und B) 35s (Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Uta Anschütz und Dr. Ronnie Gueta, Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik)

Abb. 4-1 zeigt, dass diese Pflanzen Chr2-D156C stabil exprimieren und hierdurch Membranpotentialänderungen von mehr als $+100\text{mV}$ generiert werden konnten. Beim Vergleich der Messungen mit und ohne vorangegangene Retinalinkubation konnte selbst ohne Retinalgabe eine Potentialänderung von ca. 40mV beobachtet werden, während Wildtyp-Kontrollpflanzen eine Reaktion von lediglich $\sim 10\text{mV}$ unter den eingesetzten Belichtungsbedingungen zeigten (Daten nicht gezeigt).

Grundsätzlich bewiesen diese ersten Ergebnisse, dass es möglich ist, stabile und auch funktionelle Chop2-Pflanzen zu generieren. Ob hierfür alle ChR2-Mutanten herangezogen werden können, muss in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden. Die Tatsache, dass gerade bei der Untersuchung der D156C-Mutante auch im Tabak YFP-Fluoreszenz festgestellt werden konnte, die jedoch in der nächsten Generation bereits nicht mehr detektiert werden konnte (siehe Absatz 3.6.2.2), wirft zwei Fragen auf: Birgt diese Mutante eine von den anderen untersuchten Mutanten distinkte Eigenschaft, wie z. B. eine verminderte Lichtsensitivität, welche die Anzucht erleichtert? Erste Untersuchungen im Oozytensystem belegen allerdings eher das Gegenteil. Ist es möglich, homozygote, stabile Transformanten dieser Pflanzen zu generieren, ohne einen Silencing-Effekt herbeizuführen?

Um die möglichen negativen Effekte einer ubiquitären Chop2-Expression in Pflanzen wie beispielsweise einer massiven Störung der Fertilisation, Embryogenese oder etwa der Musterbildung durch ChR2-vermittelte letale Effekte auf das Membranpotential bzw. die Calcium-Homöostase zu verringern, kann auch die Möglichkeit einer zell- oder gewebespezifischen Expression geprüft werden. Hierbei wäre nicht die gesamte Pflanze von einer eventuell schädigenden Wirkung des Proteins betroffen, sondern nur bestimmte Zellen bzw. Gewebe. Bereits innerhalb dieser Doktorarbeit wurde daher damit begonnen, verschiedene Promotoren einzusetzen, die eine Expression des Transgens ausschließlich in Schließzellen bzw. Wurzelendodermiszellen steuern. Die daraus hervorgegangenen T1-Pflanzen befinden sich zu diesem Zeitpunkt im Screening-Prozess.

Als Fazit kann also festgehalten werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit bis dato erhaltenen Ergebnisse den Grundstein für die Anwendung der Opsin-basierten Optogenetik in Pflanzen bilden.

4.2 Funktion I: Membranpotentialänderungen

4.2.1 Vergleich mit ChR2-Daten aus Oozytenmessungen

Die Vorarbeiten zu den innerhalb dieser Arbeit verwendeten ChR2-Mutanten wurden mittels der TEVC-Technik an Oozyten durchgeführt (Dr. Ronnie Gueta, Sabrina Förster). Hierbei wurde die ChR2-Funktion über die Stromantworten im Spannungsklemmenmodus aufgezeichnet. Die elektrophysiologischen Untersuchungen an Tabakblattscheiben erfolgten dahingegen mit Hilfe der Einstichttechnik im Stromklemmenmodus.

Daher können diese Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden. Weiterhin wurde in Oozytenmessungen Natrium als Hauption verwendet. Da Natrium in Pflanzen allerdings toxisch wirkt, war es in den Messlösungen der Einstichmessungen nicht enthalten. Dennoch ist es möglich, einen indirekten Vergleich zu ziehen.

Trotz unterschiedlicher Zeitskalen beider Messverfahren bestand in Bezug auf die Kinetik der gemessenen Membranpotentialänderungen im Tabak eine deutliche Korrelation mit den an *Xenopus*-Oozyten bestimmten biophysikalischen Eigenschaften der Mutanten (siehe Abb. 3-3 im Vergleich mit Abb. 3-13). Demnach zeigte C128T, wie aus den Oozytenmessungen erwartet, als Mutante mit der schnellsten Schließkinetik die kürzeste Repolarisationszeit. Ebenso wurden auch für die langsam schließenden Mutanten C128A und D156A mit Oozytendaten korrelierende Repolarisationszeiten in Tabak-Mesophyllzellen gemessen (siehe Abb. 3-16). Wie erhofft war es möglich, speziell mit den Mutanten C128A und D156A deutlich länger anhaltende Spannungsänderungen im Vergleich zur Dauer des applizierten Lichtpulses zu erzeugen.

Im Gegensatz zur Kinetik ergab die Auswertung der Depolarisationsamplituden ein anderes Ergebnis als aufgrund der Oozytenmessungen ursprünglich erwartet werden konnte: Wie in Abb. 3-3 gezeigt, wurde in Oozyten nach Expression der Mutante C128A im Vergleich zu D156A zunächst ein höherer initialer Strom gemessen. Dieser fiel jedoch zum Ende des Lichtpulses ab und betrug vor allem in der statistischen Auswertung nur ca. 50% des durch D156A generierten Stroms. In Einstichmessungen wurde im Gegensatz dazu die deutlich höchste Membranpotentialänderung mit der Mutante C128A (+113mV) erzielt, gefolgt von D156A (+79mV) und C128T (+89mV).

Die in Tab. 3-1 dargestellte Lichtsensitivität der ChR2-Mutanten in Oozyten zeigte keinen Unterschied zwischen C128A und D156A, während C128T als deutlich weniger lichtsensitiv charakterisiert wurde. In Lichtsensitivitätsmessungen an transient transformierten Tabakblättern wurde die Mutante C128A als lichtsensitivste Mutante identifiziert (siehe Abb. 3-15): Während bei allen drei Mutanten nahezu kein Unterschied zwischen 50% und 100% Lasertransmissionsleistung festgestellt werden konnte, bewirkte bereits eine Transmission von 10% eine durchschnittliche Depolarisationsamplitude von 75% des Maximalwertes bei C128A. In Messungen mit C128T und D156A konnte im Gegensatz dazu nur die Hälfte der mit 100% Transmission erzielten Membranpotentialänderungen generiert werden. Jedoch können diese Messungen nicht direkt mit den aus Oozyten gewonnenen Daten verglichen werden, da bei Membranpotential-

messungen am Tabak einerseits auch endogene Regulationsmechanismen und Transporter eine Rolle spielen können und die Lichtapplikation andererseits unter anderen Voraussetzungen durchgeführt wurde: Im Gegensatz zu Oozytenmessungen, in denen der Lichtleiter in nächster Nähe zur Membran platziert werden konnte, war es in Messungen an Blattscheiben lediglich möglich, diesen nahe an der Blattepidermis der Proben zu lokalisieren. Da das Laserlicht auf dem Weg zu den primär gemessenen Mesophyllzellen durch darüber liegendes Gewebe abgeschwächt wurde, sind die angegebenen absoluten Lichtintensitätswerte nur relativ zu betrachten bzw. beziehen sich nur auf direkt am Lichtleiter gemessene Werte. Zudem könnte auch die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der Membran in Oozyten und Pflanzen eine Rolle spielen.

4.2.2 Korrelation ChR2-Expression – Depolarisationsamplitude

Beim Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Chop2-YFP-Fusionsproteine bzw. deren Signalintensität im Western-Blot mit den erzielten Ergebnissen aus Einstichmessungen im Tabak fiel auf, dass keine Korrelation zwischen der ChR2-Expression und der Amplitude der Membranpotentialänderung im Vergleich der Mutanten zueinander bestand. In elektrophysiologischen Messungen konnte mit zunehmender Expressionsdauer (in den auf die Transformation folgenden zwei bis drei Tagen) eine kontinuierliche Steigerung der Depolarisationsamplitude beobachtet werden, welche grundsätzlich mit einer Zunahme der Fluoreszenz korrelierte. Für die Mutante C128A wurde eine wesentlich schwächere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu C128T bzw. D156A festgestellt. Dennoch konnten mit dieser Mutante (wie bereits beschrieben) die höchsten Membranpotentialänderungen generiert werden. Grundlage für diese Beobachtung könnte einerseits sein, dass für C128A zwar weniger Gesamtprotein exprimiert wurde, jedoch im Vergleich zu C128T und D156A eventuell das Targeting effektiver war und somit eine größere Dichte funktioneller Kanalproteine in der Plasmamembran vorlag. Durch eine biochemische Aufreinigung der Plasmamembran und einem anschließenden Vergleich der Bandenstärke zwischen C128T, D156A und C128A im Western-Blot könnte dies näher untersucht werden. Auch mit Hilfe von Patch-Clamp-Analysen und Einzelkanalstudien könnte die Kanaldichte bzw. -leitfähigkeit in Einzelzellen bestimmt werden. Schließlich wäre auch ein Einfluss der Mutation selbst auf die Dimerbildung denkbar: Zwar zeigte der Western-Blot eine stabile Dimerisierung aller verwendeter Mutanten, doch könnte diese konformell durch C128A begünstigt sein. Zudem wäre es möglich, dass der Einfluss dieser Mutation auf die Konformation eine Rolle in der Zugänglich-

keit der Chop2-Proteine bezüglich ihres Photoisomers Retinal spielt: So könnte ein verbesserter Einbau des Photoisomers in Chop2 zu einer im Vergleich größeren Menge an funktionellem, membranständigen Protein führen. C128A könnte zudem eine erhöhte Affinität für Retinal besitzen, wie von Ullrich et al. (2012) für andere Chr2-Mutanten postuliert, wodurch ebenfalls ein höherer Anteil an Protein funktionell mit Retinal rekonstituiert entstehen könnte.

4.2.3 Membranpotentialmessungen in Arabidopsis-Kotyledonen

Zunächst wurden elektrophysiologische Messungen an Chop2-exprimierenden Arabidopsis-Keimblättern durchgeführt. Hierbei konnte zwar die Funktion von Channelrhodopsin-2 in Pflanzen erstmals bestätigt werden, allerdings wurden hierbei lediglich Blaulicht-induzierte Membranpotentialänderungen mit einer Amplitude von durchschnittlich 15mV in Bezug zum Ruhepotential erzielt. Die Messungen in diesem System beschränkten sich auf die Nutzung der Mutante C128T, da diese in transient transformierten Arabidopsis Keimlingen die höchste Fluoreszenz aufwies. Zu diesem Zeitpunkt war allerdings noch nicht bekannt, dass für C128A einerseits die geringste Fluoreszenz detektiert wurde, mit dieser allerdings andererseits die höchsten Depolarisationsamplituden im Tabak-System erzeugt werden konnten. Im Vergleich zu C128T-Messungen an Tabak-Blättern betrug die Blaulicht-induzierte Änderung im Membranpotential bei Arabidopsis-Kotyledonen nur ca. 25%. Gründe hierfür könnten zum einen im Expressionsniveau und zum anderen in der Verfügbarkeit von Retinal liegen: Möglicherweise werden bei Keimblättern wesentlich weniger Zellen mit Chop2 transformiert als im Tabak. Daher würde eine im Vergleich geringere Anzahl von Chr2-Proteinen durch den Blaulichtstimulus aktiviert, was zu einer geringeren Depolarisationsamplitude führt. Ein weiterer Grund könnte allerdings auch in der schlechten Diffusion von Retinal in das Probenmaterial liegen. Im Gegensatz zu Tabakblattscheiben, wurden die Keimblätter mit Klebeband am Messschälchen befestigt und lediglich die Wurzel entfernt. Da Retinal hierbei somit nicht wie in Tabak-Blattscheiben über die Schnittränder direkt ins Mesophyllgewebe diffundieren konnte, war die Konzentration an aufgenommenem Retinal möglicherweise zu gering.

Schließlich weist aber auch das Keimlings-Expressionssystem selbst Nachteile auf: Im Gegensatz zu infiltrierte Tabakblättern, waren die vollständig über Unterdruck infiltrierte Zellen der Keimlinge wesentlich instabiler in den durchgeführten Einstichmessungen. Daher ist diese Methode zwar für Lokalisationsexperimente gut geeignet, zeigte

sich für funktionelle, elektrophysiologische Messungen allerdings als nur bedingt einsetzbar.

4.2.4 Grundlage der durch ChR2 ausgelösten Depolarisation in Pflanzen

Einstichmessungen am transienten Tabaksystem lieferten im Gegensatz zu denen an Arabidopsis-Kotyledonen Membranpotentialänderungen von durchschnittlich 64mV (C128T) bis 82mV (C128A) und boten somit ein gutes experimentelles System zur Charakterisierung der Blaulicht-vermittelten elektrischen Signale in Pflanzen nach heterologer Expression der ChR2-Mutanten. Nachdem deren funktionelle Expression durch die Generierung spezifischer Blaulicht-induzierter Depolarisationen bestätigt werden konnte, stellte sich die Frage nach der Basis der Depolarisationen in Pflanzen. Die höchste Permeabilität von ChR2 wurde für Protonen beschrieben (Nagel et al., 2003). Allerdings zeigten Experimente mit extrazellulären Lösungen unterschiedlicher pH-Werte im Tabak keinen signifikanten Effekt auf die ChR2-induzierte Depolarisationsamplitude (siehe Abb. 3-18). Möglicherweise fand der Lösungsaustausch in diesen Proben nicht vollständig statt, wodurch kein Einfluss externer pH-Änderung auf die ChR2-generierte Depolarisationsamplitude gemessen werden konnte. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, dass die Epidermis am Abend vor der Messung entfernt sowie ca. 10min in der jeweiligen Messlösung vor Beginn der Blaulichtapplikation inkubiert worden war. Um eine genauere Aussage über die Beteiligung von Protonen an der Depolarisation zu erhalten, könnte entweder die Patch-Clamp-Technik herangezogen oder Messungen mit Ionenselektiven Elektroden durchgeführt werden. Der Einsatz pH-sensitiver Fluoreszenzindikatoren wie z. B. dem modifizierten GFP-Derivat Phluorin (Schulte et al., 2006) oder BCECF (Molecular ProbesTM) birgt dahingegen den Nachteil, dass die Detektion der pH-Sensoren mit der Aktivierung von ChR2 interferieren würde.

Neben Protonen könnten auch Kalium-Ionen an der ChR2-vermittelten Depolarisation in Pflanzen beteiligt sein. Ein Absenken der Kalium-Konzentration in der Messlösung von 5mM auf 1mM führte zu einer Erhöhung der Depolarisationsamplitude um ca. 20mV (siehe Abb. 3-19), ging allerdings ebenfalls mit einer Hyperpolarisation des Ruhepotentials einher. Kalium-Gradienten könnten daher eine Rolle im initialen Depolarisations-Peak spielen, die jedoch nur bis zu seinem Gleichgewichtspotential von ca. -120mV entscheidend wäre, da Membranpotentialwerte positiv dieses Potentials zu einem Kalium-Ausstrom und somit einer Hyper- bzw. Repolarisation führen würden.

Da weder für Kalium-Ionen noch für Protonen ein entscheidender Effekt auf die Blaulicht-induzierte, ChR2-vermittelte Depolarisation nachgewiesen werden konnte, muss auch Calcium als Ladungsträger bzw. initialer Botenstoff zur Aktivierung von Anionen-Kanälen betrachtet werden. Calcium-Ionen könnten selbst eine Depolarisation über den direkten Einstrom durch ChR2 vermitteln. Diese Hypothese konnte jedoch durch Aequorin-Messungen an C128A-Protoplasten nicht oder nur teilweise gestützt werden. In diesen Experimenten konnte kein unmittelbar auf den Blaulichtpuls folgendes Calcium-Signal detektiert werden. Allerdings konnte ein eventueller initialer Peak in den ersten 20s aufgrund des systemimmanenten Messartefakts auch nicht aufgezeichnet werden. Zudem erfolgten diese Messungen in Arabidopsis-Protoplasten, in denen eine funktionelle elektrophysiologische Charakterisierung der ChR2-Funktion noch aussteht. Da über ChR2 direkt möglicherweise nur sehr geringe, lokale Calcium-Signale erzeugt wurden, wäre hierbei auch die Auflösungsgrenze von Aequorin als Calcium-Indikator erreicht. Für diese Art der lokalen Calcium-Messungen am Einzelsystem müssten Fluoreszenz-basierte Calcium-Indikatoren eingesetzt werden.

Neben der direkten Beteiligung von Calcium an der Depolarisation muss auch ein sekundärer Effekt diskutiert werden: Ein initialer Calcium-Einstrom könnte über Calcium-abhängige Prozesse (Kinasen etc., siehe 1.4.2) Anionen-Kanäle aktivieren, die in Pflanzen grundlegend für die Generierung von Depolarisationen sind (siehe 1.3.1.2). Um dies zu testen, könnte die Chlorid- oder Nitrat-Konzentration in der extrazellulären Lösung erhöht werden, um so den elektrochemischen Gradienten für das Hauptanion zu verringern. Falls Anionenkanäle in der ChR2-vermittelten Depolarisation eine Rolle spielen, sollte sich hierbei die Signalamplitude verringern. Allerdings müsste hierbei die Signatur des zugrunde liegenden Calcium-Signals entscheidend für die Kinetik der Anionenkanal-generierten Depolarisation sein, da die Schließkinetiken der einzelnen ChR2-Mutanten deutlich mit der Repolarisationszeit korrelierte. Möglich wäre dies durch die im tierischen System beschriebene Cluster-Bildung von korrespondierenden Signalkomponenten in den sogenannten Lipid Rafts der Plasmamembran, in Beispielen dargestellt in Simons und Toomre (2000). Die räumliche Nähe der interagierenden Signalproteine bewirkt so eine sehr schnelle, spezifische Perzeption und Signaltransduktion lokaler Signale wie lokaler Änderungen der cytosolischen Calcium-Konzentration.

Um zu klären, welchen Einfluss die externe Calcium-Konzentration auf die Depolarisationsamplitude nimmt, wurden Messungen mit dem Calcium-Chelator EGTA durchgeführt. Wie zu erwarten war, stellte die externe Applikation von EGTA einen starken

Eingriff in die Calcium-Homöostase der Zellen dar, so dass die Messung überhaupt nur über einen kurzen Zeitraum möglich war, bevor das Membranpotential der Zellen „zusammenbrach“. Trotzdem konnten einige wenige Experimente durchgeführt werden, in denen EGTA kurz nach Erreichen der maximalen Depolarisationshöhe zur Probe appliziert wurde. Daraufhin wurde eine weitere Erhöhung der Amplitude um ca. 15mV beobachtet. Da dieser Effekt direkt auf die Applikation folgte, ist ein ausschließlich durch Calcium-Einstrom getragenes Signal eher unwahrscheinlich, da hierbei eine Verringerung der Depolarisation zu erwarten wäre. Vielmehr deutet diese Beobachtung darauf hin, dass die Komplexierung des apoplastischen Calciums eine Freisetzung von Calcium-Ionen aus endogenen Speichern ins Cytosol bewirkte, was zu der beobachteten Signalerhöhung führte.

Um die Basis der Depolarisation exakt zu untersuchen, könnten Patch-Clamp Untersuchungen an transformierten Protoplasten sowohl im Tabak- als auch im Arabidopsis-System durchgeführt werden, da unter diesen Bedingungen eine exakte Definition der Lösungsbedingungen sowohl extern als auch intern möglich wäre. Zur Untersuchung der Rolle von Chlorid-Kanälen in der ChR2-vermittelten Depolarisation könnte Chop2 zudem im Hintergrund von Anionenkanal-Knockout-Pflanzen exprimiert werden.

Abb. 3-17 zeigt, dass auf die ChR2-vermittelte Depolarisation häufig auch eine Hyperpolarisation nach Repolarisation des Membranpotentials folgte. Diese könnte einerseits auf einer Aktivierung der Protonenpumpe durch die initiale Blaulichtapplikation sowie andererseits durch die Aktivierung Spannungs-gesteuerter Kalium-Kanäle (siehe 1.3.2.1) durch die vorangegangene Depolarisation begründet sein.

4.2.5 Optogenetik in Pflanzen: Variation definierter Membranpotentialänderungen durch ChR2

Mit den elektrophysiologischen Messungen am Tabak konnte gezeigt werden, dass es durch Blaulicht-Aktivierung von ChR2 (C128T/A, D156A) möglich ist, Membranpotentialänderungen, genauer Depolarisationen, in Pflanzen zu generieren. Um diese in ihrer Form und Amplitude variieren zu können, kann auf folgende experimentelle Parameter zurückgegriffen werden:

- **Applizierte Lichtintensität:** Die Aktivierung der Kanalaktivität jeder ChR2-Mutante kann durch die Lichtintensität der verwendeten Lichtquelle variiert werden (siehe Abschnitt 3.3.3.2). Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, Depola-

risationen im gesamten Spektrum der ChR2-Mutante in einem Bereich von ca. 10 bis 115mV (C128A) zu generieren.

- **ChR2-Mutanten:** Die Verwendung unterschiedlicher ChR2-Mutanten mit differierender Kinetik, Permeabilität als auch Lichtsensitivität erlaubt ein zusätzliches Variationspotential. Hierdurch ist es z. B. möglich, durch den gleichen Blaulichtpuls elektrische Signale zu erzeugen, die in Dauer und Amplitude sowie Repolarisationskinetik variieren.
- **Form des Blaulichtpulses:** Durch die Länge bzw. Frequenz des Blaulichtpulses kann das Depolarisationsmuster moduliert werden, um unterschiedliche Formen an elektrischen Signalen zu generieren.
- **Grünlicht-Modulation der Kanalaktivität:** Einige Mutanten besitzen erwie-sermaßen die Eigenschaft der möglichen Beeinflussung des Photozyklus durch Grünlicht (siehe Abschnitt 3.1.2 und 3.3.3.7). Da hierdurch die Schließkinetik beschleunigt werden kann, ist es auch unter Verwendung relativ langsam schließender Mutanten wie C128A und D156A möglich, die Repolarisationszeit gezielt zu verkürzen.

4.3 Funktion II: Calcium-Messungen

Um die Funktion heterolog exprimierter ChR2-Kanäle in Pflanzen mit einer weiteren Methode zu studieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Lumineszenz-basierte Calcium-Messungen mit Aequorin als Calcium-Indikator durchgeführt. Diese Calcium-Messungen wurden an Protoplastensuspensionen durchgeführt, da Einzelzellmessungen aufgrund der niedrigen Signalstärke mit diesem System nicht möglich waren.

4.3.1 Kritische Betrachtung der Messmethodik

Das in den Calcium-Messungen beobachtete, initiale Lumineszenzsignal direkt nach Blaulichtpulsgabe erwies sich als Messartefakt (siehe 3.4.1). Da eine Autofluoreszenz durch die Anregung des Chlorophylls als Ursache ausgeschlossen werden konnte, ist ein „Nachleuchten“ der LEDs eine mögliche Ursache. Durch Einsetzen eines elektrischen Shutters direkt oberhalb der Lichtquelle oder die Applikation eines Lasers als Lichtquelle wäre es möglich, dieses Messartefakt zu unterbinden. Diese Maßnahmen sind in zukünftigen Experimenten essentiell, um eventuell direkt nach Lichtstimulation auftretende Calcium-Signale detektieren zu können.

Eine weitere Problematik in diesen Messungen stellte das verrauschte Grundsignal schon vor Gabe des Lichtstimulus dar (siehe beispielsweise Abb. 3-26). In diesen Experimenten wurde der Calcium-Indikator Aequorin per Kotransformation mit Chop2-YFP in Protoplasten exprimiert. Dadurch sollte eine sensitivere Messmethode als unter Verwendung stabil exprimierender Aequorin-Pflanzen generiert werden. Die transiente Transformation von Aequorin führt zu einem sehr hohen Expressionsniveau in den entsprechenden Zellen und könnte ursächlich für die verrauschte Basislinie sein. Der Calcium-Indikator Aequorin wirkt auch als Calcium-Puffer und kann dabei bei Überexpression die Calcium-Homöostase der Zellen stören und somit ein instabiles cytosolisches Calcium-Gleichgewicht auch im Grundzustand bewirken. Übereinstimmend mit dieser Annahme zeigten Arbeiten von Dr. Christoph Stangl bei Verwendung stabiler Aequorin-Pflanzen dieses Verhalten nicht (Doktorarbeit 2012, Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg). Schließlich könnte auch die Aktivierung des ChR2-Proteins durch Aequorinlumineszenz (Emission bei ca. 470nm) die Ursache für die unruhige Basislinie sein. Auch in diesem Fall würde sich die Verwendung stabiler Aequorin-Pflanzen empfehlen, da in diesen das Auftreten spontaner Calcium-Änderungen ohne Stimulus nicht bekannt ist und somit auch eine eventuelle Aktivierung des ChR2-Proteins durch die Aequorin-vermittelte Lumineszenz weitaus geringer sein sollte. Es ist jedoch zu bedenken, dass eine Aktivierung von ChR2 durch das vermittelte Calcium-Signal nach Blaulichtgabe zu einer erneuten Öffnung der Kanäle führen würde, wodurch eine Art Feedback-Mechanismus geschaffen wäre, der eine definierte Calcium-Änderung unmöglich machen würde.

Die unter Abschnitt 3.4.3 gezeigten Calcium-Messungen konnten nicht quantifiziert werden, da die Durchführung eines „Discharges“ in dem verfügbaren experimentellen Setup nicht möglich war. Um die Calcium-Änderungen quantitativ erfassen zu können, müsste eine von außen steuerbare Applikationspipette am Setup angebracht werden.

Calcium-Messungen an Arabidopsis-Protoplasten ergaben eine vollständige „Reaktionsfähigkeit“ der Zellen in diesem Ansatz erst zwei Tage nach der Transformation. Dieser beobachtete Effekt könnte im Expressionsniveau der Transgene begründet sein, welches bei einer verlängerten Expressionszeit über mehrere Tage ansteigen könnte. Allerdings konnten keine offensichtlichen Fluoreszenzunterschiede von ChR2-YFP zwischen Zellen 1dpt und 2dpt festgestellt werden. Ursächlich für die erst nach Tagen gemessene Reaktionsfähigkeit der Zellen könnte zudem die Regeneration der Zellen vom Stress der Protoplastierung und Transformation sein und hiermit verbunden die sich bereits rege-

nerierende Zellwand (Dovzhenko et al., 1998). Dr. Uta Anschütz konnte einen eben solchen Effekt in Arbeiten ihrer Dissertation zur Charakterisierung pflanzlicher Glutamatrezeptoren (GLRs) beobachten: In Calcium-Messungen an Arabidopsis-Protoplasten konnte das höchste durch Glutamat induzierbare Calcium-Signal 48h nach Protoplastierung der Zellen gemessen werden (Dissertation, Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg).

Die Tatsache, dass auch ein Absenken der externen Kaliumchlorid-Konzentration von 20mM auf 1mM für die Ausbildung des ChR2-induzierten Calcium-Signals nötig war, deutet darauf hin, dass ein hyperpolarisiertes Membranpotential essentiell ist, um ein Calcium-Signal in diesem Expressionssystem generieren zu können.

In den in Abschnitt 3.4.3 gezeigten Aequorin-Experimenten konnte eine große Variabilität zwischen den durchgeführten Einzelmessungen an transformierten Protoplastensuspensionen beobachtet werden. Diese basierte höchstwahrscheinlich auf der nicht standardisierten Menge an Protoplasten sowie deren Transformationseffizienz. Während sich die eingesetzte Menge an Zellen durch eine exakte Bestimmung der Zelldichte bestimmen ließe, ist eine Normierung bzw. ein Bezug des detektierten Signals auf die Menge an exprimiertem und rekonstituiertem ChR2-Protein schwierig. Falls lediglich mit einer ChR2-Mutante gearbeitet würde, könnte man dessen Proteinmenge am ehesten über die Gesamtfluoreszenz bzw. über einen anschließenden Western-Blot nach dem Calcium-Experiment abschätzen. Um verschiedene Mutanten miteinander zu vergleichen, wäre diese Methoden jedoch nicht brauchbar, da sowohl in Fluoreszenzaufnahmen als auch im Western-Blot anhand der infiltrierten Tabakproben gezeigt werden konnte, dass die Fluoreszenzintensität bzw. Bandenintensität nicht mit der ausgelösten Depolarisation im Vergleich der unterschiedlichen Mutanten korrelierte (siehe 3.2.2 und 3.3.3.1).

4.3.2 ChR2-vermitteltes Calcium-Signal – C128A vs. L132C

Innerhalb dieser Arbeiten wurden die ChR2-Mutanten C128A und L132C in Calcium-Messungen getestet, wobei nur eine geringe Anzahl an Experimenten mit letzterer durchgeführt wurde. Die mit C128A transformierten Arabidopsis-Protoplasten zeigten ein Calcium-Signal, das nicht direkt auf die Belichtung der Zellen folgte, sondern erst nach einem Zeitraum von 2-5min einsetzte und einen Peak nach 4-8min erreichte. Abgesehen von der Tatsache, dass die Detektion eines Calcium-Signals erst ca. 20s nach Ende des Blaulichtpulses möglich war, konnte daraus geschlossen werden, dass vermut-

lich kein direkter Calcium-Einstrom ins Cytosol über ChR2 erfolgte. Vielmehr deutete die verzögerte Calcium-Erhöhung auf die Aktivierung endogener Signalkaskaden hin, welche zur Aktivierung endogener Calcium-permeabler Kanäle führten. Das beobachtete, verzögerte Calcium-Signal könnte durch eine Repolarisation des Membranpotentials nach erfolgter ChR2-vermittelter Depolarisation der Protoplasten zustande kommen. In Stange et al. (2010) konnte (wie schon in der Einleitung unter Abschnitt 1.3.2.2 beschrieben) die Aktivierung Hyperpolarisations-aktivierter Calcium-Kanäle (HACCs) durch eine vorangegangene Depolarisationsphase verstärkt werden. In diesem Zusammenhang wurde die Existenz Depolarisations-aktivierter Calcium-Kanäle (DACCs) diskutiert: Im Gegensatz zu tierischen Zellen scheinen diese jedoch in Pflanzen nicht zu existieren. Es ist daher davon auszugehen, dass die erzeugte Depolarisation den Effekt eines sogenannten Primings für HACCs übernimmt, so dass diese in ihrer Spannungsabhängigkeit zu depolarisierenden Membranspannungen verschoben würden. Dadurch könnten HACCs bereits während der Repolarisation des Membranpotentials aktiviert werden. Abb. 4-2 zeigt die Blaulicht induzierte Depolarisation in mit C128A infiltrierten Tabakblättern in zeitlicher Korrelation mit einer Calcium-Messung an ebenfalls mit C128A transformierten Arabidopsis-Protoplasten.

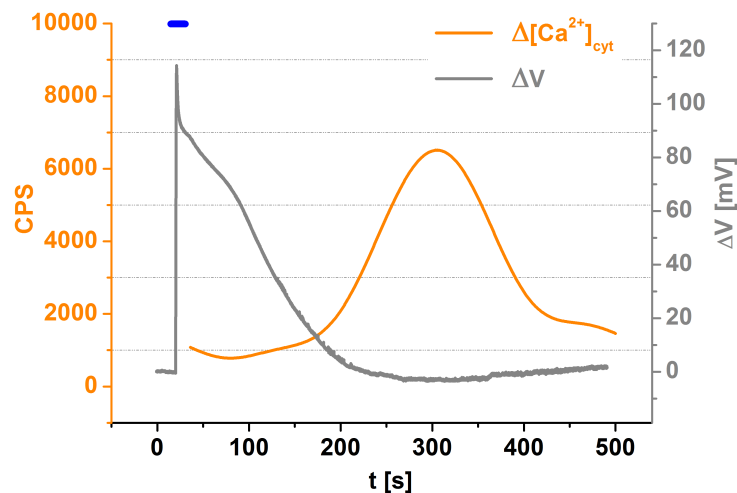


Abb. 4-2: Vergleich – BL-induzierte Depolarisation in mit C128A-YFP transformierten Tabak-Blattstücken (in grau; 3dpi) und BL-induzierte Calcium-Änderung in Arabidopsis-Protoplasten (in orange; 2dpt; geglättet mit FFT, 50Pkt).

Diese Abbildung zeigt, dass der Beginn des Calcium-Signals mit dem Wiederreichen des Ruhepotentials der Zunahme der Repolarisation der Blaulicht-induzierten, ChR2-vermittelten Depolarisation des Membranpotentials einhergeht (Ruhepotential -152mV). Dies stützt die genannte Hypothese eines Calcium-Anstiegs durch „geprimte“ Hyperpo-

larisations-aktivierte Calcium-Kanäle im Gegensatz zu einem Depolarisations-vermittelten Calcium-Signal über Depolarisation-aktivierte Calcium-Kanäle.

Calcium-Messungen mit repetitiver Blaulichtapplikation (C128A) führten zu wiederholten Calcium-Erhöhungen verbunden mit einer Abschwächung des Signals nach dem ersten cytoplasmatischen Calcium-Anstieg. Daraus kann geschlossen werden, dass das diskutierte Priming der HACCs bei schon vorangegangener Stimulation abgeschwächt wird. Bei einer Betrachtung der an Tabak durchgeführten Einstichmessungen, kann zudem eine Verminderung der Blaulicht-induzierten, durch C128A vermittelten Depolarisation ausgeschlossen werden, da die Lichtpulse im Protoplastenexperiment im Abstand von 40min bzw. 15min erfolgten. Membranpotentialmessungen im Tabak zeigten, dass Blaulicht-induzierte, ChR2 (C128A)-vermittelte Depolarisationen in einem Abstand von 10min zwischen repetitiver Blaulichtbehandlung eine stabile Amplitude aufwiesen (siehe Abb. 3-24 A). Dem sinkenden Calcium-Signal könnte jedoch auch ein irreversibler Verbrauch an Aequorin-Protein zugrunde liegen. Da mit dem vorhandenen experimentellen Aufbau keine Discharge-Messung durchgeführt werden konnte, lässt sich eine exakte Aussage darüber nicht treffen. Jedoch spricht ein erneutes Calcium-Signal in einer mit dem initialen Peak vergleichbaren Höhe nach einer längeren Dunkelperiode (ca. 1h) gegen diese Hypothese. Vielmehr könnte hierbei eine Aktivierung der Rückstellkräfte in der Calcium-Homöostase (siehe 1.4.1.2) eine schnellere „Reaktionsfähigkeit“ bei aufeinanderfolgenden Calcium-Erhöhungen in den gezeigten Abständen und daher eine geringere Signalamplitude zur Folge haben.

Neben der C128A-Mutante wurde auch L132C in Aequorin-Experimenten eingesetzt, da für diese ChR2-Mutante eine erhöhte Calcium-Leitfähigkeit beschrieben wurde (Kleinlogel et al., 2011a). Aufgrund der Tatsache, dass hier nur wenige Messungen durchgeführt wurden, ist die Interpretation dieser Mutante nur als vorläufig zu betrachten. Jedoch konnte in L132C-transformierten Protoplasten erstmals ein direkter Calcium-Anstieg nach Blaulichtgabe (nach 20s „Blindzeit“ wegen Artefakt) gemessen werden. In diesem Experiment (siehe Abb. 3-29) konnte ein biphasisches Calcium-Signal beobachtet werden, das nach einem initialen Calcium-Anstieg eine weitere, leichte Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration zeigte. Das erste Calcium-Signal könnte daher direkt ChR2-vermittelt sein, während der nachfolgende Anstieg dem schon mit C128A beobachteten verzögerten Signal gleicht, jedoch geringer als die initiale Erhöhung ausfiel. Aus TEVC-Messungen an *Xenopus*-Oozyten (siehe Abb. 3-3) war bereits bekannt, dass diese Mutante einen zwar im Vergleich zum WT-ChR2 erhöh-

ten stationären Strom aufwies, die Kinetik dieser Mutante jedoch dem WT entsprach. Allerdings könnte eine durch die Aktivierung von L132C erzeugte Depolarisation bzw. nachfolgende Repolarisation (vergleichbar zu Messungen an C128A) ebenso ursächlich für ein Repolarisations-induziertes Calcium-Signal sein, das aufgrund der schnelleren Kinetik direkt auf die Blaulichtgabe folgte. Falls eine Depolarisation in den mit L132C transformierten Protoplasten erzeugt wurde, wäre diese wahrscheinlich geringer als bei C128A und deutlich kürzer in Bezug auf die Repolarisationszeit. Dies könnte daher auch die Ursache für das im Vergleich zu Messungen an C128A deutlich schwächere, zweite Calcium-Signal sein. Die aus diesen wenigen Messungen erhobenen Daten müssen jedoch zwingend durch weitere Experimente verifiziert werden. Zudem sollte ein verbesserter experimenteller Aufbau auf eine Lumineszenzdetektion direkt nach Gabe des Blaulichtpulses abzielen und damit auch eine bessere zeitliche Auflösung der Calcium-Signale ermöglichen.

Da die bisherigen Calcium-Experimente nur mit einer definierten Blaulichtintensität und Dauer durchgeführt wurden, wäre es interessant, auch andere Lichtprotokolle und deren Auswirkung auf die cytosolische Calcium-Konzentration zu testen, um das Potential dieser Methode hinsichtlich der Generierung bereits bekannter Calcium-Signaturen zu untersuchen. Außerdem könnten in diesem Zusammenhang weitere ChR2-Mutanten untersucht werden.

Um eine genauere Aussage über die Herkunft des Calcium-Signals machen zu können, wäre es zudem nötig, die Lösungszusammensetzung der Messlösung zu variieren, indem etwa die externe Calcium-Konzentration variiert würde.

Zuletzt stellt sich die Frage, ob ein „Retinal-Substituent“, auf der möglicherweise die gleichmäßige Expression aller getesteten Chop2-Mutanten in Protoplasten beruht (siehe 3.2.1 und 4.1.2), Retinal auch funktionell ersetzen kann. Daher sollten in folgenden Experimenten auch Messungen mit Chop2-exprimierenden Protoplasten ohne Retinal-Applikation durchgeführt werden.

4.4 Ist es optogenetisch möglich, ΔV_m und $\Delta[Ca^{2+}]$ Signale von physiologischer Bedeutung zu generieren?

Mit den experimentellen Daten dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Depolarisationen mittels optogenetischer Werkzeuge artifiziell in Pflanzen zu erzeugen. Diese können je nach Form des applizierten Lichtpulses sowohl in ihrer

Amplitude als auch in ihrer Dauer und Kinetik definiert eingestellt werden. Darüber hinaus war es mit ChR2 reproduzierbar möglich, Depolarisationsamplituden im physiologischen Bereich zu generieren. Die beobachteten Membranpotentialänderungen von bis zu 120mV im Maximum entsprechen Signalen wie sie z. B. bei der Flagellin-Antwort oder durch abiotische Stimuli wie Kälte induziert werden. Durch die Verwendung von Mutanten (wie z. B. D156A) mit langsamer Schließkinetik bietet sich zudem die Möglichkeit, Signale über längere Zeitspannen bei gleichzeitig geringer Lichtintensität zu erzeugen.

Mit der Generierung stabiler Chop2-Pflanzen wurde nun auch die Möglichkeit geschaffen, ChR2 bzw. dessen Mutanten zur nicht-invasiven Simulation von Depolarisationen in Pflanzen einzusetzen. Im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten könnten hierdurch, auch unter Verwendung gewebe- bzw. zellspezifischer Promotoren, lokale sowie zeitlich streng regulierte Muster generiert werden. Dies würde eine definierte Nachahmung und Analyse Calcium-basierter Signale in pflanzlichen Zellen/Geweben ermöglichen.

Mit der funktionellen Expression der eingesetzten ChR2-Mutanten in Pflanzen wurde zudem der Grundstein für den Einsatz weiterer ChR2-Varianten bzw. optogenetischer Werkzeuge in Pflanzen geschaffen. In der Vielzahl der entwickelten ChR2-Mutanten mit Unterschieden bezüglich Anregung, Permeabilität oder Kinetik, könnte besonders eine optogenetische Variante für zukünftige Experimente sehr interessant sein: Diese von Kleinlogel et al. (2011b) entwickelte Methode stellt ein optogenetisches Fusionsprotein dar, mit dem es möglich ist, gezielte Depolarisationen und Hyperpolarisationen über die Applikation definierter Wellenlängen (blau bzw. rot) zu erzeugen. Hierbei wurden Channelrhodopsin-2 und Halorhodopsin (NphR) in Neuronen durch eine Fusionskassette in einem festen stöchiometrischen Verhältnis koexprimiert, um sowohl die Aktivierung als auch Inhibierung dieser über artifizielle Membranpotentialänderungen steuern zu können.

In den gezeigten Calcium-Messungen konnte bisher nur unter Verwendung der L132C-Mutante eine direkt durch ChR2 vermittelte Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration gezeigt werden. In Messungen mit der Mutante C128A konnte allerdings ein sekundärer Effekt von ChR2 auf das cytosolische Calcium-Niveau dieser Zellen beobachtet werden. Daher ist fraglich, ob ChR2 sich für die Generierung spezifischer Calcium-Signaturen in Pflanzen eignet. Zudem war bisher eine Quantifizierung des Calcium-Signals über Aequorin nicht möglich. Daher kann zu diesem Zeitpunkt keine

Aussage über die absolute Höhe dieser durch ChR2 erzeugten Calcium-Signale getroffen werden. Da das durch C128A induzierte Calcium-Signal wahrscheinlich nur auf sekundären Effekten beruht, werden desweiteren andere Komponenten der Signaltransduktion in diesen Zellen beeinflusst, so dass ein direkter Rückschluss auf einen möglichen Effekt des artifiziell generierten Calcium-Signals nicht ohne weiteres möglich ist. Zukünftige Untersuchungen mit der Mutante L132C müssen daher zeigen, ob ein direkter Calcium-Einstrom durch den lichtaktivierten Kanal in Pflanzen überhaupt möglich ist.

4.5 RNA-Seq

Nachdem die Expression und Funktion der ChR2-Mutanten im Tabaksystem erfolgreich getestet und charakterisiert worden war, wurde Probenmaterial aus transient transformierten Tabakblattscheiben mit zwei in ihrer Form sehr unterschiedlichen Blaulichtpulsen stimuliert. Hiermit wurden definierte Depolarisationsmuster in diesen Zellen generiert und deren Effekt auf transkriptioneller Ebene untersucht.

Hierbei wurde, wie im Ergebnisteil (Abschnitt 3.5.1) beschrieben, die Auswirkung eines langen, durchgehenden Pulses (LP), als Teil der Pathogenantwort, mit einem als Kontrolle dienenden kurzen, repetitiven Puls (SPs) verglichen. Obwohl sich die applizierten Blaulichtmuster in ihrer Form sehr unterschieden, wurde das insgesamt erzeugte Depolarisationsintegral in beiden Fällen gleich gewählt. Da in Pflanzen eine Vielzahl elektrischer Signale existieren, deren Bedeutung im Allgemeinen bzw. der Einfluss der Signalsignatur im Speziellen für die transkriptionelle Regulation bisher jedoch weitgehend unbekannt ist (siehe Einleitung, Abschnitt 1.2), sollte die ChR2-basierte Methode einen ersten Einblick in das Potential der Optogenetik als genetisches Werkzeug in Pflanzen schaffen.

Die transkriptionelle Auswirkung der generierten Membranpotentialänderungen wurde mittels der RNA-Seq-Methode untersucht. Die hieraus gewonnenen Daten zeigten, dass es möglich war, Genregulation durch ChR2-Aktivität zu erzeugen. Zudem konnte dargestellt werden, dass durch die Wahl der unterschiedlichen Pulse ein signifikant unterschiedliches Set an Genen reguliert wurde, wobei eine wesentlich größere Anzahl an Genen durch LP-Stimulierung reguliert wurde. Einige wenige Gene wurden einheitlich durch beide Behandlungen angesteuert. Das durch LP erzielte Ergebnis stimmte mit der eingangs formulierten Hypothese überein, in der LP als Imitation eines Pathogen-

induzierten Signals dienen sollte, wobei SPs als Kontrolle mit gleichem Signalintervall verwendet wurde. Kurze, oszillierende elektrische Signale sind in Pflanzen bisher nicht beschrieben, wurden aber, wie eingangs in Abschnitt 1.2 dargestellt, für die Calcium-vermittelte Signaltransduktion z. B. in Schließzellen beschrieben (Allen et al., 2001).

Innerhalb dieser Arbeit konnten durch die Blaulicht-gesteuerte Aktivierung von ChR2 sowohl Membranpotential- als auch Calcium-Änderungen gemessen werden. Da diese Messungen jedoch auf unterschiedlichen Expressionssystemen basierten, kann zum jetzigen Zeitpunkt gefolgert werden, dass es prinzipiell möglich scheint, beide Signale ChR2-vermittelt artifiziell zu erzeugen. Die in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Seq-Analysen wurden mit Tabakproben durchgeführt, weshalb mit Sicherheit abgeleitet werden kann, dass die daraus erhobenen Transkriptionsänderungen auf elektrischen Signalen beruhen (siehe Einstichmessungen, Abschnitt 3.3.3). Welchen Anteil Calcium an diesen ausmacht, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt noch unbeantwortet.

4.5.1 Interpretation der RNA-Seq-Daten

Um Aufschluss darüber zu erlangen, welche funktionellen Gruppen von Genen durch LP und SPs Signale ChR2-vermittelt angesteuert werden, wurden die erhaltenen Genlisten der Behandlungen durch Mapman in funktionelle Container (BINs) eingeteilt. Da aus den Analysen der Mapman-Einordnung zunächst keine eindeutige Tendenz zu erkennen war, wurde eine Enrichment-Analyse mit Pathogen-Microarray-Daten auf Basis der Ergebnisse des Signatur-Tools (Genevestigator) durchgeführt. Aufgrund der eingangs formulierten Hypothese, dass eine lange Depolarisation als Bestandteil z. B. der Flagellin-induzierten Signalkaskade in Pflanzen wirkt, wurden die Ergebnisse dieser Analysen auch speziell für die lang andauernde Depolarisation (LP) hinsichtlich Genen mit Wirkung in diesem Signalweg untersucht.

Aus diesen Analysen ging, wie schon aufgrund der Signatur-Analyse vermutet, hervor, dass die durch LP induzierte Genregulation eine signifikante Überlappung mit allen vier untersuchten Flagellin- bzw. Pseudomonas-Mikroarrays aufwies. Dabei konnten signifikante Ähnlichkeiten für Zeitpunkte von 1h und 3h (für flg22) sowie für 7h und 24h (für Pseudomonas DC3000) kalkuliert werden. Die höchste Übereinstimmung hierbei zeigte „flg22 1h“ und „Pseudomonas 7h“.

Bei der Betrachtung des Mapman-BINs Zellwand fiel beim Vergleich LP zu SPs auf, dass eine gegenläufige Tendenz durch SPs bzw. LP zu beobachten war: Diesem BIN

wurden etwa gleich viele Gene (LP 3, SPs 4) zugeteilt, wobei LP einen reprimierenden, SPs jedoch einen induzierenden Effekt zeigte. Während Gene wie *AtEXPB2* (AT1G65680, logFC -1.8) und *AtXTH16* (AT3G23730, logFC -1.2), die zur Lockerung der Zellwand führen (Cosgrove, 2000; Xu et al., 1996)), durch LP reprimiert waren, wies die SPs-Behandlung einen gegenteiligen Effekt auf: *AtUGD2* (AT3G29360, logFC 1.4), *AtRGP2* (AT3G08900, logFC 4.4) und *AtEXP12* (AT3G15370, logFC 1.6) wurden durch SPs induziert, was auf eine Wachstumsstimulation hinweist (Cosgrove, 2000; Klinghammer & Tenhaken, 2007; Sagi et al., 2005). Die Expression des Transkriptionsfaktors *AtMYB20*, welchem eine Rolle bei der sekundären Zellwandverstärkung zugeschrieben wird (Zhong et al., 2008), wurde durch LP hingegen induziert (AT1G66230, logFC 1.2).

Da die Inhibierung des Wachstums und eine Verstärkung der Zellwand durch Lignine eine typische Reaktion der Pflanze auf Pathogenbefall darstellt, stimmt das Ergebnis der Enrichment-Analyse mit den durch Mapman eingeordneten Expressionsdaten von LP überein. Die Signatur-Analyse deutete bereits darauf hin, dass durch SPs regulierte Gene eher eine Rolle in der abiotischen Stressantwort spielen, während sich die durch LP induzierte Genregulation signifikant mit Genen der Pathogenabwehr überschneidet. Auffällig war hierbei besonders, dass SPs in diesem Fall nicht nur als Kontrolle diente, sondern eine zu LP gegenläufige, eigene Signalwirkung innezuhaben schien. Dieses Ergebnis kann jedoch aufgrund der zu geringen Stichprobengröße der durch SPs regulierten Gene nur als vorläufig betrachtet werden.

Auch Phytohormone spielen eine Rolle in der Steuerung des durch Pathogenbefall inhibierten Wachstums (Kazan & Manners, 2009). Hierbei nimmt insbesondere Jasmonsäure eine zentrale Stellung ein (Wasternack, 2007). Sowohl LP als auch SPs führten zu einer Induktion des JA-Synthesegens *AtLOX3* (AT1G17420, SPs/LP logFC 1.5/1.3), während *AtLOX1* (AT1G55020, logFC 1.2) nur durch LP signifikant reguliert wurde (Hu et al., 2009). Bereits in Bricchi et al. (2012) wurde eine direkte Regulation von Genen der JA-gesteuerten Signaltransduktion durch elektrische Signale und somit Membranpotentialänderungen beschrieben. Gene der Brassinosteroid-(BR) Biosynthese wie *AtCYP90C1* [AT4G36380, logFC -1.2 (Kim et al., 2005)] und *AtDWF1* [AT3G19820, logFC -1.6 (Choe et al., 1999)] wurden hingegen durch LP reprimiert. Dies deutet ebenfalls auf eine Inhibierung von Wachstumsprozessen hin. BR inhibieren darüber hinaus die PAMP-gesteuerte Immunantwort und werden somit bei Pathogenbefall reprimiert (Albrecht et al., 2012).

Die Tatsache, dass ein Teil der Auxin-vermittelten Signaltransduktion durch LP induziert wurde (Auxin responsive GH3 family protein, logFC 2.02; putative Auxin response proteins: AT2G36210, logFC 1.69; AT3G59070, logFC 1.34; AT5G47530, logFC 1.38), scheint zunächst im Widerspruch zur bekannten pflanzlichen Abwehrreaktionen zu stehen, in der das Wachstum eingedämmt wird (Denance et al., 2013; Navarro et al., 2006). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass biotrophe Pathogene die Auxinbiosynthese in Pflanzen induzieren und dabei Typ III-Sekretionssysteme (also auch bakterielle Effektoren) eine Rolle spielen (Chen et al., 2007; Naseem et al., 2012; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Erhöhte Auxin-Konzentrationen induzieren jedoch zudem JA-Signalwege (Zhang et al., 2007) und stehen damit im Zusammenhang mit Verwundungs- bzw. Herbivorie-induzierten Reaktionen, die ihrerseits elektrische Signale auslösen (siehe Einleitung, Abschnitt 1.2.5 und 1.3.3). GH3-Gene wiederum kodieren für Indoleessigsäure (IAA)-Amido-Synthetasen, die in der Auxin-Homöostase wirken (Staswick et al., 2005). Ein Mitglied dieser Genfamilie, GH3.5, induziert die Abwehr über die Salicylsäure (SA)-vermittelte Signaltransduktion und spielt durch die Eigenschaft, sowohl IAA als auch SA adenylieren zu können, eine Schlüsselrolle in der Regulation der pflanzlichen Pathogenabwehr (Staswick et al., 2002; Zhang et al., 2007).

Auxin verhindert zudem den HR-abhängigen Zelltod (Gopalan, 2008). Insofern könnte die Induktion Auxin-responsiver Gene zunächst Teil einer frühen Abwehrreaktion der Pflanze sein. Wie sich LP zu späteren Zeitpunkten auf die Auxin-Biosynthese bzw. Signaltransduktion auswirkt, kann aus den vorliegenden Daten nicht extrapoliert werden und müsste gesondert untersucht werden.

Zusätzlich zu Genen, welche eine Verstärkung der Zellwand induzieren, konnte durch LP auch eine verstärkte Induktion des Phenylpropanoid-Metabolismus beobachtet werden, zu dem Prozesse wie die Lignin-, Sekundärmetabolit- sowie Aromatenbiosynthese zählen. Diese spielen nachweislich eine Rolle bei der Verstärkung von Pathogenabwehr-Mechanismen (Navarro et al., 2004a). Ein Beispiel hierfür ist das Enzym UDP-glucosyl transferase 72E1 (UGT72E1, AT3G50740, logFC 3.4), für das eine Rolle im Ligninmetabolismus vermutet wird. Außerdem befinden sich in dieser Gruppe mit *AtPAL1* (AT2G37040, logFC 1.3), *AtPAL2* (AT3G53260, logFC 1.2) und *AtPAL4* (AT3G10340, logFC 1.3) drei der insgesamt vier Mitglieder der Phenylalanin-Ammonium-Lyasen. Für *AtPAL1*, *AtPAL2* wurde neben ihrer Funktion in der Reaktion auf UV-Licht auch eine Rolle in der Pathogenabwehr beschrieben (Huang et al., 2010).

Generell fiel bei der Betrachtung der aus den Enrichment-Analysen hervorgegangenen Gene auf, dass eine große Anzahl der durch sie kodierten Proteine über ein extrazelluläres Exportsignal in den Apoplasten sekretiert wird: Darunter befinden sich antimikrobiell wirkende Gene wie AT2G38870 (logFC 3.2), welches für einen Serin-Protease-Inhibitor kodiert, oder auch AT2G31980, ein putativer Cystein-Protease Inhibitor (logFC1.3). Protease-Inhibitoren verhindern in diesem Kontext das Wachstum mikrobieller Pathogene durch die Suppression der Proteasen phytopathogener Mikroorganismen (Kim et al., 2009). Somit besteht in diesem Punkt ein direkter Bezug zu einer der wenigen Arbeiten, die elektrische Signale als direkte Ursache von Genregulation aufweisen: Wie bereits in der Einleitung (siehe Absatz 1.3.3) beschrieben, beobachteten Wildon et al. (1992) die Induktion von Protease-Inhibitoren nach Verwundung und anschließender Propagation elektrischer Signale in der gesamten Pflanze. Auch *AtPDF1.4* (AT1G19610, logFC 2.0), welches zur Gruppe der sogenannten Defensin-ähnlichen Proteine zählt, besitzt ein Sekretionssignal. Diese Proteine besitzen strukturelle Ähnlichkeit zu z. B. humanen Defensinen und wirken antimikrobiell (Thomma et al., 2002).

Mit *AtPUB22* (plant U-box 22, AT3G52450, logFC 1.7) und *AtPUB24* (plant U-box 24, AT3G11840, logFC 1.5) befanden sich auch bekannte Gene der Flagellin-induzierten Signaltransduktionskaskade innerhalb der aus der Enrichment-Analyse stammenden Genliste (flg22 1h und 3h). *AtPUB22* und *AtPUB24* agieren als negative Regulatoren der PAMP-induzierten Abwehr (Stegmann et al., 2012). *AtPUB22* interagiert dabei mit *AtExo70B2*, einem Exocytoseprotein und führt folglich zu dessen Ubiquitinylierung und Degradation. Da dieses eine Rolle in der PAMP-vermittelten Abwehrreaktion spielt, kommt es hierdurch zur Verzögerung bzw. Abschwächung der Pathogenantwort (Stegmann et al., 2012). *AtPUB22* vermittelt jedoch auch eine eigene Feedbackregulation durch Autoubiquitinylierung. Dabei könnte das Verhältnis zwischen den Targetproteinen und der PUB22-Konzentration entscheidend für die letztendliche Richtung der Regulation sein. Die Verzögerung der Pathogenantwort kommt natürlicherweise bei Pathogenbefall vor. Die Regulation über Ubiquitinylierung durch E3-Ligasen spielt hierbei eine Rolle im Endocytose-verbundenen Abbau des Flagellin-Rezeptors FLS2 beginnend ca. 30min nach Flagellin-Perzeption durch *AtPUB12/13*. Diese dient dem Schutz der Pflanze vor einer zu starken Aktivierung bzw. einer zu lange andauernden Immunantwort (Lu et al., 2011). Da *AtPUB22* sowohl durch SPs als auch LP induziert wurde, könnte dessen Regulation allein über die Amplitude des durch Chr2 gene-

rierten Signals und weniger über die Form des applizierten elektrischen Musters gesteuert sein.

In diesem Zusammenhang ist auch die reprimierende Regulation von *AtLYM1* (lysm domain GPI-anchored protein 1 precursor, AT1G21880, logFC -1.4) zu betrachten. *AtLYM1* gehört zu einer Gruppe plasmamembranständiger Proteine, die mit Peptidoglykanen als Bestandteil der bakteriellen Zellwand interagieren und so die Erkennung von Bakterien bewirken (Willmann et al., 2011). Auch dies könnte der Verhinderung eines „Over-shoots“ über die Erkennungsmechanismen der Immunantwort dienen.

Einen weiteren Bestandteil der initialen Signalkette der Pathogenabwehr stellen sehr wahrscheinlich auch durch zyklische Nukleotide regulierte Kanäle (CNGCs) dar, die als Kandidatengene für die noch nicht identifizierten Calcium-Kanäle in Pflanzen dienen (siehe Absatz 1.3.1.4). Hierbei befinden sich unter den durch LP regulierten Genen mit DEFENSE NO DEATH 1 (DND1/CNGC2, AT5G15410, logFC -1.2) und CNGC4 (AT5G15410, logFC -1.6) zwei dieser Kanäle. Beide Knockout-Mutanten zeigen eine erhöhte Pathogenresistenz (Ali et al., 2007; Balague et al., 2003), wobei in *cngc2*-Mutanten die hypersensitive Antwort (HR) vollständig inhibiert ist und eine konstitutive Abwehrreaktion abläuft (Ali et al., 2007). Da die Expression dieser Gene durch die LP-Behandlung reprimiert wurde, könnte dieses Signal möglicherweise einen Mechanismus induzieren, der zu einer Art Desensitivierung der Pathogenerkennung führt, wie bereits im vorherigen Absatz beschrieben.

In Bezug auf die Calcium-vermittelte Signaltransduktion, in der CNGCs eine Rolle spielen, konnte mit *AtACA13* (AT3G22910, SPs/LP logFC 2.4/1.7) auch ein Mitglied der Calcium-transportierenden ATPasen durch beide Signalmuster, SPs und LP, detektiert werden. Diese Calcium-Pumpe spielt möglicherweise eine Rolle in der Flagellin-Antwort, da eine Doppelmutante (*aca8/aca10*) der gleichen Genfamilie ein erhöhtes ACA13-Transkriptniveau nach flg22-Behandlung aufwies (Frei dit Frey et al., 2012). Falls das Chr2-vermittelte Signal sowohl im Fall von SPs als auch LP, wie Messungen an Arabidopsis-Protoplasten vermuten lassen, entweder zum Teil aus einem Calcium-Signal selbst besteht oder ein solches induziert, könnte die Induktion dieses Calcium-Transporters zur Wiederherstellung der Calcium-Homöostase in diesen Zellen dienen.

4.5.1.1 Vergleich mit Whalley et al. (2011)

Wie bereits in der Einleitung (siehe Abschnitt 1.6) erwähnt, wurde die transkriptionelle Regulation einzelner Komponenten eines Signalwegs auf Basis artifiziell generierter Signalmuster bisher ausschließlich durch die Arbeitsgruppe von Marc R. Knight untersucht (Whalley et al., 2011). In dieser Arbeit lag der Fokus allerdings streng auf Calcium-Signalen. Da es dennoch erstens sehr wahrscheinlich ist, dass Calcium-Signale auch Bestandteil der ChR2-basierten elektrischen Signale sind und zweitens elektrische Signale in Whalley et al. Grundlage für die generierten Calcium-Signale waren, wurde eine Enrichment-Analyse auf Basis dieser Datensätze durchgeführt.

Bei einem Vergleich der LP-Behandlung mit den drei innerhalb der in Whalley et al. (2011) generierten Datensätze konnte eine signifikante Überlappung sowohl für den transienten als auch den oszillierenden Puls festgestellt werden. Die identifizierten Gene stimmten zudem fast vollständig überein. Die Anreicherung war hier jedoch gering (transient/oszillierend: 12/15 Gene). Das bedeutet, dass durch den ChR2-basierten Ansatz ein zur Arbeit der Knight-Gruppe sehr unterschiedliches Genregulationsmuster generiert wurde. Keine Anreicherung wurde im Vergleich zu den in Walley et al. (2011) beschriebenen Dauerpulsbedingungen detektiert. Hierbei bleibt jedoch zu beachten, dass dieses Signal lediglich eine differentielle Genregulation von 27 Genen (vergleiche transient: 385 Gene, oszillierend: 516 Gene) hervorrief und somit insgesamt einen sehr geringen Effekt aufwies. Da das Gesamtintervall an erzeugter Calcium-Änderung jedoch mit dem oszillierenden Puls vergleichbar war, ist es sehr wahrscheinlich, dass in diesem Zusammenhang die Amplitude der erzeugten cytosolischen Calcium-Änderung eine entscheidende Rolle spielte.

Allerdings bleibt bei einem direkten Vergleich beider Datensätze festzuhalten, dass durch die Methode von Walley et al. (2011) nachweislich Calcium-Muster auf Basis elektrischer Signale erzeugt wurden, während dies im ChR2-basierten Ansatz nur in Arabidopsis-Protoplasten, nicht aber im Tabakblattsystem gezeigt werden konnte. Daher sind die durch LP generierten transkriptionellen Änderungen möglicherweise auf primär elektrische Signale zurückzuführen. Darüber hinaus unterschied sich auch die Signatur des applizierten elektrischen Signals. Ein dritter Unterschied bezieht sich auf das zugrundeliegende Probenmaterial: Während Whalley et al. (2011) intakte Arabidopsis-Keimlinge einsetzten, wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit Tabakblattscheiben verwendet.

Die Tatsache, dass eine Anreicherung im Vergleich dieser beiden unterschiedlichen Versuchsansätze detektierbar war, zeigt, dass ein gewisser Teil der Signalinformation in Whalley et al. (2011) und der innerhalb dieser Arbeit generierten Pulse übereinstimmen sollten. Interessant hierbei ist die Tatsache, dass zwei dieser Gene, Lipoxygenase 3 (LOX3, AT1G17420) und 4-Coumarate:CoA Ligase 1 (4CL1, AT1G51680), sowohl durch den transienten Puls sowie die Oszillation als auch durch SPs und LP reguliert wurden. Dies legt eine ubiquitäre Regulation durch elektrische bzw. Calcium-basierte Signale nahe, der wohl weniger die Signatur, sondern möglicherweise vielmehr die Amplitude des Signals zugrunde liegt.

Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass auch die ChR2-basierten Pulse ein Calcium-Signal beinhalten oder triggern, wie bereits in Calcium-Messungen an Arabidopsis-Protoplasten gezeigt werden konnte.

Um einen direkten Vergleich zwischen den beiden Datensätzen durchzuführen, könnten stabile ChR2-Arabidopsis-Keimlinge mit den in Walley et al. (2011) verwendeten Mustern behandelt werden. Zusätzlich dazu könnte die erhöht Calcium-permeable Mutante L132C genutzt werden und in parallel durchgeführten Aequorin-basierten Calcium-Messungen getestet werden.

4.5.2 Zusammenfassung und Ausblick: RNA-Seq

Elektrische bzw. Calcium-basierte Signale spielen eine ubiquitäre Rolle in der pflanzlichen Signaltransduktion. Jedoch gibt es bisher nur sehr wenige Daten, die den direkten Effekt dieser Signale auf nachgeschaltete zelluläre Antworten wie z. B. die Genregulation zeigen. Den innerhalb dieser Arbeit durchgeführten RNA-Seq-Experimenten mit ChR2-exprimierenden Pflanzen lag die Frage zugrunde, ob es allein durch die prinzipielle Nachahmung eines Teils der initialen Pathogen-induzierten Signalkaskade möglich ist, Genregulation zu steuern. Durch die Analyse dieser Daten konnte diese Hypothese bestätigt werden. Allerdings konnte, wie erwartet, nicht die volle Antwort einer Abwehrreaktion ausgelöst werden, sondern nur Teile dieser. Hierbei konnten etwa keine direkten transkriptionellen Änderungen bei Kinasen wie MAPK/CPK/CiPKs durch die verwendeten Pulse detektiert werden. Jedoch ist eine posttranskriptionale Modulation nicht auszuschließen und könnte mit Hilfe proteomischer Ansätze überprüft werden.

Weiterhin scheint auch die als Kontrolle eingesetzte SPs-Behandlung eine, wenn auch geringe, Signalfunktion innezuhaben. Obwohl dieser kurze, repetitive Puls kein bis dato

in Pflanzen bekanntes natürliches Signal darstellte und diese Art der oszillierenden Pulse bisher nur für Calcium-Signale beschrieben wurde (siehe Abschnitt 1.2.1, 1.2.3 und 1.2.4), scheint dieser artifizielle Puls einen Informationsgehalt in Bezug auf eher abiotischen Stress zu enthalten. Die Anzahl der in dieser Arbeit identifizierten regulierten Gene ist jedoch zu gering, um hierüber eine signifikante Aussage treffen zu können.

Obwohl die artifiziell erzeugten Pulse aus SPs und LP den gleichen Informationsgehalt in Bezug auf das erzeugte Signalintervall tragen sollten, wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse auf transkriptioneller Ebene generiert. Dies untermauert die Hypothese, dass die Signalsignatur entscheidend für die Kodierung der nachfolgenden Signalkaskade ist.

Das System der Agrobakterien-vermittelten, transienten Transformation der Blattproben mit Belichtung birgt den Nachteil, dass ein hoher Pathogen- bzw. Licht-basierter Hintergrund entsteht. Die gewählten Enrichment-Analysen zeigten, dass eine signifikante Anzahl von Genen angereichert wurde die übereinstimmend zuvor in Experimenten zur Flagellin- (1h) sowie Pseudomonas-Antwort (24h) detektiert wurden. Dies könnte zunächst darauf hindeuten, dass die erzielten Ergebnisse evtl. auf der Agrobakterien-Infiltration selbst beruhen. Es wurden jedoch einerseits alle Versuche in drei Replikaten durchgeführt. Andererseits wurden über den Versuchsaufbau durch YFP-infiltrierte plus mit SPs behandelte, mit Chop2-infiltrierte Pflanzen quasi zwei Negativkontrollen (n=6) im Falle der Infiltration eingesetzt. Als Kontrolle für die applizierten Lichtpulse dienten die YFP-infiltrierten Pflanzen (n=3), die eine zu SPs und LP gleiche Lichtbehandlung erfuhren. Zudem wurden drei Gene getestet, die erwiesenermaßen durch Blaulichtstimuli induziert werden (Lehmann et al., 2011). Tab. 4-3 zeigt eine hohe Transkriptmenge bei zwei dieser Gene, CCS (copper chaperone for SOD1) und ORG1 (OBP3-responsive gene 1), während der jeweilige logFC-Wert zwischen Kontrollen und Proben gering ist. Hierbei konnte zudem eindeutig gezeigt werden, dass diese Gene durch den angelegten q-Wert von <0.01 mit Werten von 1 bzw. nahe 1 als nicht signifikant regulierte Gene identifiziert wurden.

Tab. 4-3: Kontrolle – Blaulicht-induzierte Gene; Werte normalisiert auf Reads per Million (K1-3=Kontrolle 1-3, P1-3=Probe 1-3)

Solyc ID	AGI Code	TAIR10_ Aug2012	K1 SPs	K2 SPs	K3 SPs	K1 LP	K2 LP	K3 LP	P1 SPs	P2 SPs	P3 SPs	P1 LP	P2 LP	P3 LP	logFC SPs	q-Wert SPs	logFC LP	q-Wert LP
Solyc08g079830	AT1G12520	CCS	1618	982	1464	1980	1650	1396	1599	1363	1520	1909	1282	1409	0.25	1E+00	0.00	1E+00
Solyc03g083420	AT5G53450	ORG1	831	428	345	1127	459	313	1026	401	173	739	280	192	0.09	1E+00	-0.53	8E-01
Solyc11g066390	AT2G28190	CSD2	5	11	8	9	12	8	5	7	7	4	7	6	-0.20	1E+00	-0.58	7E-01

Durch den Kontrollvergleich sowie einem stringenten q-Wert sollte die durch das experimentelle Design hervorgerufene Genregulationen herausgefiltert werden, woraus lediglich durch die elektrischen Signalmuster der LP- und SPs-Behandlung induzierte Expressionsänderungen resultieren sollten.

Dennoch ist die Etablierung dieses Versuchsansatzes unter Verwendung stabil exprimierender Chop2-Pflanzen unerlässlich, um eindeutige und möglicherweise weitreichendere Aussagen treffen zu können und die bisher erzielten, sehr vorläufigen Ergebnisse aus dem transienten Versuchssystem möglichst nicht-invasiv zu evaluieren. Hierzu können besonders lichtsensitivere Chop2-Mutanten mit längerer Schließzeit beitragen.

Mit den nun generierten stabilen Chop2-Pflanzen wird es in Zukunft möglich sein, auch andere Signalmuster zu generieren und diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulusgabe auf deren transkriptionellen Effekt hin zu untersuchen.

Zudem bietet die Verwendung gewebe- bzw. zelltypspezifischer Promotoren die Möglichkeit, definierte Signale in einer sowohl zeitlichen als auch lokalen Art und Weise generieren zu können. Darüber hinaus können, basierend auf dieser Methode, bei identischem Input-Muster zell- bzw. gewebespezifische Antworten und somit Signalwege aufgeklärt werden.

Durch den Einsatz von Aequorin-Pflanzen als Grundlage der stabilen Chop2-Transformation können zukünftig auch die durch ChR2 sehr wahrscheinlich erzeugten Calcium-Änderungen parallel zur elektrophysiologischen Messung detektiert werden. Dadurch kann eine bessere Aussage über das artifiziell generierte Signal selbst sowie die nachfolgende Analyse getroffen werden. So gibt dieses Versuchssystem die Möglichkeit, sowohl bekannte als auch unbekannte Komponenten in bestimmte Signalkaskaden in Bezug auf deren Regulation über elektrische bzw. Calcium-basierte Signale zu identifizieren und deren Bedeutung über den Einsatz von Mutanten in diesen Genen zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Funktionelle Expression von ChR2 in Pflanzen

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig die funktionelle Expression des licht-aktivierten Channelrhodopsin-2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* in höheren Pflanzen gezeigt werden. Obwohl die erfolgreiche Transformation auf der Basis der Integration einer Expressionskassette für WT-ChR2 in Pflanzen genetisch nachgewiesen werden konnte, war ein funktioneller Nachweis nicht möglich. Demgegenüber war die funktionelle Expression aller getesteten ChR2-Mutanten im transienten Expressionsansatz erfolgreich und konnte schließlich auf der Basis der im Rahmen dieser Arbeit generierten Konstrukte auch für stabil transformierte Arabidopsis-Pflanzen bestätigt werden. ChR2 wurde in Arabidopsis-Protoplasten sowie Tabak-Epidermis- und Mesophyllzellen an der Plasmamembran lokalisiert, zeigte jedoch aufgrund der Überexpression eine starke Überladung des Endomembransystems.

Elektrophysiologische Messungen mit Hilfe der Einstichttechnik belegten, dass ChR2 sowohl in Arabidopsis-Keimlingen als auch im Tabakmesophyll funktionell ist, wobei sich die erzeugten Blaulicht-vermittelten Depolarisationen weitaus erfolgreicher im Tabaksystem darstellten.

Alle eingesetzten ChR2-Mutanten waren funktionell und zeigten in Einstichmessungen mit Oozytendaten korrelierende Kinetiken. Die Mutante C128A wurde hinsichtlich der erzielten lichtinduzierten Membranpotentialdepolarisationen als effektivste ChR2-Variante identifiziert.

Calcium-Messungen mit dem Reporterprotein Aequorin lieferten keinen Beweis für einen direkt durch ChR2-C128A vermittelten Calcium-Einstrom in Arabidopsis-Protoplasten. Jedoch konnte ein cytosolischer Calcium-Anstieg ca. 3min nach Blaulichtapplikation beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die durch ChR2 vermittelten Membranpotentialänderungen zu einer Aktivierung endogener, Calcium-permeabler Ionenkanäle führen könnte. Für die ChR2-L132C Mutante konnte allerdings in ersten Messungen ein direkter Calcium-Anstieg nach Lichtgabe beobachtet werden.

Transkriptionelle Änderungen aufgrund ChR2-basierter, elektrischer Signalmuster

In RNA-Seq-Analysen mit transient transformierten Tabakblättern konnte die Bedeutung der Signalsignatur elektrischer bzw. Calcium-basierter Signale verifiziert werden: Die Applikation zweier in ihrer Form gänzlich unterschiedlicher elektrischer Signalmuster lieferte ein signifikant unterschiedlich reguliertes Set an Genen, wobei einige wenige durch beide Behandlungen induziert werden konnten. Langanhaltende Depolarisationen regulierten deutlich mehr Gene und waren daher in ihrer Wirkung weitaus effektiver als kurze, repetitive Depolarisationen.

Die bioinformatische Analyse dieser Daten zeigte, dass die Nachahmung eines im Zuge der Pathogenantwort bekannten, langen Depolarisationspulses Gene der Flagellin-induzierten Signaltransduktion adressierte, während kurze, wiederkehrende Pulse mit gleichem Informationsgehalt diese nicht regulierten.

6 Summary

Functional expression of ChR2 in plants

The current work for the first time proves the functional expression of the light gated ChR2 derived from the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii* in higher plants.

In line with its function ChR2 was localized primarily at the plasma membrane in *Arabidopsis* protoplasts and Tobacco epidermal and mesophyll cells. However, overexpression as well as codon-usage often resulted in overloading of the endomembrane system such as Golgi and ER.

Electrophysiological recordings by means of the impalement technique proved ChR2 function in *Arabidopsis* seedlings as well as Tobacco mesophyll cells. Blue light induced depolarization, however, was more efficient in the Tobacco system.

In contrast to the WT protein all ChR2-mutants tested in this study were shown to be functional. Channel kinetics gained from *Xenopus* oocyte TEVC measurements correlated well with observed depolarization and repolarization kinetics of individual mutants. Highest depolarization levels were generated by the mutant C128A.

Using the Calcium reporter Aequorin, measurements provided no evidence for ChR2-C128A mediated Calcium-influx in *Arabidopsis* protoplasts. However, a delayed Calcium increase approximately 3min following blue light application suggests that ChR2 mediated membrane potential changes activated endogenous Calcium permeable ion channels. Preliminary experiments using the L132C mutant showed cytosolic Calcium elevation directly after light stimulation.

All ChR2 mutants tested in this study are suited for generating defined depolarization patterns in plants, whereas simulation of specific Calcium signatures seems possible with ChR2 variants based on the L123C mutation.

Transcriptional changes based on ChR2-mediated, electrical patterns

Transcriptional analyses of transiently transformed Tobacco leaves verified the importance of signature shape of electrical or Calcium-based signals in plants: Application of two blue light triggered depolarization patterns differing in shape revealed two sets of

significantly differentially regulated genes, although a small number of genes was regulated by both stimuli. Sustained depolarizations regulated more genes and thus turned out to be more effective than short, repetitive depolarizations.

Bioinformatic analyses of the data generated by RNA-Seq revealed the power of electrical signal application. Mimicking known electrical pathogen responses by applying a sustained depolarization pattern indeed addressed genes involved in flagellin signaling. In contrast, repetitive depolarization pulses regulated a completely different set of genes.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

Alarcon JJ, Malone M (1994) Substantial hydraulic signals are triggered by leaf-biting insects in tomato. *Journal of Experimental Botany* 45: 953-957

Albrecht C, Boutrot F, Segonzac C, Schwessinger B, Gimenez-Ibanez S, Chinchilla D, Rathjen JP, de Vries SC, Zipfel C (2012) Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 303-308

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

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

Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S, Berkowitz GA (2007) Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* 19: 1081-1095

Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411: 1053-1057

Arazi T, Kaplan B, Sunkar R, Fromm H (2000) Cyclic-nucleotide- and Ca²⁺/calmodulin-regulated channels in plants: targets for manipulating heavy-metal tolerance, and possible physiological roles. *Biochem Soc Trans* 28: 471-475

Asai N, Nishioka T, Takabayashi J, Furuichi T (2009) Plant volatiles regulate the activities of Ca²⁺-permeable channels and promote cytoplasmic calcium transients in Arabidopsis leaf cells. *Plant Signal Behav* 4: 294-300

Assmann SM, Simoncini L, Schroeder JI (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 318: 285-287

- Baekgaard L, Fuglsang AT, Palmgren MG (2005) Regulation of plant plasma membrane H⁺- and Ca²⁺-ATPases by terminal domains. *J Bioenerg Biomembr* 37: 369-374
- Balague C, Lin B, Alcon C, Flottes G, Malmstrom S, Kohler C, Neuhaus G, Pelletier G, Gaymard F, Roby D (2003) HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell* 15: 365-379
- Bamann C, Gueta R, Kleinlogel S, Nagel G, Bamberg E (2010) Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry* 49: 267-278
- Bamann C, Kirsch T, Nagel G, Bamberg E (2008) Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *J Mol Biol* 375: 686-694
- Batistic O, Kudla J (2004) Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* 219: 915-924
- Batistic O, Kudla J (2009) Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochim Biophys Acta* 1793: 985-992
- Batistic O, Kudla J (2011) Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim Biophys Acta*
- Batistic O, Rehers M, Akerman A, Schlucking K, Steinhorst L, Yalovsky S, Kudla J (2012) S-acylation-dependent association of the calcium sensor CBL2 with the vacuolar membrane is essential for proper abscisic acid responses. *Cell Res*
- Batistic O, Sorek N, Schultke S, Yalovsky S, Kudla J (2008) Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 1346-1362
- Batistic O, Waadt R, Steinhorst L, Held K, Kudla J (2010) CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant J* 61: 211-222
- Ben-Chaim Y, Chanda B, Dascal N, Bezanilla F, Parnas I, Parnas H (2006) Movement of 'gating charge' is coupled to ligand binding in a G-protein-coupled receptor. *Nature* 444: 106-109

- Benfey PN, Chua NH (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science* 250: 959-966
- Benjamini Y, Yekutieli D (2005) Quantitative trait Loci analysis using the false discovery rate. *Genetics* 171: 783-790
- Berndt A, Yizhar O, Gunaydin LA, Hegemann P, Deisseroth K (2009) Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci* 12: 229-234
- Bertl A, Blumwald E, Coronado R, Eisenberg R, Findlay G, Gradmann D, Hille B, Kohler K, Kolb HA, MacRobbie E, et al. (1992) Electrical measurements on endomembranes. *Science* 258: 873-874
- Beyhl D, Hortensteiner S, Martinoia E, Farmer EE, Fromm J, Marten I, Hedrich R (2009) The *fou2* mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium. *Plant J* 58: 715-723
- Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM, Pan ZH (2006) Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50: 23-33
- Blinks JR, Moore ED (1986) Practical aspects of the use of photoproteins as biological calcium indicators. *Soc Gen Physiol Ser* 40: 229-238
- Bonaventure G, Gfeller A, Rodriguez VM, Armand F, Farmer EE (2007) The *fou2* gain-of-function allele and the wild-type allele of Two Pore Channel 1 contribute to different extents or by different mechanisms to defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 48: 1775-1789
- Bos JI, Prince D, Pitino M, Maffei ME, Win J, Hogenhout SA (2010) A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (green peach aphid). *PLoS Genet* 6: e1001216
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng SH, Sheen J (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* 464: 418-422
- Boursiac Y, Lee SM, Romanowsky S, Blank R, Sladek C, Chung WS, Harper JF (2010) Disruption of the vacuolar calcium-ATPases in Arabidopsis results in the activation of a salicylic acid-dependent programmed cell death pathway. *Plant Physiol* 154: 1158-1171

- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8: 1263-1268
- Brautigam A, Gowik U (2010) What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. *Plant Biol (Stuttg)* 12: 831-841
- Bricchi I, Occhipinti A, Berrea CM, Zebelo SA, Brillada C, Verrillo F, De Castro C, Molinaro A, Faulkner C, Maule AJ, Maffei ME (2012) Separation of early and late responses to herbivory in Arabidopsis by changing plasmodesmal function. *Plant J*
- Bruegmann T, Malan D, Hesse M, Beiert T, Fuegemann CJ, Fleischmann BK, Sasse P (2010) Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nat Meth* 7: 897-900
- Caldwell JH, Herin GA, Nagel G, Bamberg E, Scheschonka A, Betz H (2008) Increases in intracellular calcium triggered by channelrhodopsin-2 potentiate the response of metabotropic glutamate receptor mGluR7. *J Biol Chem* 283: 24300-24307
- Campanoni P, Sutter JU, Davis CS, Littlejohn GR, Blatt MR (2007) A generalized method for transfecting root epidermis uncovers endosomal dynamics in Arabidopsis root hairs. *Plant J* 51: 322-330
- Cao J, Cole IB, Murch SJ (2006) Neurotransmitters, neuroregulators and neurotoxins in the life of plants. *Canadian Journal of Plant Science* 86: 1183-1888
- Carpaneto A, Ivashikina N, Levchenko V, Krol E, Jeworutzki E, Zhu JK, Hedrich R (2007) Cold transiently activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells. *Plant Physiol* 143: 487-494
- Catala R, Santos E, Alonso JM, Ecker JR, Martinez-Zapater JM, Salinas J (2003) Mutations in the Ca²⁺/H⁺ transporter CAX1 increase CBF/DREB1 expression and the cold-acclimation response in Arabidopsis. *Plant Cell* 15: 2940-2951
- Cerana M, Bonza MC, Harris R, Sanders D, De Michelis MI (2006) Abscisic acid stimulates the expression of two isoforms of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Biol (Stuttg)* 8: 572-578
- Cessna SG, Messerli MA, Robinson KR, Low PS (2001) Measurement of stress-induced Ca(2+) pulses in single aequorin-transformed tobacco cells. *Cell Calcium* 30: 151-156

- Chandran V, Stollar EJ, Lindorff-Larsen K, Harper JF, Chazin WJ, Dobson CM, Luisi BF, Christodoulou J (2006) Structure of the regulatory apparatus of a calcium-dependent protein kinase (CDPK): a novel mode of calmodulin-target recognition. *J Mol Biol* 357: 400-410
- Chen Z, Agnew JL, Cohen JD, He P, Shan L, Sheen J, Kunkel BN (2007) *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20131-20136
- Cheng NH, Hirschi KD (2003) Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing *Arabidopsis* protein that associates with CAX1. *J Biol Chem* 278: 6503-6509
- Cheng NH, Pittman JK, Shigaki T, Lachmansingh J, LeClere S, Lahner B, Salt DE, Hirschi KD (2005) Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol* 138: 2048-2060
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J (2002) Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* 129: 469-485
- Cheong YH, Pandey GK, Grant JJ, Batistic O, Li L, Kim BG, Lee SC, Kudla J, Luan S (2007) Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant J* 52: 223-239
- Cho D, Kim SA, Murata Y, Lee S, Jae SK, Nam HG, Kwak JM (2009) De-regulated expression of the plant glutamate receptor homolog AtGLR3.1 impairs long-term Ca²⁺-programmed stomatal closure. *Plant J* 58: 437-449
- Cho D, Villiers F, Kroniewicz L, Lee S, Seo YJ, Hirschi KD, Leonhardt N, Kwak JM (2012) Vacuolar CAX1 and CAX3 influence auxin transport in guard cells via regulation of apoplastic pH. *Plant Physiol*
- Choe S, Dilkes BP, Gregory BD, Ross AS, Yuan H, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE, Feldmann KA (1999) The *Arabidopsis* dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 119: 897-907

- Choi HI, Park HJ, Park JH, Kim S, Im MY, Seo HH, Kim YW, Hwang I, Kim SY (2005) Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol* 139: 1750-1761
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 735-743
- Clough SJ, Fengler KA, Yu IC, Lippok B, Smith RK, Jr., Bent AF (2000) The Arabidopsis *dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9323-9328
- Coca M, San Segundo B (2010) AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in Arabidopsis. *Plant J*
- Coe H, Michalak M (2009) Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No Focus: F96-F103
- Conn S, Gilliam M (2010) Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Ann Bot* 105: 1081-1102
- Conn SJ, Gilliam M, Athman A, Schreiber AW, Baumann U, Moller I, Cheng NH, Stancombe MA, Hirschi KD, Webb AA, Burton R, Kaiser BN, Tyerman SD, Leigh RA (2011) Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 240-257
- Cosgrove DJ (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326
- Cuéllar T, Pascaud F, Verdeil J-L, Torregrosa L, Adam-Blondon A-F, Thibaud J-B, Sentenac H, Gaillard I (2010) A grapevine Shaker inward K⁺ channel activated by the calcineurin B-like calcium sensor 1-protein kinase CIPK23 network is expressed in grape berries under drought stress conditions. *The Plant Journal* 61: 58-69
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133: 462-469
- Davenport R (2002) Glutamate receptors in plants. *Ann Bot* 90: 549-557
- Delhaize E, Gruber BD, Ryan PR (2007) The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Lett* 581: 2255-2262

- Denance N, Sanchez-Vallet A, Goffner D, Molina A (2013) Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front Plant Sci* 4
- Dennison KL, Spalding EP (2000) Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 124: 1511-1514
- Dodd AN, Gardner MJ, Hotta CT, Hubbard KE, Dalchau N, Love J, Assie JM, Robertson FC, Jakobsen MK, Goncalves J, Sanders D, Webb AA (2007) The Arabidopsis circadian clock incorporates a cADPR-based feedback loop. *Science* 318: 1789-1792
- Dodd AN, Jakobsen MK, Baker AJ, Telzerow A, Hou S-W, Laplaze L, Barrot L, Scott Poethig R, Haseloff J, Webb AAR (2006) Time of day modulates low-temperature Ca²⁺ signals in Arabidopsis. *The Plant Journal* 48: 962-973
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010) The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol* 61: 593-620
- Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ, Thomashow MF (2009) Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell* 21: 972-984
- Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392: 933-936
- Dovzhenko A, Bergen U, Koop HU (1998) Thin-alginate-layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts: Shoot formation in less than two weeks. *Protoplasma* 204: 114-118
- Du L, Ali GS, Simons KA, Hou J, Yang T, Reddy AS, Poovaiah BW (2009) Ca(2+)/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* 457: 1154-1158
- Dunn OJ (1961) MULTIPLE COMPARISONS AMONG MEANS. *J Am Stat Assoc* 56: 52
- Dutta R, Robinson KR (2004) Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts. *Plant Physiol* 135: 1398-1406
- Elmayan T, Vaucheret H (1996) Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *The Plant Journal* 9: 787-797

- Elzenga JTM, Prins HBA, Volkenburgh E (1995) Light-induced membrane potential changes of epidermal and mesophyll cells in growing leaves of *Pisum sativum*. *Planta* 197: 127-134
- Farmer PK, Choi JH (1999) Calcium and phospholipid activation of a recombinant calcium-dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (*Daucus carota* L.). *Biochim Biophys Acta* 1434: 6-17
- Fisher RA (1922) On the Interpretation of χ^2 from Contingency Tables, and the Calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 85: 87-94
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446
- Forterre Y, Skotheim JM, Dumais J, Mahadevan L (2005) How the Venus flytrap snaps. *Nature* 433: 421-425
- Foster KW, Saranak J, Derguini F, Zarrilli GR, Johnson R, Okabe M, Nakanishi K (1989) Activation of Chlamydomonas rhodopsin in vivo does not require isomerization of retinal. *Biochemistry* 28: 819-824
- Foster KW, Saranak J, Krane S, Johnson RL, Nakanishi K (2011) Evidence from Chlamydomonas on the photoactivation of rhodopsins without isomerization of their chromophore. *Chem Biol* 18: 733-742
- Foster KW, Saranak J, Patel N, Zarilli G, Okabe M, Kline T, Nakanishi K (1984) A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote Chlamydomonas. *Nature* 311: 756-759
- Frei dit Frey N, Mbengue M, Kwaaitaal M, Nitsch L, Altenbach D, Haweker H, Lozano-Duran R, Njo MF, Beeckman T, Huettel B, Borst JW, Panstruga R, Robatzek S (2012) Plasma membrane calcium ATPases are important components of receptor-mediated signaling in plant immune responses and development. *Plant Physiol* 159: 798-809
- Frietsch S, Wang YF, Sladek C, Poulsen LR, Romanowsky SM, Schroeder JI, Harper JF (2007) A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14531-14536

- Friso G, Giacomelli L, Ytterberg AJ, Peltier JB, Rudella A, Sun Q, Wijk KJ (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* 16: 478-499
- Fromm J, Lautner S (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ* 30: 249-257
- Galon Y, Aloni R, Nachmias D, Snir O, Feldmesser E, Scrase-Field S, Boyce JM, Bouche N, Knight MR, Fromm H (2010) Calmodulin-binding transcription activator 1 mediates auxin signaling and responds to stresses in *Arabidopsis*. *Planta* 232: 165-178
- Galon Y, Nave R, Boyce JM, Nachmias D, Knight MR, Fromm H (2008) Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 582: 943-948
- Gao F, Han X, Wu J, Zheng S, Shang Z, Sun D, Zhou R, Li B (2012) A heat-activated calcium-permeable channel – *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated ion channel 6 – is involved in heat shock responses. *The Plant Journal* 70: 1056-1069
- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* 4: ra32
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KA, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8023-8028
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21425-21430
- George L, Romanowsky SM, Harper JF, Sharrock RA (2008) The ACA10 Ca²⁺-ATPase regulates adult vegetative development and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146: 716-728

- Gleason C, Chaudhuri S, Yang T, Munoz A, Poovaiah BW, Oldroyd GE (2006) Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 441: 1149-1152
- Gobert A, Park G, Amtmann A, Sanders D, Maathuis FJ (2006) Arabidopsis thaliana cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *J Exp Bot* 57: 791-800
- Goldman DE (1943) Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. *J Gen Physiol* 27: 37-60
- Gopalan S (2008) Reversal of an immunity associated plant cell death program by the growth regulator auxin. *BMC Res Notes* 1: 126
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S (2010) Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329: 571-575
- Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, Goshen I, Thompson KR, Deisseroth K (2010) Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141: 154-165
- Grams TEE, Lautner S, Felle HH, Matyssek R, Fromm J (2009) Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. *Plant, Cell & Environment* 32: 319-326
- Grefen C, Donald N, Hashimoto K, Kudla J, Schumacher K, Blatt MR (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J* 64: 355-365
- Gross EL, Hess SC (1974) Correlation between calcium ion binding to chloroplast membranes and divalent cation-induced structural changes and changes in chlorophyll a fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 339: 334-346
- Hamilton CM, Frary A, Lewis C, Tanksley SD (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9975-9979

- Hamilton DW, Hills A, Kohler B, Blatt MR (2000) Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4967-4972
- Harada A, Shimazaki K-i (2009) Measurement of Changes in Cytosolic Ca²⁺ in Arabidopsis Guard Cells and Mesophyll Cells in Response to Blue Light. *Plant and Cell Physiology* 50: 360-373
- Harper JF, Breton G, Harmon A (2004) Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. *Annu Rev Plant Biol* 55: 263-288
- Harper JF, Hong B, Hwang I, Guo HQ, Stoddard R, Huang JF, Palmgren MG, Sze H (1998) A novel calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-terminal autoinhibitory domain. *J Biol Chem* 273: 1099-1106
- Hashimoto K, Kudla J (2011) Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie* 93: 2054-2059
- Hedrich R (2012) Ion Channels in Plants. *Physiological Reviews* 92: 1777-1811
- Hedrich R, Busch H, Raschke K (1990) Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J* 9: 3889-3892
- Hedrich R, Kurkdjian A (1988) Characterization of an anion-permeable channel from sugar beet vacuoles: effect of inhibitors. *EMBO J* 7: 3661-3666
- Held K, Pascaud F, Eckert C, Gajdanowicz P, Hashimoto K, Corratge-Faillie C, Offenborn JN, Lacombe B, Dreyer I, Thibaud J-B, Kudla J (2011) Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell Res* 21: 1116-1130
- Hepler PK, Vidali L, Cheung AY (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 159-187
- Hetherington AM, Brownlee C (2004) The generation of Ca(2+) signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* 55: 401-427
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138: 1184-1194

- Hobo T, Asada M, Kowyama Y, Hattori T (1999) ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant J* 19: 679-689
- Holland EM, Braun FJ, Nonnengasser C, Harz H, Hegemann P (1996) The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. I. Kinetics and influence of divalent ions. *Biophys J* 70: 924-931
- Horn R (2005) Electrifying phosphatases. *Sci STKE* 25
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* 132: 666-680
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008: 420747
- Hu T, Hu Z, Qu X, Ren Y, Chen G (2009) [Advances in plant lipoxygenases research]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 25: 1-9
- Huang C, Ding S, Zhang H, Du H, An L (2011) CIPK7 is involved in cold response by interacting with CBL1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 181: 57-64
- Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Chen Z (2010) Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol* 153: 1526-1538
- Hwang I, Sze H, Harper JF (2000) A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6224-6229
- Inouye S, Noguchi M, Sakaki Y, Takagi Y, Miyata T, Iwanaga S, Tsuji FI (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 3154-3158
- Ishizuka T, Kakuda M, Araki R, Yawo H (2006) Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci Res* 54: 85-94

- Ivashuta S, Liu J, Lohar DP, Haridas S, Bucciarelli B, VandenBosch KA, Vance CP, Harrison MJ, Gantt JS (2005) RNA interference identifies a calcium-dependent protein kinase involved in *Medicago truncatula* root development. *Plant Cell* 17: 2911-2921
- Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4800-4805
- Jeworutzki E, Roelfsema MR, Anschutz U, Krol E, Elzenga JT, Felix G, Boller T, Hedrich R, Becker D (2010) Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant J* 62: 367-378
- Johnson CH, Knight MR, Kondo T, Masson P, Sedbrook J, Haley A, Trewavas A (1995) Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* 269: 1863-1865
- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T (2006) The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18: 3289-3302
- Kang J, Turano FJ (2003) The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6872-6877
- Kaplan B, Davydov O, Knight H, Galon Y, Knight MR, Fluhr R, Fromm H (2006) Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca²⁺ transients reveal ABRE-related sequences as Ca²⁺-responsive cis elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 2733-2748
- Kato HE, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C, Nishizawa T, Hirata K, Ito J, Aita Y, Tsukazaki T, Hayashi S, Hegemann P, Maturana AD, Ishitani R, Deisseroth K, Nureki O (2012) Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*
- Kazan K, Manners JM (2009) Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 14: 373-382

- Keinath NF, Kierszniowska S, Lorek J, Bourdais G, Kessler SA, Shimosato-Asano H, Grossniklaus U, Schulze WX, Robatzek S, Panstruga R (2010) PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. *J Biol Chem* 285: 39140-39149
- Keller BU, Hedrich R, Raschke K (1989) Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature* 341: 450-453
- Kent WJ (2002) BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 12: 656-664
- Kim BG, Waadt R, Cheong YH, Pandey GK, Dominguez-Solis JR, Schultke S, Lee SC, Kudla J, Luan S (2007) The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in Arabidopsis. *Plant J* 52: 473-484
- Kim GT, Fujioka S, Kozuka T, Tax FE, Takatsuto S, Yoshida S, Tsukaya H (2005) CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 41: 710-721
- Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah JW, Hahm KS, Park Y (2009) Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *Int J Mol Sci* 10: 2860-2872
- Kleinlogel S, Feldbauer K, Dempski RE, Fotis H, Wood PG, Bamann C, Bamberg E (2011a) Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci* 14: 513-518
- Kleinlogel S, Terpitz U, Legrum B, Gokbuget D, Boyden ES, Bamann C, Wood PG, Bamberg E (2011b) A gene-fusion strategy for stoichiometric and co-localized expression of light-gated membrane proteins. *Nat Methods* 8: 1083-1088
- Klinghammer M, Tenhaken R (2007) Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in Arabidopsis, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls. *J Exp Bot* 58: 3609-3621
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352: 524-526
- Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N, Yoshioka H (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* 19: 1065-1080

- Kolb HA, Marten I, Hedrich R (1995) Hodgkin-Huxley analysis of a GCAC1 anion channel in the plasma membrane of guard cells. *J Membr Biol* 146: 273-282
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GE (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9823-9828
- Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, Boller T, Felix G, Kemmerling B, Postel S, Arents M, Jeworutzki E, Al-Rasheid KA, Becker D, Hedrich R (2010) Perception of the Arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *J Biol Chem* 285: 13471-13479
- Kudla J, Batistic O, Hashimoto K (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22: 541-563
- Kulma A, Villadsen D, Campbell DG, Meek SE, Harthill JE, Nielsen TH, MacKintosh C (2004) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Plant J* 37: 654-667
- Kurkdjian A, Bouteau F, Pennarun AM, Convert M, Cornel D, Rona JP, Bousquet U (2000) Ion currents involved in early Nod factor response in *Medicago sativa* root hairs: a discontinuous single-electrode voltage-clamp study. *Plant J* 22: 9-17
- Kurusu T, Hamada J, Hamada H, Hanamata S, Kuchitsu K (2010) Roles of calcineurin B-like protein-interacting protein kinases in innate immunity in rice. *Plant Signaling & Behavior* 5: 1045-1047
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO J* 22: 2623-2633
- Lacombe B, Becker D, Hedrich R, DeSalle R, Hollmann M, Kwak JM, Schroeder JI, Le Novere N, Nam HG, Spalding EP, Tester M, Turano FJ, Chiu J, Coruzzi G (2001) The identity of plant glutamate receptors. *Science* 292: 1486-1487
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lecourieux D, Lamotte O, Bourque S, Wendehenne D, Mazars C, Ranjeva R, Pugin A (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* 38: 527-538

- Lee SC, Lan WZ, Kim BG, Li L, Cheong YH, Pandey GK, Lu G, Buchanan BB, Luan S (2007) A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15959-15964
- Lehmann P, Nöthen J, Schmidt von Braun S, Bohnsack MT, Mirus O, Schleiff E (2011) Transitions of gene expression induced by short-term blue light. *Plant Biology* 13: 349-361
- Leng Q, Mercier RW, Yao W, Berkowitz GA (1999) Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol* 121: 753-761
- Levchenko V, Guinot DR, Klein M, Roelfsema MR, Hedrich R, Dietrich P (2008) Stringent control of cytoplasmic Ca²⁺ in guard cells of intact plants compared to their counterparts in epidermal strips or guard cell protoplasts. *Protoplasma* 233: 61-72
- Li D, Herault K, Isacoff EY, Oheim M, Ropert N (2012) Optogenetic activation of LiGluR-expressing astrocytes evokes anion channel-mediated glutamate release. *J Physiol* 590: 855-873
- Li L, Kim BG, Cheong YH, Pandey GK, Luan S (2006) A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁽⁺⁾ channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 12625-12630
- Li W, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien RY (1998) Cell-permeant caged InsP₃ ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature* 392: 936-941
- Li X, Chanroj S, Wu Z, Romanowsky SM, Harper JF, Sze H (2008) A distinct endosomal Ca²⁺/Mn²⁺ pump affects root growth through the secretory process. *Plant Physiol* 147: 1675-1689
- Li X, Gutierrez DV, Hanson MG, Han J, Mark MD, Chiel H, Hegemann P, Landmesser LT, Herlitze S (2005) Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17816-17821
- Lin JY (2011) A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp Physiol* 96: 19-25

- Lin JY, Lin MZ, Steinbach P, Tsien RY (2009) Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J* 96: 1803-1814
- Linder B, Raschke K (1992) A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Lett* 313: 27-30
- Liu YC, Altman A (1998) Cbl: complex formation and functional implications. *Cell Signal* 10: 377-385
- Liu ZM, Liu ZZ, Bai QW, Fang RX (2002) [Agroinfiltration, a useful technique in plant molecular biology research]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 18: 411-414
- Logan DC, Knight MR (2003) Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiol* 133: 21-24
- Lopez-Gomez M, Sandal N, Stougaard J, Boller T (2012) Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* 63: 393-401
- Love J, Dodd AN, Webb AA (2004) Circadian and diurnal calcium oscillations encode photoperiodic information in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 956-966
- Lu D, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan L (2011) Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science* 332: 1439-1442
- Ma SY, Wu WH (2007) AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses. *Plant Mol Biol* 65: 511-518
- Ma W, Berkowitz GA (2011) Ca²⁺ conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytol* 190: 566-572
- Maffei M, Bossi S, Spiteller D, Mithöfer A, Boland W (2004) Effects of Feeding *Spodoptera littoralis* on Lima Bean Leaves. I. Membrane Potentials, Intracellular Calcium Variations, Oral Secretions, and Regurgitate Components. *Plant Physiology* 134: 1752-1762
- Mahaut-Smith MP, Martinez-Pinna J, Gurung IS (2008) A role for membrane potential in regulating GPCRs? *Trends in Pharmacological Sciences* 29: 421-429

- Marion J, Bach L, Bellec Y, Meyer C, Gissot L, Faure JD (2008) Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of Arabidopsis seedlings. *Plant J* 56: 169-179
- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Gueriot ML (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol* 126: 1646-1667
- McAinsh MR, Pittman JK (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytol* 181: 275-294
- McCormack E, Tsai YC, Braam J (2005) Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci* 10: 383-389
- McMichael RW, Jr., Kochansky J, Klein RR, Huber SC (1995) Characterization of the substrate specificity of sucrose-phosphate synthase protein kinase. *Arch Biochem Biophys* 321: 71-75
- Mehlmer N, Wurzinger B, Stael S, Hofmann-Rodrigues D, Csaszar E, Pfister B, Bayer R, Teige M (2010) The Ca²⁺-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in Arabidopsis. *Plant J*
- Mei H, Cheng NH, Zhao J, Park S, Escareno RA, Pittman JK, Hirschi KD (2009) Root development under metal stress in Arabidopsis thaliana requires the H⁺/cation antiporter CAX4. *New Phytol* 183: 95-105
- Mei H, Zhao J, Pittman JK, Lachmansingh J, Park S, Hirschi KD (2007) In planta regulation of the Arabidopsis Ca²⁺/H⁺ antiporter CAX1. *Journal of Experimental Botany* 58: 3419-3427
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KA, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R (2010) AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *Plant J* 63: 1054-1062
- Meyerhoff O, Muller K, Roelfsema MR, Latz A, Lacombe B, Hedrich R, Dietrich P, Becker D (2005) AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta* 222: 418-427

- Michard E, Alves F, Feijo JA (2009) The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm. *Int J Dev Biol* 53: 1609-1622
- Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, Gilliam M, Liu L-H, Obermeyer G, Feijó JA (2011) Glutamate Receptor-Like Genes Form Ca²⁺ Channels in Pollen Tubes and Are Regulated by Pistil d-Serine. *Science* 332: 434-437
- Miedema H, Demidchik V, Very AA, Bothwell JH, Brownlee C, Davies JM (2008) Two voltage-dependent calcium channels co-exist in the apical plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *New Phytol* 179: 378-385
- Mills RF, Doherty ML, Lopez-Marques RL, Weimar T, Dupree P, Palmgren MG, Pittman JK, Williams LE (2008) ECA3, a Golgi-localized P2A-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146: 116-128
- Mishiba K, Nishihara M, Nakatsuka T, Abe Y, Hirano H, Yokoi T, Kikuchi A, Yamamura S (2005) Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. *Plant J* 44: 541-556
- Miwa H, Sun J, Oldroyd GE, Downie JA (2006) Analysis of calcium spiking using aameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J* 48: 883-894
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* 279: 36277-36286
- Monshausen GB, Messerli MA, Gilroy S (2008) Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca²⁺ follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 147: 1690-1698
- Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang YF, Andreoli S, Tiriack H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, Kwak JM, Schroeder JI (2006) CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* 4: e327
- Muir SR, Sanders D (1997) Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiol* 114: 1511-1521

- Muller M, Bamann C, Bamberg E, Kuhlbrandt W (2011) Projection structure of channelrhodopsin-2 at 6 Å resolution by electron crystallography. *J Mol Biol* 414: 86-95
- Munemasa S, Hossain MA, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y (2011) The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. *Plant Physiol* 155: 553-561
- Murata Y, Okamura Y (2007) Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in *Xenopus* oocytes coexpressing sensors of PIP₂. *J Physiol* 583: 875-889
- Myers C, Romanowsky SM, Barron YD, Garg S, Azuse CL, Curran A, Davis RM, Hatton J, Harmon AC, Harper JF (2009) Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes. *The Plant Journal* 59: 528-539
- Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A (2005a) Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* 15: 2279-2284
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296: 2395-2398
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13940-13945
- Nagel G, Szellas T, Kateriya S, Adeishvili N, Hegemann P, Bamberg E (2005b) Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochem Soc Trans* 33: 863-866
- Nakahara KS, Masuta C, Yamada S, Shimura H, Kashihara Y, Wada TS, Meguro A, Goto K, Tadamura K, Sueda K, Sekiguchi T, Shao J, Itchoda N, Matsumura T, Igarashi M, Ito K, Carthew RW, Uyeda I (2012) Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10113-10118
- Naseem M, Philippi N, Hussain A, Wangorsch G, Ahmed N, Dandekar T (2012) Integrated systems view on networking by hormones in Arabidopsis immunity reveals multiple crosstalk for cytokinin. *Plant Cell* 24: 1793-1814

- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436-439
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JD (2004a) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* 135: 1113-1128
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JDG (2004b) The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* 135: 1113-1128
- Navazio L, Mariani P, Sanders D (2001) Mobilization of Ca²⁺ by cyclic ADP-ribose from the endoplasmic reticulum of cauliflower florets. *Plant Physiol* 125: 2129-2138
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483-486
- Nieves-Cordones M, Miller AJ, Aleman F, Martinez V, Rubio F (2008) A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Mol Biol* 68: 521-532
- Nomura H, Komori T, Kobori M, Nakahira Y, Shiina T (2008) Evidence for chloroplast control of external Ca²⁺-induced cytosolic Ca²⁺ transients and stomatal closure. *Plant J* 53: 988-998
- Norholm MH (2010) A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. *BMC Biotechnol* 10: 21
- Nour-Eldin HH, Hansen BG, Norholm MH, Jensen JK, Halkier BA (2006) Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res* 34: e122
- Oyarce P, Gurovich L (2011) Evidence for the transmission of information through electric potentials in injured avocado trees. *J Plant Physiol* 168: 103-108
- Pandey GK, Cheong YH, Kim KN, Grant JJ, Li L, Hung W, D'Angelo C, Weinl S, Kudla J, Luan S (2004) The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 1912-1924

- Pandey GK, Grant JJ, Cheong YH, Kim BG, Li le G, Luan S (2008) Calcineurin-B-like protein CBL9 interacts with target kinase CIPK3 in the regulation of ABA response in seed germination. *Mol Plant* 1: 238-248
- Pandey S, Assmann SM (2004) The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* 16: 1616-1632
- Patil S, Takezawa D, Poovaiah BW (1995) Chimeric plant calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4897-4901
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731-734
- Peiter E, Maathuis FJ, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D (2005) The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434: 404-408
- Pena-Cortes H, Fisahn J, Willmitzer L (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4106-4113
- Pierson ES, Miller DD, Callaham DA, van Aken J, Hackett G, Hepler PK (1996) Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev Biol* 174: 160-173
- Pottosin I, Wherrett T, Shabala S (2009) SV channels dominate the vacuolar Ca²⁺ release during intracellular signaling. *FEBS Lett* 583: 921-926
- Prado-Cabrero A, Scherzinger D, Avalos J, Al-Babili S (2007) Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell* 6: 650-657
- Prasher D, McCann RO, Cormier MJ (1985) Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 1259-1268
- Ranf S, Wunnenberg P, Lee J, Becker D, Dunkel M, Hedrich R, Scheel D, Dietrich P (2008) Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca²⁺ signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J* 53: 287-299

- Rathore KS, Cork RJ, Robinson KR (1991) A cytoplasmic gradient of Ca²⁺ is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Developmental Biology* 148: 612-619
- Reddy AS, Ali GS, Celesnik H, Day IS (2011) Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell* 23: 2010-2032
- Robert-Seilaniantz A, MacLean D, Jikumaru Y, Hill L, Yamaguchi S, Kamiya Y, Jones JD (2011) The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *Plant J* 67: 218-231
- Roberts SK (2006) Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytol* 169: 647-666
- Roelfsema MRG, Steinmeyer R, Staal M, Hedrich R (2001) Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *The Plant Journal* 26: 1-13
- Sagi G, Katz A, Guenoune-Gelbart D, Epel BL (2005) Class 1 reversibly glycosylated polypeptides are plasmodesmal-associated proteins delivered to plasmodesmata via the golgi apparatus. *Plant Cell* 17: 1788-1800
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K, Izui K (2000) Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J* 23: 319-327
- Sanchez JP, Duque P, Chua NH (2004) ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis. *Plant J* 38: 381-395
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14 Suppl: S401-417
- Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94: 441-448
- Sato A, Sato Y, Fukao Y, Fujiwara M, Umezawa T, Shinozaki K, Hibi T, Taniguchi M, Miyake H, Goto DB, Uozumi N (2009) Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J* 424: 439-448
- Schiott M, Romanowsky SM, Baekgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG, Harper JF (2004) A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9502-9507

- Schmidt C, Schroeder JI (1994) Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma Membrane of Guard Cells (Large Nitrate Permeability). *Plant Physiol* 106: 383-391
- Schroeder JI, Hagiwara S (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 338: 427-430
- Schroeder JI, Hedrich R, Fernandez JM (1984) Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 312: 361-362
- Schroeder JI, Keller BU (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5025-5029
- Schulte A, Lorenzen I, Bottcher M, Plieth C (2006) A novel fluorescent pH probe for expression in plants. *Plant Methods* 2: 7
- Shang Z-l, Ma L-g, Zhang H-l, He R-r, Wang X-c, Cui S-j, Sun D-y (2005a) Ca²⁺ Influx into Lily Pollen Grains Through a Hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable Channel Which Can be Regulated by Extracellular CaM. *Plant and Cell Physiology* 46: 598-608
- Shang ZL, Ma LG, Zhang HL, He RR, Wang XC, Cui SJ, Sun DY (2005b) Ca²⁺ influx into lily pollen grains through a hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channel which can be regulated by extracellular CaM. *Plant Cell Physiol* 46: 598-608
- Shaw SL, Long SR (2003) Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol* 131: 976-984
- Shendure J, Ji H (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26: 1135-1145
- Shi J, Kim KN, Ritz O, Albrecht V, Gupta R, Harter K, Luan S, Kudla J (1999) Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2393-2405
- Shigaki T, Hirschi KD (2006) Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H⁺ exchangers in plants. *Plant Biol (Stuttg)* 8: 419-429
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239

- Short EF, North KA, Roberts MR, Hetherington AM, Shirras AD, McAinsh MR (2012) A stress-specific calcium signature regulating an ozone-responsive gene expression network in Arabidopsis. *Plant J*
- Sibaoka T (1991) Rapid plant movements triggered by action potentials. *Journal of Plant Research* 104: 73-95
- Simon SA, Zhai J, Nandety RS, McCormick KP, Zeng J, Mejia D, Meyers BC (2009) Short-read sequencing technologies for transcriptional analyses. *Annu Rev Plant Biol* 60: 305-333
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39
- Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8689-8694
- Sondergaard TE, Schulz A, Palmgren MG (2004) Energization of transport processes in plants. roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 136: 2475-2482
- Stael S, Wurzinger B, Mair A, Mehlmer N, Vothknecht UC, Teige M (2012) Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *J Exp Bot* 63: 1525-1542
- Stange A, Hedrich R, Roelfsema MR (2010) Ca²⁺-dependent activation of guard cell anion channels, triggered by hyperpolarization, is promoted by prolonged depolarization. *Plant J* 62: 265-276
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17: 616-627
- Staswick PE, Tiryaki I, Rowe ML (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* 14: 1405-1415
- Stegmann M, Anderson RG, Ichimura K, Pecenkova T, Reuter P, Zarsky V, McDowell JM, Shirasu K, Trujillo M (2012) The ubiquitin ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 4703-4716

- Stoelzle S, Kagawa T, Wada M, Hedrich R, Dietrich P (2003) Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1456-1461
- Subbaiah CC, Bush DS, Sachs MM (1994) Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells. *Plant Cell* 6: 1747-1762
- Subbaiah CC, Bush DS, Sachs MM (1998) Mitochondrial contribution to the anoxic Ca²⁺ signal in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiol* 118: 759-771
- Sun D-y, Bian Y-q, Zhao B-h, Zhao L-Y, Yu X-M, Shengjun D (1995) The Effects of Extracellular Calmodulin on Cell Wall Regeneration of Protoplasts and Cell Division. *Plant and Cell Physiology* 36: 133-138
- Tadamura K, Nakahara KS, Masuta C, Uyeda I (2012) Wound-induced rgs-CaM gets ready for counterresponse to an early stage of viral infection. *Plant Signal Behav* 7: 12
- Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, Dolan L (2008) Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 319: 1241-1244
- Thilmony R, Underwood W, He SY (2006) Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J* 46: 34-53
- Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. *Planta* 216: 193-202
- Thuleau P, Ward JM, Ranjeva R, Schroeder JI (1994) Voltage-dependent calcium-permeable channels in the plasma membrane of a higher plant cell. *EMBO J* 13: 2970-2975
- Tripathi V, Parasuraman B, Laxmi A, Chattopadhyay D (2009) CIPK6, a CBL-interacting protein kinase is required for development and salt tolerance in plants. *The Plant Journal* 58: 778-790
- Tuteja N (2009) Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav* 4: 942-947
- Ullrich S, Nagel G (2012) Degradation of channelopsin-2 in the absence of retinal and degradation resistance in certain mutants. *Biol Chem* 1: 2012-0256

- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11632-11637
- Urquhart W, Gunawardena AH, Moeder W, Ali R, Berkowitz GA, Yoshioka K (2007) The chimeric cyclic nucleotide-gated ion channel ATCNGC11/12 constitutively induces programmed cell death in a Ca²⁺ dependent manner. *Plant Mol Biol* 65: 747-761
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452: 487-491
- Vahisalu T, Puzorjova I, Brosche M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang YS, Lindgren O, Salojarvi J, Loog M, Kangasjarvi J, Kollist H (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* 62: 442-453
- Vainonen JP, Sakuragi Y, Stael S, Tikkanen M, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Aro E, Suorsa M, Scheller HV, Vener AV, Aro EM (2008) Light regulation of CaS, a novel phosphoprotein in the thylakoid membrane of Arabidopsis thaliana. *FEBS J* 275: 1767-1777
- Very AA, Davies JM (2000) Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of Arabidopsis root hairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9801-9806
- Vian A, Henry-Vian C, Schantz R, Ledoigt G, Frachisse J-M, Desbiez M-O, Julien J-L (1996) Is membrane potential involved in calmodulin gene expression after external stimulation in plants? *FEBS Letters* 380: 93-96
- Vincill ED, Bieck AM, Spalding EP (2012) Ca²⁺ conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant Physiol* 159: 40-46
- Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14147-14152
- Volkov AG, Adesina T, Jovanov E (2007) Closing of venus flytrap by electrical stimulation of motor cells. *Plant Signal Behav* 2: 139-145

- Volkov AG, Foster JC, Ashby TA, Walker RK, Johnson JA, Markin VS (2010) Mimosa pudica: Electrical and mechanical stimulation of plant movements. *Plant Cell Environ* 33: 163-173
- Volkov AG, Haack RA (1995) Insect-induced bioelectrochemical signals in potato plants. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 37: 55-60
- Waadt R, Schmidt LK, Lohse M, Hashimoto K, Bock R, Kudla J (2008) Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *Plant J* 56: 505-516
- Walker NA, Sanders D, Maathuis FJ (1996) High-affinity potassium uptake in plants. *Science* 273: 977-979
- Wang Y, Zhu Y, Ling Y, Zhang H, Liu P, Baluska F, Samaj J, Lin J, Wang Q (2010) Disruption of actin filaments induces mitochondrial Ca²⁺ release to the cytoplasm and [Ca²⁺]_c changes in Arabidopsis root hairs. *BMC Plant Biol* 10: 53
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10: 57-63
- Ward JM, Maser P, Schroeder JI (2009) Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Annu Rev Physiol* 71: 59-82
- Ward JM, Pei ZM, Schroeder JI (1995) Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *Plant Cell* 7: 833-844
- Ward JM, Schroeder JI (1994) Calcium-Activated K⁺ Channels and Calcium-Induced Calcium Release by Slow Vacuolar Ion Channels in Guard Cell Vacuoles Implicated in the Control of Stomatal Closure. *Plant Cell* 6: 669-683
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 100: 681-697
- Webb AAR, McAinsh MR, Taylor JE, Hetherington AM (1996) Calcium Ions as Intracellular Second Messengers in Higher Plants. In *Advances in Botanical Research*, Callow JA (ed), Vol. Volume 22, pp 45-96. Academic Press
- Weinl S, Held K, Schlucking K, Steinhorst L, Kuhlert S, Hippler M, Kudla J (2008) A plastid protein crucial for Ca²⁺-regulated stomatal responses. *New Phytol* 179: 675-686

- Whalley HJ, Sargeant AW, Steele JF, Lacoere T, Lamb R, Saunders NJ, Knight H, Knight MR (2011) Transcriptomic analysis reveals calcium regulation of specific promoter motifs in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 4079-4095
- Wheeler GL, Brownlee C (2008) Ca²⁺ signalling in plants and green algae--changing channels. *Trends Plant Sci* 13: 506-514
- White PJ, Broadley MR (2003) Calcium in plants. *Ann Bot* 92: 487-511
- Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, O'Donnell PJ, Bowles DJ (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360: 62-65
- Willmann R, Lajunen HM, Erbs G, Newman MA, Kolb D, Tsuda K, Katagiri F, Fliegmann J, Bono JJ, Cullimore JV, Jehle AK, Gotz F, Kulik A, Molinaro A, Lipka V, Gust AA, Nurnberger T (2011) Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19824-19829
- Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 118: 197-203
- Wu Y, Kuzma J, Marechal E, Graeff R, Lee HC, Foster R, Chua NH (1997) Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278: 2126-2130
- Wu Z, Liang F, Hong B, Young JC, Sussman MR, Harper JF, Sze H (2002) An endoplasmic reticulum-bound Ca(2+)/Mn(2+) pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn(2+) stress. *Plant Physiol* 130: 128-137
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14 Suppl: S165-183
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* 125: 1347-1360
- Xu W, Campbell P, Vargheese AK, Braam J (1996) The Arabidopsis XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression. *Plant J* 9: 879-889
- Yamaguchi T, Aharon GS, Sottosanto JB, Blumwald E (2005) Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺- and pH-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16107-16112

- Ye X, Al-Babili S, Klott A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305
- Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K (2011) Optogenetics in neural systems. *Neuron* 71: 9-34
- Yoo JH, Park CY, Kim JC, Heo WD, Cheong MS, Park HC, Kim MC, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee JH, Kim HS, Lee SM, Yoon HW, Lim CO, Yun DJ, Lee SY, Chung WS, Cho MJ (2005) Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in arabidopsis. *J Biol Chem* 280: 3697-3706
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2: 1565-1572
- Yoon GM, Dowd PE, Gilroy S, McCubbin AG (2006) Calcium-dependent protein kinase isoforms in Petunia have distinct functions in pollen tube growth, including regulating polarity. *Plant Cell* 18: 867-878
- Yoshioka Y, Yamamuro A, Maeda S (2006) Nitric oxide/cGMP signaling pathway protects RAW264 cells against nitric oxide-induced apoptosis by inhibiting the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Sci* 101: 126-134
- Young JJ, Mehta S, Israelsson M, Godoski J, Grill E, Schroeder JI (2006) CO₂ signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7506-7511
- Zebelo SA, Matsui K, Ozawa R, Maffei ME (2012) Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (*Solanum lycopersicon*) plant-to-plant communication. *Plant Sci* 196: 93-100
- Zhang F, Wang LP, Boyden ES, Deisseroth K (2006) Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods* 3: 785-792
- Zhang Z, Li Q, Li Z, Staswick PE, Wang M, Zhu Y, He Z (2007) Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during Arabidopsis-Pseudomonas syringae interaction. *Plant Physiol* 145: 450-464

Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye ZH (2008) A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2763-2782

Zhou C, Yang Y, Jong AY (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8: 172-173

Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, Wang XF, Wu FQ, Xu YH, Zhang XY, Zhang DP (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 3019-3036

Zimmermann MR, Maischak H, Mithofer A, Boland W, Felle HH (2009) System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiol* 149: 1593-1600

Zipfel PF (2009) Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. *Immunol Lett* 126: 1-7

Zuo J, Niu QW, Chua NH (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* 24: 265-273

7.2 Chemikalienverzeichnis

Tab 7-1: Chemikalienverzeichnis

Chemikalie	Hersteller	Standort
1-NAA	Sigma-Aldrich	Hamburg
2,4 D	Sigma-Aldrich	Hamburg
6-BAP	Sigma-Aldrich	Hamburg
Aceton	Applichem	Darmstadt
Acetosyringon	Sigma-Aldrich	Hamburg
Agar-Agar Kobel	Roth	Karlsruhe
Agarose Biozyme LE	Biozym	Hessisch Oldendorf
AgNO ₃	Merck	Darmstadt
Ampicillin	Applichem	Darmstadt
Basta	Bayer CropScience	Monheim
Brilliant Blue Coomassie R250	Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Hamburg
BSA	Applichem	Darmstadt
BTP	Fluka	München
CaCl ₂	Applichem	Darmstadt
Cefotaxim	Duchefa	Haarlem, Niederlande
Cellulase R10	Yakult	Japan
Coelenterazin	Synchem	Felsberg
DMSO	Roth	Karlsruhe
DTT	Biomol	Hamburg
EDTA	Merck	Darmstadt
Essigsäure	Fluka	München
EtOH	Roth	Karlsruhe
FeSO ₄ x7H ₂ O	Merck	Darmstadt
Formaldehyd	Sigma-Aldrich	Hamburg
Formamid	Fluka	München
Gentamycin	Sigma-Aldrich	Hamburg
Glucose	Sigma-Aldrich	Hamburg
Glycerin	Merck	Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich	Hamburg
HCl	Merck	Darmstadt

Hefeextrakt	Applichem	Darmstadt
Hygromycin B	Sigma-Aldrich	Hamburg
Isopropanol	Applichem	Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich	Hamburg
KCl	Applichem	Darmstadt
KH₂PO₄	Merck	Darmstadt
KH₂PO₄	Merck	Darmstadt
KOH	Merck	Darmstadt
Macerozym	Yakult	Japan
Mannitol	Sigma-Aldrich	Hamburg
MeOH	Merck	Darmstadt
MES	Applichem	Darmstadt
MgCl₂	Applichem	Darmstadt
MgSO₄	Sigma-Aldrich	Hamburg
Milchpulver	Applichem	Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich	Hamburg
MS-Medium	Duchefa	Haarlem, Niederlande
Myo-Inositol	Sigma-Aldrich	Hamburg
Na₂CO₃	Merck	Darmstadt
Na₂HPO₄	Merck	Darmstadt
Na₂S₂O₃·5H₂O	Merck	Darmstadt
NaCl	Applichem	Darmstadt
NaOH	Merck	Darmstadt
Natriumhypochlorid	Sigma-Aldrich	Hamburg
Östrogen	Sigma-Aldrich	Hamburg
PEG (Polyethylenglycol)	Sigma-Aldrich	Hamburg
Phytigel	Sigma-Aldrich	Hamburg
Proteinase Inhibitor	Roche	Basel, Schweiz
PVPP	Sigma-Aldrich	Hamburg
Retinal	Sigma-Aldrich	Hamburg
Rifampicin	Sigma-Aldrich	Hamburg
RNase	Applichem	Darmstadt
Saccharose	Sigma-Aldrich	Hamburg
SDS	Roth	Karlsruhe
Spectinomycin	Sigma-Aldrich	Hamburg

Spermidin-Trihydrochlorid	Sigma-Aldrich	Hamburg
β-Mercaptoethanol	Applichem	Darmstadt
TCA	Merck	Darmstadt
Tris	Applichem	Darmstadt
Triton-X 100	Sigma-Aldrich	Hamburg
Trypton	Applichem	Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich	Hamburg
Wolfram, tungsten M-17	Biorad Laboratories	München
Xylencyanol	Roth	Karlsruhe

7.3 Primertabelle

Tab. 7-2: Primerliste - Klonierungen

Primer	Sequenz 5' - 3'
Chop2 USER fwd	GGCTTAAUATGGATTATGGAGGCCG
UBQ10 prom user fwd	GGCTTAAUACCCGACGAGTCAGTAATAAACGG
RBC terminator rev	GGTTTAAUCGATTGATGCATGTTGTCAATC
L132C fwd	ACCTGCCCGGTCATTTGCATTACCTG
L132C rev	CAGGTGAATGCAAATGACCGGGCAGGT
C128A fwd	TGGCTTCTCACCGCCCCGGTCATTCTCAT
C128A rev	ATGAGAATGACCGGGGCGGTGAGAAGCCA
D156A fwd	CTGCTTGTGTCTGCTATTGGCACAATT
D156A rev	AATTGTGCCAATAGCAGACACAAGCAG
C128A L132C fwd	CTTCTCACCGCCCCGGTCATTTGCATTACCTG
C128A L132C rev	CAGGTGAATGCAAATGACCGGGGCGGTGAGAAG
GFP CT rev	GGTTTAAUTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG
Aeq USER fwd	GGCTTAAUATGCATCTCGAGGTCGACG
Aeq USER rev	GGTTTAAUTTAGGGGACAGCTCCACCG
DsRed USER fwd	GGCTTAAUATGGCCTCCTCCGAGAAC
AtRem1.3 USER rev	GGTTTAAUTTAGTTAAATATTCCAAGGATTCCTTTG

7.4 Genlisten RNA-Seq

Tab. 7-3: Durch LP und SPs signifikant regulierte Gene für $q < 0.01$ (absteigend nach logFC, doppelt zugeordnete AGIs in orange, k. Z. für keine Zuordnung, K1-3=Kontrollen, P1-3= Proben, K=Kontrollen SPs vs. LP, angegeben sind normalisierte Werte für „reads per million“)

Solyc ID	AGI Code	BLAST	SPs								K
			K1	K2	K3	P1	P2	P3	logFC	q-Wert	
Solyc08g016720.1.1	AT1G30100.1	0E+00	0.4	0.2	0.8	11.7	1.2	1.8	3.5	6E-10	1E+00
Solyc07g056320.1.1	AT1G06520.1	3E-176	1.8	1.9	1.3	16.7	6.5	10.8	2.9	2E-11	1E+00
Solyc11g066640.1.1	AT5G48930.1	1E-59	0.9	0.9	0.4	9.9	1.7	1.6	2.7	4E-07	1E+00
Solyc01g009330.1.1	AT3G52450.1	3E-121	0.6	0.6	0.0	4.4	1.8	0.7	2.6	9E-05	1E+00
Solyc06g074710.1.1	AT5G48930.1	2E-60	0.5	0.6	0.5	6.3	0.8	1.8	2.6	3E-05	1E+00
Solyc09g082890.1.1	AT3G22910.1	2E-127	2.3	1.0	1.6	17.6	2.8	4.1	2.4	3E-07	1E+00
Solyc09g072700.1.1	AT4G26010.1	2E-94	2.0	2.2	0.8	5.8	9.9	5.2	2.2	1E-06	3E-01
Solyc05g008360.1.1	AT1G15010.1	6E-30	2.2	4.7	1.4	8.1	19.2	5.7	2.1	7E-07	1E+00
Solyc02g088710.1.1	AT1G62940.1	0E+00	0.8	0.7	0.8	3.2	2.3	2.6	1.9	4E-03	1E+00
Solyc00g020840.1.1	AT5G23980.1	2E-64	2.4	0.1	0.1	6.9	1.9	0.2	1.9	2E-03	8E-01
Solyc04g005480.1.1	AT2G03440.1	2E-28	19.4	17.6	16.9	83.8	38.6	47.0	1.8	2E-05	1E+00
Solyc04g007620.1.1	AT2G01300.1	2E-25	0.8	1.0	1.7	2.4	4.4	3.8	1.7	8E-03	1E+00
Solyc03g093620.1.1	AT3G45070.1	1E-65	4.0	5.0	3.1	18.5	7.3	6.9	1.5	3E-03	1E+00
Solyc03g122340.1.1	AT1G17420.1	0E+00	140.2	101.4	130.6	461.0	195.6	324.0	1.5	5E-04	1E+00
Solyc00g026160.1.1	AT5G23980.1	5E-148	8.0	1.2	0.5	20.4	4.5	0.7	1.5	4E-03	1E+00
Solyc10g012080.1.1	AT4G23470.1	3E-104	37.2	41.8	38.5	123.8	94.9	87.1	1.5	7E-04	1E+00
Solyc06g069130.1.1	AT1G18410.1	0E+00	10.6	13.9	5.6	45.3	14.3	14.9	1.4	4E-03	1E+00
Solyc03g117870.1.1	AT1G51680.1	0E+00	442.8	508.5	346.3	1028.4	1049.4	770.2	1.2	9E-03	1E+00

Solyc ID	AGI Code	BLAST	LP								K
			K1	K2	K3	P1	P2	P3	logFC	q-Wert	
Solyc08g016720.1.1	AT1G30100.1	0E+00	0.2	0.7	0.8	2.1	1.9	1.7	1.8	5E-03	1E+00
Solyc07g056320.1.1	AT1G06520.1	3E-176	1.8	1.7	1.9	6.2	6.3	4.1	1.8	3E-04	1E+00
Solyc11g066640.1.1	AT5G48930.1	1E-59	1.8	1.0	0.5	6.9	3.8	3.7	2.3	2E-06	1E+00
Solyc01g009330.1.1	AT3G52450.1	3E-121	1.1	0.7	0.5	1.1	1.6	4.0	1.7	7E-03	1E+00
Solyc06g074710.1.1	AT5G48930.1	2E-60	1.3	0.4	0.3	4.6	2.9	1.4	2.3	4E-05	1E+00
Solyc09g082890.1.1	AT3G22910.1	2E-127	1.9	2.6	1.4	11.4	4.3	2.2	1.7	3E-04	1E+00
Solyc09g072700.1.1	AT4G26010.1	2E-94	0.5	0.5	0.9	2.4	5.2	3.4	2.7	3E-07	3E-01
Solyc05g008360.1.1	AT1G15010.1	6E-30	1.4	2.2	3.3	7.2	8.0	6.9	1.8	1E-04	1E+00
Solyc02g088710.1.1	AT1G62940.1	0E+00	0.5	0.8	0.6	2.5	2.9	1.4	2.0	8E-04	1E+00
Solyc00g020840.1.1	AT5G23980.1	2E-64	4.1	0.8	0.1	10.1	5.3	0.7	1.8	1E-04	8E-01
Solyc04g005480.1.1	AT2G03440.1	2E-28	14.4	13.7	23.6	44.4	34.6	41.1	1.3	3E-03	1E+00
Solyc04g007620.1.1	AT2G01300.1	2E-25	1.1	0.7	2.5	3.5	2.7	5.6	1.6	7E-03	1E+00
Solyc03g093620.1.1	AT3G45070.1	1E-65	3.5	1.6	2.3	8.2	15.1	4.3	2.1	3E-06	1E+00
Solyc03g122340.1.1	AT1G17420.1	0E+00	121.9	100.6	154.1	282.9	371.3	365.8	1.6	1E-04	1E+00
Solyc00g026160.1.1	AT5G23980.1	5E-148	11.6	2.7	0.3	28.7	16.3	1.0	1.8	7E-06	1E+00
Solyc10g012080.1.1	AT4G23470.1	3E-104	36.4	57.0	38.7	100.2	106.4	85.7	1.3	2E-03	1E+00
Solyc06g069130.1.1	AT1G18410.1	0E+00	8.4	7.0	8.5	22.8	24.9	15.7	1.5	3E-04	1E+00
Solyc03g117870.1.1	AT1G51680.1	0E+00	300.7	431.8	334.3	965.3	1381.4	926.5	1.8	5E-06	1E+00

Tab. 7-4: Durch SPs signifikant regulierte Gene für $q < 0.01$ (absteigend nach logFC, doppelt zugeordnete AGIs in orange, k. Z. für keine Zuordnung, K1-3=Kontrollen, P1-3= Proben, K=Kontrollen SPs vs. LP, angegeben sind normalisierte Werte für „reads per million“)

Solyc ID	AGI Code	BLAST	SPs							logFC	q-Wert	q-Wert
			K1	K2	K3	P1	P2	P3				
Solyc03g019750.1.1	AT3G08900.1	4E-175	0.1	0.0	0.0	0.9	0.8	0.4	4.4	2E-03	1E+00	
Solyc02g078130.1.1	AT4G20970.1	7E-32	0.1	0.1	0.1	2.2	0.5	0.3	3.5	1E-03	9E-01	
Solyc01g090370.1.1	AT2G44840.1	2E-34	0.1	0.2	0.0	0.1	2.5	0.3	3.2	4E-03	1E+00	
Solyc04g074400.1.1	AT4G08950.1	3E-92	9.9	13.4	7.3	15.3	156.9	25.7	2.8	8E-15	1E-01	
Solyc06g034410.1.1	AT5G62280.1	8E-49	0.1	0.5	0.0	0.3	2.4	0.7	2.5	5E-03	3E-01	
Solyc10g054770.1.1	AT4G38840.1	6E-22	0.9	1.4	0.4	1.0	10.6	1.0	2.3	8E-06	8E-02	
Solyc11g005350.1.1	AT1G68170.1	7E-72	2.5	2.0	2.7	5.1	19.8	5.7	2.2	4E-07	1E-01	
Solyc02g077590.1.1	AT5G53980.1	1E-24	17.3	7.1	39.1	52.2	139.6	73.5	2.2	3E-08	4E-02	
Solyc10g006750.1.1	AT4G27310.1	3E-24	4.7	2.3	5.3	11.3	23.7	10.9	2.0	3E-06	4E-01	
Solyc07g008250.1.1	AT2G25490.1	0E+00	94.6	125.5	134.2	252.1	851.4	209.1	2.0	1E-07	8E-02	
Solyc03g118450.1.1	k. Z.	k. Z.	3.5	2.1	1.9	17.4	7.3	3.0	2.0	3E-05	1E+00	
Solyc01g090970.1.1	AT4G00165.1	5E-37	0.3	0.6	2.0	0.3	2.1	7.8	2.0	1E-03	1E+00	
Solyc07g063410.1.1	AT4G27410.2	2E-105	9.3	3.0	4.7	30.3	18.5	9.8	1.9	1E-05	4E-02	
Solyc05g008730.1.1	AT2G25490.1	3E-14	1.8	3.3	3.2	5.1	18.2	4.3	1.9	9E-05	6E-01	
Solyc02g083120.1.1	AT4G35720.1	4E-44	3.3	2.7	6.0	8.2	21.0	10.2	1.8	6E-05	3E-02	
Solyc07g052610.1.1	AT3G21870.1	3E-64	1.2	0.8	0.3	3.2	1.8	2.2	1.8	1E-02	1E+00	
Solyc02g070910.1.1	AT5G46330.1	0E+00	9.6	11.4	5.2	29.0	34.2	17.7	1.7	2E-05	1E-02	
Solyc04g079250.1.1	AT2G26560.1	9E-142	1.6	1.4	0.7	5.1	3.4	2.3	1.6	1E-02	1E+00	
Solyc07g063210.1.1	AT3G15370.1	3E-95	3.0	0.8	4.6	11.2	4.0	8.8	1.6	4E-03	1E+00	
Solyc05g056410.1.1	AT3G14880.2	3E-34	4.9	5.2	4.9	10.5	24.0	7.8	1.6	6E-04	3E-02	
Solyc09g007080.1.1	AT3G12620.1	7E-154	13.7	16.1	8.0	23.6	62.5	17.7	1.6	2E-04	6E-01	
Solyc01g098940.1.1	AT3G10720.2	1E-180	11.9	12.8	11.7	28.5	40.6	29.0	1.5	4E-04	1E+00	
Solyc01g107740.1.1	AT4G34150.1	2E-76	48.5	37.7	46.5	148.7	99.8	107.2	1.5	4E-04	1E+00	
Solyc12g094640.1.1	AT1G42970.1	0E+00	49.2	9.4	72.1	41.1	22.7	275.7	1.5	2E-04	8E-02	
Solyc01g006540.1.1	AT1G17420.1	0E+00	5.4	2.7	7.1	3.3	4.3	31.9	1.5	6E-04	1E+00	
Solyc09g007790.1.1	AT5G03230.1	8E-30	3.3	3.0	2.0	11.5	7.0	3.4	1.5	8E-03	1E+00	
Solyc12g013620.1.1	AT4G27410.2	2E-105	21.9	12.8	15.1	67.8	35.2	25.3	1.5	2E-03	9E-01	
Solyc02g077050.1.1	AT2G27420.1	3E-89	15.5	4.0	11.7	68.4	4.1	7.7	1.5	9E-03	6E-01	
Solyc03g097960.1.1	AT2G27660.1	7E-54	28.0	24.9	14.9	63.4	79.3	25.9	1.4	1E-03	4E-02	
Solyc03g123750.1.1	AT3G14360.1	3E-166	2.6	2.6	3.9	1.5	11.4	9.3	1.4	9E-03	8E-02	
Solyc02g088690.1.1	AT3G29360.1	5E-168	232.7	123.6	248.6	413.3	508.6	527.5	1.4	2E-03	1E+00	
Solyc07g054730.1.1	AT4G28240.1	9E-13	12.3	13.9	14.1	19.3	48.6	24.2	1.3	7E-03	3E-01	
Solyc03g118410.1.1	AT4G25050.1	7E-27	6.0	4.8	9.7	3.4	12.2	30.8	1.3	7E-03	1E+00	
Solyc05g051200.1.1	AT3G23240.1	9E-38	3.1	11.9	4.5	2.2	36.3	5.9	1.3	9E-03	1E+00	
Solyc02g069460.1.1	AT1G31330.1	3E-90	37.4	39.6	83.3	20.7	66.4	264.8	1.3	4E-03	5E-01	
Solyc08g013670.1.1	AT5G64040.1	8E-60	15.7	9.2	26.2	7.3	10.1	92.2	1.2	7E-03	8E-01	
Solyc04g008110.1.1	AT1G27320.1	0E+00	112.1	189.6	78.4	42.2	46.5	53.4	-1.3	1E-02	1E+00	
Solyc02g032100.1.1	AT3G12750.1	9E-102	22.1	49.1	16.2	9.9	13.3	8.6	-1.4	9E-03	2E-02	
Solyc03g096770.1.1	AT3G49570.1	4E-15	41.2	67.9	14.2	12.5	9.1	20.6	-1.4	6E-03	2E-02	
Solyc10g052510.1.1	AT4G39230.1	1E-124	23.5	39.9	8.5	8.9	7.5	7.6	-1.5	3E-03	1E+00	
Solyc04g082120.1.1	AT1G20380.1	0E+00	14.8	45.3	11.7	7.4	10.0	6.0	-1.5	2E-03	2E-02	
Solyc03g096780.1.1	AT3G49570.1	3E-18	49.3	79.4	18.5	14.4	10.5	21.3	-1.6	1E-03	4E-02	
Solyc04g007210.1.1	AT1G25440.1	1E-81	16.9	39.2	9.1	4.5	5.6	9.4	-1.6	9E-04	1E+00	
Solyc01g007620.1.1	ATCG00820.1	3E-21	1.2	23.7	2.0	1.7	3.2	3.2	-1.6	4E-03	1E+00	
Solyc03g112580.1.1	AT1G17230.1	0E+00	47.0	66.4	31.3	13.1	13.9	15.9	-1.6	2E-04	1E+00	
Solyc01g110610.1.1	AT1G75580.1	1E-38	4.8	8.5	4.2	1.3	0.6	2.5	-1.9	9E-04	1E+00	
Solyc03g116480.1.1	AT1G27340.1	1E-16	2.9	5.4	1.7	0.8	0.8	0.8	-2.0	4E-03	7E-01	
Solyc09g005110.1.1	AT4G33070.1	0E+00	104.8	189.4	19.5	18.1	42.3	11.9	-2.0	5E-07	4E-02	
Solyc01g110590.1.1	AT2G21220.1	2E-38	4.5	10.5	4.0	1.0	1.1	2.2	-2.0	1E-04	1E+00	
Solyc12g007160.1.1	AT3G49290.1	1E-19	0.7	1.5	0.6	0.0	0.1	0.1	-3.5	6E-03	6E-01	
Solyc02g077240.1.1	AT4G33070.1	0E+00	1.0	1.5	0.1	0.0	0.1	0.0	-5.3	7E-04	1E+00	

Tab. 7-5: Durch LP signifikant regulierte Gene für $q < 0.01$ (absteigend nach logFC, doppelt zugeordnete AGIs in orange, k. Z. für keine Zuordnung, K1-3=Kontrollen, P1-3= Proben, K=Kontrollen SPs vs. LP, angegeben sind normalisierte Werte für „reads per million“)

Solyc ID	AGI Code	BLAST	LP							logFC	q-Wert	K
			K1	K2	K3	P1	P2	P3				
Solyc02g085660.1.1	AT3G50740.1	2E-120	0.0	0.2	0.0	0.3	1.2	0.3	3.4	7E-03	4E-01	
Solyc01g080960.1.1	AT4G17800.1	4E-81	0.3	0.0	0.1	0.5	2.5	0.1	3.2	6E-04	1E+00	
Solyc09g084440.1.1	AT2G38870.1	4E-12	0.2	0.2	0.2	1.7	3.2	0.1	3.2	3E-05	1E+00	
Solyc11g066420.1.1	AT5G22890.1	9E-88	0.6	0.2	0.4	1.7	6.0	1.2	3.1	2E-07	1E-01	
Solyc01g094240.1.1	AT3G61220.1	2E-92	0.5	0.2	0.6	3.5	3.7	0.8	2.8	3E-06	2E-01	
Solyc09g010960.1.1	AT5G43290.1	8E-35	0.1	0.9	0.3	1.9	5.6	0.7	2.7	4E-06	9E-01	
Solyc04g051180.1.1	AT1G21140.1	4E-56	0.1	0.2	0.1	0.0	1.2	1.2	2.7	8E-03	7E-01	
Solyc10g085370.1.1	AT5G01700.2	9E-101	0.2	0.5	0.1	1.4	2.4	0.7	2.6	4E-04	1E+00	
Solyc01g094260.1.1	AT3G61220.1	2E-92	0.3	0.2	0.6	2.6	2.3	0.8	2.6	2E-04	7E-01	
Solyc01g094270.1.1	AT2G24190.2	2E-91	0.4	0.7	1.0	5.4	4.1	1.4	2.5	7E-06	1E+00	
Solyc01g094250.1.1	AT3G61220.1	4E-91	0.8	0.5	0.9	4.6	4.2	1.3	2.3	4E-05	1E+00	
Solyc05g052880.1.1	AT5G02020.1	2E-20	1.1	1.0	0.7	5.5	5.0	2.4	2.3	7E-06	1E+00	
Solyc08g079960.1.1	AT3G14067.1	1E-44	0.4	0.2	0.1	1.2	1.4	0.6	2.2	8E-03	7E-01	
Solyc08g007560.1.1	AT4G12050.1	5E-99	2.5	1.6	2.1	6.0	14.0	5.8	2.2	8E-07	2E-01	
Solyc10g081780.1.1	AT2G35910.1	1E-41	1.6	1.2	1.4	5.7	7.2	3.7	2.1	1E-05	9E-02	
Solyc01g010420.1.1	AT1G27100.1	1E-44	0.4	0.5	0.1	1.9	1.2	1.1	2.1	3E-03	1E+00	
Solyc02g077060.1.1	AT3G50450.1	3E-08	0.6	0.3	0.4	2.7	1.6	1.1	2.1	2E-03	1E+00	
Solyc01g079940.1.1	AT1G03220.1	2E-86	5.4	8.1	6.1	18.2	47.1	11.0	2.1	1E-07	9E-02	
Solyc01g079930.1.1	AT1G03220.1	1E-73	0.7	1.1	0.8	2.3	6.0	1.4	2.1	2E-04	1E+00	
Solyc01g079910.1.1	AT1G03220.1	4E-22	1.6	2.3	1.8	5.4	13.7	2.7	2.1	7E-06	5E-02	
Solyc01g079920.1.1	AT1G03220.1	2E-84	13.8	19.5	13.6	39.6	108.3	26.7	2.0	1E-07	3E-01	
Solyc10g086090.1.1	AT2G38870.1	1E-10	30.3	23.2	14.3	110.7	123.0	20.3	2.0	6E-08	2E-01	
Solyc09g014910.1.1	AT5G01750.2	5E-29	1.5	1.3	1.7	8.1	4.8	3.5	2.0	4E-05	1E+00	
Solyc02g092820.1.1	AT1G28130.1	0E+00	0.8	0.4	0.3	1.3	3.6	0.8	2.0	3E-03	7E-01	
Solyc01g079900.1.1	AT1G03220.1	5E-40	3.6	3.6	3.0	9.2	22.1	5.3	2.0	3E-06	8E-02	
Solyc10g086100.1.1	AT2G38870.1	8E-12	58.6	39.1	26.8	201.2	212.5	39.4	2.0	9E-08	1E+00	
Solyc12g010980.1.1	AT3G26040.1	3E-46	0.8	1.6	1.1	5.4	5.4	2.3	2.0	1E-04	1E+00	
Solyc02g021290.1.1	ATCG00020.1	4E-17	1.4	1.4	1.1	2.3	2.9	8.5	2.0	6E-05	2E-01	
Solyc07g009040.1.1	AT1G19610.1	4E-10	0.7	0.8	0.3	2.1	3.6	0.7	2.0	2E-03	1E+00	
Solyc06g011590.1.1	AT2G28120.1	0E+00	0.5	0.9	0.7	2.1	3.2	1.9	1.9	2E-03	7E-01	
Solyc01g068380.1.1	AT5G50400.1	2E-102	2.9	2.9	3.3	10.4	12.8	7.7	1.9	1E-05	3E-01	
Solyc07g009360.1.1	k. Z.	k. Z.	0.6	0.3	0.6	1.4	1.1	2.5	1.9	9E-03	1E+00	
Solyc10g074840.1.1	k. Z.	k. Z.	1.5	4.2	2.1	3.5	19.4	3.3	1.9	3E-05	3E-01	
Solyc04g076750.1.1	AT1G09930.1	0E+00	3.0	3.3	2.0	9.6	13.5	4.7	1.9	2E-05	9E-01	
Solyc00g080750.1.1	AT2G01340.1	2E-40	6.2	8.7	7.6	22.3	36.2	16.5	1.9	4E-06	9E-01	
Solyc07g008290.1.1	AT3G21190.1	8E-101	0.7	0.3	0.8	4.8	0.5	0.6	1.8	9E-03	1E+00	
Solyc01g079950.1.1	AT1G03230.1	1E-83	1.4	2.0	1.2	3.5	8.9	2.2	1.8	2E-04	3E-01	
Solyc09g059460.1.1	AT4G27870.1	2E-41	46.4	45.1	28.3	157.0	178.7	50.5	1.8	2E-06	1E+00	
Solyc06g065530.1.1	AT1G29670.1	2E-65	13.4	22.0	6.8	15.8	99.5	17.3	1.8	3E-06	4E-02	
Solyc03g121190.1.1	AT1G51920.1	7E-10	12.5	17.8	17.0	57.8	54.9	36.9	1.8	7E-06	8E-01	
Solyc08g067270.1.1	AT5G21280.1	2E-10	2.8	3.0	2.5	9.9	10.2	5.8	1.8	9E-05	9E-01	
Solyc11g027690.1.1	k. Z.	k. Z.	0.7	1.5	0.8	1.2	2.8	5.3	1.7	2E-03	1E-01	
Solyc12g039030.1.1	ATCG00020.1	1E-24	4.1	1.6	3.7	4.4	5.3	18.3	1.7	1E-04	6E-01	
Solyc01g079970.1.1	AT1G03220.1	9E-122	8.6	8.0	5.9	16.3	38.2	12.5	1.7	3E-05	1E+00	
Solyc01g097530.1.1	ATCG00020.1	6E-23	5.3	2.2	5.3	5.8	5.8	26.7	1.7	1E-04	1E+00	
Solyc09g066400.1.1	AT3G26300.1	3E-103	1.9	15.1	16.1	2.3	50.7	43.8	1.7	7E-05	9E-02	
Solyc04g008480.1.1	AT1G14600.1	7E-33	1.7	1.2	2.1	5.2	4.2	5.3	1.7	1E-03	1E+00	
Solyc10g006920.1.1	AT5G53750.1	4E-100	1.3	0.8	1.3	1.8	2.1	6.2	1.7	3E-03	1E+00	
Solyc09g009980.1.1	AT2G36210.1	2E-30	1.4	0.9	2.3	3.6	7.1	2.5	1.7	2E-03	8E-01	
Solyc01g106200.1.1	AT5G64410.1	4E-94	7.3	8.6	5.1	21.0	28.1	12.2	1.7	5E-05	1E+00	

Solyc ID	AGI Code	BLAST	LP							logFC	q-Wert	K
			K1	K2	K3	P1	P2	P3				
Solyc08g077010.1.1	AT4G17800.1	4E-96	2.3	3.3	2.9	5.7	14.2	4.8	1.7	3E-04	2E-01	
Solyc03g094020.1.1	AT3G45940.1	1E-21	23.8	31.9	34.7	40.1	163.9	51.9	1.7	6E-05	3E-01	
Solyc12g015920.1.1	AT3G07600.1	1E-15	1.0	1.8	2.0	2.1	8.3	3.1	1.6	2E-03	3E-01	
Solyc10g047170.1.1	AT1G22150.1	0E+00	21.5	27.5	13.8	33.6	119.3	22.3	1.6	4E-05	1E+00	
Solyc10g081790.1.1	AT2G35910.1	4E-55	14.6	14.6	11.6	39.5	51.0	23.9	1.6	6E-05	9E-01	
Solyc04g011480.1.1	AT2G39518.1	2E-25	52.5	66.2	49.9	204.9	160.6	110.0	1.6	4E-05	4E-01	
Solyc03g120550.1.1	AT1G52190.1	0E+00	12.3	13.5	12.0	28.3	53.1	23.6	1.6	9E-05	1E+00	
Solyc11g007890.1.1	AT2G36690.1	4E-132	12.5	14.3	12.6	45.4	31.8	33.8	1.6	7E-05	1E+00	
Solyc01g017500.1.1	k. Z.	k. Z.	1.9	3.8	3.2	3.7	6.7	14.4	1.6	5E-04	7E-01	
Solyc01g048590.1.1	ATCG00020.1	8E-38	4.2	2.5	3.6	3.9	5.6	19.1	1.6	3E-04	5E-01	
Solyc12g055960.1.1	AT5G15050.1	2E-134	1.6	1.3	2.6	2.8	6.1	6.1	1.6	2E-03	1E+00	
Solyc03g113810.1.1	AT3G48180.1	4E-13	0.9	1.6	1.2	5.6	3.0	2.1	1.6	4E-03	9E-01	
Solyc08g079970.1.1	AT5G67360.1	6E-171	1.3	1.8	1.4	2.9	7.2	2.0	1.6	3E-03	7E-01	
Solyc11g069220.1.1	AT1G61560.1	5E-168	88.2	87.5	72.3	188.9	344.7	150.1	1.6	5E-05	1E+00	
Solyc05g016120.1.1	ATCG00020.1	1E-73	19.0	12.1	14.7	18.2	24.0	84.3	1.6	7E-05	1E+00	
Solyc01g079980.1.1	AT1G03220.1	1E-122	6.9	7.2	4.2	11.9	27.8	10.1	1.6	2E-04	6E-01	
Solyc05g008220.1.1	AT2G01340.1	4E-44	6.6	7.7	7.0	17.2	27.6	13.6	1.6	2E-04	1E+00	
Solyc08g006730.1.1	AT2G39030.1	9E-35	104.9	85.4	94.3	378.8	248.1	151.1	1.6	7E-05	1E+00	
Solyc01g079960.1.1	AT1G03220.1	5E-127	28.8	35.3	23.0	55.3	135.8	43.7	1.6	8E-05	1E+00	
Solyc04g011490.1.1	AT2G39530.1	1E-27	26.7	35.0	26.3	108.1	79.5	52.7	1.6	8E-05	6E-01	
Solyc05g050880.1.1	AT5G05340.1	2E-112	4.8	6.4	4.9	9.1	25.4	8.5	1.6	3E-04	9E-01	
Solyc03g006250.1.1	AT1G28590.1	1E-119	13.8	14.1	10.2	36.1	45.8	20.9	1.6	1E-04	1E+00	
Solyc02g089720.1.1	AT1G18310.1	0E+00	188.5	249.9	222.2	388.1	904.4	474.2	1.6	1E-04	1E+00	
Solyc11g027650.1.1	k. Z.	k. Z.	116.5	93.6	89.0	120.4	179.5	505.5	1.6	7E-05	1E+00	
Solyc11g051210.1.1	k. Z.	k. Z.	168.6	143.7	136.6	190.1	264.0	753.4	1.6	7E-05	1E+00	
Solyc08g006750.1.1	AT1G43710.1	8E-152	29.8	36.5	50.9	80.2	155.6	75.9	1.6	2E-04	5E-01	
Solyc12g088940.1.1	AT5G66850.1	5E-140	83.5	80.1	65.5	227.6	232.6	153.5	1.6	9E-05	1E+00	
Solyc08g016770.1.1	AT1G43710.1	2E-149	3.4	4.9	6.6	11.4	19.3	8.9	1.6	7E-04	4E-01	
Solyc10g083230.1.1	AT2G36090.1	2E-79	23.1	28.1	20.8	59.6	84.7	47.4	1.6	1E-04	1E+00	
Solyc02g090490.1.1	AT4G37050.1	1E-120	57.8	87.4	51.9	216.4	204.6	107.6	1.6	8E-05	1E+00	
Solyc01g065590.1.1	k. Z.	k. Z.	28.5	27.2	24.0	32.1	51.4	129.0	1.6	1E-04	4E-01	
Solyc09g066370.1.1	AT3G26300.1	4E-101	0.8	5.6	5.1	1.2	16.0	13.0	1.5	1E-03	1E-02	
Solyc09g065100.1.1	AT4G09820.1	1E-122	1.4	1.7	1.1	2.6	6.4	1.9	1.5	6E-03	2E-01	
Solyc03g044830.1.1	AT3G18950.1	1E-137	10.0	8.1	7.2	27.2	27.0	12.5	1.5	3E-04	1E+00	
Solyc07g005400.1.1	AT2G24260.1	3E-69	14.1	12.0	11.8	28.6	51.6	18.9	1.5	3E-04	9E-01	
Solyc12g042460.1.1	AT1G51680.1	0E+00	30.9	36.2	28.9	83.2	103.6	65.6	1.5	1E-04	1E+00	
Solyc09g014740.1.1	AT1G21270.1	3E-159	7.6	8.8	6.8	18.8	24.4	16.9	1.5	4E-04	5E-01	
Solyc08g006740.1.1	AT1G43710.1	4E-152	24.8	28.3	37.2	61.4	112.2	59.7	1.5	3E-04	4E-01	
Solyc11g044620.1.1	k. Z.	k. Z.	186.8	167.7	138.0	189.3	314.7	773.9	1.5	1E-04	2E-01	
Solyc11g021170.1.1	k. Z.	k. Z.	6.3	4.9	4.1	6.3	9.1	23.7	1.5	5E-04	5E-01	
Solyc11g044610.1.1	ATCG01050.1	9E-14	198.9	182.9	160.5	203.3	350.5	836.6	1.5	1E-04	6E-01	
Solyc03g117830.1.1	k. Z.	k. Z.	35.0	31.2	25.4	34.9	54.7	145.4	1.5	2E-04	3E-01	
Solyc05g009310.1.1	AT1G25440.1	6E-85	3.5	5.5	2.5	3.9	22.5	2.5	1.5	1E-03	1E+00	
Solyc01g096670.1.1	AT2G40890.1	0E+00	114.8	159.3	171.7	333.8	501.4	300.6	1.5	3E-04	1E+00	
Solyc00g056680.1.1	AT4G16820.1	3E-168	2.1	3.1	3.3	12.5	5.8	3.6	1.5	2E-03	1E+00	
Solyc06g007690.1.1	k. Z.	k. Z.	11.4	14.9	13.6	13.6	26.0	62.0	1.5	4E-04	4E-01	
Solyc11g066330.1.1	AT2G28120.1	0E+00	7.1	8.8	6.6	15.7	30.2	10.9	1.5	6E-04	1E+00	
Solyc01g095150.1.1	AT2G46140.1	8E-50	108.3	91.3	94.8	270.9	267.5	210.2	1.5	3E-04	1E+00	
Solyc12g044980.1.1	k. Z.	k. Z.	26.2	31.4	28.3	31.3	60.2	125.9	1.5	3E-04	1E+00	
Solyc02g011880.1.1	k. Z.	k. Z.	57.2	70.0	63.7	63.6	131.4	287.1	1.5	3E-04	1E+00	

Solyc ID	AGI Code	BLAST	LP							logFC	q-Wert	K
			K1	K2	K3	P1	P2	P3				
Solyc00g277510.1.1	ATCG00020.1	2E-28	10.2	6.7	7.2	9.8	10.0	41.1	1.5	5E-04	1E+00	
Solyc04g079400.1.1	AT5G66850.1	2E-146	25.0	30.2	20.3	73.3	74.8	42.5	1.5	3E-04	1E+00	
Solyc01g067300.1.1	AT4G15610.1	3E-44	10.9	12.9	8.6	40.5	30.7	11.0	1.5	4E-04	1E+00	
Solyc02g011990.1.1	ATCG00020.1	3E-76	18.0	8.7	13.8	15.1	19.2	67.6	1.5	5E-04	1E+00	
Solyc01g098580.1.1	AT3G05170.1	8E-115	11.5	11.2	12.3	39.9	22.9	25.2	1.5	6E-04	1E+00	
Solyc11g044630.1.1	k. Z.	k. Z.	11.6	15.3	11.4	14.4	26.6	54.6	1.5	4E-04	9E-01	
Solyc01g007050.1.1	AT3G11840.1	7E-84	10.4	8.7	8.4	26.2	28.5	13.5	1.5	8E-04	1E+00	
Solyc01g007730.1.1	k. Z.	k. Z.	115.6	120.1	93.3	120.3	194.5	504.6	1.5	3E-04	1E+00	
Solyc11g056340.1.1	ATCG00020.1	5E-28	13.2	7.3	9.4	10.8	14.3	49.3	1.4	6E-04	1E+00	
Solyc08g068730.1.1	AT2G39030.1	3E-37	13.2	13.0	11.4	44.5	32.0	17.8	1.4	6E-04	1E+00	
Solyc06g043130.1.1	AT5G13930.1	5E-55	1.9	4.1	2.2	6.5	9.0	4.9	1.4	3E-03	1E+00	
Solyc04g012080.1.1	AT4G14050.1	3E-12	142.2	143.5	133.4	159.6	253.5	627.4	1.4	3E-04	1E+00	
Solyc06g043020.1.1	k. Z.	k. Z.	88.0	110.6	103.8	115.1	198.4	436.3	1.4	3E-04	9E-01	
Solyc01g017490.1.1	k. Z.	k. Z.	131.2	129.3	102.4	134.1	209.8	554.7	1.4	3E-04	5E-01	
Solyc10g081520.1.1	AT1G45063.1	8E-29	16.2	19.7	22.6	47.2	51.6	45.7	1.4	7E-04	1E+00	
Solyc06g068650.1.1	AT1G51680.1	0E+00	35.4	46.2	47.0	102.9	129.3	84.6	1.4	6E-04	1E+00	
Solyc09g090210.1.1	AT2G41970.1	1E-110	3.1	3.9	2.9	5.9	13.2	5.1	1.4	3E-03	1E+00	
Solyc01g007700.1.1	k. Z.	k. Z.	138.8	168.1	144.1	164.0	287.1	655.4	1.4	4E-04	4E-01	
Solyc01g005390.1.1	AT1G14860.1	8E-62	10.8	9.9	8.4	27.3	24.3	19.7	1.4	8E-04	1E+00	
Solyc05g054250.1.1	AT5G19090.1	2E-11	4.6	3.2	2.2	15.1	6.7	3.0	1.4	2E-03	1E+00	
Solyc08g068770.1.1	AT2G39030.1	4E-37	3.4	3.2	3.3	11.6	7.4	5.3	1.4	3E-03	1E+00	
Solyc11g013780.1.1	ATCG00020.1	6E-23	3.0	2.0	2.3	2.3	3.9	11.4	1.4	5E-03	1E+00	
Solyc07g064720.1.1	AT5G55050.1	2E-79	57.0	31.1	50.0	161.1	97.4	78.7	1.4	7E-04	1E+00	
Solyc04g072020.1.1	AT1G71697.1	1E-128	49.2	49.5	47.8	112.7	148.6	91.9	1.4	7E-04	1E+00	
Solyc05g011880.1.1	AT5G02230.1	7E-99	2.7	2.1	3.4	7.6	7.2	4.8	1.4	7E-03	1E+00	
Solyc09g064170.1.1	k. Z.	k. Z.	85.1	87.7	73.1	128.8	145.9	319.2	1.4	5E-04	1E+00	
Solyc09g014710.1.1	AT1G21270.1	1E-169	53.1	65.5	59.7	123.8	182.6	121.1	1.4	7E-04	6E-01	
Solyc09g014720.1.1	AT1G21270.1	7E-166	77.1	98.5	84.4	180.5	260.7	181.6	1.4	7E-04	5E-01	
Solyc03g120560.1.1	AT1G52190.1	0E+00	7.5	8.6	7.2	14.1	29.7	11.5	1.4	2E-03	1E+00	
Solyc01g067330.1.1	AT4G15630.1	2E-46	213.1	216.7	188.0	597.3	573.4	311.5	1.4	6E-04	1E+00	
Solyc08g005330.1.1	AT5G02930.1	6E-22	21.3	19.4	17.2	24.5	36.3	77.0	1.4	8E-04	5E-01	
Solyc01g007710.1.1	k. Z.	k. Z.	149.5	187.8	176.6	174.5	332.0	717.3	1.4	7E-04	9E-01	
Solyc08g080310.1.1	AT4G23030.1	0E+00	4.0	6.2	5.1	10.4	11.5	14.6	1.4	3E-03	1E+00	
Solyc05g041910.1.1	AT5G47530.1	3E-121	254.8	387.0	342.9	691.4	837.7	812.8	1.4	8E-04	1E+00	
Solyc10g085360.1.1	AT2G36190.1	0E+00	44.9	44.7	37.6	109.7	129.7	62.3	1.4	8E-04	1E+00	
Solyc11g051180.1.1	k. Z.	k. Z.	88.7	82.2	68.4	105.1	131.0	330.7	1.4	6E-04	1E+00	
Solyc11g021150.1.1	k. Z.	k. Z.	183.4	239.1	203.0	215.1	386.3	878.1	1.4	7E-04	8E-01	
Solyc06g017930.1.1	ATCG00860.1	4E-24	58.9	78.1	64.4	72.2	126.0	278.4	1.4	8E-04	1E+00	
Solyc01g107910.1.1	AT4G34050.1	8E-125	188.7	350.9	277.3	650.1	782.0	499.9	1.4	9E-04	1E+00	
Solyc03g019980.1.1	AT3G47090.1	0E+00	3.4	2.3	1.8	7.9	7.5	2.3	1.4	7E-03	1E+00	
Solyc04g039760.1.1	ATCG00860.1	3E-110	93.6	98.8	84.7	132.0	150.3	369.8	1.4	8E-04	1E+00	
Solyc01g017050.1.1	k. Z.	k. Z.	96.0	124.0	109.9	106.7	202.9	459.6	1.4	1E-03	1E+00	
Solyc01g010080.1.1	AT4G32650.1	0E+00	6.1	5.8	3.8	10.9	19.8	5.5	1.4	3E-03	1E+00	
Solyc10g083290.1.1	AT2G36190.1	0E+00	379.3	409.7	323.4	950.7	1093.8	541.0	1.4	1E-03	1E+00	
Solyc04g025530.1.1	AT1G65960.2	0E+00	61.8	71.2	102.6	178.5	196.7	171.1	1.4	2E-03	1E+00	
Solyc10g086710.1.1	AT3G54040.1	9E-44	92.8	98.9	93.3	231.6	247.0	182.6	1.3	1E-03	9E-02	
Solyc07g048060.1.1	AT3G59070.1	3E-40	11.0	13.4	12.5	28.0	29.3	28.0	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc09g011790.1.1	AT3G54040.1	6E-38	4.8	5.3	5.3	13.4	13.3	8.7	1.3	4E-03	4E-02	
Solyc08g007540.1.1	AT1G12420.1	6E-158	3.2	3.4	3.0	6.3	9.6	6.2	1.3	8E-03	1E+00	
Solyc02g089150.1.1	AT1G13680.1	1E-124	6.4	2.9	4.2	18.3	7.3	5.7	1.3	5E-03	1E+00	

Solyc ID	AGI Code	BLAST	LP							logFC	q-Wert	K
			K1	K2	K3	P1	P2	P3				
Solyc10g050160.1.1	AT4G34050.1	2E-125	20.9	36.0	27.9	68.1	79.2	47.7	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc05g008210.1.1	AT2G01340.1	3E-45	7.9	10.1	7.3	18.3	25.4	13.4	1.3	3E-03	1E+00	
Solyc05g007940.1.1	AT2G02990.1	3E-80	73.6	71.1	80.1	192.6	204.1	113.6	1.3	2E-03	5E-01	
Solyc02g084570.1.1	AT4G36220.1	0E+00	71.9	82.5	96.4	128.4	271.8	164.2	1.3	2E-03	2E-01	
Solyc03g058220.1.1	ATCG00860.1	1E-05	59.5	79.3	65.8	76.7	133.1	254.2	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc07g056400.1.1	AT3G14370.1	8E-169	19.9	21.3	12.4	45.9	50.9	24.6	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc09g097850.1.1	AT2G31980.1	9E-22	7.1	6.7	9.7	20.9	18.8	13.7	1.3	5E-03	1E+00	
Solyc09g014730.1.1	AT1G21270.1	1E-170	15.0	20.0	17.8	37.1	48.8	33.0	1.3	3E-03	7E-01	
Solyc02g069250.1.1	AT4G39330.1	5E-116	35.4	31.1	26.3	138.4	27.9	47.0	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc06g024270.1.1	k. Z.	k. Z.	109.2	89.2	95.0	103.4	145.4	412.0	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc01g005000.1.1	AT1G65960.2	0E+00	19.9	21.3	30.7	51.8	59.2	50.7	1.3	4E-03	1E+00	
Solyc01g106800.1.1	AT1G58360.1	0E+00	7.7	5.3	7.1	12.9	22.4	9.5	1.3	6E-03	5E-01	
Solyc11g039860.1.1	k. Z.	k. Z.	83.7	108.3	101.5	107.3	185.6	364.6	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc07g006280.1.1	AT2G23810.1	2E-114	181.6	192.8	181.6	498.1	373.1	381.0	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc03g059080.1.1	AT2G41970.1	7E-169	6.4	8.0	7.2	12.0	24.1	12.0	1.3	6E-03	1E+00	
Solyc09g072810.1.1	AT1G17230.1	0E+00	48.8	45.7	55.8	95.0	172.5	64.6	1.3	3E-03	1E+00	
Solyc08g068780.1.1	AT2G39030.1	5E-36	12.1	12.5	11.2	38.1	26.8	15.4	1.3	4E-03	1E+00	
Solyc07g008110.1.1	AT2G32300.1	3E-22	52.5	61.5	75.0	123.3	156.1	139.3	1.3	3E-03	1E+00	
Solyc12g010570.1.1	AT2G23810.1	6E-108	46.5	44.0	38.4	122.2	85.2	80.0	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc01g099190.1.1	AT1G17420.1	0E+00	14.6	14.9	13.7	30.9	43.9	20.3	1.3	4E-03	1E+00	
Solyc12g056960.1.1	k. Z.	k. Z.	74.8	68.5	63.7	179.1	188.6	89.7	1.3	3E-03	8E-01	
Solyc09g090830.1.1	AT4G26500.1	2E-26	57.2	75.8	61.3	62.9	116.5	249.6	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc11g072550.1.1	AT4G15093.1	1E-100	174.8	187.1	163.1	434.7	431.7	294.6	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc01g007330.1.1	ATCG00490.1	0E+00	48.2	41.7	35.9	41.5	62.1	174.1	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc05g054660.1.1	AT2G28710.1	2E-28	6.8	4.6	6.1	15.7	15.4	7.3	1.3	9E-03	1E+00	
Solyc04g076880.1.1	AT4G37870.1	0E+00	188.5	223.4	189.2	433.1	670.5	211.5	1.3	3E-03	1E+00	
Solyc05g006340.1.1	AT1G24130.1	1E-118	24.0	15.6	18.1	61.3	47.5	17.8	1.3	4E-03	9E-01	
Solyc09g009150.1.1	AT5G03700.1	2E-136	19.6	15.2	17.2	30.9	59.0	22.6	1.3	5E-03	1E+00	
Solyc12g062450.1.1	k. Z.	k. Z.	239.0	221.4	188.4	302.7	358.1	759.7	1.3	2E-03	7E-01	
Solyc12g088040.1.1	AT5G02070.1	0E+00	194.0	259.6	146.1	411.1	584.8	314.3	1.3	2E-03	1E+00	
Solyc00g018970.1.1	k. Z.	k. Z.	4.7	7.6	6.0	6.6	12.5	20.7	1.3	7E-03	7E-01	
Solyc05g048850.1.1	AT2G45810.1	0E+00	40.3	46.8	39.2	45.8	78.7	150.6	1.3	3E-03	7E-01	
Solyc01g099680.1.1	AT3G05500.1	3E-69	130.1	144.1	117.4	362.5	283.5	210.7	1.3	3E-03	1E+00	
Solyc03g036480.1.1	AT3G10340.1	9E-45	10.4	13.8	10.9	26.2	29.8	20.5	1.3	5E-03	1E+00	
Solyc02g079500.1.1	AT5G05340.1	1E-67	166.6	279.5	163.3	366.8	669.0	284.5	1.3	3E-03	1E+00	
Solyc09g011670.1.1	AT3G53990.1	7E-64	15.5	26.1	29.6	30.4	89.5	33.0	1.3	7E-03	3E-02	
Solyc10g086180.1.1	AT2G37040.1	0E+00	654.3	897.9	807.8	1739.6	1894.1	1492.3	1.3	3E-03	1E+00	
Solyc11g045440.1.1	k. Z.	k. Z.	32.3	36.2	33.3	43.5	58.2	119.0	1.3	4E-03	1E+00	
Solyc02g085800.1.1	AT5G16080.1	1E-95	3.9	5.9	1.9	8.1	13.8	3.3	1.2	9E-03	1E+00	
Solyc09g010940.1.1	AT5G02230.1	6E-104	22.4	22.6	37.9	67.8	66.7	43.9	1.2	8E-03	1E+00	
Solyc03g120600.1.1	AT1G52200.1	2E-58	41.9	58.3	45.8	101.3	133.1	78.9	1.2	4E-03	8E-01	
Solyc03g119980.1.1	AT1G52760.1	2E-152	81.5	107.7	114.7	210.9	275.3	165.1	1.2	5E-03	1E+00	
Solyc03g006400.1.1	AT5G58950.1	5E-166	26.5	20.0	23.3	60.2	49.8	39.7	1.2	5E-03	1E+00	
Solyc09g007910.1.1	AT2G37040.1	0E+00	32.6	41.1	36.1	78.2	93.0	63.6	1.2	5E-03	1E+00	
Solyc03g071870.1.1	AT3G53260.1	4E-44	43.0	41.2	37.0	83.3	101.5	73.2	1.2	5E-03	1E+00	
Solyc02g078500.1.1	AT4G27450.1	2E-90	13.5	17.5	4.0	43.5	24.5	7.6	1.2	3E-03	1E+00	
Solyc02g079510.1.1	AT5G05340.1	6E-68	220.7	376.1	241.0	471.6	916.3	385.8	1.2	4E-03	1E+00	
Solyc01g081450.1.1	AT5G17650.1	3E-44	29.4	28.3	24.4	82.9	56.0	36.7	1.2	5E-03	1E+00	
Solyc03g120980.1.1	AT1G15210.1	0E+00	130.8	131.2	209.2	200.3	399.2	394.5	1.2	8E-03	1E+00	
Solyc10g052880.1.1	AT1G33590.1	9E-168	29.6	76.6	57.5	52.7	154.4	139.0	1.2	5E-03	1E+00	

Solyc ID	AGI Code	BLAST	LP							logFC	q-Wert	K
			K1	K2	K3	P1	P2	P3				
Solyc04g080790.1.1	AT1G75410.1	8E-96	11.3	16.5	12.7	16.3	51.6	17.1	1.2	8E-03	2E-01	
Solyc04g054690.1.1	AT4G39830.1	0E+00	480.0	549.8	449.1	1037.8	1363.6	727.7	1.2	5E-03	1E+00	
Solyc03g122360.1.1	AT5G07990.1	3E-116	48.8	58.8	48.0	189.1	71.0	74.1	1.2	4E-03	1E+00	
Solyc04g054660.1.1	AT4G39830.1	4E-71	34.5	40.7	32.1	77.2	97.6	51.6	1.2	5E-03	1E+00	
Solyc01g090180.1.1	AT4G15093.1	4E-98	12.6	13.1	12.0	27.1	30.2	22.2	1.2	8E-03	1E+00	
Solyc09g010080.1.1	AT2G36190.1	0E+00	21.5	21.7	16.8	45.1	52.1	29.2	1.2	6E-03	1E+00	
Solyc12g040570.1.1	AT3G02360.1	4E-88	52.0	54.4	67.8	126.3	135.0	105.3	1.2	7E-03	1E+00	
Solyc12g008970.1.1	AT2G19450.1	0E+00	34.0	42.1	43.9	68.1	95.1	88.9	1.2	7E-03	1E+00	
Solyc12g019890.1.1	AT1G64760.1	0E+00	32.5	23.1	28.8	64.1	63.1	50.1	1.2	7E-03	1E+00	
Solyc07g008120.1.1	AT2G32300.1	6E-21	11.7	14.9	17.1	27.7	31.6	32.5	1.2	1E-02	1E+00	
Solyc03g122350.1.1	AT5G07990.1	1E-115	98.6	113.5	98.3	371.4	141.5	148.0	1.2	5E-03	1E+00	
Solyc08g068870.1.1	AT5G10760.1	4E-50	8.3	10.2	4.7	21.6	15.3	12.3	1.2	8E-03	1E+00	
Solyc01g105070.1.1	AT2G41480.1	2E-114	686.0	738.7	388.4	1420.1	1653.0	731.0	1.2	4E-03	1E+00	
Solyc02g062850.1.1	AT2G18480.1	8E-22	9.8	16.1	7.3	19.7	32.9	16.7	1.2	7E-03	1E+00	
Solyc10g083300.1.1	AT1G55120.1	0E+00	80.2	85.1	64.8	172.7	207.7	99.9	1.2	6E-03	1E+00	
Solyc01g099160.1.1	AT1G17420.1	0E+00	64.9	67.4	56.7	129.7	180.1	82.9	1.2	7E-03	7E-01	
Solyc11g011050.1.1	AT1G66230.1	3E-84	12.7	14.3	12.0	35.7	31.6	14.1	1.2	9E-03	1E+00	
Solyc05g007230.1.1	AT1G17230.1	0E+00	19.4	16.7	11.8	29.0	46.5	23.8	1.2	8E-03	1E+00	
Solyc01g099170.1.1	AT1G55020.1	1E-120	19.3	18.7	18.3	39.6	51.9	24.6	1.2	1E-02	5E-01	
Solyc09g011660.1.1	AT3G53990.1	5E-60	86.4	129.7	129.7	189.3	365.8	154.4	1.2	1E-02	2E-01	
Solyc04g082500.1.1	AT1G76360.1	1E-137	51.3	40.5	51.4	107.8	106.9	79.4	1.2	1E-02	1E+00	
Solyc03g114100.1.1	AT1G52720.1	6E-24	11.4	20.6	9.3	24.2	42.5	17.8	1.2	9E-03	1E+00	
Solyc01g007900.1.1	AT2G37040.1	0E+00	199.9	229.1	188.1	445.5	469.9	347.3	1.2	8E-03	1E+00	
Solyc07g048070.1.1	AT4G17280.1	3E-117	151.5	196.0	169.7	377.6	376.8	304.1	1.2	8E-03	1E+00	
Solyc10g055800.1.1	AT3G12500.1	4E-138	359.0	1102.4	386.4	455.0	2737.3	528.8	1.2	7E-03	2E-01	
Solyc10g055810.1.1	AT3G12500.1	1E-141	164.4	490.9	175.4	187.6	1240.3	235.5	1.2	7E-03	4E-01	
Solyc09g007890.1.1	AT2G37040.1	0E+00	147.6	167.8	141.6	318.3	355.3	254.0	1.2	9E-03	1E+00	
Solyc03g036470.1.1	AT2G37040.1	2E-107	72.7	80.8	71.2	154.3	171.1	129.1	1.2	1E-02	1E+00	
Solyc05g005460.1.1	AT1G60420.1	0E+00	120.8	93.9	67.0	246.0	204.6	113.6	1.1	9E-03	1E+00	
Solyc03g118470.1.1	AT2G01670.1	3E-49	12.9	12.0	42.7	10.9	9.4	8.3	-1.1	9E-03	5E-01	
Solyc02g084740.1.1	AT4G36380.1	4E-176	60.7	53.8	74.1	20.0	13.4	43.3	-1.2	9E-03	1E+00	
Solyc02g088560.1.1	AT5G15410.1	0E+00	148.9	109.8	220.6	39.9	36.9	116.1	-1.2	5E-03	1E+00	
Solyc03g044060.1.1	AT5G67470.1	0E+00	60.8	43.9	71.3	21.1	16.0	33.4	-1.2	7E-03	1E+00	
Solyc01g100370.1.1	AT3G62550.1	8E-41	11.4	21.5	89.0	13.3	22.3	12.4	-1.2	2E-03	9E-01	
Solyc12g098610.1.1	AT3G23730.1	7E-117	47.7	27.6	42.5	26.2	4.9	16.1	-1.2	8E-03	2E-02	
Solyc03g119540.1.1	AT1G25440.1	2E-74	22.8	18.9	21.8	6.9	10.3	7.6	-1.2	9E-03	1E+00	
Solyc11g008630.1.1	AT1G65450.1	2E-150	53.1	36.2	55.8	12.9	14.1	29.7	-1.2	5E-03	1E+00	
Solyc07g064160.1.1	AT5G54770.1	1E-148	167.2	109.6	154.2	51.4	43.6	72.9	-1.2	4E-03	1E+00	
Solyc01g111570.1.1	AT2G16750.1	2E-144	46.4	37.4	45.7	14.4	12.3	23.7	-1.2	6E-03	1E+00	
Solyc02g087350.1.1	AT3G28340.1	2E-136	3.2	2.2	15.1	3.3	2.0	2.7	-1.2	7E-03	5E-01	
Solyc01g095530.1.1	AT5G41761.1	1E-17	34.6	23.8	28.6	15.9	3.4	14.9	-1.2	8E-03	1E+00	
Solyc12g099930.1.1	AT2G13360.1	0E+00	251.5	95.2	117.8	89.2	18.9	73.8	-1.2	7E-03	7E-01	
Solyc02g092560.1.1	AT5G67385.1	0E+00	106.9	67.3	105.7	33.5	19.9	55.3	-1.2	4E-03	1E+00	
Solyc01g091530.1.1	AT3G60900.1	3E-149	83.5	39.1	51.6	31.1	12.0	24.0	-1.3	5E-03	1E+00	
Solyc01g080070.1.1	AT3G06130.1	1E-102	22.7	21.1	28.4	8.5	6.0	13.0	-1.3	5E-03	1E+00	
Solyc12g055840.1.1	AT1G32860.1	4E-137	28.6	25.5	26.8	9.8	7.1	13.7	-1.3	5E-03	1E+00	
Solyc05g054750.1.1	AT3G55240.1	1E-24	9.4	20.0	15.4	4.6	4.4	7.8	-1.3	6E-03	1E+00	
Solyc04g024780.1.1	AT1G23710.1	4E-49	3.3	2.6	10.0	3.4	1.2	1.3	-1.3	1E-02	2E-01	
Solyc06g059740.1.1	AT1G77120.1	2E-178	3.8	5.6	25.2	4.0	4.0	4.6	-1.3	2E-03	3E-02	
Solyc02g092600.1.1	AT5G67385.1	2E-64	11.2	9.2	11.8	3.2	2.1	6.4	-1.3	5E-03	1E+00	

Solyc ID	AGI Code	BLAST	LP							logFC	q-Wert	K
			K1	K2	K3	P1	P2	P3				
Solyc07g006910.1.1	AT5G55950.1	2E-130	17.2	11.8	10.7	4.6	4.9	4.8	-1.3	5E-03	5E-01	
Solyc06g036640.1.1	AT5G28910.2	0E+00	34.1	21.2	37.1	12.9	9.0	11.2	-1.3	2E-03	1E+00	
Solyc01g110360.1.1	AT2G21330.1	0E+00	440.4	360.0	492.3	96.0	57.7	309.7	-1.4	1E-03	1E+00	
Solyc12g096080.1.1	AT4G34131.1	6E-41	19.1	9.1	12.4	6.1	1.1	7.4	-1.4	5E-03	2E-01	
Solyc03g093540.1.1	AT5G51190.1	1E-41	4.2	5.3	8.1	2.6	1.8	1.8	-1.4	8E-03	8E-01	
Solyc03g097380.1.1	AT5G63530.1	2E-92	14.6	20.1	23.7	4.0	5.8	10.7	-1.4	2E-03	1E+00	
Solyc11g008680.1.1	AT3G02630.1	2E-178	1.9	1.5	7.1	1.1	1.3	1.2	-1.4	9E-03	7E-01	
Solyc05g009270.1.1	AT1G25450.1	0E+00	13.7	18.2	15.2	4.8	3.2	8.5	-1.4	3E-03	2E-01	
Solyc02g064720.1.1	AT5G67385.1	0E+00	15.5	15.2	12.7	5.0	3.5	6.8	-1.4	3E-03	1E+00	
Solyc02g094190.1.1	AT3G01930.1	0E+00	41.2	27.6	57.6	14.4	8.8	20.3	-1.4	6E-04	4E-01	
Solyc11g044360.1.1	AT4G38160.1	1E-120	15.8	15.7	14.2	5.1	4.8	5.7	-1.4	2E-03	1E+00	
Solyc09g092500.1.1	AT4G15550.1	3E-127	3.2	1.9	9.2	0.9	0.7	3.3	-1.4	3E-03	1E+00	
Solyc12g099780.1.1	AT1G67870.1	1E-14	77.0	60.7	35.5	26.9	21.8	10.2	-1.4	1E-03	1E+00	
Solyc03g119550.1.1	AT1G21880.2	2E-57	8.6	4.4	10.2	2.1	1.8	3.9	-1.4	2E-03	1E+00	
Solyc06g005980.1.1	AT2G29690.1	0E+00	7.0	4.6	10.7	2.8	0.9	3.7	-1.5	2E-03	3E-01	
Solyc09g014400.1.1	AT5G01260.2	5E-44	7.9	6.4	24.2	4.4	2.2	6.0	-1.5	3E-04	1E+00	
Solyc07g042100.1.1	AT1G17400.1	2E-30	8.1	8.6	8.8	1.9	1.5	4.9	-1.5	2E-03	1E+00	
Solyc03g093560.1.1	AT5G51190.1	4E-44	5.5	5.6	13.0	3.1	2.7	1.9	-1.5	9E-04	4E-01	
Solyc02g069490.1.1	AT3G19820.1	0E+00	35.4	35.6	21.2	10.6	4.9	13.5	-1.5	4E-04	1E-01	
Solyc03g120790.1.1	AT1G15260.1	2E-17	6.5	6.4	6.0	1.6	1.6	2.7	-1.5	2E-03	5E-01	
Solyc10g006800.1.1	AT5G54250.1	0E+00	24.5	18.9	30.9	4.4	5.5	12.5	-1.6	1E-04	1E+00	
Solyc08g078170.1.1	AT4G17500.1	7E-44	1.5	2.1	4.7	0.3	0.4	1.7	-1.6	7E-03	1E-02	
Solyc07g006600.1.1	AT5G57685.1	2E-29	0.5	0.7	5.4	0.6	0.9	0.4	-1.6	5E-03	2E-01	
Solyc00g323130.1.1	AT1G70830.1	5E-63	35.8	11.1	9.5	7.4	1.8	7.6	-1.6	3E-04	4E-02	
Solyc02g078450.1.1	AT2G20740.1	4E-51	10.3	6.3	11.0	3.3	1.4	3.4	-1.6	3E-04	1E+00	
Solyc05g007690.1.1	AT5G15310.1	4E-73	1.6	3.8	3.9	0.1	0.3	2.2	-1.7	5E-03	1E+00	
Solyc09g065660.1.1	AT3G22830.1	7E-100	7.0	3.9	11.8	3.3	1.3	1.7	-1.7	2E-04	3E-02	
Solyc12g005400.1.1	AT5G15410.1	0E+00	59.7	40.3	50.3	10.7	11.8	18.8	-1.7	1E-05	1E+00	
Solyc06g051750.1.1	AT5G05690.1	0E+00	41.2	31.0	18.8	9.1	7.8	7.8	-1.8	3E-05	5E-01	
Solyc03g093390.1.1	AT1G65680.1	2E-78	84.0	51.0	80.2	20.1	4.9	32.9	-1.8	7E-06	1E+00	
Solyc04g018090.1.1	AT2G01980.1	3E-92	2.5	1.9	3.1	0.7	0.5	0.8	-1.8	4E-03	1E+00	
Solyc01g099260.1.1	AT3G05345.1	1E-80	4.7	3.4	3.1	1.2	0.6	1.1	-1.8	1E-03	1E+00	
Solyc12g008800.1.1	AT5G56840.1	3E-40	3.3	3.8	1.8	0.8	0.4	1.2	-1.8	3E-03	1E+00	
Solyc12g088390.1.1	AT1G27730.1	4E-38	6.3	12.3	34.8	4.6	3.6	5.6	-1.8	3E-06	2E-01	
Solyc00g280110.1.1	AT3G55240.1	2E-16	1.6	3.6	3.1	0.5	0.3	1.3	-1.9	2E-03	1E+00	
Solyc07g008430.1.1	AT5G57123.1	8E-17	1.1	1.6	6.4	0.9	0.3	1.0	-1.9	5E-04	7E-02	
Solyc10g085880.1.1	AT2G36780.1	2E-109	1.3	1.8	1.6	0.3	0.2	0.6	-1.9	1E-02	1E+00	
Solyc11g020860.1.1	AT1G30260.1	2E-13	10.2	6.0	11.9	2.0	1.4	3.3	-1.9	8E-06	1E+00	
Solyc10g008160.1.1	AT5G44190.1	2E-43	3.2	2.0	2.9	0.4	0.9	0.5	-2.1	3E-04	1E+00	
Solyc05g009950.1.1	AT1G26100.1	2E-79	1.9	1.2	1.7	0.4	0.1	0.5	-2.1	8E-03	1E+00	
Solyc03g093180.1.1	AT3G47430.1	5E-94	1.5	1.0	2.1	0.3	0.1	0.6	-2.1	2E-03	5E-01	
Solyc02g090990.1.1	AT4G36950.1	7E-84	0.7	0.9	7.7	0.4	0.3	1.2	-2.2	4E-05	1E-01	
Solyc10g084430.1.1	AT5G02750.1	3E-64	2.2	1.2	5.9	0.9	0.3	0.6	-2.2	1E-05	1E+00	
Solyc07g054750.1.1	AT4G10270.1	3E-26	0.4	1.8	13.4	0.7	1.5	0.7	-2.3	3E-07	6E-02	
Solyc02g081820.1.1	AT5G44730.1	2E-90	0.5	0.3	3.1	0.2	0.1	0.4	-2.3	4E-03	2E-02	
Solyc03g113460.1.1	AT2G47130.1	3E-68	0.7	0.3	3.0	0.3	0.2	0.2	-2.3	2E-03	1E+00	
Solyc03g113130.1.1	AT5G15120.1	8E-72	0.0	0.3	2.7	0.0	0.3	0.1	-2.5	3E-03	1E-01	
Solyc01g107460.1.1	AT2G15020.1	1E-40	7.7	3.0	7.1	0.9	0.2	1.2	-2.8	3E-10	2E-01	
Solyc12g005750.1.1	AT4G15248.1	2E-21	0.1	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	-4.9	1E-03	1E+00	

Tab. 7-6: Übersicht – Verteilung der BINs für $q < 0.01$ in Prozent, absolute Genanzahl in Klammern; absolut regulierte Gene in rot (reprimiert)/grün (induziert); n. p. für nicht präsenzte BINs (PS = Photosynthese, AS-Metabolismus = Aminosäure-Metabolismus, CHO-Metabolismus = Kohlenhydrat-Metabolismus, OPP = oxidativer Pentose-Phosphat-Stoffwechsel)

BIN Nr.	BINs	SPs [Gene]		LP [Gene]		gemeinsame [Gene]	
1	PS	6% [3]	3	5% [13]	11	2	n.p.
2+3	CHO Metabolismus	n.p.		2% [6]	4	2	n.p.
4	Glykolyse	n.p.		0% [1]	1		n.p.
5	Fermentation	4% [2]	2	0% [1]		1	n.p.
6	Gluconeogenese/Glyoxylat-Zyklus	n.p.		0% [1]	1		n.p.
7	OPP	n.p.		0% [1]	1		n.p.
10	Zellwand	8% [4]	4	1% [3]		3	n.p.
11	Lipid-Metabolismus	4% [2]	2	2% [6]	5	1	11% [2] 2
13	AS-Metabolismus	n.p.		3% [8]	6	2	n.p.
15	Handhabung metall. Stoffe	n.p.		1% [2]	1	1	11% [2] 2
16	Sekundärmetabolismus	2% [1]	1	7% [19]	18	1	22% [4] 4
17	Hormon-Metabolismus	14% [7]	4	6% [16]	9	7	11% [2] 2
18	Kofaktor/Vitamin-Metabolismus	n.p.		1% [2]	1	1	n.p.
20	Stress	2% [1]	1	5% [14]	11	3	n.p.
21	Redox	n.p.		1% [3]	2	1	n.p.
23	Nukleotid-Metabolismus	n.p.		1% [2]	1	1	n.p.
24	Biodegradation von Xenobiotika	n.p.		0% [1]	1		n.p.
26	Diverse	2% [1]	1	11% [30]	24	6	6% [1] 1
27	RNA-transkriptionelle Regulation	10% [5]	4	7% [20]	12	8	6% [1] 1
28	DNA-Regulation	n.p.		1% [3]	2	1	n.p.
29	Protein-Regulation	14% [7]	4	10% [27]	25	2	n.p.
30	Signaltransduktion	8% [4]	4	6% [15]	12	3	6% [1] 1
31	Zelluläre Organisation	2% [1]	1	0% [1]		1	6% [1] 1
33	Entwicklung	8% [4]	4	3% [9]	7	2	6% [1] 1
34	Transport	2% [1]		5% [14]	10	4	n.p.
35	nicht zugeordnet	14% [7]	4	19% [52]	33	19	17% [3] 3

Tab. 7-7: Enrichment-Analyse I – Genlisten des Vergleichs von Pathogen-Microarrays mit RNA-Seq-Daten aus LP (Navarro et al., 2004a; Thilmony et al., 2006)

fig22 1h		fig22 3h			DC3000 7h	DC3000 24h
AT1G03230	AT3G07600	AT1G03230	AT3G02360	AT5G44730	AT1G15260	AT1G15260
AT1G15010	AT3G11840	AT1G15260	AT3G02630	AT5G48930	AT1G17420	AT1G17420
AT1G15260	AT3G14067	AT1G17230	AT3G05170	AT5G50400	AT1G21270	AT1G21880
AT1G17420	AT3G19820	AT1G17420	AT3G05500	AT5G54250	AT1G21880	AT1G25450
AT1G19610	AT3G21190	AT1G19610	AT3G06130	AT5G54770	AT1G25450	AT1G27730
AT1G21270	AT3G22910	AT1G21140	AT3G07600	AT5G55050	AT1G27730	AT1G29670
AT1G21880	AT3G23730	AT1G21270	AT3G11840	AT5G58950	AT1G29670	AT1G51680
AT1G23710	AT3G26300	AT1G21880	AT3G12500	AT5G63530	AT1G51680	AT1G52190
AT1G25450	AT3G28340	AT1G23710	AT3G14067	AT5G64410	AT1G52190	AT1G52720
AT1G27100	AT3G47430	AT1G25450	AT3G19820	AT5G66850	AT1G52720	AT1G58360
AT1G27730	AT3G50740	AT1G27100	AT3G21190	AT5G67360	AT1G58360	AT1G66230
AT1G28130	AT3G52450	AT1G27730	AT3G23730	AT5G67470	AT1G66230	AT2G21330
AT1G29670	AT3G53260	AT1G28130	AT3G26300		AT2G21330	AT2G37040
AT1G30260	AT3G61220	AT1G29670	AT3G28340		AT2G39030	AT2G39030
AT1G33590	AT4G15550	AT1G30260	AT3G47430		AT2G39530	AT2G45810
AT1G43710	AT4G15610	AT1G33590	AT3G50740		AT2G45810	AT3G05500
AT1G51680	AT4G15630	AT1G51680	AT3G52450		AT3G05500	AT3G14067
AT1G51920	AT4G16820	AT1G51920	AT3G53260		AT3G14067	AT3G22910
AT1G52190	AT4G17500	AT1G52190	AT3G54040		AT3G26300	AT3G26300
AT1G52200	AT4G23030	AT1G52200	AT3G61220		AT3G47090	AT3G50740
AT1G52720	AT4G23470	AT1G52720	AT3G62550		AT3G47430	AT3G62550
AT1G58360	AT4G26500	AT1G52760	AT4G15093		AT3G50740	AT4G17500
AT1G60420	AT4G32650	AT1G55020	AT4G15550		AT3G62550	AT4G36220
AT1G61560	AT4G36380	AT1G60420	AT4G15610		AT4G17500	AT4G39330
AT1G64760	AT4G38160	AT1G61560	AT4G15630		AT4G23470	AT5G01750
AT1G65960	AT4G39330	AT1G65960	AT4G16820		AT4G36220	AT5G13930
AT1G66230	AT4G39830	AT1G66230	AT4G17500		AT4G39330	AT5G44190
AT1G71697	AT5G01260	AT1G67870	AT4G17800		AT5G02020	AT5G48930
AT1G75410	AT5G01750	AT1G71697	AT4G23030		AT5G03700	AT5G53750
AT1G76360	AT5G02020	AT2G01670	AT4G23470		AT5G15050	AT5G64410
AT2G01300	AT5G03700	AT2G01980	AT4G26500		AT5G44190	
AT2G01670	AT5G05340	AT2G13360	AT4G32650		AT5G48930	
AT2G16750	AT5G05690	AT2G16750	AT4G34050		AT5G55050	
AT2G23810	AT5G13930	AT2G21330	AT4G36220		AT5G64410	
AT2G28710	AT5G15050	AT2G23810	AT4G38160		AT1G15260	
AT2G31980	AT5G15310	AT2G24260	AT4G39330		AT1G17420	
AT2G32300	AT5G15410	AT2G28710	AT4G39830		AT1G21270	
AT2G35910	AT5G17650	AT2G29690	AT5G01750		AT1G21880	
AT2G36210	AT5G19090	AT2G35910	AT5G02020		AT1G25450	
AT2G36690	AT5G44190	AT2G36210	AT5G02070		AT1G27730	
AT2G37040	AT5G47530	AT2G36690	AT5G03700		AT1G29670	
AT2G38870	AT5G50400	AT2G37040	AT5G05340		AT1G51680	
AT2G39530	AT5G51190	AT2G38870	AT5G05690		AT1G52190	
AT2G41970	AT5G54250	AT2G39030	AT5G13930		AT1G52720	
AT2G45810	AT5G63530	AT2G39530	AT5G15050		AT1G58360	
AT2G46140	AT5G64410	AT2G40890	AT5G15310		AT1G66230	
AT2G47130	AT5G66850	AT2G45810	AT5G15410		AT2G21330	
AT3G01930	AT5G67360	AT2G46140	AT5G16080		AT2G39030	
AT3G02360	AT5G67470	AT2G47130	AT5G22890		AT2G39530	
AT3G05500		AT3G01930	AT5G44190		AT2G45810	

Tab. 7-8: Enrichment-Analyse II – Genlisten des Vergleichs von Microarray-Daten aus Whalley et al. (2011) mit RNA-Seq-Daten aus LP

Transienter Puls	Oszillation
AT1G09930	AT1G09930
AT1G17420	AT1G17420
AT1G51680	AT1G51680
AT1G52200	AT1G52200
AT1G77120	AT1G76360
AT2G02990	AT2G02990
AT2G41480	AT2G29690
AT2G46140	AT2G31980
AT3G05170	AT2G41480
AT3G05500	AT2G46140
AT3G62550	AT3G05170
AT5G02070	AT3G05500
	AT3G62550
	AT5G02070
	AT5G15050

7.5 Chop2-Sequenzen

Die angegebenen Sequenzen beziehen sich auf die Aminosäuren 1-315 des Vollängenproteins Channelrhodopsin-2 mit C-terminaler YFP-Fusion in 5'-3'-Richtung. Unterstrichen sind die jeweiligen Startcodons (ATG) der einzelnen Proteine. Tab. 7-9 zeigt zudem die eingefügten Mutationen in den Aminosäuren 128, 132 und 156 der verwendeten Chop2-Mutanten C128A, C128T, D156A, D156C und L132C.

Chop2₃₁₅-YFP

1	<u>ATGGATTATG</u>	GAGGCGCCCT	GAGTGCCGTT	GGGCGCGAGC	TGCTATTTGT
51	<u>AACGAACCCA</u>	GTAGTCGTCA	ATGGCTCTGT	ACTTGTGCCT	GAGGACCAGT
101	<u>GTTACTGCGC</u>	GGGCTGGATT	GAGTCGCGTG	GCACAAACGG	TGCCCAAACG
151	<u>GCGTCGAACG</u>	TGCTGCAATG	GCTTGCTGCT	GGCTTCTCCA	TCCTACTGCT
201	<u>TATGTTTTAC</u>	GCCTACCAAA	CATGGAAGTC	AACCTGCGGC	TGGGAGGAGA
251	<u>TCTATGTGTG</u>	CGCTATCGAG	ATGGTCAAGG	TGATTCTCGA	GTTCTTCTTC
301	<u>GAGTTTAAGA</u>	ACCCGTCCAT	GCTGTATCTA	GCCACAGGCC	ACCGCGTCCA
351	<u>GTGGTTGCGT</u>	TACGCCGAGT	GGCTTCTCAC	CTGCCCGGTC	ATTCTCATTC
401	<u>ACCTGTCAAA</u>	CCTGACGGGC	TTGTCCAACG	ACTACAGCAG	GCGCACCATG
451	<u>GGTCTGCTTG</u>	TGTCTGATAT	TGGCACAATT	GTGTGGGGCG	CCACTTCCGC
501	<u>CATGGCCACC</u>	GGATACGTCA	AGGTCATCTT	CTTCTGCCTG	GGTCTGTGTT
551	<u>ATGGTGCTAA</u>	CACGTTCTTT	CACGCTGCCA	AGGCCTACAT	CGAGGGTTAC
601	<u>CACACCGTGC</u>	CGAAGGGCCG	GTGTCGCCAG	GTGGTGACTG	GCATGGCTTG
651	<u>GCTCTTCTTC</u>	GTATCATGGG	GTATGTTCCC	CATCCTGTTC	ATCCTCGGCC
701	<u>CCGAGGGCTT</u>	CGGCGTCCTG	AGCGTGTACG	GCTCCACCGT	CGGCCACACC
751	<u>ATCATTGACC</u>	TGATGTCGAA	GAACTGCTGG	GGTCTGCTCG	GCCACTACCT
801	<u>GCGCGTGCTG</u>	ATCCACGAGC	ATATCCTCAT	CCACGGCGAC	ATTCGCAAGA
851	<u>CCACCAAATT</u>	GAACATTGGT	GGCACTGAGA	TTGAGGTCTGA	GACGCTGGTG
901	<u>GAGGACGAGG</u>	CCGAGGCTGG	CGCGGTACCC	GCGGCCGCCA	CCATGGTGAG
951	<u>CAAGGGCGAG</u>	GAGCTGTTCA	CCGGGGTGGT	GCCCATCCTG	GTCTGAGCTGG
1001	<u>ACGGCGACGT</u>	AAACGGCCAC	AAGTTCAGCG	TGTCCGGCGA	GGGCGAGGGC
1051	<u>GATGCCACCT</u>	ACGGCAAGCT	GACCCTGAAG	TTCATCTGCA	CCACCGGCAA
1101	<u>GCTGCCCGTG</u>	CCCTGGCCCA	CCCTCGTGAC	CACCTTCGGC	TACGGCCTGC
1151	<u>AGTGCTTCGC</u>	CCGTACCCC	GACCACATGA	AGCAGCACGA	CTTCTTCAAG
1201	<u>TCCGCCATGC</u>	CCGAAGGCTA	CGTCCAGGAG	CGCACCATCT	TCTTCAAGGA
1251	<u>CGACGGCAAC</u>	TACAAGACCC	GCGCCGAGGT	GAAGTTCGAG	GGCGACACCC
1301	<u>TGGTGAACCG</u>	CATCGAGCTG	AAGGGCATCG	ACTTCAAGGA	GGACGGCAAC
1351	<u>ATCCTGGGGC</u>	ACAAGCTGGA	GTACAACCTAC	AACAGCCACA	ACGTCTATAT
1401	<u>CATGGCCGAC</u>	AAGCAGAAGA	ACGGCATCAA	GGTGAACCTC	AAGATCCGCC
1451	<u>ACAACATCGA</u>	GGACGGCAGC	GTGCAGCTCG	CCGACCACTA	CCAGCAGAAC
1501	<u>ACCCCATCG</u>	GCGACGGCCC	CGTGCTGCTG	CCCGACAACC	ACTACCTGAG
1551	<u>CTACCAGTCC</u>	GCCCTGAGCA	AAGACCCCAA	CGAGAAGCGC	GATCACATGG
1601	<u>TCCTGCTGGA</u>	GTTCGTGACC	GCCGCCGGGA	TCACTCTCGG	CATGGACGAG
1651	<u>CTGTACAAGT</u>	AA			

Tab. 7-9: Mutationen der verwendeten Chop2-Varianten

Chop2	AS 128	AS 156	AS 132
WT	TGC	GAT	CTC
C128T	ACC	-	-
C128A	GCC	-	-
D156A	-	GCT	-
D156C	-	TGT	-
L132C	-	-	TGC

Posterpräsentationen

Melanie Baumann, Christoph Stangl, Ronnie Gueta, Georg Nagel & Dirk Becker
"Simulation and analysis of Calcium signatures in plants"
Regulation of Plant Growth, Potsdam (2010)

Melanie Baumann, Ronnie Gueta, Georg Nagel & Dirk Becker
"Simulation and Analysis of Electrical Signals in Plants"
Plant Calcium Signaling Meeting (2010)

Melanie Baumann, Ronnie Gueta, Georg Nagel & Dirk Becker
"Functional expression of Channelrhodopsin-2 in Plants"
Botanikertagung, Berlin (2011)

Melanie Baumann, Ronnie Gueta, Georg Nagel & Dirk Becker
"Functional expression of Channelrhodopsin-2 in Plants"
Molecular Interactions, Berlin (2011)

Mein Dank geht an

PD. Dr. Dirk Becker und Prof. Dr. Georg Nagel für die interessante Themenstellung, die gute Betreuung während meiner Doktorarbeit sowie die Ermöglichung einer sehr eigenständigen Arbeitsweise.

Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und die hilfreichen Anregungen und Diskussionen zur Gestaltung der Experimente.

Prof. Dr. Andreas Weber, der sich freundlicherweise als Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat.

Dr. Andrea Bräutigam und Simon Schliesky für die Durchführung der RNA-Seq- und Enrichment-Analysen.

Doris Waffler und Frieda Reisberg, die in allen Belangen zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Dr. Christina Larisch, Dr. Patrick Mumm und Dr. Ronnie Gueta, die mir beim Korrekturlesen der Arbeit behilflich waren.

Alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Hedrich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft untereinander. Ein besonderer Dank gilt hierbei auch Joachim Rothenhöfer für die Pflanzenanzucht.

Meine Familie und meinen Freund Andi, die mich auch in den (zahlreichen) nervenaufreibenden Phasen immer bedingungslos unterstützt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

