

**Charakterisierung des Channelrhodopsin-2
aus *Chlamydomonas reinhardtii*
als nicht-invasives, optogenetisches
Werkzeug zur funktionellen Analyse
elektrischer Signale in Pflanzen**



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

vorgelegt
von
Antonella Reyer
aus Würzburg

Würzburg

2020



Charakterisierung des Channelrhodopsin-2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* als nicht-invasives, optogenetisches Werkzeug zur funktionellen Analyse elektrischer Signale in Pflanzen

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

vorgelegt von

Antonella Reyer

(Vor- und Familienname)

Würzburg

(Geburtsort)

Würzburg, 2020

(Erscheinungsjahr der Dissertation)

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Dirk Becker

Gutachter: PD Dr. Susanne Berger

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Ebenso wie Tiere verfügen Pflanzen über die Fähigkeit elektrische Signale zu generieren. Dabei repräsentieren elektrische Signale – Membranpotentialänderungen an der Plasmamembran – die frühesten Antworten, welche an Pflanzenzellen im Zuge veränderter externer und intrinsischer Bedingungen beobachtet werden können. Stimuli wie Kälte, Hitze, Verwundung, Herbivorie und Pathogene, aber auch physiologische Prozesse, wie Wachstum und Bestäubung führen zur Änderung des Potentials der Plasmamembran pflanzlicher Zellen. Die meisten dieser Membranpotentialänderungen bestehen aus einer schnellen Depolarisation, gefolgt von einer Repolarisation des Membranpotentials, deren Kinetik, in Abhängigkeit des Stimulus hoch variabel sein kann. Das Wissen über die molekularen Grundlagen der Generierung und Weiterleitung elektrischer Signale in Pflanzen ist im Gegensatz zu Tieren nur wenig verstanden. Eine Ausnahme stellen ‚klassisch-erregbare‘ Pflanzen wie die Venusfliegenfalle oder die Mimose dar. In diesen Pflanzen führt ein Berührungsreiz zur Auslösung eines charakteristischen Aktionspotentials, welches in der Folge zu einer, auf differentiellen Turgoränderungen basierenden, nastischen Bewegung führt. In allen anderen Pflanzen ist die Kinetik der Membranpotentialänderungen sehr variabel, abhängig vom Stimulus und dem physiologischen Zustand der Zellen und – mit Ausnahme der Reaktion auf einen Kältestimulus – lediglich nach langen Latenzzeiten wiederholbar. Dieser Umstand verhindert eine systematische Analyse der molekularen Basis elektrischer Signale in den meisten Pflanzen. Ziel dieser Arbeit war es daher, auf der Basis des Channelrhodopsin-2 (ChR2) aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, welches bereits seit 2005 in der Neurobiologie genutzt wird, ein nicht-invasives Werkzeug zur funktionellen Analyse elektrischer Signale in Pflanzen zu etablieren. ChR2 ist ein Blaulicht-aktivierter Kationenkanal, der für seine Funktion all trans-Retinal als Cofaktor benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Varianten des ChR2, mit einem Schwerpunkt auf ChR2-C128T und vor allem ChR2-D156C, auch bekannt als ChR2-XXL eingesetzt. ChR2 konnte bereits durch M. Baumann im Rahmen ihrer Dissertation funktionell im transienten Expressionssystem *Nicotiana benthamiana* dargestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das System weiter ausgebaut und die besonders aussichtsreichen ChR2-Varianten nicht nur in *N. benthamiana*, sondern auch in stabilen *Arabidopsis thaliana* Linien funktionell charakterisiert. Dabei konnte mit dem ChR2-XXL ein geeignetes optogenetisches Werkzeug zur Untersuchung elektrischer Signale in Pflanzen identifiziert werden. ChR2-XXL bietet die Möglichkeit das Membranpotential durch kurze, 5 s Blaulichtpulse im Mittel um 95 mV zu depolarisieren und im Anschluss die Repolarisationsphase zu untersuchen. Blaulicht-induzierbare, ChR2-XXL-vermittelte Depolarisationen konnten, reproduzierbar und beliebig oft an den gleichen Zellen wiederholt ausgelöst werden. Dadurch ermöglicht ChR2-XXL die bisher nur unzureichend

bekanntes molekulare Komponenten der Repolarisation des Membranpotentials in Pflanzen zu erforschen. In tierischen Zellen generieren spannungsabhängige Natriumkanäle die Depolarisation, während spannungsabhängige Kaliumkanäle die Depolarisationskinetik bestimmen. Die im Vergleich zu tierischen Zellen veränderten Ionengradienten lassen vermuten, dass die pflanzliche Depolarisation im Wesentlichen durch Ca^{2+} -abhängige Anionenkanäle vermittelt wird, die durch den Efflux von Cl^- das Membranpotential depolarisieren. Für die Repolarisation wird zum einen die Beteiligung von auswärtsgerichteten Kaliumkanälen postuliert. Zum anderen wird auch eine Beteiligung der Plasmamembran (PM) H^+ -ATPasen vermutet, welche gleichzeitig einen essentiellen Beitrag zur Generierung des Ruhepotentials leisten. In der vorliegenden Arbeit wurde es durch den Einsatz von ChR2-XXL möglich, beide potentiellen Komponenten der Repolarisationsphase, Kaliumkanäle und PM H^+ -ATPasen, erstmals durch eine nicht-invasive, Anionen-unabhängige Methode der Depolarisation zu untersuchen. Durch den Einsatz von Mutanten und Kaliumkanalinhibitoren konnte ein möglicher Beitrag des auswärtsgerichteten Kaliumkanals *Arabidopsis thaliana* GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K^+ CHANNEL (AtGORK) an der Repolarisationsphase in Arabidopsis Mesophyllzellen nahezu ausgeschlossen werden. Der auswärtsgerichtete Kaliumkanal GORK öffnet erst bei Membranpotentialen positiv vom Gleichgewichtspotential für Kaliumionen (E_K (-118 mV)). Da die ChR2-induzierbaren Depolarisationen ebenso wie viele natürliche Stimuli, diesen Wert kaum erreichen oder nur geringfügig überschreiten, leistet der GORK einen geringfügigen Beitrag bei der Repolarisation. Dies ließ vermuten, dass die Repolarisation von E_K bis zum Ruhepotential bei ca. -180 mV dagegen möglicherweise durch die PM H^+ -ATPasen bewerkstelligt wird. Die Wirkung des PM H^+ -ATPase Inhibitors Natriumorthovanadat, sowie des PM H^+ -ATPase Aktivators Fusicoccin auf die Repolarisationsphase konnten diese Hypothese unterstützen. Die Hemmung der PM H^+ -ATPasen verlangsamte die Repolarisationskinetik während eine Aktivierung der PM H^+ -ATPasen diese beschleunigte. So wurde es erstmals möglich den genauen Einfluss der PM H^+ -ATPasen auf Wiederherstellung des Membranpotentials während der Repolarisation in Mesophyllzellen zu studieren. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass in Gegenwart des Kaliumkanalblockers Ba^{2+} die Repolarisation ebenfalls beschleunigt werden konnte. In Übereinstimmung mit dem ‚Pump-and-Leak‘-Modell (Alberts et al. 2002) deutet dies darauf hin, dass schwach einwärtsgerichtete Kaliumkanäle, wie der ARABIDOPSIS K^+ TRANSPORTER 2 (AKT2) dem PM H^+ -ATPasen Protonengradienten entgegenwirken und somit das Ruhepotential aus der Summe der bewegten Ladungen von Pumpen und Kaliumkanälen bestimmt wird. Das mögliche Potenzial optogenetischer, Rhodopsin-basierter Werkzeuge für die molekulare Analyse elektrischer Signale, insbesondere unter Einsatz der breiten Palette lichtgesteuerter Pumpen und Kanäle, ihrer spektralen Diversität und ihrer Einkreuzung in ausgewählte Arabidopsis Mutanten wird diskutiert.

Summary

Like animals, plants have the ability to generate electrical signals – membrane potential changes on the plasma membrane. Electrical signals represent the earliest answers that can be observed in plant cells in the course of changing external and internal conditions. Stimuli such as cold, heat, wounding, herbivory and pathogens, as well as physiological processes such as growth and pollination, lead to changes in the potential of the plasma membrane of plant cells. Most of these membrane potential changes consist of rapid depolarization, followed by repolarization of the membrane potential, the kinetics of which can be highly variable depending on the stimulus. In contrast to animals, knowledge about the molecular basis of the generation and transmission of electrical signals in plants is poorly understood. Exceptions include "classically excitable plants" such as the Venus fly trap or mimosa, in which a touch stimulus leads to the triggering of a characteristic action potential, which subsequently leads to an elastic movement based on differential turgor changes. In all other plants, the kinetics of membrane potential changes are highly variable, depending on the stimulus and the physiological state of the cells and – with the exception of the reaction to a cold stimulus – can only be repeated after long latency periods. This prevents a systematic analysis of the molecular basis of electrical signals in most plants. The aim of this work was therefore to establish a non-invasive tool for the functional analysis of electrical signals in plants based on the channelrhodopsin-2 ChR2 from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, which has been used in neurobiology since 2005. ChR2 is a blue light-activated cation channel that needed all-trans retinal as a cofactor in order to function. In this work, different variants of the ChR2, with a focus on C128T and especially D156C, also known as ChR2-XXL, were used. ChR2 could already be functionally represented by M. Baumann in the context of her dissertation in the transient expression system *Nicotiana benthamiana*. In the present work, the system was expanded and particularly promising ChR2 variants were characterized not only in *N. benthamiana*, but also in stable *Arabidopsis thaliana* lines. The ChR2-XXL identified a suitable optogenetic tool for examining electrical signals in plants. ChR2-XXL offers the possibility to depolarize the membrane potential by short, 5 s blue light pulses on average by 95 mV and then to investigate the repolarization phase. Blue light-inducible, ChR2-XXL-mediated depolarizations could be triggered reproducibly and repeatedly on the same cells as often as desired. ChR2-XXL enables research into the previously inadequate molecular components of the repolarization of the membrane potential in plants. In animal cells, voltage-dependent sodium channels generate depolarization, while voltage-dependent potassium channels determine the depolarization kinetics. The ion gradients changed compared to animal cells suggest that plant depolarization is essentially due to Ca²⁺-dependent anion channels, which depolarize the membrane potential through the efflux of Cl⁻. For repolarization, the involvement of

outward rectifying potassium channels is postulated. On the other hand, participation of PM H⁺-ATPases is also suspected, which at the same time make an essential contribution to the generation of the resting potential. In the present work, the use of ChR2-XXL made it possible for the first time to investigate both potential components of the repolarization phase, potassium channels and PM H⁺-ATPases, using a non-invasive, anion-independent method of depolarization. Through the use of mutants and potassium channel inhibitors, a possible contribution of the outward rectifying potassium channel *Arabidopsis thaliana* GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K⁺ CHANNEL (GORK) to the repolarization phase in *Arabidopsis* mesophyll cells could almost be excluded. The outward-rectifying potassium channel GORK only opens at membrane potentials more positive than the equilibrium potential for potassium ions (E_K (-118 mV)). Since the ChR2-inducible depolarizations, like many natural stimuli, hardly reach this value or only exceed it slightly, GORK makes a minor contribution to repolarization. This suggested that the repolarization from E_K to the resting potential at approximately -180 mV, on the other hand, may be accomplished by PM H⁺-ATPases. The effects of the PM H⁺-ATPase inhibitor sodium orthovanadate and the PM H⁺-ATPase activator fusicoccin on the repolarization phase supported this hypothesis. The repolarization kinetics were slowed by inhibition of the PM H⁺-ATPases and accelerated by their activation. This made it possible for the first time to study the exact influence of the PM H⁺-ATPases on restoring the membrane potential during repolarization in mesophyll cells. It was also observed that repolarization could be accelerated in the presence of the potassium channel blocker Ba²⁺. In accordance with the 'pump-and-leak' model, this indicates that weakly inwardly-rectifying potassium channels, such as the *Arabidopsis* K⁺ Transporter 2 (AKT2) counteract the PM H⁺-ATPase-generated proton gradient and thus the resting potential from the sum of the moving charges of pumps and potassium channels is determined. The potential of optogenetic, rhodopsin-based tools for the molecular analysis of electrical signals, in particular using the wide range of light-controlled pumps and channels, their spectral diversity and their intersection with selected *Arabidopsis* mutants is discussed.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	6
Summary.....	8
1 Einleitung	16
1.1 Elektrische Erregbarkeit.....	16
1.1.1 Grundlagen der zellulären Erregbarkeit.....	17
1.1.2 Elektrische Signale in Pflanzen	19
1.1.2.1 ‚Klassische‘ erregbare Pflanzen.....	20
1.1.2.2 Elektrische Signale im Kontext von biotischem und abiotischem Stress	22
1.1.2.3 Generierung elektrischer Signale in Pflanzen	33
1.2 Optogenetische Werkzeuge zur Generierung elektrischer Signale.....	40
1.2.1 Überblick optogenetische Werkzeuge	40
1.2.1.1 Optogenetische Werkzeuge und Optogenetikdesign.....	41
1.2.1.2 Natürlich vorkommende Licht-gesteuerte Ionenkanäle und Ionenpumpen	43
1.2.2 Channelrhodopsin-2 und seine Mutanten	44
1.3 Zielsetzung.....	47
2 Material und Methoden.....	48
2.1 Molekularbiologische Methoden	48
2.1.1 Allgemeines und verwendete Chemikalien	48
2.1.2 Extraktion genomischer DNA aus Pflanzen	48
2.1.3 Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	49
2.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	49
2.1.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	50
2.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion	50
2.1.7 Agarosegelelektrophorese.....	51
2.1.8 Vektoren.....	52
2.1.9 USER®-Klonierung.....	53
2.1.9.1 Verwendete Primer.....	53
2.1.9.2 Linearisierung der Zielvektoren.....	54
2.1.9.3 DpnI-Verdau der USER©-PCR	54
2.1.9.4 USER©-Reaktion.....	54
2.1.10 Sequenzierung.....	55
2.2 Mikrobiologische Methoden	56
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	56
2.2.1.1 Kulturbedingungen.....	56
2.2.1.2 Transformation mittels Hitzeschock	56
2.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
2.2.2.1 Kulturbedingungen.....	57

2.2.2.2	Transformation mittels Elektroporation.....	57
2.3	Pflanzen und Anzuchtbedingungen.....	58
2.3.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	58
2.3.1.1	Generelles	58
2.3.1.2	Anzucht und Kultur im Weißlicht.....	59
2.3.1.3	Anzucht und Kultur im Rotlicht	59
2.3.2	<i>Nicotiana benthamiana</i>	59
2.4	Transformation von Pflanzen	59
2.4.1	Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	60
2.4.2	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
2.5	Mikroskopische Methoden	62
2.5.1	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop.....	62
2.5.2	Digitales Automatikmikroskop	62
2.6	Anregungslichtquelle.....	63
2.7	Elektrophysiologische Methoden	64
2.7.1	Einstichmessungen in Mesophyll.....	64
2.7.1.1	Generelles	64
2.7.1.2	Aufbau des Messplatzes.....	64
2.7.1.3	Verwendete Lösungen	65
2.7.1.4	Einstichelektroden.....	66
2.7.1.5	Durchführung.....	66
2.7.1.6	Normierung des Membranpotentials.....	68
2.7.1.7	Ermittlung der Depolarisationszeitpunkte	68
2.7.2	Oberflächenelektrodenmessungen.....	68
3	Ergebnisse	70
3.1	Kälte Stimuli erzeugen transiente Depolarisationen in Mesophyllzellen.....	70
3.2	Licht induziert eine Membranpotential-Depolarisation in Mesophyllzellen.....	72
3.2.1	<i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen reagieren mit einer spezifischen Blaulicht-abhängigen Depolarisation.....	73
3.3	Die Applikation von H ₂ O ₂ führt zu einer Depolarisation in <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen	79
3.4	Der Verlust von GORK führt nicht zu einer Veränderung der Repolarisationskinetik nach Depolarisation durch Blaulicht-Stimuli.....	81
3.5	Elektrophysiologische Eigenschaften transient exprimierter ChR2 Varianten in <i>N. benthamiana</i>	85
3.5.1	Oberflächenelektroden.....	87
3.5.2	Charakterisierung von ChR2-Mutanten in <i>N. benthamiana</i> mit der Einstichmessmethode.....	89
3.6	Elektrophysiologische Eigenschaften von ChR2 in stabilen <i>Arabidopsis</i> Transformanten	94
3.6.1	Kultivierung unter Rotlichtregime als optimale Wachstumsbedingungen für Channelrhodopsin-2 Pflanzen	94

3.6.2	Die externe Retinalzufuhr wird auch <i>in planta</i> für die Funktion des Channelrhodopsin-2 benötigt	95
3.6.3	Die ChR2-Mutanten C128T und D156C weisen spezifische Charakteristika bei der stabilen Expression in <i>Arabidopsis</i> auf	98
3.6.4	Oberflächenelektroden	105
3.7	Beteiligung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen an der Repolarisation ..	108
3.8	Die PM-H ⁺ -ATPasen als Hauptkomponente der Repolarisation	111
4	Diskussion	120
4.1	Blaulicht-abhängige und Kälte-induzierte Depolarisation in <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyll	121
4.1.1	Änderungen des Membranpotentials als Reaktion auf abiotische Stimuli	121
4.1.2	Blaulicht führt zu einer spezifischen Depolarisation der Plasmamembran von adulten <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen	123
4.1.2.1	Die Blaulicht-abhängige Depolarisation ist unabhängig von der Photosynthese 124	
4.1.2.2	Die Blaulicht-abhängige Depolarisation steht nicht im Kontext mit der ROS Produktion und unterscheidet sich in ihrer Kinetik von der Depolarisation durch externe ROS Zufuhr	124
4.2	Channelrhodopsin-2 als optogenetisches Werkzeug in Pflanzen	127
4.2.1	<i>Nicotiana benthamiana</i> eignet sich als Test- und Modellsystem für Channelrhodopsin-2 in Pflanzen	127
4.2.2	Channelrhodopsin-2 lässt sich stabil in <i>Arabidopsis</i> implementieren	130
4.2.3	Allgemeine Eigenschaften von ChR2 in Pflanzen	132
4.2.4	Unterschiede zwischen ChR2 in <i>A. thaliana</i> und <i>N. benthamiana</i>	133
4.2.5	Einsatz von ChR2 zur Untersuchung elektrischer Signale in Pflanzen	137
4.2.5.1	Vergleich der Depolarisations- und Repolarisationskinetiken natürlicher elektrischer und ChR2-induzierter Signale in <i>Arabidopsis</i>	137
4.2.5.2	Mögliche molekulare Mechanismen der Repolarisation in Pflanzen	138
4.2.5.3	ChR2 als optogenetisches Werkzeug zur Untersuchung der Repolarisation in <i>Arabidopsis</i>	140
4.2.6	Protonen-ATPase und Repolarisation	141
4.3	Ausblick	145
A	Anhang	148
A.1	Zusätzliche Daten	148
A.2	Generation weiterer stabiler ChR2 Pflanzen	150
A.3	Verwendete Chemikalien	152
A.4	Zusammensetzung von Puffern und Medien	155
	Abkürzungsverzeichnis	158
	Literaturverzeichnis	159
	Abbildungsverzeichnis	171

Publikationsliste	175
Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie	176
Danksagung	177

1 Einleitung

Alle Lebewesen teilen sich eine Schnittmenge biochemischer Merkmale. Dazu gehören die Codierung der Erbinformationen auf der Basis von DNA und die Transkription dieser Information als RNA zur Synthese von Proteinen an Ribosomen. Außerdem sind die Zellen aller Lebewesen von einer Zellmembran, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, umgeben (Ausnahme: Lipideinzelschicht bei einigen Archaeen). Die Zellmembran ermöglicht, dass Zellen einen cytoplasmatischen Reaktionsraum darstellen, der sich von der Umwelt abgrenzt und davon differierende Bedingungen aufweisen kann. Die Transporteigenschaften integraler Membranproteine bestimmen die selektive Permeabilität der Membran. Infolge dessen kann es im Inneren der Zellen erst zu einer Anreicherung, Ausscheidung oder Exklusion von Ionen, anorganischen und organischen Substanzen kommen. Sie führt zu dem Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die Membran, welcher ein weiteres biochemisches Merkmal darstellt, das sich alle Lebewesen teilen. Die meisten biologischen Prozesse benötigen diesen Gradienten direkt oder indirekt, da Stoffwechsel, Reizbarkeit, Fortpflanzung und Wachstum darauf basieren. Aufgrund der semipermeablen Eigenschaften der Membran kann dieser Gradient durch die Ungleichverteilung von Stoffkonzentrationen zwischen Zellinnerem und -äußeren an Zellmembranen aufgebaut werden. Diese Differenz im elektrochemischen Potential über die Membran wird als Transmembranpotential definiert, kurz Membranpotential. Der Tod, also das Ende des Lebens einer jeden Zelle, geht mit dem Zusammenbruch dieses Gradienten und damit dem Membranpotentials einher.

1.1 Elektrische Erregbarkeit

Das Membranpotential ist die Grundlage für die Erregbarkeit von Zellen. Zellen können auf intra- und extrazelluläre Stimuli mit einer Änderung des Membranpotentials reagieren (Hille 2001). Kinetik und Amplitude der Potentialänderung können sich drastisch zwischen verschiedenen Zellen unterscheiden und sind darüber hinaus maßgeblich durch die Art des Reizes, der die Änderung hervorgerufen hat, bestimmt. Prinzipiell ist jede Änderung des Membranpotentials auf einen Reiz hin eine Form der elektrischen Erregbarkeit und kann als elektrisches Signal definiert werden. Jedoch ist in der Biologie die Definition für die elektrische Erregbarkeit enger gesteckt, da die Ausformung von Membranpotentialänderungen so divers ist. Laut Hille 2001 gelten Zellen als elektrisch erregbar, wenn sie dazu in der Lage sind, mit einem Aktionspotential auf einen Elektroschock zu reagieren, welcher mindestens zu einer Depolarisation führt, die über das sog. Schwellenpotential hinaus geht (Hille 2001). Ein Aktionspotential ist eine schnelle

(scharfe) Depolarisation mit einem Alles-oder-Nichts Charakter und stereotyper Ausprägung (Hille 2001).

In Tieren (Metazoen) sind vor allem spezialisierte Zellen elektrisch erregbar, dazu gehören in erster Linie Neuronen-, Glia- und Muskelzellen, aber auch die Zellen der Hirnanhangdrüse, α - und β -Zellen des Pankreas, Spermien und Eizellen, sowie die Zellen des Neuroepithels (Hille 2001). Sie sind zur Generation von Aktionspotentialen in der Lage und in Metazoen hauptsächlich für die Signalweiterleitung und Verarbeitung zuständig (Hille 2001). Bei einzelligen Lebewesen und anderen multizellulären Organismen ist die Unterscheidung sehr viel schwieriger. Dies liegt vor allem daran, wie Zellen elektrische Signale erzeugen.

1.1.1 Grundlagen der zellulären Erregbarkeit

Die basale Voraussetzung der zellulären Erregbarkeit ist der elektrochemische Gradient und die Zellmembran, die gleichzeitig Isolator ist und durch ihre Eigenschaften als Membran mit selektiver Permeabilität auch die Verschiebungen von Ionen ermöglicht. Diese selektive Permeabilität wird durch Transmembranproteine erzeugt. Alle Lebewesen besitzen in ihrer Zellmembran Proteine, welche den Austausch von Stoffen mit der Umwelt ermöglichen. Diese lassen sich basierend auf ihrem Transportmechanismus verschiedenen Gruppen zuteilen.

Elektrogene Pumpen, darunter auch Ionenpumpen, nutzen meist die Hydrolyse von ATP, um Stoffe entgegen ihres chemischen Gradienten über die Membran zu transportieren, daher auch der Name membranständige ATPasen. Sie betreiben einen primär aktiven Transport, der über die Spaltung von ATP die benötigte Energie bezieht. Unter diesen sind vor allem die Na^+/K^+ -ATPasen und die Protonen-ATPasen hervorzuheben, denn sie sind maßgeblich am Aufbau des elektrochemischen Gradienten beteiligt. Die Na^+/K^+ -ATPase kommt dabei nur in Tieren vor, während die Protonen-ATPasen vor allem in Pflanzen, Pilzen und manchen Einzellern für den Aufbau des elektrochemischen Gradienten unverzichtbar sind (Rodríguez-Navarro and Benito 2010). Eine weitere wichtige Funktion von Ionenpumpen ist außerdem die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} Homöostase durch Ca^{2+} ATPasen. Dadurch, dass diese Pumpen unter ATP-Verbrauch selektiv für bestimmte Kationen (z.B. Na^+ oder H^+) einen starken Gradienten erzeugen, können die Transportprozesse durch andere Transmembranproteine direkt oder indirekt energetisiert werden.

Eine große Gruppe von Transmembranproteinen sind die Transporter. Transporter haben Bindungstaschen, die die zu transportierenden Stoffe einzeln oder in definierter Anzahl binden und dann durch eine Konformationsänderung im Protein auf die andere Seite der

Membran bringen und dort freigeben. Auch die ATPasen beruhen auf einem solchen Prinzip, mit dem Unterschied, dass diese die zu transportierenden Stoffe auch entgegen eines elektrochemischen Gradienten bewegen können. Transporter nutzen hingegen für ihren Transportmechanismus die „gespeicherte“ Energie eines chemischen Gradienten eines zweiten Ions oder Stoffes, um das Benötigte zu transportieren. Dieser chemische Gradient kann zum Beispiel durch Pumpen aufgebaut werden. Je nach Transportrichtung gliedern sie sich in zwei Gruppen: Die Symporter und die Antiporter. Symporter transportieren beide Ionen/Stoffe in die gleiche Richtung, Antiporter in entgegengesetzte Richtungen (Alberts et al. 2012). Viele Transporter in Pflanzen nutzen den Protonengradienten, der durch die Protonen-ATPase erzeugt wurde, um ein anderes Ion oder Molekül entgegen des chemischen Gradienten für diesen Stoff zu transportieren und so die benötigten Substanzen in der Zelle/Kompartiment an- bzw. abzureichern. Dies ist nicht nur für Ionen wichtig, sondern auch für organische Verbindungen wie Zucker oder Aminosäuren. Ebenfalls für den Transport organischer Moleküle wichtig sind Translokatoren, wie z.B. der Glucose 6-Phosphate/Phosphate Translokator der Membran von Plastiden, der die Aufnahme von Glucose in Plastide ermöglicht (Flügge 1999). Als letztes Transmembranprotein sind sog. ‚Facilitator‘ zu erwähnen. Diese vermitteln sehr selektiv den Durchtritt von ungeladenen Stoffen entlang ihres Gradienten. Beispielsweise sorgen Aquaporine dafür, dass Wasser durch die Membran gelangen kann, ohne den Protonengradienten dabei zu zerstören.

Kationen und Anionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten den Durchtritt durch die Membran zu ermöglichen wird durch Ionenkanäle und -transporter bewerkstelligt. Diese Gruppe umfasst eine Vielzahl von sehr unterschiedlichen Proteinen; ihre Gemeinsamkeit ist, dass mehrere transmembrane Domänen der Proteine eine mehr oder weniger selektive Pore in der Zellmembran bilden. Durch diese Pore können dann Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten die Membran passieren. Da dies ein potentiell bidirektionaler Prozess wäre, ist es wichtig, dass die Öffnung der Kanäle nur unter bestimmten Umständen erfolgt. Dies wird durch vielfältige Mechanismen gesteuert. Wichtige Steuerungsmechanismen sind Bindung von Liganden, Membranspannung, Mechanik, Temperatur und Licht.

Gerade die Ionenpumpen und -kanäle sind für die elektrische Erregbarkeit von Zellen essentiell. Dies ist auch der Grund, warum vor allem im tierischen System die Expression bestimmter Ionenkanäle charakteristisch für elektrisch erregbare Zellen ist. Jeder Zelltyp weist dort ein definiertes Expressionsprofil für Ionenkanäle auf und determiniert damit die elektrischen Signale die dieser Zelltyp erzeugen kann (Hille 2001). Das typische Beispiel einer elektrisch erregbaren Zelle in Tieren ist das Neuron. Die Spezialisierung eines Neurons für die Erzeugung von Aktionspotentialen manifestiert sich sowohl auf genetischer als auch auf morphologischer Ebene.

Das von Neuronen erzeugte Aktionspotential ist sehr gut untersucht und bis in Detail aufgeklärt. Das Ruhepotential tierischer Zellen wird durch die Na^+/K^+ -ATPase aufgebaut und sorgt dafür, dass die Konzentration von Natrium im Extrazellularraum höher ist als im Cytoplasma, dort herrscht eine hohe Kaliumkonzentration (Jorgensen et al. 2003). Die Na^+/K^+ -ATPase transportiert dabei unter ATP-Hydrolyse 2 K^+ aus dem Extrazellularraum ins Cytoplasma und im gleichen Schritt 3 Na^+ aus dem Cytoplasma in den Extrazellularraum (Neurosciences 2013). Dies resultiert in Neuronen in einer Transmembranpotentialdifferenz von etwa -60 bis -70 mV. Ein Aktionspotential folgt dem Alles-oder-Nichts-Prinzip und benötigt eine Depolarisation des Membranpotentials über ein gewisses Schwellenpotential hinaus. Danach läuft stereotypisch das für den Zelltyp charakteristische Muster von Depolarisation, Repolarisation und evtl. Hyperpolarisation ab, welches in der Summe als Aktionspotential bezeichnet wird. Die Depolarisation erfolgt dabei durch den Einstrom von Na^+ aus dem Extrazellularraum in die Zelle. Dies erfolgt je nach Nervenzelltyp durch verschiedene spannungsabhängige Na^+ - und/oder Ca^{2+} -Kanäle. Dadurch wird das Membranpotential depolarisiert und ab einer gewissen Membranspannung kommt es zu einer spannungsabhängigen Inaktivierung der Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle. Durch die Depolarisation werden gleichzeitig spannungsabhängige auswärtsgerichtete Kaliumkanäle geöffnet, die für einen Kaliumausstrom aus der Zelle sorgen, so dass es zur Repolarisation kommt (Neurosciences 2013). Das Aktionspotential ist also osmotisch neutral und im Anschluss sorgt die Na^+/K^+ -ATPase wieder für die Einstellung der Ionenhomöostase.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in Tieren die chemischen Gradienten für Natrium und Kaliumionen beim Aktionspotential und somit bei der elektrischen Erregbarkeit essentiell sind. Auch Pflanzen sind dazu in der Lage, elektrische Signale zu erzeugen und weiterzuleiten, jedoch auf andere Art und Weise.

1.1.2 Elektrische Signale in Pflanzen

Wie in Kap. 1.1 beschrieben wurde, ist das Membranpotential die Grundlage der elektrischen Erregbarkeit. Dass Pflanzen elektrische Signale erzeugen können, ist ein lang bekanntes Phänomen. Der französische Physiker Pierre Bertholon de Saint-Lazare veröffentlichte 1783 die ersten Aufzeichnungen zu Pflanzen und deren Reaktion auf elektrische Reize (Bertholon de Saint-Lazare 1783). Einige Jahre später, im Jahre 1791, wurden auch die ersten Beobachtungen von elektrischer Erregbarkeit in Wirbeltieren von Luigi Galvani (1791) publiziert, wobei erst Alessandro Volta erkannte, dass es sich dabei um Elektrizität handelte. Somit ist seit mehr als 230 Jahren bekannt, dass Pflanzen und Wirbeltiere auf elektrische Reize mit einer Reaktion reagieren und somit über eine gewisse elektrische Erregbarkeit verfügen. Die Aufzeichnungen von Bertholon de Saint-Lazare blieben zu ihrer Zeit unbedeutend. Erst 1872, also knapp 100 Jahre später, zeigte der Arzt

John Burdon-Sanderson, dass die fleischfressende Pflanze *Dionaea muscipula* elektrisch erregbar ist und dies eine wichtige Rolle in ihrer karnivoren Lebensweise einnimmt (Burdon-Sanderson 1872). Bis heute ist diese Pflanze das Paradebeispiel für die Untersuchung von elektrischen Signalen in Pflanzen.

1.1.2.1 ‚Klassische‘ erregbare Pflanzen

Prinzipiell ist davon auszugehen, dass die meisten pflanzlichen Zellen bis zu einem gewissen Grad elektrisch erregbar sind. Darüber hinaus gibt es Pflanzen, in denen einige Gewebe speziell zur Erzeugung elektrischer Signale differenziert sind. Solche Pflanzen können im besten Sinne als „klassische“ erregbare Pflanzen bezeichnet werden. Diese Pflanzen eint, dass sie dazu in der Lage sind, auf meist mechanische Stimuli mit sehr stereotypen Aktionspotentialen (APs) zu reagieren. In Folge dieser APs kommt es zu einer gerichteten, meist schnellen, Bewegung (Nastie) und oft zu weiteren physiologischen Veränderungen. Die Mehrzahl dieser Pflanzen gehört in die Gruppe der karnivoren Pflanzen, welche einen Teil ihres Nährstoff- bzw. Mineralstoffbedarfs durch den Fang und die Verdauung von Insekten decken können. Beispiele dafür sind die Venusfliegenfalle, Sonnentaugewächse und Wasserfallen. Nicht-karnivore Pflanzen, die in der Lage sind APs auszubilden und mit schnellen Bewegungen zu reagieren sind verschiedene Mimosengewächse. Viele klassisch-erregbare Pflanzen wurden bereits eingehend wissenschaftlich untersucht, da sie aufgrund ihrer Fähigkeit zur schnellen Bewegung die Aufmerksamkeit der Forscher erweckten. Ein sehr bekanntes Beispiel ist die Venusfliegenfalle *Dionaea muscipula*. *Dionaea* ist die einzige Vertreterin ihrer Gattung und gehört in die Familie der Sonnentaugewächse (Biswal et al. 2017). Die in den nordamerikanischen Mooren im Bundesstaat Carolina vorkommende Pflanze wurde 1759 erstmalig erwähnt und dann 1768 durch Daniel Solander und John Ellis wissenschaftlich beschrieben (Nelson 1989). Ellis hatte bereits erkannt, dass es sich bei der Venusfliegenfalle um eine karnivore Pflanze handelt. Genau diese Eigenschaft wurde dann auch von Charles Darwin hundert Jahre später sehr eingehend untersucht und 1875 in „Insectivorous Plants“ veröffentlicht (Darwin 1875). Darwin war von der Venusfliegenfalle fasziniert, da die Pflanze zu einer der schnellsten Bewegungen im Pflanzenreich fähig ist. *Dionaea muscipula* hat sich im Laufe der Evolution stark an ihre karnivore Lebensweise angepasst. Diese Anpassung ging mit einer morphologischen Veränderung aller ihrer Blätter einher. Bis auf die Keimblätter ist die Lamina (Blattspreiten) aller Blätter zu einem Fangapparat umgebaut, den sogenannten Fallen. Die Petiole (Blattstiel), an deren Ende die Falle sitzt, ist zur Phyllodie umgebaut und dient als photosynthetisches Organ und ersetzt damit die Funktion, die sonst durch die Lamina erfüllt wird. Die Fallen sind durch die Mittelrippe zweigeteilt und an den Blatträndern befinden sich lange Fortsätze, die verhindern, dass Insekten nach dem Fallenschluss der Falle entkommen (Reusenprinzip), siehe Abb. 1.1. Die adaxiale Seite der ehemaligen

Lamina bildet nach Fallenschluss die Innenseite der Falle. Sie ist mit zahlreichen Drüsenzellen bedeckt und auf jeder Fallenhälfte sitzen zwei bis vier sensorische Haare, die auch als Triggerhaare bezeichnet werden. Der Fallenschluss wurde von Darwin eingehend untersucht.



Abb. 1.1: Blätter von *Dionaea muscipula* sind umgebildet zu Fallen mit sensorischen Haaren (Triggerhaaren)

*In Anpassung an ihre karnivore Lebensweise sind bei *Dionaea muscipula* die Blätter zu Klappfallen umgebaut, an deren Rand lange Fortsätze sitzen, welche die Flucht von Beutetieren verhindert. Auf der Fallennenseite sitzen je Fallenhälfte drei bis fünf sensorische Haare, sog. Triggerhaare. Die Triggerhaare dienen Wahrnehmung von Beutebewegung in der Falle. Dabei erfolgt über die Biegung der Haare die Auslösung von Aktionspotentialen, welche dann zur Signaltransduktion führen.*

Darwin stellte in seinen langjährigen Experimenten auch fest, dass *Dionaea* dazu in der Lage ist tierische Eiweiße zu erkennen und auf diese mit einem Verdauungsprozess zu reagieren. Dieses, bemerkte er, beschleunigte sich, wenn zuvor die Triggerhaare der Fallen mindestens zweimalig berührt wurden und es zu dem bekannten raschen Fallenschluss kam (Darwin 1875). Wie bereits erwähnt, beschäftigte sich Burdon-Sanderson zur gleichen Zeit mit den durch die Berührung der Triggerhaare hervorgerufenen Aktionspotentialen in *Dionaea*. Diese sind heute gut elektrophysiologisch charakterisiert und typische Beispiele der klassischen elektrischen Erregbarkeit in Pflanzen. Die Aktionspotentiale in der Venusfliegenfalle haben dabei eine definierte Kinetik und dauern weniger als 2 s, wie auch in Abb. 1.2 gezeigt wird (Scherzer et al. 2019; DiPalma et al. 1966; Di Palma et al. 1961). Im Pflanzenreich ist eine Dauer von 2 s sehr schnell. Sie erscheint jedoch langsam, wenn sie mit den AP tierischer Neuronen vergleicht, deren Dauer je nach Zelltyp zwischen 1 bis 3 ms beträgt (Neurosciences 2013). Diese Aktionspotentiale in *Dionaea*, ihre Signaturen und ihre Erzeugung auf Ebene der Ionenkanäle zu verstehen war und bleibt Gegenstand

der aktuellen Forschung (Krol et al. 2006; Escalante-Pérez et al. 2011; Bohm et al. 2016; Scherzer et al. 2019).

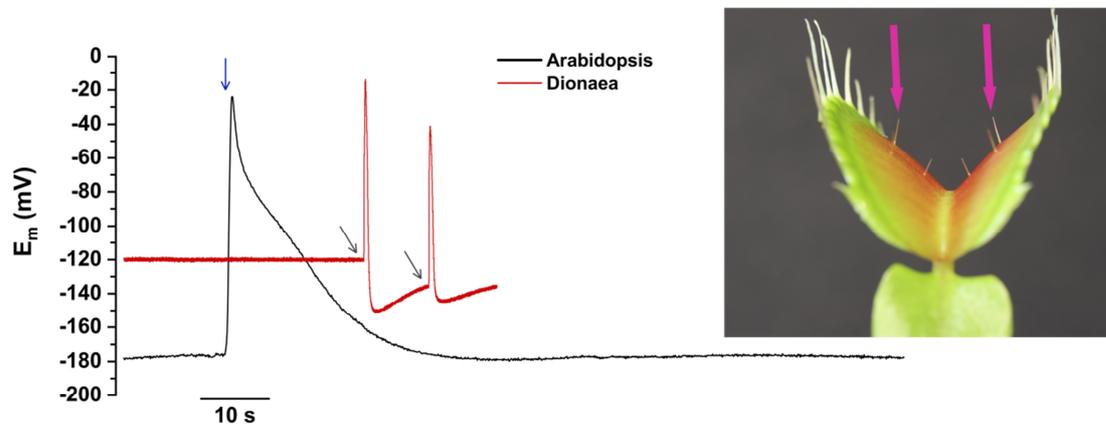


Abb. 1.2: *Dionaea muscipula* reagiert auf die Berührung eines Triggershaars mit einem schnellen Aktionspotential, welches mehr als 20 mal schneller ist, als ein durch Kälte ausgelöstes Aktionspotential in *Arabidopsis thaliana*

Überlagerung der Aufzeichnung des Membranpotentials von *Arabidopsis thaliana* (schwarze Kurve) und *Dionaea muscipula* (rote Kurve) aufgezeichnet mit der Einstichttechnik im Mesophyll. *Arabidopsis thaliana* reagiert auf einen Kältestimulus (blauer Pfeil) mit der schnellen Depolarisation des Membranpotentials um 156 mV auf -23 mV, anschließend erfolgt in 28 s die Repolarisation, bis das Ruhepotential von -179 mV wieder erreicht wird. *Dionaea muscipula* reagiert auf die Berührung eines Triggerhaars (grauer Pfeil) (Inset Foto, pinke Pfeile markieren Triggerhaare) mit einem Aktionspotential. Das Aktionspotential in *Dionaea* hat eine Depolarisationsamplitude von 110 mV und erreicht dabei ein depolarisiertes Membranpotential von -10 mV. Im Anschluss kommt es zur schnellen Repolarisation. Die Gesamtdauer des Aktionspotentials beträgt nur 1,3 s und ist damit um den Faktor 20 schneller als in *Arabidopsis*. (Aufzeichnung des Aktionspotentials in *Dionaea* freundlicherweise von Dr. Sönke Scherzer bereitgestellt).

In *Dionaea* und vielen weiteren klassischen erregbaren Pflanzen folgt auf die aktionspotentialähnlichen, elektrischen Signale direkt eine gerichtete Bewegung (Nastie) (Sibaoka 1991). Es konnte jedoch für eine Vielzahl von niederen und höheren Pflanzen bereits gezeigt werden, dass auch diese elektrische Signale erzeugen können (Pickard 1973; Krol and Trębacz 1999; Krol et al. 2003; Krol et al. 2004; Carpaneto et al. 2007; Koselski et al. 2008; Fromm and Lautner 2007).

1.1.2.2 Elektrische Signale im Kontext von biotischem und abiotischem Stress

Elektrische Signale sind ein bisher wenig verstandener Teil der pflanzlichen Physiologie und nur einzelne Teilaspekte sind bereits gut erforscht. Bei der Betrachtung elektrischer Signale in der Mehrzahl der Pflanzen wird deutlich, dass sich diese sehr viel vielfältiger und variabler in ihrer Generierung und Kinetik zeigen, verglichen mit den Aktionspotentialen, welche aus Tieren und deren Neuronen bekannt sind. Gleichzeitig ist die Generation von pflanzlichen elektrischen Signalen nur unzureichend untersucht und verstanden, als es bei ihren tierischen Pendanten der Fall ist. Die meisten elektrischen Signale in Pflanzen, die bislang untersucht wurden, sind Depolarisationen der

Plasmamembran, die auf einen Stimulus hin erfolgen. Im Anschluss kommt es zu einer Repolarisation, welche aber, je nach Zelltyp oder Reiz, in ihrer Kinetik extrem verschieden sein kann. Auch die Amplitude der Depolarisation ist sehr variabel. Verschiedene Autoren haben unterschiedliche Klassifizierungen zur Beschreibung für dieses Phänomen vorgeschlagen, bzw. die von ihnen gemessenen Reaktionen benannt. Dabei findet sich eine Fülle verschiedener Begrifflichkeiten, oft sogar unterschiedliche für das gleiche Phänomen, je nachdem mit welcher Methode die elektrischen Signale abgeleitet wurden. Vom Beginn des 20. Jahrhunderts bis heute haben zahlreiche Wissenschaftler dieses Feld bearbeitet und trotzdem bleiben pflanzliche elektrische Signale ein Thema mit unklaren Definitionen. Viele Autoren haben sich am Tierreich orientiert und die aufgezeichneten Spannungsänderungen als Aktionspotentiale bezeichnet, auch die Begriffe Variationspotentiale und Rezeptorpotentiale sind häufig zu finden. Gerade im Bereich der elektrischen Signale nach Verwundung, vor allem im Kontext von Herbivoren, ist zudem eine Vielzahl weiterer Begriffe in Gebrauch, häufig werden diese ausschließlich von einzelnen Autoren verwendet. Über diese Begriffe soll nur eine kurze Tabelle Übersicht verschaffen (Tab. 1.1), denn die vorhandenen Definitionen sind so überlappend und je nach Publikation variant, dass es nicht möglich ist allgemeingültige Aussagen zu treffen.

Tab. 1.1: Übersicht der gängigen Begriffe für elektrische Signale in Pflanzen

Begriff	Kinetik	Stimulus	Publikation
Aktionspotential	Schnelle Depolarisation und Repolarisation	kurzer Kältereiz, Berührung	(Degli Agosti 2014; Krol et al. 2004; Carpaneto et al. 2007)
Variationspotential	Schnelle Depolarisation und langsame Repolarisation	Hitze, Verwundung	(De Jaegher et al. 1991; Rhodes et al. 1996; Volkov et al. 2007; Fromm et al. 2013; Katicheva et al. 2014; Vodeneev et al. 2015; Zimmermann et al. 2016)
Rezeptorpotential	Schnelle oder langsame Depolarisation und langsame Repolarisation	chemische Stimuli, die an spezifische Rezeptoren binden; Stimuli häufig von Herbivoren, Pathogenen und Symbionten	(Koers et al. 2011; Guzel Deger et al. 2015; Jeworutzki et al. 2010; Krol et al. 2010)

Bereits 1973 hat Barbara Pickard eine sehr ausführliche Übersichtarbeit über dieses Thema verfasst und betitelte es „Action potentials in higher plants“ (Pickard 1973). Sie beschrieb alle elektrischen Signale in Pflanzen unter dem Überbegriff „Aktionspotential“, obschon sie Adriën Loo Houwink zitiert, der bereits 1935 Beobachtungen über sogenannte Variationspotentiale nach Hitzeeinwirkung an *Mimosa pudica* veröffentlicht hatte (Houwink 1935). Pickard gibt in ihrem Übersichtsartikel den Stand der Forschung sehr umfassend wieder. Schon damals war bekannt, dass verschiedene Pflanzen, die nicht in die

Gruppe der „klassisch“ erregbaren Pflanzen gehören, auf Reize durch Kälte, Hitze, Verwundung und konzentrierte KCl-Lösung mit einer schnellen Änderung des Membranpotentials reagieren. Was zu ihrer Zeit unbekannt war, jedoch schon postuliert wurde, war das Vorhandensein einer sog. „Verwundungssubstanz“. Dass durch Verwundung chemische Verbindungen in der Pflanze gebildet werden, die im Zusammenhang mit elektrischen Signalen stehen, ist heute bekannt, es handelt sich dabei unter anderem um Jasmonate (Mousavi et al. 2013). Ansonsten ist zum damaligen Wissensstand jedoch nur eine überschaubare Informationsmenge hinzugekommen. Heute ist bekannt, dass viele elektrische Signale mit einer Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration einhergehen (Lewis et al. 1997; Katicheva et al. 2014; Keinath et al. 2015; Gilroy et al. 2016; Förster et al. 2019). Auch ist bekannt, dass der Ausstrom von Cl^- aus den Zellen wahrscheinlich in vielen Fällen für die Depolarisation des Membranpotentials verantwortlich ist siehe 1.1.2.3. Viele neue Erkenntnisse sind im Bereich der Rezeptorpotentiale hinzugekommen (Jeworutzki et al. 2010; Krol et al. 2010), etwas, das zu Pickards Zeiten 1973 noch gänzlich unbekannt war. Was jedoch nach wie vor schwierig ist, ist die Einteilung der gemessenen elektrischen Signale in allgemeingültige Kategorien. Gerade die Aussage vieler Autoren, dass es sich bei den gemessenen Signalen um Aktionspotentiale handelt, sollte kritisch hinterfragt werden. Per Definition sind Aktionspotentiale Änderungen des Membranpotentials, die erfolgen, wenn das Membranpotential über einen Schwellenwert depolarisiert wird und dann einem Alles-oder-nichts Prinzip mit zelltypspezifischer Kinetik folgen. Signale die allen genannten Kriterien entsprechen, sind nur eindeutig in klassisch erregbaren Pflanzen zu finden (Dionaea, Mimose) sowie in manchen Algen (Chara) und Lebermoosen (Krol et al. 2003). Das Signal, das in allen anderen Gefäßpflanzen zu finden ist und dem Aktionspotential am Ehesten nahekommt, ist die Änderung des Membranpotentials durch Kälte (Carpaneto et al. 2007; Lewis et al. 1997). Da es aber schwer ist, eine valide Aussage zu der Einteilung der gemessenen Potentialänderungen zu treffen, wird in dieser Arbeit nur von Änderungen des Membranpotentials gesprochen.

Obwohl die Kategorisierung der gemachten Beobachtungen komplex ist, sind elektrische Signale in Pflanzen ein wichtiger Teil der Physiologie. Gerade im Zusammenhang mit abiotischen und biotischen Stressoren sind elektrische Signale fast immer zu finden. Ein wichtiger Aspekt in dieser Thematik ist die Frage, ob es sich bei der Änderung des Membranpotentials nach einem Reiz um ein lokales oder ein systemisches Ereignis handelt. Um dies zu beantworten muss jedoch zuerst geklärt werden, welchen Vorteil elektrische Signale haben und welche Arten der Signaltransduktion existieren. Dabei werden zunächst alle Änderungen des Membranpotentials, die auf einen äußeren oder intrinsischen Reiz hin stattfinden, als „elektrische Signale“ definiert. Es ist davon auszugehen, dass elektrische Signale evolutiv sehr alt sind, denn sie sind in allen Lebewesen zu finden und gehen mit dem Vorhandensein eines Membranpotentials einher.

Gerade bei einzelligen Lebewesen sind elektrische Signale besonders sinnvoll. Eine Änderung des Membranpotentials z.B. durch einen osmotischen Stimulus erfolgt praktisch automatisch und es erscheint logisch, dass Zellen diesen Umstand nutzen, um ihn in eine zelluläre Antwort umzusetzen. Ionenkanäle spielen dabei eine entscheidende Rolle. Zum einen vermitteln sie den Durchtritt der Ionen durch die Membran, was zu einer Änderung des Membranpotentials führt, also die Grundvoraussetzung für elektrische Signale darstellt. Zum anderen ermöglichte die Modifikation in der Steuerung der Ionenkanäle im Laufe der Evolution, dass die Kanäle nur durch bestimmte Stimuli den Durchtritt der Ionen ermöglichen. Die Konsequenz daraus ist, dass manche Ionenkanäle zum Teil selbst dazu in der Lage sind, Reize zu perzipieren und ein Signal zu generieren. Dieses Prinzip wurde im Laufe der Evolution noch ausgedehnt, in dem die Steuerung der Kanäle durch interagierende Proteine verfeinert wurde. Dies führte dazu, dass eine Vielzahl von weiteren Proteinen Reize wahrnehmen können und so direkt und indirekt zu einer Steuerung der Ionenkanäle beitragen können. Bei der Betrachtung einzelliger Lebewesen wird deutlich, dass Signale durch Änderungen des Membranpotentials eine schnelle Möglichkeit bieten, auf einen Reiz zu reagieren. Mit der Evolution mehrzelliger Organismen ging auch eine Evolution der Perzeption von Reizen und die Signaltransduktion zwischen Einzelzellen einher. Am Anfang dieser Entwicklung stand, der Zusammenschluss mehrerer Einzelzellen zu einem Organismus und damit verbunden eine Kommunikation zwischen den Einzelzellen. Bereits in vielen Bakterien sind solche Mechanismen in Form von ‚Quorum sensing‘ und Biofilmbildung bekannt, dies gilt auch für viele Einzeller (Allison and Hughes 1991). Quorum sensing erfolgt durch die Exkretion von Signalmolekülen nach bestimmten Reizen und in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Artgenossen, sowie deren Anzahl. Diese Signalmoleküle dienen der innerartlichen Kommunikation und führen zu einer Änderung der Physiologie und des Verhaltens von anderen Individuen der gleichen Art. Oft kommt es in Folge dessen zu einem Zusammenschluss der sonst einzelligen Lebewesen in einen vorübergehenden Zellverbund, ein Beispiel ist die Bildung sogenannter Biofilme von Bakterien z.B. auf Oberflächen (Tolker-Nielsen 2015; Heindl et al. 2014). Dies ermöglicht den Einzelindividuen einen Überlebensvorteil durch die Bewahrung von Wasser, dem Schutz vor Umwelteinflüssen und vor Feinden. In dauerhaft mehrzelligen Organismen sind solche Signalwege noch weiter ausgebaut worden (Kaiser 2001). Dies führte soweit, dass die Zellen sich stark differenziert haben und sich verschiedene Gewebe und Organe herausgebildet haben, sodass ein Überleben der Einzelzellen oft unter natürlichen Bedingungen nicht mehr möglich ist. In mehrzelligen Organismen sind nur noch wenige Zellen an der Oberfläche direkt Umweltreizen ausgesetzt. Um sich an diese Reize physiologisch anzupassen, mussten mehrzellige Organismen neue Signalwege entwickeln, damit auch die Zellen, die keinen direkten Kontakt mit dem Reiz haben, physiologische Änderungsprozesse einleiten zu können. Mehrzellige Organismen, die aufgrund ihrer Anatomie auf solche speziellen Signalwege

angewiesen sind, sind in erster Linie Eumetazoen (Gebetiere), manche Pilze und Pflanzen, vor allem Gefäßpflanzen. Besonders wichtig ist die Verbreitungsmöglichkeit der generierten Signale. In diesen Organismen haben sich komplexe interzelluläre Signaltransduktionsmechanismen herausgebildet, bzw. weiterentwickelt. Signale werden bei ihnen zwischen den Organen und Zellen als elektrische Signale, durch Hormone und andere Signalmoleküle vermittelt. Dazu gehört auch die Herausbildung von vielfältigen Rezeptoren, um chemische Reize und intrinsische Signalmoleküle und Hormone zu perzipieren. Chemische Signale in Form von Hormonen, Botenstoffe und Signalmolekülen spielen eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von Reizen, jedoch benötigen sie einen physikalischen Transportweg, um vom Bildungsorgan/gewebe zum Bestimmungsorgan/gewebe zu gelangen. Bis auf wenige gasförmige Substanzen, wie das Phytohormon Ethylen, braucht es zur Verbreitung solcher chemischen Signale einen Flüssigkeitsstrom (endokrin) (Blutstrom, Hämolymphe, Phloem) oder das Signal muss von Zelle zu Zelle weitergegeben werden (parakrin) (Diffusion, Transport in Vesikeln oder mit Transportproteinen, Neugenerierung des Signals in jeder Zelle). Elektrische Signale haben den entscheidenden Vorteil, dass sie meist sehr viel schneller sind, als Signale z.B. durch Hormone. Durch die Kopplung elektrischer und chemischer Signale können auch sehr komplexe Reize verarbeitet (integriert) und damit komplexe Reaktionen auf einen Reiz generiert werden. Elektrische Signale sind für mehrzellige Organismen essentiell und ermöglichen es auch sehr schnelle Reaktionen zu vollziehen, beispielsweise Reflexe bei Wirbeltieren oder der Fallenschluss bei *Dionaea*.

In Gefäßpflanzen, vor allem aber in den Samenpflanzen, haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Signalwege entwickelt, welche durchaus Analogien zu den Eumetazoen aufweisen. Diese Pflanzen verfügen über ein Gefäßsystem, welches die Ausbreitung von chemischen Signalen über weite Strecken ermöglicht und sie verfügen über ein komplexes Hormonsystem. Außerdem sind sie dazu in der Lage elektrische Signale zu generieren und diese auch weiterzuleiten. Ebenso kommt es in manchen Fällen zu einer Kopplung elektrischer und hormoneller Signale, wie beispielsweise beim Fraß von Insekten (systemisches elektrisches Signal und Jasmonatbildung) (Mousavi et al. 2013). Pflanzen sind als sessile Organismen im Besonderen darauf angewiesen, sich an ändernde Umweltbedingungen anzupassen, da sie diesen nicht durch Ortswechsel ausweichen können. Auch haben sie keine Möglichkeit Feinden zu entkommen, sie können sich lediglich verteidigen, um zu überleben. Die Verarbeitungsgeschwindigkeit pflanzlicher Signale ist nicht so schnell wie im Tierreich. Doch im Rahmen ihrer Möglichkeiten verfügen auch Pflanzen über schnelle Signale. Diese sind gerade im Zusammenhang mit Fraßfeinden sehr wichtig, da diese aus dem Tierreich stammen und sich im Vergleich zu Pflanzen schnell bewegen können. Oder im Fall der Karnivoren, bei denen tierische Beutetiere gefangen werden müssen (*Dionaea* und *Aldrovanda*). Elektrische Signale sind in Pflanzen, wie eingangs erwähnt wurde, weitverbreitet. Die Stimuli, in deren Kontext es

zur Generierung solcher Signale kommt, sind vielfältig und es konnte bisher für viele eine systemische Verbreitung gezeigt werden. Da es jedoch nicht auszuschließen ist, dass ein lokal erzeugtes nicht weitergeleitetes elektrisches Signal trotzdem zur Generierung eines chemischen Signals führt, werden hier alle Änderungen des Membranpotentials als elektrisches Signal behandelt. Allerdings ist die Generierung systemischer Signale im Anschluss an lokal erzeugte elektrische Signale von essentieller Bedeutung für die Pflanze. Wenn ein Organ/Gewebe der Pflanze einem Stimulus ausgesetzt wurde, kann der Rest der Pflanze nur durch ein systemisches Signal, ob nun elektrisch oder chemisch, auf die die neue Stresssituation vorbereitet werden und sich so als Organismus bestmöglich anpassen. Eine Vielzahl abiotischer und biotischer Reize führt in Pflanzen zu einer Änderung des Membranpotentials. Dabei sind bei Pflanzen im Gegensatz zu Tieren meist keine darauf spezialisierten Zellen daran beteiligt. Es scheint so, als ob die meisten Zellen in Pflanzen auf gewisse Stimuli reagieren können. Sehr gut untersucht ist die Änderung des Membranpotentials durch Kälte. Dabei ist vor allem eine schnelle lokale Abkühlung gemeint, die zu einer sehr schnellen Depolarisation des Membranpotentials mit anschließender rascher Repolarisation führt (Krol et al. 2004; Lewis et al. 1997; Fromm and Bauer 1994; Minorsky and Spanswick 1989; Shiina and Tazawa 1986). Diese Beobachtung konnte in allen bisher untersuchten Gefäßpflanzen gemacht werden. Dieses durch Kälte ausgelöste elektrische Signal bewegt sich meist apikal nach distal entlang des Phloems (Fromm and Bauer 1994; Hafke et al. 2013). Die Ausbreitung erfolgt dabei sogar in der Sprossachse. Begleitet oder eingeleitet wird diese Reaktion von einer starken Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} Konzentration (Hafke et al. 2013; Carpaneto et al. 2007). Eine ähnliche Reaktion konnte auch durch eine Berührung, die nicht zur Verwundung führt, beobachtet werden (Meyerhoff et al. 2005; Degli Agosti 2014). Auch bei den klassisch erregbaren Pflanzen Venusfliegenfalle, Mimose und Sonnentau führt Berührung zu schnellen elektrischen Signalen, die jedoch eindeutig den Charakter eines Aktionspotentials haben, wie es aus dem Tierreich bekannt ist (Bohm et al. 2016; DiPalma et al. 1966; Di Palma et al. 1961; Krol et al. 2006; Houwink 1935; Williams and Pickard 1972). In nicht „klassisch“ erregbaren Pflanzen ist die elektrische Reaktion, die auf Kälte bzw. Berührung stattfindet, zwar einem Aktionspotential ähnlich, aber sehr variabel in seiner Kinetik, als dass klar von einem Aktionspotential gesprochen werden könnte. Ein weiterer gut untersuchter Stimulus ist die mechanische Verwundung ohne die Beteiligung von Herbivoren oder starke lokale Hitzeeinwirkung durch eine Flamme (Verwundung) oder einen heißen Gegenstand. In allen untersuchten Gefäßpflanzen führen diese Reize zu einer Änderung des Membranpotentials. Diese Membranpotentialänderung ist charakterisiert durch eine schnelle Depolarisation charakterisiert, welche aber langsamer ist als das elektrische Signal nach einem Kältestimulus. Nach Erreichen eines Depolarisationsmaximums kommt es zu einer langsamen Repolarisation, welche möglicherweise auch vom Grad der Schädigung des Gewebes abhängig ist. Die meisten

Messungen an Pflanzen im Kontext dieser Stimuli sind mit der Methode der Oberflächenelektroden durchgeführt worden. Viele Autoren bezeichnen diese Art eines elektrischen Signals als Variationspotential (Katicheva et al. 2014; Sukhov et al. 2013), auch die Bezeichnung als verwundungsinduziertes Oberflächenpotential (Mousavi et al. 2013) oder andere Termini werden verwendet. Einige Autoren sprechen auch von einem Aktionspotential (Felle and Zimmermann 2007). Das elektrische Signal, das durch Verwundung oder Hitze induziert wird, breitet sich entlang des Phloems in der Pflanze aus und erreicht auch benachbarte Gewebe und Organe (Mousavi et al. 2013; Katicheva et al. 2014; Sukhov et al. 2013; Shao et al. 2020). Da bei der Verwundung auch chemische Substanzen aus den Pflanzenzellen freigesetzt werden, wird es bei diesen Reizen schwieriger aufzuschlüsseln, was auf zellulärer Ebene die Änderung des Membranpotentials herbeiführt. Zimmermann et al. (2010) postulierten die Existenz sogenannter systemischer Potentiale, welche nach Verwundung oder durch osmotische Stimuli vom Stimulus perzipierenden Gewebe an andere Gewebe weitergeleitet werden. Es wurden dabei mit Mikroelektroden die Potentialänderungen im Apoplasten, also außerhalb der Zellen, abgeleitet. Die aufgezeichneten Signale verhielten sich invers zu solchen, die mit intrazellulären Mikroelektroden aufgezeichnet werden. Die gemessenen Signale entsprachen einer Hyperpolarisation und es gab Hinweise darauf, dass sie durch eine Überaktivierung der H^+ -ATPase zurückzuführen waren (Zimmermann et al. 2009). (2020) konnten Shao et al. zeigen, dass die Verwundung in der Wurzel von Arabidopsis in ein Ca^{2+} -Signal entlang der Leitbündel in der ganzen Pflanze auslöst. Dieses war verbunden mit dem Auftreten sog. ‚slow wave‘ Potentialen, also wie die zuvor beschriebenen systemischen Potentiale, welche außerdem im Zusammenhang mit Glutamatsignaling standen. Die durch Verwundung oder Verbrennung freigesetzten chemischen Stoffe sind endogene Elicitoren und werden als sogenannte DAMPs (engl. damage-associated molecular patterns) zusammengefasst (Boller and Felix 2009; Krol et al. 2010). In den Pflanzenwissenschaften werden alle chemischen Substanzen, die eine Abwehrreaktion in der Pflanze in Gang setzen, als Elicitoren definiert (Schopfer 2010). Neben den endogenen Elicitoren, die aus der Pflanze selbst stammen (z.B. *AtPEP1*), gibt es noch exogene Elicitoren, die von Pathogenen stammen (z.B. *flg22*). Diese exogenen Elicitoren werden als MAMPs (engl. microbe-associated molecular patterns) zusammengefasst (Boller and Felix 2009). Die Gemeinsamkeit von DAMPs und MAMPs ist deren Perzeption in der Pflanze durch die Bindung an spezifische Rezeptoren, welche integrale Membranproteine sind. Diese Rezeptoren werden korrespondierend als Mustererkennungsrezeptoren PRRs (engl. pattern recognition receptors) zusammengefasst. Jeder PRR ist nur zur Bindung eines spezifischen Elicitors in der Lage. Wie schon erwähnt, stehen die DAMPs mit den elektrischen Signalen nach Verwundung im Kontext. Auch die MAMPs führen zur Generierung elektrischer Signale in Pflanzen. Dies wird durch die Bindung von DAMPs und MAMPs an ihren spezifischen Mustererkennungsrezeptor bewirkt. Deshalb werden

diese elektrischen Signale auch manchmal als Rezeptorpotentiale bezeichnet, analog zum Tierreich. Die Bindung der Elicitoren an ihren Rezeptor sorgt intrazellulär die Aktivierung von Signalkaskaden in deren Folge sich das Membranpotential ändert (Jeworutzki et al. 2010). Wie dies genau bewerkstelligt wird, ist bisher nicht aufgeklärt, auch weil die an der Potentialänderung beteiligten Ionenkanäle oder Transporter nicht genau bekannt sind. Es kommt dabei jedoch zu einer raschen Erhöhung des cytosolischen Calciumspiegels und meist zur Depolarisation des Membranpotentials (Blume et al. 2000). Diskutiert wird eine Beteiligung der Protonen-ATPase und gesichert ist, dass die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) teil dieses Prozesses sind (Boller and Felix 2009). ROS, wie beispielsweise H_2O_2 , bewirken auch ohne das Vorhandensein biotischer Elicitoren eine Depolarisation des Membranpotentials in bereits mechanisch oder durch Hervorrie verwundetem Gewebe (Maffei et al. 2006). Gleichzeitig wiesen sie nach, dass durch mechanische Verwundung an den Wundrändern H_2O_2 gebildet wird. Sie fanden jedoch keinen Unterschied zwischen der H_2O_2 Menge direkt nach der Verwundung und 180 min später. Wurde die Verwundung jedoch durch den Fraß der Larven von *Spodoptera littoralis* verursacht, so wurde von der Pflanze am Wundrand mehr H_2O_2 gebildet, dessen Menge über die Zeit kontinuierlich zunahm (Maffei et al. 2006). Maffei et al. konnten auch in Zellkulturen der Sojabohne zeigen, dass H_2O_2 alleine zum Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration führt, etwas das im Kontext von elektrischen Signalen nach Verwundung schon häufig gezeigt wurde. Dies ist ein gutes Beispiel dafür, dass mechanische Verwundung selbst Signalkaskaden in der Pflanze in Gang setzt, welche durch das Vorhandensein von Elicitoren, in diesem Falle die ROS-Bildung, noch verstärkt werden. Elicitoren beim Insektenfraß sind vor allem chemische Verbindungen im InsektenSpeichel, wie (z.B. Volicitin (N-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamine)) und auch Chitin selbst (Truitt et al. 2004; Alborn et al. 1997; Mithöfer and Boland 2008). Chitin ist sowohl als Elicitor im Zusammenhang mit Herbivoren, als auch im Kontext mit Pilzen als Pathogenen oder Symbionten von Bedeutung. Chitin selber ist ein Polymer aus N-Acetyl-D-glucosamin-Einheiten. Pflanzen besitzen als Teil ihrer Immunabwehr Chitinasen, die dazu in der Lage sind die Zellwand von pathogenen Pilzen zu zersetzen (Eckardt 2008). Es ist bekannt, dass Chitin von der Rezeptorkinase CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1) perzipiert wird (Miya et al. 2007). CERK1 hat unter anderem eine Ser/Thr Kinasedomäne und drei extrazelluläre LysM-Motive (Miya et al. 2007). Die für Leguminosen wichtigen NOD-Faktoren, welche essentiell für die Ausbildung der Wurzelknöllchensymbiose sind, werden von den symbiontischen Bakterien produziert und gehören in die Gruppe der Lipochitinoooligosaccharide (Eckardt 2008). Ihre Perzeption durch die Nodrezeptorproteine NRF1 und NRF5 stammt wahrscheinlich aus der Pathogenabwehr, da auch NRF1 und NRF5 Rezeptorkinasen mit LysM Motiven sind (Eckardt 2008).

Sehr gut untersucht sind auch elektrische Signale, die durch bakterielle Elicitoren ausgelöst werden. Prominente Beispiele sind das Proteinfragment Flaggelin22 (*flg22*) aus den

Flagellenproteinen vieler Bakterien (Felix et al. 1999). *Flg22* wird über die Bindung an den Mustererkennungsrezeptor FLS2 erkannt (Gómez-Gómez and Boller 2000). Jeworutzki et al (2010) konnten zeigen, dass *flg22* zur Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration und einer Depolarisation der Plasmamembran führt, und dass beides über den FLS2 Rezeptor vermittelt wird (Jeworutzki et al. 2010). Die Depolarisation betrug bei *A. thaliana* Col0 im Durchschnitt 125 mV im Mesophyll und konnte auch in Wurzelhaaren gemessen werden, wo sie geringer ausfiel (Jeworutzki et al. 2010). Wie für Rezeptorpotentiale üblich, war die erzielte Depolarisation abhängig von der Konzentration des Elicitors. Die größte durchschnittlich gemessene Depolarisation wurde mit 10 nM *flg22* erzielt, doch bereits Konzentrationen von 0,1 und 1 nM hatten eine deutliche Depolarisation zur Folge. Jeworutzki et al konnten auch zeigen, dass die *flg22* induzierte Depolarisation des Membranpotentials mit einem Ausstrom (Efflux) von Chlorid und Kaliumionen, und einem Einstrom (Influx) von Protonen, sowie einer Alkalisierung des Apoplasten einhergeht. Gleichzeitig kommt es durch *flg22* auch zu einer Produktion von ROS im Mesophyll (Guzel Deger et al. 2015). Die Beteiligung eines Chlorideffluxes bei der Depolarisation nach der Gabe von fungalen oder endogenen Elicitoren wurde auch schon von Zimmermann et al (1998) in Tabak Zellkultur gemessen (Zimmermann et al. 1998). Dass durch DAMPs elektrische Signale in Pflanzen ausgelöst werden, die den Signalen durch *flg22* ähneln, konnten Krol et al. (2010) ausführlich am Beispiel vom damage-associated molecular pattern peptide 1 (*AtPep1*) in *A. thaliana* zeigen. *AtPep1* ist ein endogenes Peptid, welches nach Verwundung in *A. thaliana* auftritt. Über die Bindung an die Proteinkinase PEPR1 kommt es zu einer Rezeptor-abhängigen Depolarisation des Membranpotentials durch die Aktivierung von Anionenkanälen in der Plasmamembran (Krol et al. 2010).

Die Interaktion und Kommunikation mit Symbionten erzeugt ebenfalls elektrische Signale in Pflanzen. Bei der Symbiose mit Mykorrhiza und Knöllchenbakterien werden von den Pilzen bzw. Knöllchenbakterien Signalmoleküle an die Pflanze abgegeben. Diese Signalmoleküle führen zu physiologischen Änderungen in der Pflanze, die die Symbiose ermöglichen, begünstigen und auch die Immunantwort der Pflanze unterdrücken. Diese Kommunikation hat sich wahrscheinlich aus der Pathogenabwehr entwickelt. Dabei stellt die Symbiose stets ein labiles Gleichgewicht zwischen Wirt und Symbiont dar. Daher gibt es starke Parallelen zwischen den oben behandelten MAMPs und den Signalmolekülen in symbiontischen Prozessen. Es konnte für solche Signalmoleküle, welche im Kontext der abuskulären Mykorrhiza und der Symbiose mit Knöllchenbakterien auftreten, bei *Medicago truncatula* gezeigt werden, dass diese Signalmoleküle zu einer Depolarisation des Membranpotentials von Wurzelhaaren führen (Hürter et al. 2018). Die elektrischen Signale im Kontext der Symbiose bilden somit einen Grenzfall zwischen einem physiologischen Geschehen mit Eustress und biotischem Stress, wie er bei Pathogenbefall auftritt.

Bisher sind lokale Kälte, Berührung, lokale Hitze, mechanische Verwundung und biogene Elicitoren als Auslöser für elektrische Signale in Erscheinung getreten, doch darüber hinaus gibt es noch weitere physikalische Stimuli, die elektrische Signale erzeugen können. Zum einen sind dies konzentrierte Salzlösungen, oder allgemein osmotischer Stress, und zum anderen starkes Blaulicht.

Die lokale Applikation konzentrierter Salzlösungen (zumeist KCl) führt zur Depolarisation der Plasmamembran in einer Vielzahl von Pflanzen (Favre et al. 2001; Felle and Zimmermann 2007). Wie die Pflanze diesen Stimulus perzipiert, ist bisher auf genetischer Ebene nur wenig geklärt. Wahrscheinlich ist jedoch, dass dieser Reiz durch einen dehnungsaktivierten Calciumkanal perzipiert wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Wahrnehmung von hyperosmotischen Reizen, z.B. 600 mM Sorbitol, durch einen solchen Kanal, namens OSCA1.1 (*reduced hyperosmolality-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase 1*), vermittelt wird (Yuan et al. 2014). Dabei gibt es in *Arabidopsis thaliana* zahlreiche Kandidatengene, welche mutmaßlich für solche Ionenkanäle kodieren (Murthy et al. 2018; Hou et al. 2014). Dehnungsaktivierte Ionenkanäle werden durch die Dehnung der Membran, in welche sie eingebettet sind, aktiviert. Eine Dehnung der Membran kann durch verschiedene Faktoren auftreten, z. B. durch direkte Berührung oder durch Änderung der Osmolalität (Murthy et al. 2018). Die Dehnung bewirkt das Öffnen der Kanäle. Im Falle von OSCA1 handelt es sich um einen Kationenkanal, der mono- und divalente Kationen passieren lässt, mit einer leichten Präferenz für K^+ gegenüber Ca^{2+} (Yuan et al. 2014). In planta bewirkt OSCA1.1 wenige Sekunden nach der Applikation von 600 mM Sorbitol eine starke Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration (Yuan et al. 2014). Diese Calciumerhöhung fällt in *osca1.1* Verlustmutanten deutlich niedriger aus. Es ist davon auszugehen, dass in Verlustmutanten von OSCA1.1 die Depolarisation durch einen hyperosmotischen Stimulus deutlich geringer ausfällt, als im Wildtyp.

Die Gabe eines 20 s Blaulichtpulses verursacht ebenfalls eine Depolarisation der Plasmamembran. Dies konnten Spalding and Cosgrove (1989a) erstmalig in etiolierten *Cucumis sativus* Keimlingen zeigen. Sie untersuchten die Pflanzen, da bereits seit 1968 bekannt war, dass Blaulicht in den etiolierten Keimlingen vieler dikotyledoner Pflanzen zu einer sehr schnellen Inhibition des Wachstums führt (Spalding and Cosgrove 1989a; Cosgrove 1988; Cosgrove and Green 1981; Meijer 1968; Gaba and Black 1979). Es war jedoch nicht bekannt, wie diese für Pflanzen sehr schnelle Reaktion eingeleitet wird. Die beiden Autoren konnten zeigen, dass der Einleitung der Wachstumsinhibition 30 s nach Blaulichtgabe eine Depolarisation der Plasmamembran voran geht. In der gleichen Arbeitsgruppe konnte später auch gezeigt werden, dass diese Depolarisation der Plasmamembran möglicherweise Calcium-unabhängig ist und durch einen Chloridkanal vermittelt wird, der Cl^- aus der Zelle entlässt (Lewis et al. 1997; Cho and Spalding 1996). In etiolierten Keimlingen hat diese Reaktion eine klare physiologische Relevanz. Sobald

der Keimling aus dem Erdreich wächst und das Tageslicht (hoher Blaulichtanteil) erreicht, muss das schnelle Streckungswachstum eingestellt werden, um Energie zu sparen und mit der Photosynthese zu beginnen. Auch in de-etiolierten Pflanzen führt Licht zu einer Verlangsamung des Wachstums (Gaba and Black 1979). Die Untersuchungen, dass Blaulicht zu einer Depolarisation des Membranpotentials führt, wurden jedoch bislang überwiegend in Keimlingen oder jungen Pflanzen durchgeführt. Daneben ist BL auch als Auslöser von Aktionspotentialen in dem als erregbar eingestuften Lebermoos *Conocephalum conicum* charakterisiert worden (Krol and Trębacz 1999). Blaulicht hat aber neben der Depolarisation des Membranpotentials in wachsenden Pflanzen auch noch eine essentielle Bedeutung in der Steuerung vieler weiterer Prozesse (z.B. positiver Phototropismus (Sproß), Chloroplastenausrichtung, Stomaöffnung (Wang et al. 2014; Weiler and Nover 2008)), die hier jedoch nicht weiter behandelt werden sollen.

Nachdem nun eine Vielzahl von Stimuli behandelt wurden, welche elektrische Signale in Pflanzen auslösen, muss abschließend betrachtet werden, welche physiologisch bedeutsamen Rollen elektrische Signale darüber hinaus haben. Elektrische Signale treten nicht nur im Kontext von Stresssituationen auf, auch normale Prozesse der pflanzlichen Physiologie stehen mit ihnen im Zusammenhang. Die allermeisten Pflanzen betreiben Photosynthese. Dabei und bei der Regulation der Stomata kommt es zu elektrischen Signalen (Roelfsema et al. 2001; Elzenga et al. 1995). Elektrische Signale treten in Stomata in Form von sich lokal ändernden Membranpotentialen der Schließzellen auf. Das elektrische Signal selbst kann jedoch nicht systemisch werden, da Schließzellen elektrisch isoliert sind (Roelfsema et al. 2001; Roelfsema et al. 2004). Die Photosynthese selbst führt in Mesophyllzellen zu vorübergehenden Änderungen des Membranpotentials, wenn die Pflanzen zuvor abgedunkelt waren. Die Beleuchtung der Pflanze führt dann zu einer initialen Depolarisation, auf die dann auch unter weiterer Beleuchtung eine Repolarisation zum Ruhepotential folgt. Wird das Licht ausgeschaltet, so kann eine Hyperpolarisation des Membranpotentials beobachtet werden, die dann in der erneuten Einstellung des Ruhepotentials mündet (Brinckmann and Lüttge 1974; Elzenga et al. 1995; Stahlberg and Van Volkenburgh 1999). Elektrophysiologisch wurde dies 1995 in der Argenteum Mutante von *Pisum sativum* L. untersucht (Elzenga et al. 1995). Dabei wurden Mesophyll- und Epidermiszellen getrennt betrachtet. Die Forscher fanden, dass das Anschalten des Lichts nicht nur zu einer vorübergehenden Depolarisation des Membranpotentials führte, sondern dass dieses abhängig von der externen Cl^- Konzentration war, jedoch nicht durch die Änderung der externen K^+ oder Ca^{2+} Konzentration beeinflusst wurde. Wurden Kaliumkanäle durch Kaliumkanalblocker (TAE^+ und Ba^{2+}) gehemmt, so verstärkte sich die Depolarisation. Durch die Gabe des Photosyntheseinhibitors DCMU konnte die lichtabhängige Depolarisation unterbunden werden (Elzenga et al. 1995; Stahlberg and Van Volkenburgh 1999). Die vorübergehende Depolarisation scheint also nur durch die Photosynthese hervorgerufen zu werden.

Elektrische Signale treten auch während der Fortpflanzung in der Blüte auf und auch im Pollenschlauch kommt es zu sich ändernden Membranpotentialen (Fromm et al. 1995; Gutermuth et al. 2018). Fromm et al (1995) konnten in Hibiskus Blüten zeigen, dass die Stigmen auf Verwundung, Kälte und Bestäubung mit einer Änderung des Membranpotentials reagieren. Die so erzeugten elektrischen Signale unterschieden sich jedoch zwischen den drei Stimuli stark. Auf Verwundung und Kälte reagierten die Zellen des Stigmas ähnlich wie Mesophyllzellen anderer dikotyledoner Pflanzen. Der Kontakt des Stigmas mit Pollen führte jedoch erst zu einer ausgeprägten Hyperpolarisation und anschließend zu zahlreichen aneinandergereihten sehr schnellen Depolarisationen und Repolarisationen, ähnlich einem ‚Spiking‘ (Fromm et al. 1995). Die Einzelsignale dieses Signals waren Depolarisationen um etwa 100 mV und die Repolarisation erfolgte in 2 - 3 s (Fromm et al. 1995).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass elektrische Signale in einem breiten Spektrum physiologischer Reaktionen von Pflanzen auf ihre Umwelt eine Rolle spielen. Die auslösenden Stimuli sind dabei nicht nur abiotischer (physikalischer) Natur, sondern umfassen auch eine Vielzahl biotischer (chemischer) Stimuli. Letztere beinhalten darüber hinaus auch endogene Stimuli, welche im Falle von AtPEP1, einen Zusammenhang zwischen Immunreaktion und Auxinhomeostase nahelegen (Jing et al. 2019). Darüber hinaus ist über die Integration der elektrischen Signale in zelluläre Antworten nach wie vor nicht viel bekannt. Das breite, jedoch differenzierte Spektrum elektrischer Signale zeigt, dass Pflanzen diese Stimuli klar unterscheiden und somit z. B. auch zwischen Pathogenen, Symbionten und Artgenossen differenzieren können. Das elektrische Signalling in Pflanzen scheint daher ebenso komplex wie das der Tiere. Das scheinbare Fehlen spezialisierter Zellen für die Generierung elektrischer Signale kann durch eine generelle Fähigkeit zur elektrischen Erregbarkeit pflanzlicher Zellen kompensiert zu werden. Es bleibt die Frage nach dem molekularen Mechanismus zu klären, wie Pflanzen elektrische Signale auf zellulärer Ebene erzeugen und diese weiterleiten, um aus einem lokalen Signal ein systemisches zu generieren.

1.1.2.3 Generierung elektrischer Signale in Pflanzen

Die Aktionspotentiale in Vertebraten basieren auf einem Membranpotential, welches in erster Linie durch eine Na^+/K^+ -Pumpe generiert wird. Während des Aktionspotentials in den Neuronen werden die Zellen durch einen Einstrom von Natriumionen depolarisiert und die Repolarisation erfolgt durch den Ausstrom von Kaliumionen siehe Kap. 1.1.1. In Pflanzen wird das Membranpotential in erster Linie durch die Protonen-ATPase generiert. Auch unterscheiden sich die Ionengradienten über der Plasmamembran stark zwischen Tieren und Pflanzen. Die einzige Gemeinsamkeit ist der auswärts gerichtete Kaliumgradient. Über die Generierung elektrischer Signale in Pflanzen ist bislang nur

wenig bekannt. Eine Hypothese ist, dass die Depolarisation der Plasmamembran durch den Ausstrom von Chlorid/Anionen aus der Zelle über möglicherweise spannungsabhängige Anionenkanäle aus der Zelle erfolgt, oft in Calcium-abhängiger Weise (Lewis et al. 1997; Cho and Spalding 1996; Thomine et al. 1997; Zimmermann et al. 1998; Jeworutzki et al. 2010; Abe 1981; Stahlberg and Cosgrove 1994; Fromm and Bauer 1994). Diese schließen dann ab einem gewissen Membranpotential oder durch andere, bisher nicht bekannte Faktoren. Für diesen Teil der Hypothese gibt es einige Belege (Patch Clamp, Ionen-selektive Elektroden). Weitere Arbeiten diskutieren die Möglichkeit, dass die Depolarisation nur durch den Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} Konzentration verursacht wird (Carpaneto et al. 2007; Krol et al. 2004).

Die Hypothesen zur Repolarisation beziehen sich in erster Linie auf auswärtsgerichtete Kaliumkanäle der SKOR-GORK Familie (Felle and Zimmermann 2007; Cuin et al. 2018), die Ca^{2+} -ATPase (Krol et al. 2004) und die Protonen-ATPase (Vodeneev et al. 2006). Die auswärtsgerichteten Kaliumionenkanäle werden dabei von vielen Autoren favorisiert (Cuin et al. 2018; Fromm and Bauer 1994). Wenn die Repolarisation durch Ionenkanäle erfolgt, so müssen die Ionengradienten miteinbezogen werden, denn Kanäle sind für die Ionen im Prinzip im Offenzustand in beide Richtungen permeabel. Die Ionen folgen also ihrem elektrochemischen Gradienten. Die Flussrichtung eines Ions hängt somit von seinem Umkehrpotential ab. Dieses lässt sich über die Nernst-Gleichung berechnen, sofern die Konzentration des Ions auf beiden Seiten der Membran bekannt ist.

Vereinfachte Nernst-Gleichung zur Berechnung des Umkehrpotentials bei 25 °C von Ion x, wobei z die Äquivalenzahl und c die Stoffmengenkonzentration ist:

$$E_x = \frac{59 \text{ mV}}{z_e} \lg \frac{c_{\text{extrazellulär}}}{c_{\text{intrazellulär}}} \quad (1.1)$$

Viele Ionenkanäle sind spannungsabhängig, d.h. die Öffnung der Kanalpore wird durch die Membranspannung gesteuert, ist aber darüber hinaus häufig von verschiedenen weiteren Faktoren (z.B. extrazellulären Ionenkonzentration, pH-cytosolisch oder extrazellulär, Phosphorylierung) abhängig. Spannungsabhängige Ionenkanäle tragen in ihren Transmembrandomänen einen Spannungssensor, der die Öffnung steuert. Spannungsabhängige, Kalium-permeable Ionenkanäle gehören zur Familie der Shaker-Kaliumkanäle ((Dreyer and Blatt 2009)). In *Arabidopsis thaliana* zählen dazu sowohl Auswärtsgerichteter GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K^+ CHANNEL (GORK) und STELAR K^+ OUTWARD RECTIFIER (SKOR) als auch

Einwärtsgleichrichter z.B. Arabidopsis K^+ Transporter 1 (AKT1) und K^+ Transporter of *Arabidopsis thaliana* 1 (KAT1) (Dreyer and Blatt 2009). Spannungsabhängige Einwärtsgleichrichter sind im Wesentlichen durch eine definierte Aktivierungsschwelle charakterisiert. Diese liegt beim KAT1 Kanal bei ca. -80 bis -100 mV (Dreyer and Blatt 2009). Während des Ruhepotentials einer Mesophyllzelle bei -170 mV kommt es beispielsweise durch KAT1 zu einem permanenten Kaliumstrom, dessen depolarisierender Einfluss auf das Membranpotential durch die H^+ -ATPase kompensiert wird (Dreyer and Blatt 2009). Im Gegensatz dazu, werden spannungsabhängige Auswärtsgleichrichter durch depolarisierende Membranpotentiale geöffnet, wobei im Falle der GORK/SKOR Kanäle die Aktivierungsschwelle durch die extrazelluläre Kaliumkonzentration entscheidend mitbestimmt wird (Blatt and Gradmann 1997). Obwohl diese spannungsabhängigen Kaliumkanäle im Tierreich die Repolarisation während des APs vermitteln, konnte ihre Beteiligung an der Repolarisation im Rahmen elektrischer Signalen in Pflanzen bisher nicht eindeutig geklärt werden (Cuin et al. 2018; Felle and Zimmermann 2007).

Insgesamt ist bis heute nicht wirklich geklärt, welche Gene und die dazugehörigen Ionenkanäle an der Generierung elektrischer Signale in Pflanzen beteiligt sind. Es gibt bereits Arbeiten in denen mit der Patch-clamp-Technik Chloridströme gemessen wurden, welche in Arabidopsis die Blaulicht-induzierte Depolarisation der Plasmamembran vermitteln und auch an der Depolarisation auf Kältereize beteiligt sind (Cho and Spalding 1996; Lewis et al. 1997). Anionenkanäle der Slow-type anion channel (SLAC)/SLAC1-homologs (SLAH) Familie, aus der Gruppe der Al-activated malate transporter (ALMT) Kanäle oder der Anoctamin-ähnlichen Kanäle könnten hier eventuell eine Rolle spielen. Für die Generierung von Membranpotentialänderungen in Schließzellen und Pollenschläuchen sind Anionenkanäle essentiell. Hier sind die Gene die die Kanäle codieren bereits größtenteils bekannt (Gutermuth et al. 2018; Geiger et al. 2011; Saito and Uozumi 2019). Guzel Deger et al. (2015) konnten zeigen, dass der flg22-induzierte Stomaschluss mit einer Aktivierung der Anionenkanäle SLAC1/SLAH3 einhergeht. Ob diese Kanäle auch eine Rolle bei der Flagellin-induzierten Depolarisation in Mesophyllzellen spielen, ist nicht bekannt.

Ebenfalls in den Schließzellen wird der spannungsabhängige, auswärtsgleichrichtende Kaliumkanal GORK exprimiert. Dieser öffnet sich, wenn durch die offenen Anionenkanäle (SLAC1, SLAH3, AtALMT12) die Membran der Schließzellen depolarisiert wird (Hedrich and Geiger 2017). GORK sorgt für einen Kaliumausstrom aus der Zelle, was zu einem passiven Wassernachstrom führt, damit die Schließzelle schrumpft und der stomatäre Spalt verringert wird (Hosy et al. 2003). Das Einstellen des Ruhemembranpotentials geschieht dann höchstwahrscheinlich wieder über die Protonen-ATPase, wie in allen pflanzlichen

Zellen. Ob SLAC1, SLAH3, AtALMT12 und GORK jedoch auch für die elektrischen Signale in anderen Geweben verantwortlich sind ist unbekannt.

Die Plasmamembranständigen (PM) Protonen ATPasen (H^+ -ATPasen) sind, wie eingangs erwähnt wurde, für alle Pflanzen essentiell. Diese Proteine sind dazu in der Lage, durch die Hydrolyse von ATP Protonen entgegen ihres elektrochemischen Gradienten über die Membran zu transportieren. Es gibt verschiedene H^+ -ATPasen, diese werden als V-, F- und P-Typ-ATPasen klassifiziert. Die PM H^+ -ATPasen der Pflanzen sind P-Typ ATPasen. In Arabidopsis gibt es 11 verschiedene P-Typ H^+ -ATPasen, benannt als *AtAHA1-11* (*Arabidopsis thaliana* H^+ -ATPase) (Harper et al. 1989; Palmgren 2001). Für jeden Zelltyp gibt es ein charakteristisches Expressionsprofil dieser ATPasen. Die wichtigsten sind allerdings AHA1 und AHA2. Eine homozygote Doppelverlustmutation dieser beiden Gene ist embryolethal (Haruta et al. 2010). Laut eFP-Browser werden *AHA1* und *AHA2* in der gesamten Pflanze exprimiert, wobei AHA2 eine schwächere Expression im oberirdischen Teil, aber dafür eine verstärkte Expression in der Wurzel aufweist (Winter et al. 2007). Alle bisher isolierten *AHA1* und *AHA2* Einzelverlustmutanten sind unter Laborbedingungen lebensfähig und unterscheiden sich nicht vom Wildtyp (Haruta et al. 2010; Haruta and Sussman 2012). Ein Phänotyp ergibt sich für die Einzelverlustmutanten von AHA1 und 2 erst unter Stressbedingungen, wie einem hohem Kaliumchloridgehalt oder alkalischem pH des Mediums, da die AHAs zum Teil in ihrer Funktion redundant sind (Haruta et al. 2010; Haruta and Sussman 2012). Die *AHA1* Mutanten, welche eine reduzierte Menge AHA1 aufweisen, wie die *aha-1-9* und *aha1-10*, zeigen einen Blaulicht-abhängigen Stomaöffnungs-Phänotyp (Yamauchi et al. 2016). Rotlicht bewirkt bei ihnen eine fast identische Öffnung der Stomata wie im Wildtyp. Die Kombination aus Rotlicht und schwachem Blaulicht bewirkt bei *aha-1-9* und *aha1-10* jedoch keine, zum Wildtyp identische, Zunahme der Stomaweite (Yamauchi et al. 2016). Die Anzahl der aktiven H^+ -ATPasen wird nur geringfügig auf transkriptioneller Ebene reguliert, sondern erfolgt überwiegend durch posttranslationale Proteinmodifikation. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass die Transkriptzahl häufig nicht mit der Proteinmenge korreliert ist (Yamauchi et al. 2016; Alsterfjord et al. 2004). Bei der Aktivierung der AHAs spielen komplexe Phosphorylierungsmuster eine entscheidende Rolle (Falhof et al. 2016). Dies ergibt sich schon aus der Tatsache, dass das Genprodukt der AHAs nach der Translation und Einbau in die Membran durch Autoinhibition kaum Protonen pumpt (Pedersen et al. 2015). Diese Autoinhibition wird durch den N-Terminus und vor allem den C-Terminus des Proteins verursacht (Palmgren et al. 1991; Ekberg et al. 2010). Im etwa 100 Aminosäuren langen C-Terminus der PM H^+ -ATPasen befinden sich mehrere wichtige Phosphorylierungsstellen (Falhof et al. 2016). Solange sich die Pumpe im autoinhibierten Zustand befindet, ist die Hydrolyse von ATP nur geringfügig mit der Menge an transportierten Protonen gekoppelt (Baunsgaard et al. 1996). Das heißt, es wird ATP hydrolysiert, aber nur wenige Protonen werden über die Membran verschoben, sodass die Pumpe sich in einem basalen

Aktivitätszustand befindet (Pedersen et al. 2015; Palmgren et al. 1991; Ekberg et al. 2010). Diese Autoinhibition kann aufgehoben werden, in dem definierte Phosphorylierungsstellen phosphoryliert werden. Es gibt jedoch auch Stellen, die nach Phosphorylierung hemmend wirken (Ekberg et al. 2010) In der AtAHA2 wurden für die Phosphorylierungsstellen S899 und S931 nach Phosphorylierung eine hemmende Wirkung auf die Pumpe gezeigt (Haruta et al. 2014; Fuglsang et al. 2007). An einer Aktivierung sind die Phosphorylierungsstellen T881, T924, S931, T946 und T947 direkt oder indirekt beteiligt. Dabei wirkt sich die Phosphorylierung vor allem auf die Bindung der 14-3-3 Proteine aus (Fuglsang et al. 1999; Fuglsang et al. 2003; Fuglsang et al. 2014). 14-3-3 Proteine sind lösliche Proteine im Cytoplasma, die an andere Proteine binden und deren Konformation stabilisieren können (Ottmann et al. 2007; Alsterfjord et al. 2004). Die Bindung von PM H⁺-ATPase und 14-3-3 Protein ist sehr wichtig für die Konformationsänderung der PM H⁺-ATPase und damit die Aufhebung der Autoinhibition (Fuglsang et al. 1999; Fuglsang et al. 2003; Ottmann et al. 2007). 14-3-3 Proteine binden dabei an das vorletzte Threonin (T947 in AHA1, T948 in AHA2). Die Phosphorylierung dieses Threonins ist also essentiell, um die PM H⁺-ATPase vom basalen in den aktivierten Zustand zu bringen (Fuglsang et al. 1999; Fuglsang et al. 2003; Alsterfjord et al. 2004; Ottmann et al. 2007). Die Kinasen, die die direkte Phosphorylierung des vorletzten Threonins durchführen, sind bisher noch weitestgehend unbekannt. Es wird eine Beteiligung der TOR-Kinasen diskutiert (Van Leene et al. 2019).

Es gibt viele Stimuli, die über Kinasen und Phosphatasen auf die Aktivität der H⁺-ATPase wirken. Der wichtigste Stimulus ist Blaulicht, welches über die Blaulicht-aktivierten Proteinkinasen Phototropin1 und 2 als Photorezeptoren wahrgenommen wird und in Schließzellen die Kinase BLUS1 phosphoryliert (Takemiya et al. 2013; Takemiya et al. 2005). Die so aktivierte BLUS1 sorgt dann über die Phosphorylierung nachgeschalteter Kinasen dafür, dass die AHA2 an Position T947 phosphoryliert wird, womit eine Bindungsstelle für die 14-3-3 Proteine geschaffen und damit die Autoinhibition aufgehoben wird (Falhof et al. 2016; Takemiya et al. 2013). Da BLUS1 vor allem in Schließzellen und kaum im Mesophyll exprimiert wird, gibt es im Mesophyll möglicherweise eine andere Kinase, die die Blaulicht-vermittelte Phosphorylierung der AHAs über die Phototropine bewirkt. Denn auch im Mesophyll führt Blaulicht zu einer verstärkten Phosphorylierung der H⁺-ATPase, sowohl bei Arabidopsis, als auch im Lebermoos *Marchantia polymorpha* (Okumura et al. 2016; Okumura et al. 2012). Es ist auch ein alternatives Modell im Gespräch, das davon ausgeht, dass eine Phosphatase die Phosphorylierung durch eine konstitutiv aktive Kinase unterbindet und diese Phosphatase durch Phot1/2 und BLUS1 indirekt gehemmt wird, wodurch die konstitutiv aktive Kinase die H⁺-ATPasen phosphorylieren kann (Spartz et al. 2014; Falhof et al. 2016). Blaulicht sorgt also dafür, dass die H⁺-ATPasen in einen aktiven Zustand gebracht werden. Die H⁺-ATPase ist in Pflanzen auch der treibende Faktor bei der Öffnung der Stomata (Inoue and Kinoshita 2017). Gleichzeitig sind die Stomata auch die Haupteintrittspforte für Bakterien

und Pilze, die als Pathogene der Pflanze schaden. Wenn Pflanzen Pathogene über die oben beschriebenen MAMPs perzipieren, schließen sie ihre Stomata, um das Eindringen der Pathogene zu unterbinden. Bisher konnte die Interaktion von MAMPs perzipierenden Rezeptorkinasen mit den H^+ -ATPasen noch nicht gezeigt werden. Es ist jedoch bekannt, dass *flg22* in vivo zu einer Änderung des Phosphorylierungsstatus der H^+ -ATPase führt und mit einer Inhibition einhergeht (Falhof et al. 2016). Es ist aber bereits gezeigt worden, dass Rezeptorkinasen, die pflanzliche Wachstumsfaktoren und Phytohormone wahrnehmen, häufig auch mit der H^+ -ATPase interagieren (Fuglsang et al. 2014; Ladwig et al. 2015; Caesar et al. 2011; Xue et al. 2018; Takahashi et al. 2014; Fuglsang et al. 2007). Wie diese Interaktionen genau verlaufen, ist bisher noch weitestgehend unbekannt. Die Wirkungen einzelner Phytohormone auf die H^+ -ATPase sind jedoch bereits teilweise bekannt. Es konnte sowohl in Zellkulturen, als auch im Arabidopsis Hypokotyl gezeigt werden, dass das Wachstumshormon Auxin (Indol-3-Essigsäure-IAA) zu einer gesteigerten Phosphorylierungsrate der AHAs, am vorletzten Threonin (T947/T948), führt (Chen et al. 2010; Takahashi et al. 2012). Das für den Stomaschluss essentielle Trockenstresshormon Abscisinsäure (ABA wirkt sich ebenfalls auf den Phosphorylierungsstatus der AHAs aus (Falhof et al. 2016). In der Anwesenheit von ABA sinkt das Niveau an phosphoryliertem T947/T948 (Chen et al. 2010; Xue et al. 2018; Takahashi et al. 2014; Hayashi et al. 2011; Bueso et al. 2014). Dabei vermag ABA die Blaulicht-induzierte Phosphorylierung des vorletzten Threonins zu unterbinden (Hayashi et al. 2011). In einem Screeningexperiment haben Chen et al. 2010 außerdem herausgefunden, dass das Cytokinin Kinetin die Phosphorylierung von T947 verringert, während das Phytohormon Gibberellinsäure die Phosphorylierung des T947 fördert (Chen et al. 2010).

Wie schon erwähnt, versuchen Pflanzen nach Pathogenbefall die Stomata zu schließen. Einige Pathogene haben Toxine, die dieses verhindern oder rückgängig machen. Das auch für die Forschung bedeutsamste Beispiel ist das Pilzgift Fusicoccin von *Fusicoccum amygdali*. Fusicoccin sorgt dafür, dass die Bindung der 14-3-3 Proteine an die H^+ -ATPase irreversibel stabilisiert wird und aktiviert die Pumpe damit maximal (Johansson et al. 1993; Lanfermeijer and Prins 1994). In planta bewirkt dies eine sehr schnelle Öffnung der Stomata. Durch den massiven Ausstrom von Protonen wird die Plasmamembran hyperpolarisiert und einwärtsgerichtete Kaliumkanäle aktiviert (KAT1, AKT1) (Saito and Uozumi 2019). Über Transporter werden gleichzeitig auch Anionen ins Cytoplasma gebracht, was in der Summe das osmotische Potential erhöht und zu einem Wassereinstrom führt (Saito and Uozumi 2019). Der Turgordruck wird erhöht, die Schließzellen schwellen an und der stomatäre Spalt öffnet sich. Dies ermöglicht in der Folge den Pilzen ein Eindringen in die Pflanze, wobei sie die widerstandsfähige Kutikula und Epidermis umgehen können. Fusicoccin gibt ein eindrucksvolles Beispiel dafür, wie sehr die H^+ -ATPase das pflanzliche Membranpotential formt. Die Zugabe von Fusicoccin sorgt innerhalb weniger Minuten für das Absinken des Ruhepotentials um etwa 35 mV.

Fusicoccin ist eines der wenigen pharmakologischen Werkzeuge zum Studium der H^+ -ATPase in Pflanzen. Ein weiteres häufig eingesetztes Werkzeug ist Orthovanadat, welches im Gegensatz zu Fusicoccin die Aktivität von P-Typ ATPasen hemmt.

Die Vergiftung der H^+ -ATPase durch Orthovanadat führt über die Zeit zu einem Anstieg des Membranpotentials im Gurkenhypokotyl von -144 mV auf -84 ± 8 mV (Spalding and Cosgrove 1992), was nahe am Umkehrpotential für Kalium liegt. Da der Einfluss der H^+ -ATPasen auf das Membranpotential so groß ist, ist es wahrscheinlich, dass die Pumpe auch einen wesentlichen Teil zur Repolarisation der Plasmamembran nach einer Depolarisation beiträgt. Dafür spricht auch, dass die H^+ -ATPase spannungsabhängig ist (Lohse and Hedrich 1992; Becker et al. 1993). Bei positiven Membranspannungen ist sie aktiver und deaktiviert dann langsam, bis sie bei etwa -200 mV nur noch eine geringe Pumpleistung aufweist (Lohse and Hedrich 1992; Becker et al. 1993). Eine Inaktivierung der H^+ -ATPase ist jedoch wahrscheinlich nicht der Hauptgrund für die Depolarisation bei elektrischen Signalen, denn durch eine Überaktivierung kann immer noch mit flg22 depolarisiert werden (Jeworutzki et al. 2010). Die Beteiligung der H^+ -ATPase an der Repolarisation in Pflanzen aufzuklären, ist schwierig. Die meisten Stimuli, die eine Depolarisation in Pflanzen hervorrufen, haben schädigende/stark beeinträchtigende Wirkung auf die Pflanze, die Ausnahme bildet ein Kältereiz. Verwundung, chemische Elicitoren und Hitze haben schädigende Effekte auf die Zellen und die dadurch hervorgerufene elektrischen Signale sind meist einmaliger Natur und bedürfen einer langen Erholungszeit, um erneut ausgelöst werden zu können. Gleichzeitig müssten Versuche mit und ohne Hemmung der H^+ -ATPase, am besten an der gleichen Probe, durchgeführt werden, was invasive Stimuli ausschließt. Prinzipiell ist nur der Kältestimulus geeignet, um nicht-invasiv ein elektrisches Signal auszulösen. Doch auch hier ist die Amplitude der Depolarisation schwankend und eine Desensibilisierung der Pflanzen für den Reiz kann nicht ausgeschlossen werden. Die gleichen Überlegungen gelten für die Hypothese, dass die Kinetik der Repolarisation durch auswärtsgleichrichtende Kaliumkanäle mitbestimmt wird. Auch hier ist die Auslösung einer vergleichbaren schnellen nicht-invasiven Depolarisation an der gleichen Probe mehrmals hintereinander das größte Problem. Aus diesem Grunde haben wir nach einer nicht- bzw. minimal-invasiven Methode gesucht, welche reproduzierbare Depolarisationen des Membranpotentials erzeugen kann. In Anlehnung an den erfolgreichen Einsatz optogenetischer Werkzeuge in der Neurobiologie wurde deshalb versucht, das optogenetische Werkzeug Channelrhodopsin-2 aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* in Pflanzen funktionell zu exprimieren.

1.2 Optogenetische Werkzeuge zur Generierung elektrischer Signale

Die Optogenetik umfasst eine Vielzahl molekularbiologischer Werkzeuge, die seit 2005 zunehmend in der Forschung, vor allem in der Neurobiologie, Anwendung finden. Per Definition ist Optogenetik die Licht-vermittelte Manipulation physiologischer Prozesse auf der Basis genetisch codierter sensorischer Photorezeptoren. 2010 wurde diese Methode von Nature zur Methode des Jahres erklärt (Method of the Year 2010 2010). Ihren Ursprung hatte die Optogenetik in der Entdeckung der Licht-gesteuerten Protonen bzw. Kationenkanäle Channelrhodopsin-1 und -2 aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* 2002 und 2003 durch Georg Nagel, Peter Hegemann und Ernst Bamberg (Nagel et al. 2002; Nagel et al. 2003). Während die Veröffentlichung erster Versuche mit Channelrhodopsin 2 (ChR2) exprimierenden tierischen Zellen 2005 als Geburtsstunde der Optogenetik gilt (Nagel et al. 2005a; Boyden et al. 2005), ist das Spektrum optogenetischer Werkzeuge in den vergangenen 15 Jahren kontinuierlich angewachsen.

1.2.1 Überblick optogenetische Werkzeuge

Inzwischen gibt es eine Vielzahl optogenetischer Werkzeuge. Die meisten Proteine, welche als optogenetische Werkzeuge genutzt werden, stammen aus Bakterien, Algen oder Pflanzen und nur wenige aus Tieren. Es handelt sich dabei um Proteine, welche in den Ursprungsorganismen der Lichtwahrnehmung im weitesten Sinne dienen. Meist dienen sie der Licht-abhängigen Steuerung oder Optimierung physiologischer Prozesse, z.B. Induktion der Fortpflanzung oder Bewegung zur Lichtquelle hin. Durch gezielte Mutagenese der ursprünglichen Proteine aus diesen Organismen wurden ihre Eigenschaften den experimentellen Anforderungen angepasst bzw. für diese optimiert. Prinzipiell stellen alle optogenetischen Werkzeuge sensorische Photorezeptoren dar. Es handelt sich also um Proteine, welche mit Hilfe eines Chromophors Licht einer definierten Wellenlänge für eine Konformationsänderung nutzen können und in Folge dessen eine Funktion ausführen. Dabei ist der Aufbau der jeweiligen Proteine sehr divers.

Bei vielen optogenetischen Werkzeugen findet sich ein modularer Aufbau aus zwei, auch getrennt funktionalen, Proteinen, welche über einen Linker miteinander verbunden sind. Dabei trägt das eine Protein, das als photosensorische Einheit fungiert, das Chromophor und ein weiteres Protein bildet die funktionale Einheit, die die Signaltransduktion im weitesten Sinne erzeugt, beispielsweise ein Enzym. Bei einer kleineren Gruppe ist das Chromophor in das ausführende Protein eingebettet und es ist nicht möglich, zwei funktionale Einheiten voneinander abzugrenzen z.B. das ChR2. Durch den häufig modularen Aufbau ist es möglich, künstlich neue sensorische Photorezeptoren zu

konstruieren. Dies ermöglicht eine fast unendliche Anzahl von Anwendungen und stellt ein stetig wachsendes Feld dar.

Die existenten optogenetischen Werkzeuge lassen sich z.B. aufgrund ihres Chromophors, ihrer Funktionsweise (Ionenpumpe oder Kanal, Enzym, usw.) oder ihrer Herkunft klassifizieren. Ausführliche Übersichtsarbeiten zu dieser Thematik bzw. ihren Teilgebieten haben beispielsweise Ziegler und Möglich (2015), Govorunova et al. (2017) oder Hoffmann et al. (2018) verfasst. Für einen möglichen Einsatz einer optogenetischen Methode zur Manipulation des Membranpotentials pflanzlicher Zellen bietet sich ein direkt Licht-gesteuerter Ionenkanal an. Im Folgenden soll kurz auf den Einsatz und die Funktionsweise sensorischer Photorezeptoren, Licht-aktivierter Enzyme, vor allem aber Licht-gesteuerter Ionenkanäle und Licht-getriebener Ionenpumpen eingegangen werden.

1.2.1.1 Optogenetische Werkzeuge und Optogenetikdesign

Die Klasse der Light–oxygen–voltage sensitive (LOV) Domänen enthaltenden Flavoproteine, zu denen auch die pflanzlichen Phototropine gehören, fungieren als sensorische Photorezeptoren, die es einer Vielzahl von Organismen (Bakterien, Archaeen, Pilzen, Algen und höheren Pflanzen) ermöglichen, blaues Licht wahrzunehmen. Zur Lichtwahrnehmung benötigen LOV-Domänen Flavinmononukleotid (FMN) oder Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Chromophor (Möglich et al. 2010; Ziegler and Möglich 2015). Dient FAD als Co-Faktor, spricht man von einer BLUF-Domäne. LOV Photorezeptoren sind durch einen intramolekularen, modularen Aufbau charakterisiert, bestehend aus einer Sensor- (LOV) und einer Effektor-Domäne, deren Blaulicht-abhängige, reversible Interaktion eine Konformationsänderung in der Protein-Tertiärstruktur auslöst, und somit die Wahrnehmung des Lichtreizes in eine physiologische Antwort umsetzt.

LOV-Domänen sind Photorezeptoren, die in einer Vielzahl von zu finden sind. Ihre natürliche Funktion ist die Perzeption von Licht. Dabei sind die LOV-Domänen an Effektorproteine gekoppelt, deren Funktion sehr vielgestaltig sein kann und beide Einheiten zusammen einen funktionalen sensorischen Photorezeptor schaffen (Glantz et al. 2016). In der Natur sind LOV-basierte sensorische Photorezeptoren an vielen zellphysiologischen Vorgängen beteiligt, welche durch Licht gesteuert werden müssen. Dieser modulare Aufbau und die geringe Größe der LOV Domäne (100 – 140 Aminosäuren) ermöglicht das Design chimärer Proteine, bei denen die LOV Domäne mit Effektordomänen ausgewählter Enzyme/Proteine gekoppelt und gentechnisch in einen Zielorganismus eingebracht werden. Dort kann das Effektorprotein dann Licht-abhängig gesteuert werden. So wurde beispielsweise durch die Fusion einer LOV-Domäne mit dem STIM1 (stromal interaction molecule 1) Protein eine photoaktivierbare Version dieses Calcium Sensors erzeugt (Pham et al. 2011). Nach Lichtstimulation aktiviert STIM1 den

plasmamembranständigen ORAI1 Ca^{2+} -Kanal und ermöglicht somit die nicht-invasive Generierung lokaler Calcium Signale.

Die Idee, mit Hilfe von Licht nicht-invasiv in zelluläre Signaltransduktionsketten einzugreifen, konnte mit der Entdeckung sensorischer Photorezeptoren mit Enzymcharakter in verschiedenen Algen und Bakterien neue optogenetische Möglichkeiten eröffnen. Hier werden insbesondere Licht-abhängige Adenylat-Cyclasen, welche ATP zum sekundären Botenstoff cAMP umsetzen, genutzt. Diese Adenylat-Cyclasen erhalten ihre Licht-abhängige Funktion ebenfalls über die Verknüpfung mit Flavin-abhängigen LOV-Sensordomänen. Als optogenetische Werkzeuge sind bisher beispielsweise bPAC aus dem Bodenbakterium *Beggiatoa sp.* und euPAC α und β aus der Grünalge *Euglena gracilis* publiziert worden (Gao et al. 2015; Raffelberg et al. 2013). Auch Licht-abhängige Guanylatcyclasen sind bekannt, beispielsweise aus den aquatischen Pilzen *Allomyces reticulatus* und *Blastocladiella emersonii* (Scheib et al. 2015; Avelar et al. 2014). Sie gehören allerdings in die Familie der Rhodopsine. Durch Codonoptimierung der Guanylatcyclase von *Blastocladiella emersonii* ist das optogenetische Werkzeug BeCyclOp entstanden, welches in tierischen Zellen zur Licht-gesteuerten Manipulation cGMP-abhängiger Signalwege erfolgreich eingesetzt wird (Gao et al. 2015). BeCyclOp ist darüber hinaus ein gutes Beispiel für die Optimierung natürlich vorkommender sensorischer Photorezeptoren, um eine Anwendung in der Optogenetik möglich zu machen.

Obwohl bisher mehr als 6.700 Proteinensequenzen als mögliche LOV-Domänen gefunden wurden (Glantz et al. 2016), kommt in bisher designten optogenetischen Werkzeugen vor allem die AsLOV2-Domäne aus Hafer (*Avena sativa*) zum Einsatz (Ziegler and Möglich 2015). AsLOV2 stammt aus dem Phototropin-1 des Hafers und zeichnet sich durch ihre geringe Größe von nur knapp 16.5 kDa, sowie durch ihre ausgezeichnete strukturelle Charakterisierung aus (Hoffmann et al. 2018). Ihr Co-Faktor FMN dient als Chromophor und die Anregung erfolgt durch Blaulicht mit 450 nm. Nach der Anregung durch Blaulicht erholt sich AsLOV2 im Sekundenbereich wieder. Dies ist ein wichtiger Punkt, denn die Zeitspanne, die ein Photorezeptor bzw. ein optogenetisches Werkzeug zur sogenannten ‚dark recovery‘, also zur Erholung oder Wiederherstellung der Reaktion auf Licht, benötigt, ist entscheidend für seinen Einsatz. Da dies bei AsLOV2 in wenigen Sekunden der Fall ist, ist es für den Einsatz in den meisten neurobiologischen Anwendungen zu langsam, aber für viele zellbiologische Anwendungen optimal. Beispiele für optogenetische Werkzeuge auf Basis von AsLOV2 sind BLINK1, ein Licht-gesteuerter viraler Kationenkanal (Cosentino et al. 2015), L57V, Tandem-Fusion mit der katalytischen Domäne der humanen Caspase 7, die zur Licht-induzierten Apoptose genutzt werden kann (Mills et al. 2012), oder auch zur Licht-gesteuerten DNA-Bindung von Repressoren in *E. coli* (Strickland et al. 2008). Darüber hinaus gibt es noch eine Vielzahl weiterer bereits etablierter Anwendungen und es kommen stetig neue hinzu. Das in der Neurobiologie

wichtigste Werkzeug ist jedoch das Channelrhodopsin-2, da es extrem schnelle Änderung des Membranpotentials ermöglicht.

1.2.1.2 Natürlich vorkommende Licht-gesteuerte Ionenkanäle und Ionenpumpen

Eine große Gruppe optogenetischer Werkzeuge bilden die Licht-gesteuerten/abhängigen Ionenkanäle und Ionenpumpen. Diese können durch einen Lichtstimulus reversibel zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand geschaltet werden. Im Falle der Pumpen wird das Licht direkt zur Energetisierung eines Transportprozesses genutzt. Das erste optogenetische Werkzeug entstammte dieser Gruppe, das Channelrhodopsin-2, und die ersten optogenetischen Anwendungen damit wurden 2005 veröffentlicht (Boyden et al. 2005; Nagel et al. 2005a). Wichtigste Vertreter sind die Licht-gesteuerten Kationenkanäle Channelrhodopsin-1 und -2 (ChR) aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Nagel et al. 2002; Nagel et al. 2003; Nagel et al. 2005b), die aus der Gruppe der Archaeen stammenden Licht-getriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin (BR) aus *Halobacterium salinarum* (Geibel et al. 2001) und die Licht-getriebene Chloridpumpe Halorhodopsin (NpHR) aus *Natronomonas pharaonis* (Bamann et al. 2010b). Daneben wurden erst vor wenigen Jahren Licht-gesteuerte Anionenkanäle aus verschiedenen Mikroalgen der Klasse Cryptophyceae entdeckt, sogenannte ACRs (engl. anion channel rhodopsins) (Govorunova et al. 2015). Alle vier Typen sind auch in weiteren Algen bzw. Archaeen zu finden und gehören zur Proteinklasse der Opsine. Opsine bilden eine sehr große Proteinfamilie, die in verschiedenen Eubakterien, Archaeen und Eukaryoten vorkommen. Dabei wird grundlegend zwischen mikrobiellen und eukaryontischen Opsinen unterschieden, wobei in Algen und Pilzen Opsine des mikrobiellen Typs gefunden werden. Es ist dabei nicht geklärt, ob Opsine beider Typen sich homolog oder analog entwickelt haben. Trotz ihrer ungeklärten Evolution sind alle Opsine Transmembranproteine mit sieben transmembranen Helices und kommen zunächst als Apoproteine vor. Opsine benötigen den Co-Faktor Retinal (meist all trans-Retinal in den mikrobiellen Opsinen, cis-11-Retinal bei Tieren), um zum funktionalen Protein zu werden, welches nach der Bindung von Retinal als Rhodopsin bezeichnet wird. Das Retinal wirkt dabei als Chromophor und ermöglicht die Steuerung oder die Energetisierung der Rhodopsine durch sichtbares Licht (Hohmann-Marriott and Blankenship 2011). Die tierischen Opsine, die für den Sehprozess der Tiere entscheidend sind, spielen in der Optogenetik eine eher untergeordnete Rolle. Sie gehören, im Gegensatz zu den mikrobiellen Rhodopsinen, zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Durch die Einwirkung von Licht auf das Chromophor cis-11-Retinal wird das Retinal abgespalten und es kommt zu einer Konformationsänderung, die das gekoppelte G-Protein aktiviert. Es kommt zur Umsetzung von cGMP zu GMP. Dadurch werden Ligand-gesteuerte Natriumkanäle geschlossen, die für den Offenzustand cGMP als Ligand benötigen (Alberts et al. 2012). Durch den Schluss der Natriumkanäle kommt es zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials in der Sehzelle. Auch diese Opsine können als

optogenetische Werkzeuge genutzt werden. Dazu werden sie entweder in andere Zellen als Sehzellen eingebracht.

Die Steuerung von Ionenkanälen durch Licht, im besonderen ChR2 und ACRs, haben inzwischen einen festen Platz in der experimentellen und beginnend auch in der klinischen Neurobiologie und Zellbiologie. Mit der Entdeckung des ChR2 2003 wurde sofort die Idee geboren, dieses Protein in Neuronen einzubringen. Die Depolarisation des Membranpotentials durch Licht, und damit eine zeitliche und räumliche Steuerung von Aktionspotentialen, eröffnete der Neurobiologie ein völlig neues Feld. Die meisten optogenetischen Werkzeuge haben ihren Ursprung deshalb in der Neurobiologie.

1.2.2 Channelrhodopsin-2 und seine Mutanten

In der Neurobiologie ist ChR2 mit seinen Varianten nicht mehr wegzudenken. Das wildtypische ChR2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* spielt dabei jedoch heute keine Rolle mehr. Durch gezielte Mutationen des Proteins ist eine Fülle von Varianten entstanden, die die Anwendungsmöglichkeiten stark ausgedehnt haben. Dabei führen einzelne, gezielte Punktmutationen oftmals zu veränderten biophysikalischen Eigenschaften des Proteins. In der Optogenetik wird die vollfunktionsfähige, C-terminal trunke Version des ChR2 bestehend aus 315 Aminosäuren genutzt (Nagel et al. 2003). Wie alle Opsine ist das genetischkodierte Protein ein Apoprotein und wird zunächst als Channelopsin2 bezeichnet. Durch die Bindung seines Chromophors all trans-Retinal als Co-Faktor wird es zum funktionellen Channelrhodopsin-2 (ChR2). Ohne die Retinalbindung degradiert das Apoprotein rasch (Nagel et al. 2003). In *Chlamydomonas* ist ChR2 im Augenfleck für die Phototaxis bei Schwachlicht verantwortlich und degradiert unter Starklichtbedingungen (Nagel et al. 2003). In der Alge wurde das Protein 2002 und 2003 biochemisch charakterisiert bzw. bioinformatisch modelliert (Sineshchekov et al. 2002; Suzuki et al. 2003). Die ersten elektrophysiologischen Messungen an ChR2 im heterologen Expressionssystem von *Xenopus laevis* Oozyten, sowie in Säugerzellen, wurden 2003 durch Nagel et al. veröffentlicht (Nagel et al. 2003). Diese Arbeit zeigte eindrucksvoll, dass es sich bei dem ChR2 Protein tatsächlich um einen Blaulicht-gesteuerten Kationenkanal handelt (Nagel et al. 2003). Blaulicht mit einer Wellenlänge von 440 - 480 nm (Optimum \sim 460 nm) triggert die Kanalöffnung und damit das instantane Einsetzen des ‚Photocurrents‘. ChR2 vermittelt für fast alle mono- und divalenten Kationen eine Leitfähigkeit, wobei die Reihenfolge der Permeabilität umgekehrt proportional zum Atomradius der Kationen ist. Dabei ergibt sich eine Selektivität in folgender Reihenfolge: $H^+ \gg Li^+ > Na^+ > K^+ \gg Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+} \gg Zn^{2+}$. Mg^{2+} kann den Kanal nicht passieren (Nagel et al. 2003). Das für Mg^{2+} keine Leitfähigkeit besteht, kann an der stark gebundenen Hydrathülle liegen und spricht für die Hypothese, dass die Kationen ChR2 weitestgehend ohne ihre Hydrathülle und selektiv nach ihrem Atomradius

passieren (Nagel et al. 2003; Hille 2001). Dabei ist die Leitfähigkeit für H^+ 106 mal größer als für Na^+ . Die Kinetik der Blaulicht-aktivierten, ChR2-vermittelten Ströme folgen dabei einem typischen Muster. Unmittelbar nach Lichtgabe ($\leq 200 \mu s$) wird ein Spitzenstrom (engl. peak current) gemessen, der dann sofort in ein stationäres Niveau mit verminderter Amplitude (engl. stationary level) relaxiert (Nagel et al. 2003). Dieses stationäre Niveau stellt sich im anhaltenden Licht ein und bleibt dann weitestgehend konstant, da eine definierte Fraktion der ChR2 Kanäle inaktiviert. Nach Ausschalten des Blaulichts deaktivieren die ChR2 Kanäle und der Strom kehrt zum Ausgangsniveau zurück. Die Schlusskinetik des ChR2 ist dabei vom intrazellulären pH-Wert abhängig und unabhängig vom extrazellulären pH-Wert. Je saurer das Cytoplasma ist, desto langsamer ist die Schließkinetik (Nagel et al. 2003). Wird das Licht abgeschaltet, jedoch in kurzem Abstand erneut Blaulicht gegeben. Dies spricht für eine Desensibilisierung von ChR2 durch Blaulicht. Wie oben bereits für andere Photorezeptoren beschrieben, benötigt auch ChR2 für eine vollständige Wiederherstellung eine gewisse Erholung im Dunkeln (dark recovery). Wie lange die Phase ohne Licht dauern muss, um den Spitzenstrom wieder in vollem Umfang generieren zu können, ist ebenfalls abhängig von den Umgebungsbedingungen. Die ‚dark recovery‘ wird durch negative Membranpotentiale, sowie saure extrazelluläre pH-Werte beschleunigt (Nagel et al. 2003).

Das Studium schneller neuronaler Prozesse mit Hilfe der Optogenetik erforderte die Generierung von verbesserten Varianten des ChR2. Beispielsweise ist das ChR2 für viele Anwendungen in diesem Feld in seiner Schließkinetik zu langsam (Deisseroth and Hegemann 2017). Zur Lösung dieses Problems wurden ChR2 Mutanten generiert. Eine Erste war 2009 die ChIEF Variante - einer, Chimäre aus ChR1 und ChR2 mit einer Punktmutation (I170V im ChR2-Teil). Die ChIEF Variante zeigt eine geringere Desensibilisierung im Blaulicht und eine beschleunigte Schließkinetik (Lin et al. 2009). Eine weitere Beschleunigung der Schließkinetik des ChR2 konnte mit der ChR2 E123T accelerated (ChETA) Mutante erzielt werden (Gunaydin et al. 2010). Mit der ChETA Variante ist es möglich, Neuronen mit bis zu 200 Hz zu erregen. Auch die Affinität zu Retinal ist ein limitierender Faktor für die Anwendung des ChR2. Im tierischen System ist zwar in allen Zellen Retinal vorhanden, jedoch nur in sehr geringen Mengen. Deshalb ist es häufig notwendig, Retinal im Experiment zu supplementieren, da es ohne ausreichend Retinal zu einer schnellen Degradation des Apoproteins kommt (Dawydow et al. 2014). Aufgrund der Gewebedicke oder Licht-abschirmender Pigmente (Melanin) ist zudem die Applikation von Blaulicht in den meisten Tiermodellen schwierig. Im Gegensatz zu Licht längerer Wellenlänge erreicht Blaulicht nur die oberen Zellschichten eines Gewebes. Daher wurde in Säugern parallel zur Etablierung der Optogenetik auch Lichtleiter entwickelt, die durch eine Operation tief im Gehirn der Tiere fixiert werden konnten. Doch dies ist nur bis zu einer gewissen Größe des Tieres möglich und eine freie Bewegung der Versuchstiere wird stark eingeschränkt. Bei anderen Tiermodellen der Neurobiologie, wie

z.B. *Drosophila melanogaster*, ist dies ohnehin nicht möglich. Auch die für die Aktivierung des ChR2 benötigte Lichtstärke stellt im Experiment ein Problem dar; zum einen durch Abschwächung durch Zellschichten im Gewebe, zum anderen aufgrund der Tatsache, dass hochenergetisches Blaulicht ab einer gewissen Intensität zu einer Erwärmung des bestrahlten Gewebes führt. 2014 wurde eine Variante des ChR2 veröffentlicht, mit der gleich mehrere dieser Probleme auf einmal behoben werden konnten. Sie wurde ChR2-XXL (ChR2 D156C) genannt (Dawydow et al. 2014). Durch die Mutation der Asparaginsäure an Position 156 zu einem Cystein verändern sich gleich mehrere Charakteristika des ChR2. ChR2-XXL gehört zu den sogenannten langsamen Mutanten, denn ihre Schließkinetik ist stark verlangsamt. Dies schließt sie für gewisse Anwendungen in der Neurobiologie aus, eröffnet jedoch in anderen Bereichen neue Möglichkeiten. So ist der ChR2-XXL vermittelte Spitzenstrom in *Xenopus* Oozyten etwa 19 mal größer als beim ChR2 WT. ChR2-XXL zeigt in seiner Amplitude damit den größten Strom, der bisher mit einem ChR2 im heterologen Expressionssystem generiert werden konnte (Dawydow et al. 2014). Die ChR2-XXL Variante ist zudem durch eine erhöhte Affinität zum Retinal charakterisiert und für seine Aktivität ist das im tierischen System intrinsisch vorkommende Retinal bereits ausreichend, kann allerdings durch Retinal Supplementation zusätzlich erhöht werden (Dawydow et al. 2014). Bemerkenswert ist auch die stark gesteigerte Lichtsensitivität von ChR2-XXL gegenüber ChR2 WT. In transgenen *Drosophila melanogaster* konnten Dawydow und Gueta et al. zeigen, dass die Lichtsensitivität 10.000-mal höher ist als im ChR2 WT (Dawydow et al. 2014). Die ChR2-XXL Variante bietet somit durch nur eine einzige Punktmutation gleich mehrere verbesserte Eigenschaften: i) sie ist ohne zusätzliches Retinal stabiler als der ChR2 WT, ii) sie kann deutlich größere Ströme generieren und iii) sie besitzt eine höhere Lichtsensitivität. Diese Eigenschaften machen die ChR2-XXL Variante auch zu einem geeigneten Kandidaten bei der Implementation eines ChR2s in höheren Landpflanzen. Pflanzen enthalten kein messbares Retinal und ihre Pigmente absorbieren Blaulicht. Die verbesserte Proteinstabilität in Abwesenheit von Retinal und die erhöhte Lichtempfindlichkeit der ChR2-XXL Variante tragen diesem Umstand Rechnung. Die vergleichsweise langsame Schlusskinetik des ChR2-XXL reflektiert zudem die Kinetik der meisten zu beobachtenden elektrischen Signale in Pflanzen.

1.3 Zielsetzung

In der Neurobiologie und Zellbiologie haben sich optogenetische Werkzeuge seit der Veröffentlichung der ersten Arbeiten über ChR2 2005 zu einem etablierten System entwickelt. Es gibt zahlreiche Einsatzmöglichkeiten, deren Zahl durch die aktuelle Forschung stetig erweitert wird. Der Einsatz optogenetischer Werkzeuge in Pflanzen hingegen ist bisher nur wenig erprobt.

Erste Arbeiten auf diesem Gebiet stammten von M. Baumann, welche im Rahmen ihrer Dissertation die Funktion von transient exprimierten ChR2-Varianten in *N. benthamiana* nachweisen konnte.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, nun eine umfassende elektrophysiologische Charakterisierung ausgewählter ChR2 Varianten in stabil exprimierenden *A. thaliana* Pflanzen durchzuführen und dabei die Eignung des ChR2 als optogenetisches Werkzeug zum Studium elektrischer Signale in Pflanzen zu prüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Allgemeines und verwendete Chemikalien

Sofern nicht anders erwähnt wurden alle Zentrifugationsschritte in einer Tischzentrifuge 5418R der Firma Eppendorf durchgeführt. Die automatischen Mikroliterpipetten waren aus der Serie LABMATE pro von der Firma PZ HTL S.A. Lab Solutions (Warschau). Eine Tabelle aller verwendeten Einmalartikel und Chemikalien findet sich im Anhang. Alle Fotografien, in dieser Arbeit wurden selbst angefertigt, dazu wurden folgende Kameramodelle verwendet: Canon IXUS 950 IS, Canon EOS M10, Canon EOS M50.

2.1.2 Extraktion genomischer DNA aus Pflanzen

Am Anfang aller Molekularbiologie steht geeignetes genetisches Material. Zur Klonierung, sowie zur Genotypisierung transgener Pflanzen muss aus den pflanzlichen Zellkernen die genomische DNA isoliert werden. Dies wurde mit der Methode nach Edwards durchgeführt (Edwards et al. 1991), welche kostengünstig und robust ist. Ein Schockgefrieren des Pflanzenmaterials in flüssigem Stickstoff ist nicht unbedingt nötig. Die Methode erlaubt obendrein eine rasche Extraktion vieler Proben. Es wird nur wenig Pflanzenmaterial benötigt, einige Blüten, oder eine Blattscheibe von 4 mm Durchmesser waren ausreichend. Die Proben wurden in ein 1,5 ml Standard-Reaktionsgefäß gegeben und meist vor der weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren. Zu Beginn der Extraktion wurden das Pflanzenmaterial zerkleinert. Größere Probenzahlen wurden mit zwei Keramikugeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer stickstoffgekühlten Kugelmühle (TissueLyser II Qiagen; 30 Hz für 45 s) gemörsert. Kleinere Probenzahlen wurden tiefgefroren (-20 °C) und mit einem Edelstahlhandpistil direkt im Standard-Reaktionsgefäß zerdrückt.

Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde mit 400 µL Edwardspuffer gründlich gemischt und anschließend 10 - 15 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 16.873 x g für 4 min bei RT. Vom Überstand wurden 350 µL in ein frisches Standard-Reaktionsgefäß mit 350 µL Isopropanol gegeben, invertiert und für 2 - 5 min inkubiert. Die durch den Isopropanol ausgefällt DNA wurde anschließend bei 16.873 x g 6 - 10 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µL 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und danach in 20 -50 µL PCR-H₂O resuspendiert. Die Konzentration der genomischen DNA wurde photometrisch bestimmt, siehe Kap. 2.1.4.

2.1.3 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA zu vervielfältigen, wurde sie in *E. coli*s eingebracht und die Bakterien vermehrt, (siehe 2.2.1). Anschließend musste die Plasmid-DNA wieder aus den Bakterien isoliert werden. Dies geschah mittels einer Mini-Präparation.

Für die Mini Präparation wurden am Vortag 3 – 5 ml selektionsantibiotikum-haltiges LB-Medium mit Bakterien inokuliert und über Nacht, 14 - 16 h inkubiert, siehe Kulturbedingungen Kap. 2.2.1.1. Von dieser Übernachtskultur wurden 1,5 – 3 ml in ein Standard-Reaktionsgefäß überführt und bei 16.873 x g 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 300 µL P1 Puffer durch vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 300 µL P2 Puffer zugegeben, invertiert und der Ansatz 2 min bei RT inkubiert (Puffer siehe Tab. 2.1). Danach wurden 300 µL 3 M Natriumacetat bzw. Kaliumacetat zur Reaktion gegeben und vorsichtig invertiert. Es folgte ein vierminütiger Zentrifugationsschritt. 600 µL des klaren Überstandes wurden in einem neuen Standard-Reaktionsgefäß mit 600 µL Isopropanol gemischt und 4 – 30 min bei 16.873 x g zentrifugiert. Eine längere Zentrifugation erhöhte dabei Qualität und Quantität der extrahierten DNA. Es folgte ein Waschschriff bei dem der Überstand dekantiert und 500 µL 70 %iger Ethanol zugegeben wurde mit anschließend einer 1-minütigen Zentrifugation. Der Ethanol wurde abgegossen und mit einer 100 µL Pipette die restliche Flüssigkeit sorgfältig abgenommen. Das Plasmid-DNA Pellet wurde dann für 10 – 20 min bei 37 °C im geöffneten Standard-Reaktionsgefäß getrocknet. Nach vollständiger Trocknung erfolgte die Resuspendierung in 20 – 50 µL PCR-H₂O mit anschließender Konzentrationsbestimmung.

Tab. 2.1: Pufferzusammensetzung Mini Präparation

P1 Puffer	P2 Puffer
50 mM TRIS	200 mM NaOH
10 mM EDTA	1 % SDS
100 mg /L RNase	

2.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen der präparierten DNA bzw. RNA Proben wurden photometrisch an einem Nanodrop2000 der Firma ThermoFisher bestimmt. Dazu wurde mit dem Lösungsmittel in dem die DNA bzw. RNA gelöst wurde, ein Leerwert bestimmt und danach je 1 µL der Proben aufgetragen und gemessen.

2.1.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Zur Aufreinigung von PCR Produkten wurde das PCR Purification Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben genutzt. Zur Aufreinigung ausgeschnittener Agarosegelbanden wurde das PCR-Gel Extraction Kit der Firma Qiagen genutzt.

Die USER Plasmide wurden nach der Linearisierung durch Ausfällung aufgereinigt, da sie zu groß waren, um ein Kit zu benutzen siehe 2.1.9.2.

2.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion – polymerase chain reaction – (PCR) dient der Vervielfältigung eines gewünschten DNA Fragmentes. Die Methode wurde 1983 durch Kary B. Mullis entwickelt und seitdem weiterentwickelt. Die PCR ermöglicht die zellfreie Vervielfältigung von DNA auf Basis der DNA-Polymerase thermophiler Bakterien und Archaeen.

Die Methode ermöglicht nicht nur die einfache Vermehrung der DNA, sondern auch ihre Modifikation durch entsprechend modifizierte Primer z.B. USER[®] Überhänge, für die USER[®] Klonierung. Durch diese lassen sich Überhänge für die Klonierung, modifizierte Basen, wie Uracil oder Punktmutationen in die Sequenz einfügen (Mutageneseprimer). Durch die Integration dieser PCR-Produkte in Vektoren wird es möglich, diese DNA Fragmente im großen Maßstab zu replizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen DNA-Polymerasen gearbeitet, der Phusion Cx-Polymerase und der DreamTaq[™]-DNA-Polymerase. Die Phusion Cx-Polymerase wurde für die Klonierungen genutzt, da sie keine Proofreading-Funktion besitzt. Dies ermöglicht den Einbau von modifizierten Basen oder Punktmutationen durch Mutageneseprimer. Jeweils ein Standardrezept für die Zusammensetzung einer PCR-Reaktion ist im Folgenden zu sehen:

Tab. 2.2: Standard PCR Ansatz für eine PCR-Reaktion bei der Verwendung von PhusionCx – oder DreamTaq[™]-Polymerase

Phusion Cx Polymerase	DreamTaq [™] -DNA-Polymerase
10 µL Phusion HF 5x Puffer	5 µL DreamTaq [™] 10x Puffer
1 µL dNTPs	1 µL dNTPs
1 µL Primer fwd (10 µM)	1 µL Primer fwd (10 µM)
1 µL Primer rev (10 µM)	1 µL Primer rev (10 µM)
35 µL PCR H ₂ O	40 µL PCR H ₂ O
1 µL Phusion Cx Polymerase	0,4 µL DreamTaq [™] -DNA-Polymerase
1 µL Template DNA	1 µL Template DNA

Es wurde immer eine Negativkontrolle, also PCR-Ansatz ohne Template DNA, und sofern möglich, eine Positivkontrolle, also ein Ansatz mit einer bereits funktionierenden Template-DNA, mitgeführt. Die fertigen PCR-Ansätze wurden gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend einen Thermocycler (Mastercycler Eppendorf Hamburg) gestellt. Nachfolgend ist die Programmierung des Thermocyclers für eine PCR mit der Phusion Cx-Polymerase zusehen:

Temperatur	Dauer	
98 °C	2`	
98 °C	30``	} 35 x
58 °C (54 – 62 °C)	30``	
72 °C	1`30`` (30`` pro 1 kb)	
72 °C	5`	
8 °C	∞	

Die Annealingtemperatur (Temperatur der Primerhybridisierung) musste den Primern angepasst werden und die Elongationszeit der Fragmentgröße. Für die Verwendung der Taq – Polymerase dürfte nur eine Denaturierungstemperatur von 95 °C verwendet werden. Die fertige PCR wurde zur weiteren Verwendung entweder gekühlt (Kurzzeitlagerung) oder eingefroren (Langzeitlagerung).

2.1.7 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von PCR-Produkten, cDNA und linearisierten Plasmiden muss die DNA entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dies erfolgt mit der Agarosegelelektrophorese. Dabei wird die DNA aufgrund ihrer Ladung in einem Agarosegel, welches als molekulares Sieb wirkt, in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Das Agarosegel liegt dabei in einer horizontalen Elektrophoresekammer, die mit einem Laufpuffer gefüllt ist, welcher das elektrische Feld überträgt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA werden verschiedene Konzentrationen der Agarose verwendet. Je kleiner die DNA Fragmente desto höher die verwendete Agarosekonzentration zur Auftrennung. Für die meisten Anwendungen in dieser Arbeit genügte ein 1%iges Gel (m/V) in 1 x TAE. Als Elektrophoresepuffer wurde ein 1 x TAE Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) verwendet, siehe Anhang A2. Um die Größe der Fragmente beurteilen zu können, wurde ein selbsthergestellter λ Pst Marker genutzt. Dieser bestand aus gekaufter DNA des λ Phagen welche mit dem Restriktionsenzym PstI geschnitten wurde, siehe Anhang A2. Das Agarosegel wurde direkt in der Gelelektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet und mit DNA und Marker beladen. Die 1 – 2 μ L DNA wurde vorher

mit Wasser und 1 μL 5x Probenpuffer gemischt, damit die DNA auf den Boden der Geltasche sinken und der Verlauf makroskopisch kontrolliert werden konnte. Die Elektrophorese erfolgt unter Gleichspannung von 100 Volt und 20 Milliampere. Die Dauer richtet sich nach der Größe des gewünschten Fragments und der Agarosekonzentration des Gels. Je höher die Agarose-Konzentration und je größer das Fragment, desto länger die Dauer. Meist betrug die Dauer 30 -45 Min. Anschließend an einer käuflichen Geldokumentation mit UV Licht fotografiert (Geldokumentation, INTAS).

2.1.8 Vektoren

Vektoren sind in der Molekularbiologie unverzichtbar zur Übertragung und Vervielfältigung von DNA. Man bezeichnet sie auch häufig als Genfähren. Als Vektoren können Plasmide, Cosmide und modifizierte Viren dienen. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Plasmide genutzt. Für die im Rahmen dieser Arbeit selbst erstellten Konstrukte wurde ein pCambia Vektor genutzt in welchen mittels USER[©]-Klonierung CHR2-Varianten mit YFP unter 2x35s-Promoter und 35s-Terminator eingebracht wurden.

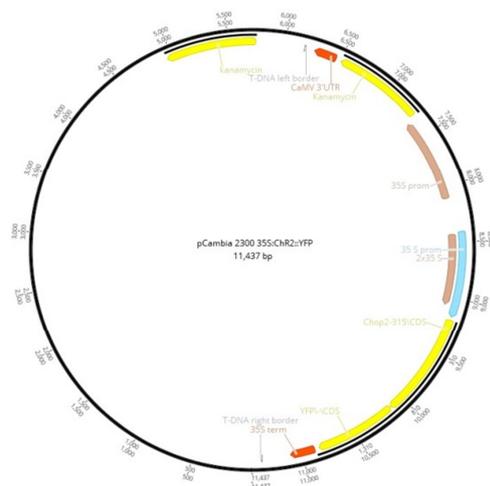


Abb. 2.1: Exemplarische Vektorkarte pCambia mit 2x35s-Promoter::Chr2-YFP::35s-Terminator

Für die Elektrophysiologischen Messungen an Tabak und Arabidopsis wurden nur Konstrukte im pMDC32 Vektor genutzt, welche von Melanie Baumann, Doris Waffler, Elfriede Reisberg und Ronnie Gueta erstellt wurden. Diese fertigen Konstrukte wurden lediglich in *E. coli* transformiert und vermehrt.

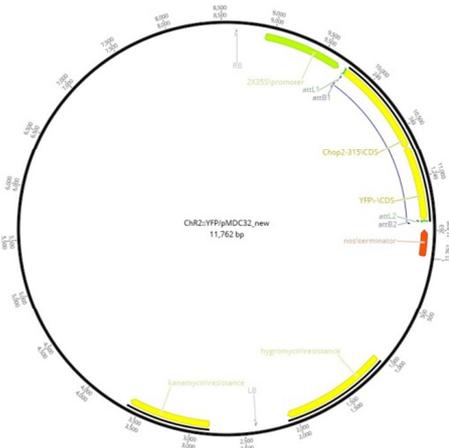


Abb. 2.2: Exemplarische Vektorkarte pMDC32 mit 2x35s-Promoter::Chr2-YFP::NOS-Terminator

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Klonierungsschritte unter Einbeziehung von pMDC32 durchgeführt, sondern nur die bereits vorhandenen Konstrukte von M. Baumann, R. Gueta und D. Waffler genutzt

2.1.9 USER®-Klonierung

Die Methode der USER© Klonierung wurde 2006 von Nour-Eldin et al. (Nour-Eldin et al. 2006) durch eine Veröffentlichung dem breiten Publikum bekannt. Sie wurde aber bereits in den frühen Neunzigern entwickelt und kommerziell unter dem Namen USER© vertrieben. Diese Klonierungsmethode basiert auf Primern, die an den zu inserierenden PCR Produkten einen 8 basenpaarlangen Überhang schaffen, an dessen 3'-Ende ein Desoxyuracil steht. Die Zielvektoren werden linearisiert und durch die verwendeten Restriktionsenzyme wird in diesen ein komplementärer Überhang geschaffen, in den das PCR Fragment sich dann während der USER-Reaktion unspezifisch anlagern kann. Durch das zugesetzte USER©-Enzym werden diese Überhänge dann ligiert.

2.1.9.1 Verwendete Primer

Die verwendeten Primer zur Klonierung, Sequenzierung und Genotypisierung waren von Sigma Aldrich mit folgenden Sequenzen:

Chr2-USER-fwd GGCTTAAUATGGATTATGGAGGCGC

Chr2-USER-rev GGT TTA AUC CCT TGC CGG TGC CCT TGT TGAC

YFP-NT-seq-rev GCTCGACCAGGATGGGCACC

YFP-USER-CT-rev GGT TTA AUT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG CCG

Die Primer wurden waren $c = 100 \mu\text{M}$ und wurden vor der Verwendung 1:10 mit Wasser verdünnt.

2.1.9.2 Linearisierung der Zielvektoren

Als Zielvektoren für die durchgeführten Klonierungen in dieser Arbeit dienten ausschließlich die binären pCambia Vektoren 2300 (Kanamycin-Resistenz in Pflanzen) und 3300 (BASTA[®]-Resistenz in Pflanzen). Diese sehr großen Vektoren umfassen bereits ohne Insert etwa 10 kb, dies erschwert die nötige Aufreinigung nach der Linearisierung. Die Linearisierung wurde mit DNA aus einer Minipräparation durchgeführt. Es wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µL 10 µg der Plasmid DNA mit 70 Einheiten PacI Restriktionsenzym in 20 µL NEB Cut smart Puffer über Nacht bei 37 °C verdaut. Am nächsten Morgen wurden noch einmal 20 Einheiten PacI und 40 Einheiten Nt.BbvCI zugegeben und weitere 2 – 4 h bei 37 °C verdaut. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mit dem PCR Aufreinigungs-Kit der Firma Qiagen. War dieses Kit nicht verfügbar oder lieferte nur eine geringe Ausbeute, so wurde eine Aufreinigung mit einer Ethanol-Präzipitation durchgeführt. Dazu wurden zu dem 200 µL Reaktionsansatz 20 µL 3 M Natriumacetat (pH 5,2 mit Essigsäure) und 550 µL eiskalter 96%iger Ethanol hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz für 30 min bei -20 °C eingefroren und anschließend 30 min bei 20.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 1 ml 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach dem der Ethanol abgezogen wurde, wurde das Pellet für 10 min bei 37 °C getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 20 -50 µL PCR-H₂O. Es wurde die Konzentration bestimmt und dann wurde der geschnittene Vektor mit dem gleichen Volumen 87%igem Glycerol gemischt und bei -20 °C gelagert.

2.1.9.3 DpnI-Verdau der USER[®]-PCR

Die USER[®]-PCR wurde als normale PCR, siehe XX, durchgeführt, als Primer wurden die USER[®]-Primer verwendet. Diente als Template für die PCR eine Plasmid-DNA, so musste die fertige PCR mit 1 µL DpnI versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert werden, um den Template-Vektor zu entfernen. Nach dem Verdau erfolgte noch eine Hitzebehandlung bei 80 °C für 20 min, um das DpnI zu inaktivieren. Die fertige DpnI-verdaute USER[®]-PCR konnte bei -20 °C zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.1.9.4 USER[®]-Reaktion

Die USER[®]-Reaktion meint den Prozess der Anlagerung und Ligation von USER[®]-PCR-Fragment und linearisiertem Vektor. Dazu wurden 3 µL der DpnI verdauten USER[®]-PCR in 5 µL EB-Puffer mit 1,5 µL linearisiertem Vektor und 1 µL USER[®]-Enzym gemischt. Der Ansatz für 25 min bei 37 °C und weitere 25 min bei 25 °C inkubiert. Der fertige Ansatz konnte bis zur weiteren Verwendung im Hitzeschock auch eingefroren werden.

2.1.10 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma GATC-Eurofins durchgeführt. Dafür wurde die Plasmid-DNA bzw. die aufgereinigte PCR entsprechend der Firmenangaben verdünnt und anschließend verschickt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Geneious.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein gramnegatives Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae. Es ist säurefest und peritrich begeißelt. *E. coli* lebt im Darm vieler Säugetiere inklusive des Menschen. Dort ist es Teil der natürlichen Darmflora und meist apathogen. Durch seine Fähigkeit Plasmide aufzunehmen kann es jedoch auch zum Pathogen werden, wenn es Plasmide mit Virulenzfaktoren trägt. Die Eigenschaft, leicht Plasmide aufzunehmen und diese zu replizieren, macht es zu einem wichtigen Werkzeug der Molekularbiologie. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Transformation *E. colis* basierend auf dem Stamm XL1-Blue MRF^c (Stratagene) verwendet. Diese wurden vermehrt und chemisch kompetent gemacht, da sie von Natur aus keine freie Plasmid-DNA aufnehmen.

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Zur Anzucht der *E. colis* gibt es zwei verschiedene Methoden. Nach der Transformation mit Plasmid DNA werden die Bakterien auf Platten ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Zur Gewinnung von Plasmid DNA werden die Bakterien in 4 -5 ml Flüssigkultur in einem 15 ml Falcon angezogen. Das Temperaturoptimum der Wachstumsbedingungen von *E. coli* liegt bei 37 °C, zudem wird eine gute Sauerstoffversorgung benötigt. Deshalb erfolgte die Anzucht in Flüssigkultur unter konstantem Schütteln. Der Brutschrank war auf einen hohen Luftdurchsatz eingestellt. Sowohl die Kultur auf Agar-Platten, als auch in Flüssigmedium, erfolgte über Nacht, also ca. 16 h. Diese Zeit ist ausreichend, um gut sichtbare Kolonien auf Platte und ausreichend dicht bewachsene Flüssigkulturen zu erzielen.

2.2.1.2 Transformation mittels Hitzeschock

Um die Bakterien mit DNA zu transformieren, wurden die Zellen chemisch kompetent gemacht und bei - 80 °C aufbewahrt. Zur Transformation wurden die 50 µL Bakterien mit 5 µL der USER© Reaktion gemischt, 20 min auf Eis gestellt und anschließend für 50 s in ein Wasserbad mit 42 °C gehalten. Danach wurden die Bakterien für 3 min auf Eis gestellt und mit 350 µL SOC Medium versetzt. Bevor die Bakterien ausplattiert wurden, erfolgte noch eine einstündige Inkubation bei 37 °C und 350 rpm im Heizblock (Thermomix, Eppendorf), damit die Antibiotikaresistenz ausgebildet werden konnte.

2.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens ist ein grampositives Bakterium aus der Familie der Rhizobiaceae. *A. tumefaciens* hat eine aerobe chemoorganotrophe Lebensweise mit

phytopathogenen Eigenschaften. Die Pathogenität wird über sogenannte Virulenzplasmide vermittelt. Dabei ist *A. tumefaciens* nicht nur in der Lage Pflanzen zu infizieren, sondern darüber hinaus die Pflanze genetisch umzuprogrammieren, um die Pflanze in besonderem Maße zu parasitieren. Dazu kann es DNA aus den Virulenzplasmiden in das Genom des Wirts stabil übertragen und so den Stoffwechsel manipulieren. Die Pflanzen liefern dabei nicht nur Nahrung in Form von Stoffwechselprodukten, sondern auch Lebensraum durch die Gallenbildung der pflanzlichen Zellen. Diese stellen de facto eine der wenigen Formen pflanzlicher Tumore dar, da die Zellen einen veränderten Zellstoffwechsel und ein unkontrolliertes Wachstum aufweisen. Dieses Ti-Plasmid vermittelt dabei die Übertragung der bakteriellen DNA ins pflanzliche Genom. Die Fähigkeit, dass *A. tumefaciens* dieses Plasmid auf die Pflanzen übertragen kann und die Fähigkeit des Plasmids, DNA ins Genom des Wirts zu übertragen, wird in der Molekularbiologie genutzt, um gezielt und effizient DNA in Pflanzen zu übertragen. Zu diesem Zwecke wird das Ti-Plasmid modifiziert und sozusagen entwaffnet engl. disarmed. Zusätzlich zu dem disarmed Ti-Plasmid wird in die Bakterien noch ein binärer Vektor eingebracht, der eine Nutzung sowohl in Bakterien, als auch in Pflanzen ermöglicht. Auf diesem Vektor befinden sich dann die einzubringende DNA mit passendem pflanzenkompatiblen Promoter und Terminator, sowie eine Herbizidresistenz, um die genetisch veränderte Pflanzen zu selektionieren.

2.2.2.1 Kulturbedingungen

Zur Kultivierung der Agrobakterien wurde ein YEB-Medium mit Selektionsantibiotika verwendet (siehe Anhang), dieses ist ein Vollmedium. Die Agrobakterien wachsen als typische Umweltbakterien auch schon bei niedrigen Temperaturen, jedoch nur langsam. Bei Raumtemperatur wird bereits ein gutes Wachstum erzielt, das Temperaturoptimum liegt bei 28 °C, das Maximum bei 32 °C, ab dieser Temperatur werden die Plasmide ausgestoßen.

2.2.2.2 Transformation mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Methode die die Transformation von Bakterien bzw. die Transfektion von Eukaryoten mit DNA ermöglicht. Die Methode beruht darauf, dass die zu transformierenden Zellen in möglichst ionenarmer Umgebung mit der einzubringenden DNA zu mischen und anschließend mit Hochspannung zu behandeln. Diese Behandlung erfolgt in speziellen Küvetten, welche auf zwei Seiten Metallplatten haben und dazwischen befindet sich die Flüssigkeit mit den Zellen. Durch die Spannung treten in der Zellmembran kleinste Öffnungen auf, durch die die DNA in die Zellen gelangen kann. In dieser Arbeit wurde die Elektroporation genutzt, um die Agrobakterien mit der binären Plasmid-DNA zu transformieren. Dazu wurden die Bakterien gewaschen, um möglichst viele Ionen aus dem Wachstumsmedium zu entfernen. Anschließend wurde die Plasmid-

DNA verdünnt ($c = 20 - 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$) und von dieser Verdünnung $1 - 2 \mu\text{L}$ in einem Standard-Reaktionsgefäß mit den Agrobakterien gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in die eisgekühlten Küvetten gegeben und in den Elektroporator gesetzt. Dann erfolgte das Anlegen der Hochspannung mit 2500 V bei 10 mm Küvetten. Die durch das Gerät angezeigte Dauer des Pulses musste bei mehr als 5 s liegen für eine erfolgreiche Elektroporation. Danach wurden die Küvetten mit 300 μL SOC Medium befüllt und noch einmal kurz auf Eis gestellt. Die Bakterien in dem Medium wurden dann in Standard-Reaktionsgefäße überführt und für eine Stunde bei 28 °C und 300 rpm in einem Thermomix der Firma Eppendorf inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien in der Zentrifuge pelletiert, der Überstand abgegossen, das Pellet gelöst und auf YEB-Agar mit Selektionsantibiotika ausgestrichen. Die mit Parafilm[®] (Pechiney Plastic Packaging) verschlossenen Petrischalen wurden entweder bei 28 °C für 48 h inkubiert oder für 72 h abgedunkelt bei Raumtemperatur. Die daraus resultierenden Kolonien konnten dann mittels Kolonie PCR kontrolliert werden und zur Transformation verwendet werden.

2.3 Pflanzen und Anzuchtbedingungen

2.3.1 *Arabidopsis thaliana*

2.3.1.1 Generelles

Die Pflanze *Arabidopsis thaliana* ist ein Modellorganismus aus der Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler). *A. thaliana* ist eine einjährige Langtagpflanze und weist unter optimalen Bedingungen eine rasche Generationenfolge auf. Zur Kultur benötigt sie ein gemäßigtes Klima und moderates Licht. In allen Versuchen wurde der Ökotypus Columbia 0, kurz Col0, verwendet. Alle Mutanten befanden sich in diesem genetischen Hintergrund.

Zur Anzucht wurde als Substrat die Einheitserde P der Firma Pazer verwendet. Dieses wurde maximal sieben Tage vorher im Autoklaven bei 100 °C für 20 min hitzebehandelt, um Arthropoden und Nematoden, sowie deren Eier bzw. Zysten, und Pilze und deren Sporen abzutöten. Auf Erde erfolgte die Kultur in Töpfen mit 5,5 cm Durchmesser, je elf pro Pflanzschale. Bewässert wurde indirekt, die Wasserzugabe erfolgte in die Schalen. Zur Samengewinnung wurden die Infloreszenzen nach der Entwicklung erster Samenschoten an Holzstäbe gebunden und, nachdem die ersten Schoten sich gelb verfärbt hatten, in Pergamenttüten verpackt und an den Stäben befestigt. Die Pflanzen wurden solange weiter gegossen, bis der Großteil der Schoten gelb geworden war. Durch die semisterilen

Bedingungen waren die Pflanzen, die für die Versuche verwendet wurden, frei von Arthropoden und Nematoden.

2.3.1.2 Anzucht und Kultur im Weißlicht

Die Anzucht der Pflanzen im Weißlicht erfolgte in einem Klimaschrank der Firma Binder unter Langtagbedingungen, bei einer durchschnittlichen Photonenflussdichte von $120 \mu\text{mol}\bullet\text{s}^{-1}$. Es herrschten $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 16 h Licht und $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 8 h Dunkelheit. Die Humidität wurde durch den Schrank konstant bei 60 % relativer Feuchte gehalten.

2.3.1.3 Anzucht und Kultur im Rotlicht

Bei der Reihenuntersuchung der stabilen Channelrhodopsin – Arabidopsis durch E. Reisberg gab es Hinweise darauf, dass die Pflanzen nur bei der Anzucht unter Rotlichtbedingungen stabil Fluoreszenz aufwiesen. Alle stabilen Arabidopsis Pflanzen wurden deshalb in der Regel unter Rotlichtbedingungen kultiviert. Zur Anzucht der Pflanzen wurde ein eigens angefertigter Klimaschrank mit Rotlicht LEDs der Firma Philips (PHILIPS GP LED production DR 150) genutzt. Diese LED Lampen liefern laut Hersteller eine durchschnittliche Photonenflussdichte von $62,5 \mu\text{mol}\bullet\text{s}^{-1}$. Wie im Ergebnissteil Abb. 3.18 zu sehen ist, zeigen Pflanzen unter Rotlichtbedingungen eine reduzierte Fitness. Um dennoch eine Vermehrung und rasche Entwicklung zu gewährleisten, wurden Langtagbedingungen mit 16 h Licht und 8 h Dunkelheit gewählt. Die Temperatur lag bei $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ am Tag und $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Nacht, die Humidität konnte nicht exakt gesteuert werden, da der Klimaschrank die Luft nur entfeuchten konnte.

2.3.2 *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana benthamiana aus der Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae) ist eine aus Australien stammende Tabakart. *N. benthamiana* bevorzugt ein warmes Klima. Die Pflanzen wuchsen im Gewächshaus bei kontinuierlich $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ Solltemperatur und 16 h Licht mit einer durchschnittlichen Stärke von $140 \mu\text{mol}\bullet\text{s}^{-1}$. Dabei wurde ein Teil der Wärme und des Lichts durch Natriumdampflampen erzeugt. Als Substrat diente die Einheitserde T der Firma Pazer. Die Aussaat erfolgte breitwürfig und die Keimlinge wurden nach zwei Wochen in 7 cm Töpfchen pikiert. Für die transiente Transformation wurden die Pflanzen im Alter von 4 – 6 Wochen genutzt.

2.4 Transformation von Pflanzen

Die agrobakterienvermittelte Transformation ermöglicht es, fremde DNA ins pflanzliche Genom zu integrieren. Dabei muss zuerst die gewünschte DNA mittels Klonierung in

einen geeigneten Vektor eingebracht werden. Dieser Vektor ist binär, er ermöglicht also die Nutzung in Bakterien und Pflanzen gleichermaßen. Je nachdem ob die DNA in die Keimzellen oder in die vegetativen Zellen der Pflanze eingebracht werden, ist die eingebrachte DNA erblich oder nicht.

2.4.1 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana benthamiana stellt ein gutes System zur transienten Expression von Genen in Pflanzen dar. Dabei werden die Plasmide, welche die gewünschten Gene tragen, mittels Agrobakterien in das Genom der differenzieren somatischen Pflanzenzellen integriert und dort exprimiert. Diese Tabakart bietet sich an, da die Immunantwort von *N. benthamiana* nach der Transformation nur schwach ausfällt und so eine hohe Effizienz gewährleistet wird. Die verwendeten Pflanzen hatten bei der Transformation ein Alter von fünf bis sechs Wochen.

Die Agrobakterien, welche zur Transformation genutzt werden sollten, wurden am Vorabend von einer Platte in 15 ml Flüssigmedium in 50 ml Schraubdeckel-Falcons (YEB-Medium mit Gentamycin, Rifampicin und Kanamycin, siehe Anhang) überimpft. Die Kultivierung erfolgte unter konstantem Schütteln über Nacht für 16 h bei 28 °C.

Am nächsten Tag wurde die Agrobakterien bei 2500 xg für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 10 ml sterilem VE-H₂O gelöst und erneut pelletiert (2500 xg; 10 min; RT). Nach diesem Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Agromixpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Bakterien in den liegenden Falcons für 2 h im Dunkeln auf einem Taumelschüttler mit 8 rpm inkubiert. Die Tabakpflanzen wurden 2 h vor Versuchsbeginn ins Labor an einen hellen, warmen, zugluftfreien Ort gestellt und reichlich gewässert, damit sich die Stomata öffnen konnten.

Anschließend wurde am Photometer (Nanodrop 2000) in einer Halbmikroliterküvette die optische Dichte der 1:10 verdünnten Bakterien bei 600 nm bestimmt. Die Agrobakterien wurden mit Agromixpuffer in einer 3 cm Petrischale auf eine optische Dichte von 1,0 eingestellt. Anschließend wurden die Agrobakterien, die mit dem Konstrukt transformiert waren, im Verhältnis 5:1 mit Agrobakterien gemischt, die das K19 Helferplasmid trugen. Diese Mischung wurde dann mit einer 1 ml Tuberkulinspritze (BD Plastipak, Becton Dickinson GmbH, Madrid, Spanien) ohne Kanüle über die Blattunterseite durch die offenen Stomata infiltriert. Auf der Oberseite wurden die infiltrierten Bereiche auf dem Blatt mit einem breiteren wasserfesten Faserschreiber markiert. Die Pflanzen wurden nach der Infiltration wieder ins Gewächshaus verbracht. Dort wuchsen die Pflanzen für weitere 2 -4 Tage, bevor sie zu Messzwecken verwendet wurden.

2.4.2 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Das stabile Integrieren von Channelrhodopsin-Mutanten in das Genom von *Arabidopsis* erfolgte über die sogenannte „Floral-Dip“-Methode, bei der die Infloreszenzen der Pflanzen in eine Agrobakterien-haltige Lösung getaucht, bzw. mit dieser benetzt werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten stabilen *Arabidopsis* Linien wurden über diese Methode generiert. Da *Arabidopsis* im starken Maße selbstbestäubend ist, kommt es oft schon vor der Öffnung der Blüte zur Befruchtung. Für diese Prozedur ist es also wichtig, von den Infloreszenzen alle offenen Blüten und Schoten mit einer Uhrmacherpinzette vor dem Floral-Dip zu entfernen. Denn es können nur die unbefruchteten Eizellen in den noch geschlossenen Blüten transformiert werden.

Die Grundvoraussetzung waren Agrobakterien, welche das zu transformierende Konstrukt auf einem binären Plasmid besaßen. Die Bakterien wurden am Vortag in einem 300 ml Schikanekolben in 100 ml YEB-Medium (Gentamycin, Rifampicin, Kanamycin, siehe Anhang) steril inokuliert und über Nacht bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml Bakteriensuspension in zwei 50 ml Falcons überführt und bei 2900 xg für 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in einer Lösung von 5 % Saccharose und 0,05% Silvet resuspendiert und auf eine OD600 von 0,8 eingestellt. Diese Lösung wurde in ein hohes schmales Becherglas gegeben und die Blütenstände darin gebadet. Zusätzlich wurde danach auf die Knospen weitere Lösung mit einer 20 µL Pipette pipettiert. Die so behandelten Infloreszenzen wurden in eine Schale gestellt und mit einer Plastiktüte abgedeckt und 24 h im Klimaschrank belassen. Anschließend wurde die Tüte entfernt. Für bessere Resultate wurde das Floral-Dipping eine Woche später noch mal wiederholt, dabei aber ohne die Blütenstände zu baden, sondern nur durch Pipettieren der Agrobakterien auf die frischen Knospen. Die Pflanzen wurden weitergegossen und die Samenstände nach dem Gelbwerden der ersten Schoten eingetütet. Die Samen dieser Pflanzen bildeten die sogenannte T0 Generation und waren alle heterozygot, sofern sie transformiert wurden. Die Zahl der Transformaten liegt so bei 1 – 2 %. Nachdem die reifen Samen getrocknet waren, wurden sie gesiebt. Das Saatgut wurde sterilisiert, auf Platten mit ½ MS-Medium (siehe Anhang) mit Selektionsherbizid ausgelegt und im Rotlicht zwei bis drei Wochen kultiviert. Alle überlebenden Pflanzen sollten positiv transformiert sein. Es wurden maximal 20 Keimlinge auf sterile Erde überführt und weiter kultiviert. Die Pflanzen wurden alle mittels PCR genotypisiert. Die Samen dieser T0 Pflanzen lieferten die T1 Generation, der Genotyp dieser T1 Pflanzen entspricht für gewöhnlich der Segregation nach Mendel. Somit war in der nächsten Generation ein Viertel der Pflanzen wildtypisch, also nicht Träger der eingebrachten DNA. Um die homozygoten Pflanzen der T1 Generation zu identifizieren, mussten die Samen dieser Pflanzen auf Selektionsplatten ausgelegt werden und nach der Keimung ausgezählt werden. Überlebten alle Keimlinge, so handelte es sich bei der Mutterpflanze aus der T1 Generation, um eine homozygote

Merkmalsträgerin. Starben ein Viertel der Keimlinge, so war die Mutterpflanze heterozygot im Genotyp für die transformierte DNA. Die Samen der T₀ Generation wurden nach der Ernte noch „gepoolt“, also alle gemeinsam geerntet. Dies liegt daran, dass die Agrobakterien die DNA in jeder Eizelle an einer anderen Stelle ins Genom integrieren. Somit ist das Ergebnis der Transformation für jede Tochterpflanze der T₀ Generation individuell. In der T₁ und T₂ Samen-Generation müssen die Samen jeder Pflanze separat gesammelt werden, denn jede Pflanze der T₀ Generation bildet eine eigene Linie. Es ist dabei zu beachten, dass nicht nur die positive Transformation entscheidend ist, sondern auch an welcher Stelle die DNA ins Genom integriert wurde.

2.5 Mikroskopische Methoden

Sowohl zur Beurteilung der transienten, als auch der stabilen Transformation wurden an die Chr2-Mutanten immer C-terminal ein Yellow fluorescent protein (YFP) angehängt. Dieses konnte dann in den Pflanzen mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie zur Beurteilung des Transformationserfolgs herangezogen werden. Dabei wurden zwei verschiedene Arten der Fluoreszenzmikroskopie genutzt, die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie und die Fluoreszenz Mikroskopie mit einem Automatikmikroskop.

2.5.1 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop

Zur Aufnahme besonders detailreicher Fluoreszenzbilder wurde ein konfokales Laserscanning Mikroskop (TCS SP5 II) der Firma Leica benutzt. Die Konfokalität dieses Mikroskops ermöglicht es, besonders effizient Streulicht aus den Ebenen ober- und unterhalb der Fokusebene zu exkludieren. Dadurch kann die Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Proteinen in den Kompartimenten, besonders in der Plasmamembran gut beurteilt werden. Die Aufnahmen wurden mit der dazu gehörigen Leicasoftware angefertigt. Die Anregung der Fluoreszenzproteine erfolgte mit einem Argon-Laser bei 20 % Leistung. Das YFP wird bei ungefähr 514 nm angeregt, das Maximum der Emission liegt bei 527 nm. Der Bandpassfilter wurde deshalb auf 530 bis 590 nm eingestellt.

2.5.2 Digitales Automatikmikroskop

Für die Reihenuntersuchung stabiler transgener Arabidopsis Keimlingen wurde ein Biozero[©] Automatikmikroskop der Firma Keyence verwendet. Dieses Modell ist ein Inversmikroskop, welches zusätzlich zum Durchlicht auch die Möglichkeit der Fluoreszenzmikroskopie bietet. Für die Reihenuntersuchungen (Screening) der transgenen stabilen *A. thaliana* Linien wurde dieses Mikroskop dem LSM vorgezogen. Das Biozero[©]

ist kein Konfokalmikroskop. Dies ist ein Nachteil wenn es um die Bildgebung geht, da immer Fluoreszenzstreulicht aus den unteren und oberen Bildebenen in die fokussierte Bildebene fällt. Beim Screening ist diese Eigenschaft aber vorteilig, wenn die Pflanzen nur eine schwache Fluoreszenz ausweisen. Das ist ein typisches Problem bei fluoreszenzmarkierten, plasmamembranständigen Proteinen. Mit dem Automatikmikroskop konnte in kurzer Zeit eine größere Anzahl von Proben angeschaut werden. Zur Vergleichbarkeit wurde eine Belichtungszeit ausgewählt, die dann beibehalten wurde, um zu gewährleisten, dass die Fluoreszenz objektiv beurteilt werden konnte. Alle Proben wurden, wie schon am LSM, immer von der abaxialen Seite aus betrachtet.

2.6 Anregungslichtquelle

Es wurde eine selbst gebaute LED-Vorrichtung für die Anregung des Channelrhodopsins genutzt. Diese Vorrichtung arbeitete mit einer 2 Watt LED, welche eine Wellenlänge von 460 nm hatte. Es konnten zwei verschiedene optische Konstruktionen genutzt werden. Bei der einen wurde die LED auf eine optische Faser aus Kunststoff mit einem Durchmesser von 1,5 mm und einer Fläche von $1,767 \text{ mm}^2$ verschaltet, bei der anderen betrug der Durchmesser 0,75 mm und die Fläche $0,44 \text{ mm}^2$. Die am Ende der optischen Faser gemessene maximale Leistung, bei einer Stromstärke von 1000 mA am Vorschaltgerät, betrug bei 1,5 mm Durchmesser 31 mW bzw. $17,5 \text{ mW/mm}^2$. Die Leistung der LED konnte über das Vorschaltgerät stufenlos reguliert werden und wurde der Einfachheit halber in mehreren Schritten gemäß der zugeführten Stromstärke eingeteilt. Diese Schritte waren 200, 300, 400, 500, 700 und 1000 , es handelte sich dabei um apparente Leistung.

2.7 Elektrophysiologische Methoden

2.7.1 Einstichmessungen in Mesophyll

2.7.1.1 Generelles

Das Mesophyll höherer Landpflanzen setzt sich zu meist aus Palisaden- und Schwammparenchym zusammen. Das Mesophyll, ist wie der Name schon sagt, das in der Mitte liegende Gewebe zwischen der oberen und der unteren Epidermis. Beim Einstich ins Mesophyll des intakten Blattes bzw. Blattscheibe wird zuerst die Epidermis eingestochen, alle tieferliegenden Zellen sind dann Mesophyllzellen. Bei höheren Landpflanzen sind die meisten Zelltypen untereinander über Plasmodesmata verbunden. Deshalb sind sie nicht elektrisch isoliert, Ausnahmen sind z.B. Stomata. Durch die fehlende elektrische Isolierung ist es nicht möglich diese Zellen mit einer Spannungsklemme zu versehen. D.h. es können keine Ströme gemessen werden, sondern es kann lediglich das natürliche Membranpotential und dessen Verlauf beobachtet werden. Beim Einstich mit Einzelkapillaren wird also immer nur die Spannung des Membranpotentials über einen applizierten Strom gemessen.

2.7.1.2 Aufbau des Messplatzes

Die Einstichmessungen sind sehr empfindlich auf elektromagnetische Störungen, deshalb fanden die Messungen in einem Faraday'schen Käfig statt. Da auch Vibrationen oder Schwingungen die Messung unmöglich machen würden, war der Messplatz auf einem schwingungsfreigelagerten Tisch (Druckluftsystem) aufgebaut. Auf diesem befand sich das Mikroskop (Axioskop 2 FS, Carl Zeiss). Auf dem Mikroskoptisch stand der Vorverstärker für die Spannungselektrode, auch die Badelektrode und der Lichtleiter waren dort mit magnetischen Haltern befestigt. Die Steuereinheit für den Mikromanipulator (Kleindieck) befand sich im Käfig, ebenso, wie die Blaulicht-LED mit ihrem Lichtleiter. Die Stromversorgung beider Geräte stand außerhalb des Käfigs, um Störungen zu vermeiden.

Die Messungen wurden an einem PC unter Windows XP mit dem Programm WinEDR aufgezeichnet. Die Signale des Vorverstärkers liefen in den Verstärker (VF 102 Dual Microelectrode Amplifier von bio-logic) und anschließend über einen Besselfilter (Warner instruments). Anschließend wurde das Signal über einen AD-Wandler (ITC-18 Computer Interface von InstruTECH Corporation) in den Computer eingespeist. Das optische und akustische Monitoring erfolgte über ein selbstgebautes Gerät. Die Auswertung der Daten aus WinEDR wurde mit OriginPro 2016 und 2020 durchgeführt.



Abb. 2.3: Aufbau Messplatz Foto

Die Einstichelektrode mit dem Mikromanipulator der Firma Kleindieck und dem Vorverstärker steht links vom Messschälchen mit der Blattprobe. Auf der rechten Seite ist die Badelektrode im Halter und der Blaulichtleiter samt Halter zusehen. Das Mikroskop mit 10 x Objektiv kommt von oben ins Bild.

2.7.1.3 Verwendete Lösungen

Die verwendete Messlösung, weiterhin als Badlösung bezeichnet, wurde genutzt, um die präparierten Blattstücke zu überschichten und darin die Messungen durchzuführen. Zur Herstellung der Leitfähigkeit und zur Aufrechterhaltung der Membranintegrität enthielt die Messlösung Kalium- und Calciumchlorid und zur Stabilisierung des pH-Wertes MES. Der pH-Wert wurde mit BTP eingestellt und bildete zusammen mit MES ein Puffersystem. Sofern nicht anders erwähnt, wurde für die Messungen immer Messlösung II verwendet, in Anlehnung an M. Baumann.

Tab. 2.3: Zusammensetzung der Einstichmesslösung

	Messlösung II
Kaliumchlorid	1 mM
Calciumchlorid	1 mM
MES	10 mM
pH	mit 1 M BTP auf pH 6,0

Die Messlösung wurde immer bei +4 °C gelagert und im Zweifelsfalle nach Herstellung sterilfiltriert. Eine keimarme Lösung war wichtig für gute Messergebnisse.

2.7.1.4 Einstichelektroden

Die Einstichelektroden setzen sich aus zwei Komponenten zusammen. Zum einen die Halbzelle und zum anderen die mit KCl gefüllte Glaskapillare. Die Halbzelle wurde selbstgebaut aus einem Silikonschlauch, einem Silberdraht und einem anderen Draht. Der angeschliffene Silberdraht wurde mit Zwei-Komponenten-Kleber in den Silikonschlauch geklebt und anschließend mit dem Draht verlötet, an dessen Ende ein Stecker saß. Der Silberdraht wurde vor der Benutzung chloriert. Das Chlorieren erfolgte an einem selbstgebauten batteriebetriebenen Gerät, welches eine Elektrolyse durchführt, wobei sich am Silberdraht als Fremdstromanode eine Schicht Silberchlorid abscheidet.

Die Glaskapillaren zum Einstich wurden an einem Laserpuller P2000 (Sutter Instruments) gezogen. Die dafür benötigten Glaskapillaren waren von der Firma Hilgenberg mit folgender Spezifikation: Borosilikatglas mit Filament und geschnittenen Enden, Länge 100 mm, Außendurchmesser 1,0 mm und Wandstärke 0,21 mm. Die Einstellungen am Laserpuller war Programm 14 für Single-barrels, die ‚heat‘ wurde auf 274 geändert

2.7.1.5 Durchführung

Die Pflanzenproben wurden entweder abends oder morgens präpariert, dies variierte je nach Versuch und verwendeter Pflanze. Dazu wurde mit einer 4 mm Biopsie-Stanze der Firma Stiefel® LABORATORIUM GmbH ein Stück aus dem Blattgewebe entnommen. Die Stanze wurde von der Blattunterseite auf das Blatt angesetzt und gegen den auf der Blattoberseite befindlichen Zeigefinger gedrückt. Das so ausgestanzte Blattstück wurde anschließend der Deckel einer 3-cm Petrischale geklebt. Dies erfolgte entweder direkt auf doppelseitiges Klebeband oder auf ein rundes Deckglas welches mit doppelseitigem Klebeband im Petrischalendeckel (Durchmesser 3 cm) befestigt war und auf der Oberseite mit medizinischem Gewebekleber bestrichen war. Die Proben wurden dann je nach Versuch mit Messlösung II (+/- Retinal) überschichtet und vor dem Einstich 2-16 h bei 18 – 22 °C meist im Dunkeln inkubiert. Mindestens 30 – 60 min vor Messbeginn wurde die Messlösung getauscht, die frische Lösung war immer ohne Retinal. Die Zellen waren von da ab immer im Dunklen.

Für die Einstichmessungen wurden die Proben im dem Petrischalendeckel auf dem Tisch des Mikroskops platziert. Die Badelektrode wurde aus einer unbehandelten Glaskapillare des gleichen Typs wie die Messelektroden angefertigt. Dazu wurde die Elektrode mit 300 mM KCl befüllt und an einer Seite mit einem Agarosepfropf (2 % Agarose in 300 mM KCl) verschlossen. In die offene Seite der Kapillare wurde ein chlorierter Silberdraht inseriert, der mit einem Kabel an die Erdung des Geräts angeschlossen war. Die Badelektrode wurde mit dem Agarosepfropf voran von rechts in das Messschälchen getaucht, möglichst ohne die Blattscheiben zu berühren. Die Einstichelektrode wurde ebenfalls luftblasenfrei mit 300 mM KCl befüllt und mit einem Elektrodenhalter der Firma

Kleindieck versehen. Danach wurde der chlorierte Silberdraht der Halbzelle inseriert. Das Ganze wurde dann mit dem Elektrodenhalter am Mikromanipulator der Firma Kleindieck befestigt. Der Stecker der Halbzelle wurde in den Vorverstärker gesteckt und die Elektrode mit dem Mikromanipulator makroskopisch im Messschälchen positioniert. Anschließend wurde unter mikroskopischer Kontrolle die Einstichelektrode an die Blattoberfläche angenähert. Der eigentliche Einstich in die Zelle erfolgte dann unter optischer und akustischer Kontrolle. War ein tieferes Vordringen ins Gewebe nötig, so erfolgte dieses alleine über die Anzeige der Spannung am optisch-akustischen Monitor des Verstärkers. Nach erfolgreichem Einstich wurde die Mikroskopbeleuchtung ausgeschaltet. Wenn die Zelle sich nach einigen Minuten erholt hatte und ein stabiles Membranpotential aufwies, wurde mit den Messungen begonnen.

Anmerkung zur Retinalvorinkubation

Aus der Notwendigkeit der Retinalvorinkubation ergab sich das Problem, dass die Blattscheiben nach der Zugabe des Retinals im Dunkeln zu halten waren, um die Degradation des Retinals in der Lösung einzudämmen. Je nach Messung wurden die Blattscheiben am Messtag 3 h vor der Messung mit der retinalhaltigen Messlösung inkubiert, oder 14 – 16 h vorher über Nacht. In beiden Fällen standen die Proben dunkel. Da jedoch davon auszugehen ist, dass die Dunkelheit in Kombination mit dem Eingriff in den circadianen Rhythmus die Physiologie der pflanzlichen Zellen beeinflusst, wurde ein anderes Inkubationsregime ausgetestet. Zum Ende dieser Arbeit hin wurde vermehrt das ChR2 als Werkzeug zur Aufklärung der Repolarisationsprozesse des Membranpotentials genutzt. Im Zuge dessen war es von Bedeutung möglichst gering in die Physiologie der Zellen einzugreifen. Deshalb wurde dazu übergegangen die Pflanzen am Vorabend der Messung aufzukleben und mit retinalhaltiger Messlösung zu überschichten. Die Proben wurden nicht ins Dunkel gestellt wie sonst, sondern in einer Petrischale platziert und zurück ins Rotlichtkabinett gestellt. Erst am Messtag, nach dem Wechsel der Messlösung wurden die Proben abgedunkelt. Mit diesem, veränderten, Prozedere wurde nur wenig in den circadianen Rhythmus der Pflanzen eingegriffen und es konnten sehr gute Messergebnisse erzielt werden. Zugleich lag das Verwundungsereignis durch das Ausstanzen der Blattscheiben länger zurück, verglichen mit der Präparation am Messtag. Das Membranpotential war im subjektiven Empfinden des Experimentators stabiler und oft auch negativer, als beim Ansetzen der Proben am gleichen Tag. Für weitere Versuche ist diese Methode den anderen deutlich vorzuziehen.

Für die Oberflächenpotentialmessungen an Arabidopsis wurden die Blätter an der Pflanze auf Parafilm gelegt und mit Retinal-haltiger Messlösung von oben und unten benetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht und war ausreichend zur Rekonstitution des ChR2s, siehe Abb. 4.6.

2.7.1.6 Normierung des Membranpotentials

Zur besseren Vergleichbarkeit von Messungen verschiedener Pflanzen wurde das Membranpotential der einzelnen Messungen auf das Ruhepotential der gleichen Pflanze 20 s vor Stimulus Gabe normiert. Dies geschah durch Subtraktion des Ruhepotentials von allen folgenden Werten. Somit lag das normierte Ruhepotential bei 0 mV.

2.7.1.7 Ermittlung der Depolarisationszeitpunkte

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit Blaulicht wurde das Licht manuell eingeschaltet und ging somit mit einer minimalen Verzögerung einher. Dennoch ist ausgehend von den Daten in Oozyten und HEK-Zellen die Annahme berechtigt, dass die Verzögerung nur im Millisekundenbereich lag (Nagel et al. 2003; Gunaydin et al. 2010). Für alle Messungen wurde als Beginn der Depolarisation, also der erste Messpunkt, der um mehr als 2 mV vom Ruhepotential abwich, genommen. Alle Depolarisationszeiten für das ChR2 wurden so bestimmt. Bei den Messungen natürlicher elektrischer Signale war das Festsetzen des Zeitpunkts der Stimulusapplikation komplexer. Für die Experimente mit Blaulicht an *Arabidopsis thaliana* wurde die Zeit notiert, bei der das Blaulicht eingeschaltet wurde. Etwaige Ungenauigkeiten waren dort aufgrund der trägen Reaktion nicht relevant. Bei der Applikation von Eiswasser und Wasserstoffperoxid wurde der Applikationszeitpunkt notiert. Beim Eiswasser erfolgte die Reaktion jedoch instantan, es wurde der Beginn der Depolarisation also mit der Applikation gleichgesetzt.

Zusätzliche Anmerkungen zu pharmakologische Substanzen in den Einstichmessungen

- Vanadat
Die Messungen konnten in vielen Fällen für mehr als 1,5 h durchgeführt werden. In einigen Fälle oder bei Zugabe von 2 mM Vanadat kam es jedoch zum raschen Exitus der Zellen und einen Zusammenbruch des Membranpotentials auf -80 - -60 mV. Messungen des Membranpotentials von *A. thaliana* Col0 zeigten einen Exitus der Zellen innerhalb von 30 - 40 min. Das Membranpotential näherte sich dann dem Umkehrpotentials für Kalium.
- Fusicoccin
Die Epidermis muss nicht entfernt werden
- BaCl₂ und CsCl
Die Epidermis wurde nicht entfernt

2.7.2 Oberflächenelektrodenmessungen

Oberflächenelektroden stellen eine nicht invasive Methode dar, um die Potentialänderungen von Organsimen zu verfolgen. Dabei werden die Elektroden nur auf der Blattoberfläche aufgeklebt und detektieren anschließend die Änderungen im

Membranpotential der Pflanze. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Technik zum Anbringen der Elektroden auf der Blattoberfläche entwickelt. Bei dieser Klebetechnik wurden die Silberelektroden mit einer Mischung aus 20 % (m/v) Gelatine in 20 mM KCl aufgeklebt. Die Gelatine wurde einmal aufgekocht und konnte anschließend durch beliebig häufiges Erwärmen in heißem Wasser wieder nutzbar gemacht werden. Von dieser Mischung wurden 4–6 μL mit einer 10 μL Pipette als Tropfen langsam auf die Blattoberfläche gegeben und anschließend in die aushärtende Masse der Silberdraht der Elektrode gesteckt.

Das Gerät zur Messung der Oberflächenpotentiale war eine Einzelanfertigung von Herrn Marco Danz. Das Gerät fungiert als Verstärker und ermöglicht es, mit drei Elektroden (Silberdraht an Kupferkabel gelötet) zeitgleich zu messen. So konnte auch untersucht werden, ob sich die durch das Channelrhodopsin ausgelöste Depolarisation des Membranpotentials im Leitgewebe fortpflanzt. Die Oberflächenelektroden wurden sowohl zur Untersuchung der transient transformierten *N. benthamiana* Pflanzen, als auch zur Untersuchung der stabil exprimierenden *A. thaliana* Pflanzen genutzt. Die Signale aus dem Verstärker wurden über einen AD Wandler der Firma (ITC-18 Computer Interface von InstruTECH Corporation) an den Computer übertragen und die Aufzeichnung mit der Software Patchmaster der Firma Heka. Die Datensätze aus der Patchmaster Software wurden direkt mit der Software OriginPro 2016 geöffnet und darin ausgewertet.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit gliedern sich in zwei Teilaspekte: i) Änderungen des Membranpotentials durch natürliche Stimuli und ii) optogenetisch erzeugte Änderungen des Membranpotentials durch ektopische Expression des Licht-gesteuerten Kationenkanals ChR2. Die Arbeiten aus beiden Bereichen sollen die quantitative Analyse der Kinetik der Membranpotentialänderungen ermöglichen und darüber hinaus einen Einblick in die molekularen Grundlagen der Repolarisation ermöglichen. Zur Untersuchung des Membranpotentials wurden zwei verschiedene elektrophysiologische Techniken genutzt: Zum einen wurden Membranpotentiale über die Insertion von Mikrokapillaren in intakte Pflanzenzellen – der sogenannten Einstichmethode – intrazellulär abgeleitet. Dabei legt sich die Zellmembran so um die Kapillare, dass es zu einer Abdichtung kommt. Diese Messmethode erlaubt es das Membranpotential der Zellen und dessen Änderungen sehr präzise aufzuzeichnen. Dabei können die Messungen an einer intakten Zelle bis zu mehreren Stunden umfassen. Alternativ kann die Summe der Potentialänderungen an der obersten Zellschicht, z.B. an der Epidermis eines Blattes, über aufgeklebte Oberflächenelektroden abgeleitet werden, ähnlich einem medizinischen Elektrokardiogramm. Elektrische Signale, die mit Oberflächenelektroden aufgenommen wurden, gleichen in ihrer Kinetik intrazellulär aufgezeichneten Signalen. Eine absolute Bestimmung der Potentialänderungen (in mV) ist jedoch in dieser Konfiguration nicht möglich. Dies erschwert eine quantitative Analyse der Messwerte verschiedener Messungen. Im ersten Teil werden die Ergebnisse zu den abiotischen Stimuli Kälte, Weißlicht, Blaulicht und oxidativem Stress vorgestellt. Im zweiten Teil folgen die Ergebnisse der Implementation des optogenetischen Werkzeugs ChR2 nach transienter und stabiler Expression in den beiden Modellpflanzen *Nicotiana benthamiana* bzw. *Arabidopsis thaliana*.

3.1 Kälte Stimuli erzeugen transiente Depolarisationen in Mesophyllzellen

Vor der Implementierung des ChR2 als optogenetisches Werkzeug zur nicht-invasiven Modulation des Membranpotentials pflanzlicher Zellen, sollte zunächst die Reaktion bzw. die Kinetik von Potentialänderungen in Mesophyllzellen des Blattes im Hinblick auf typische abiotische Stresssignale hin charakterisiert werden. Kälte ist ein Stimulus, der in Pflanzen zu einer schnellen, reproduzierbaren und starken Depolarisation, mit anschließend rascher Repolarisation, des Membranpotentials führt (de Angeli et al. 2007; Krol et al. 2004; Carpaneto et al. 2007). Viele Autoren bezeichnen die durch Kälte

induzierte Depolarisation des Membranpotentials in Pflanzen als Aktionspotential (siehe 1.1.2.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Kältereiz insbesondere als Kontrolle, zum Beispiel zur Validierung des verwendeten Einstichsystems genutzt. Die Applikation einer eiskalten Lösung führte immer zu einer Änderung des Membranpotentials mit typischer Charakteristik (Abb. 3.1). Diese war zunächst durch eine schnelle Depolarisation gekennzeichnet, welche nach Einsetzen in 1 - 2 s das Depolarisationsmaximum erreichte. Die Amplitudenhöhe (ΔV) und die Kinetik der Repolarisation waren dabei je nach Pflanze und vor allem auch in Abhängigkeit der Messtage variabel. Im Gegensatz zu anderen Stimuli (siehe unten) war es möglich, durch die Applikation eiskalter Lösung aktionspotentialähnliche Potentialänderungen mehrfach an der gleichen Probe hervorzurufen. Wenn die maximalen Amplituden mehrerer Messungen zusammengefasst wurden, konnte daraus eine durchschnittliche Maximalamplitude von ca. 172 ± 7 mV (SE), jedoch mit einer großen Streuung von 123 - 208 mV, ermittelt werden. (siehe Abb. 3.10 A ,WT'). Eine vergleichende Analyse der durch Kälte induzierten Aktionspotentiale ist in Kap. 3.4 zu finden.

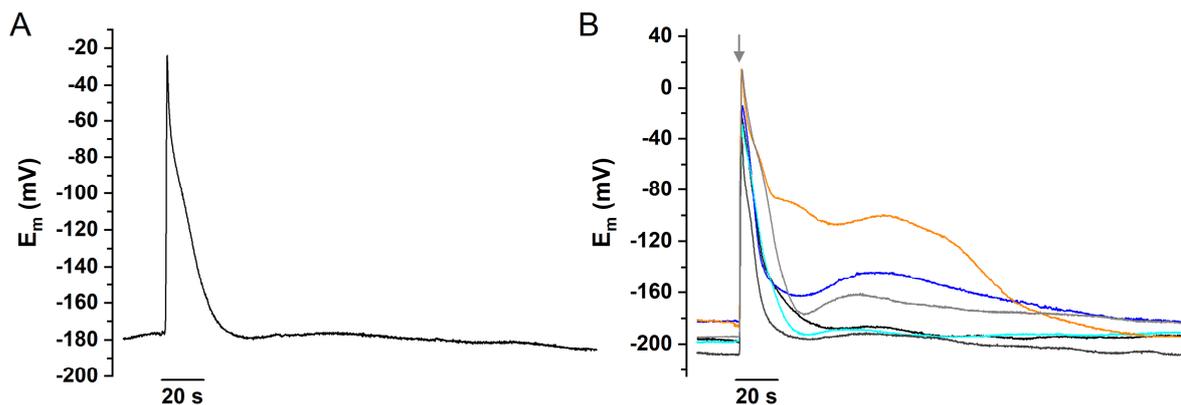


Abb. 3.1: Kälte induziert eine Depolarisation des Membranpotentials in Arabidopsis thaliana Mesophyllzellen

(A) Repräsentative schnelle Depolarisation des Membranpotentials durch die Applikation von $125 \mu\text{L}$ eiskalter Badlösung (Kältestimulus), gemessen mit der Einstichmethode an Arabidopsis WT Mesophyllzellen. Die aufgezeichnete Depolarisation um 160 mV mündete in einer sehr schnellen Repolarisation, durch die in 25 s das Ruhepotential wieder erreicht wurde. (B) Überlagerte Aufzeichnungen der Depolarisation des Membranpotentials durch einen Kältestimulus wie in (A) an sechs Individuen von Arabidopsis WT. Alle zeigten eine sehr schnelle Depolarisation, aber unterschiedliche Verläufe der Repolarisationsphasen. Bis auf eine Pflanze (orange Kurve) wurde die stärkste Repolarisation in den ersten 10 s erreicht.

Abb. 3.1 B zeigt eine Zusammenstellung verschiedener Potentialänderungen, die durch Kälte an *A. thaliana* (Arabidopsis) Mesophyllzellen induziert wurden. Dabei ist zu erkennen, dass die Repolarisation häufig mehrphasig und in ihrer Kinetik sehr viel variabler verlief als die Depolarisation (Abb. 3.1 B). Während sich die Kinetiken in den ersten Sekunden der Repolarisationsphase im Vergleich individueller Experimente deutlich überlagerten (Abb. 3.1 B), fiel auf, dass die Repolarisationskinetik danach deutliche Varianzen aufwies Abb. 3.1 B.

3.2 Licht induziert eine Membranpotential-Depolarisation in Mesophyllzellen

Pflanzen nutzen Licht als Energiequelle und reagieren auf Licht auch mit einer Vielzahl anderer physiologischer und entwicklungsabhängiger Reaktionen. Werden Pflanzen für längere Zeit (Stunden bis Tage) in Dunkelheit gehalten, so kann in photosynthetisch aktiven Zellen eine Depolarisation beobachtet werden, wenn durch die Applikation von Weißlicht, die Photosynthese einsetzt (Marten et al. 2010; Elzenga et al. 1995). Dies konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit in Arabidopsis Mesophyllzellen mittels der Einstichmethode gemessen werden. In einem Dunkelexperiment diente dabei die Halogenlampe des Mikroskops als Weißlichtquelle, welche am Präparat eine Photonenflussdichte von $140 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ erzeugte. Ausgehend von einer abgedunkelten Blattprobe, konnte nach Einschalten der Mikroskopbeleuchtung eine transiente, moderate Depolarisation $\Delta V = 38 \pm 3,5 \text{ mV}$ (SE, $n = 7$) des Membranpotentials der Mesophyllzellen beobachtet werden (Abb. 3.2). Wurde das Licht ausgeschaltet, kam es zu einer raschen Hyperpolarisation um etwa -15 mV . Darauf folgte eine erneute langsame Depolarisation, in deren Anschluss sich das Membranpotential wieder dem ursprünglichen Ruhepotential annäherte. Um zu prüfen, ob es sich bei dieser durch Weißlicht induzierten Depolarisation in Abb. 3.2 um eine Reaktion auf einsetzende photosynthetischen Prozesse handelte, wurden die Blattproben mit dem Photosyntheseinhibitor 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) für 10 - 20 min inkubiert. Durch die Zugabe von DCMU, kommt es zu einer Inhibition des Elektronentransports zwischen Photosystem II und Plastochinon. Dadurch können die Elektronen, die durch die Wasserspaltung freigesetzt werden, nicht mehr auf das Photosystem I übertragen werden, was zu einer Unterbrechung der Elektronentransportkette führt (Trebst 2007). Abb. 3.2 zeigt, dass in Gegenwart von $5 \mu\text{M}$ DCMU die Weißlicht-induzierte Depolarisation des Membranpotentials nahezu vollständig unterdrückt wurde. Im Gegensatz dazu, konnte jedoch durch Applikation eines 60 s Blaulichtpulses ($\lambda=480 \text{ nm}$; 1 min, 1000 mA LS) eine deutliche Depolarisation des Membranpotentials beobachtet werden. Dieses Experiment stützt die Hypothese, dass die einsetzende Photosynthese zur vorübergehenden Depolarisation des Membranpotentials führt. Ein Prozess, welcher allerdings unabhängig von einer in Mesophyllzellen bisher nicht beschriebenen Blaulicht-abhängigen Depolarisation zu sein scheint.

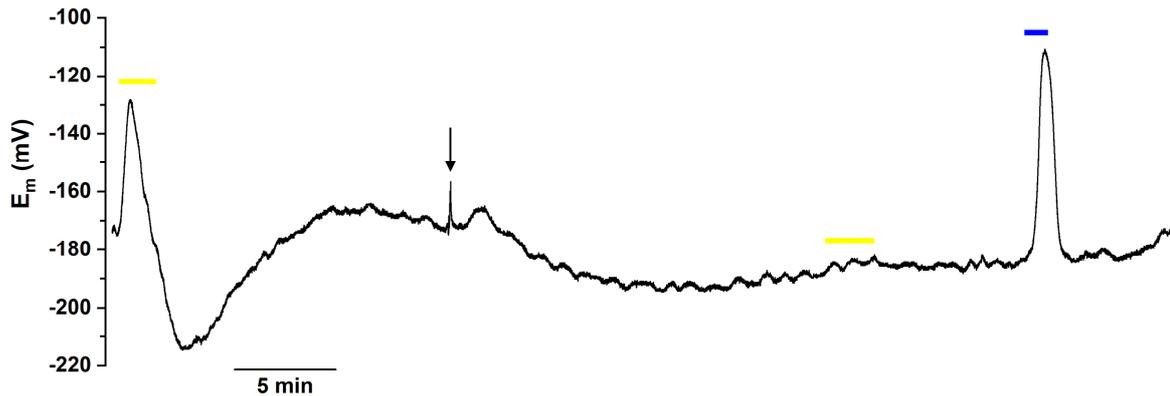


Abb. 3.2: Die photosynthese-bedingte, transiente Depolarisation des Membranpotentials, wird vollständig durch den Photosyntheseinhibitor DCMU gehemmt, nicht jedoch die Depolarisation durch 50 s Blaulicht

Exemplarische Aufzeichnung des Membranpotentials mittels Einstichttechnik von *Arabidopsis* WT Mesophyllzellen in Antwort auf verschiedene Lichtstimuli. 20 s nach Beginn der Messung wurde die Mikroskopbeleuchtung für 2,2 min eingeschaltet (gelber Balken) und eine Photosynthese-bedingte Depolarisation des Membranpotentials konnte beobachtet werden. Nach dem Ende der Belichtung kam es zu einer starken transienten Hyperpolarisation mit Überschwingen, ehe sich das Ruhepotential erneut einstellte. Nach 16,6 min wurde DCMU (Pfeil) appliziert mit einer Endkonzentration von 5 μ M und es schloss sich eine Wartezeit von 17,8 min an, ehe erneut die Mikroskopbeleuchtung (gelber Balken) eingeschaltet wurde. Es konnte keine Photosynthese-bedingte Depolarisation des Membranpotentials mehr beobachtet werden. Nach einer Wartezeit von 9,6 min wurde ein 60 s Blaulichtpuls appliziert, der eine starke Depolarisation des Membranpotentials um 70 mV bewirkte, welche Photosynthese-unabhängig war.

Vor dem Hintergrund, dass im Rahmen dieser Arbeit der Blaulicht-gesteuerte Kationenkanal ChR2 in Pflanzen als optogenetisches Werkzeug zur Kontrolle des Membranpotentials in Pflanzenzellen implementiert werden sollte, wurde im Folgenden die Regulation des Membranpotentials von Mesophyllzellen durch Blaulicht näher untersucht. Dass Keimlinge dikotyledoner Pflanzen auf starkes Blaulicht mit einer Depolarisation des Membranpotentials im Hypokotyl reagieren, konnte bereits von Spalding und Cosgrove (1989b) gezeigt werden, für die Mesophyllzellen adulter *Arabidopsis* wurde dies bisher nicht gezeigt.

3.2.1 *Arabidopsis* Mesophyllzellen reagieren mit einer spezifischen Blaulicht-abhängigen Depolarisation

Um diese Blaulichtreaktion von Mesophyllzellen im Einstich-Experiment untersuchen zu können wurde eine Blaulichtdiode (Kap. 2.6) verwendet, deren Intensität zwischen 200 und 1000 apparenter Leistung justiert werden konnte und welche über einen Lichtleiter an das Setup gekoppelt wurde. Nach erfolgreichem Einstich in eine intakte Mesophyllzelle konnte ein durchschnittliches Membranpotential von -176 mV gemessen werden. Die Applikation von Blaulichtpulsen einer Dauer von 1 – 20 s führte zunächst zu keinen signifikanten Änderungen des Membranpotentials in den Mesophyllzellen. Jedoch infolge einer Bestrahlung der Blattprobe mit hochenergetischem Blaulicht (500 – 1000 mA LS) konnte nach 20 – 60 s in den Mesophyllzellen adulter *Arabidopsis* Col0 Pflanzen eine

deutliche, transiente Depolarisation des Membranpotentials mit einer Gesamtdauer von 70 s beobachtet werden (Abb. 3.3).

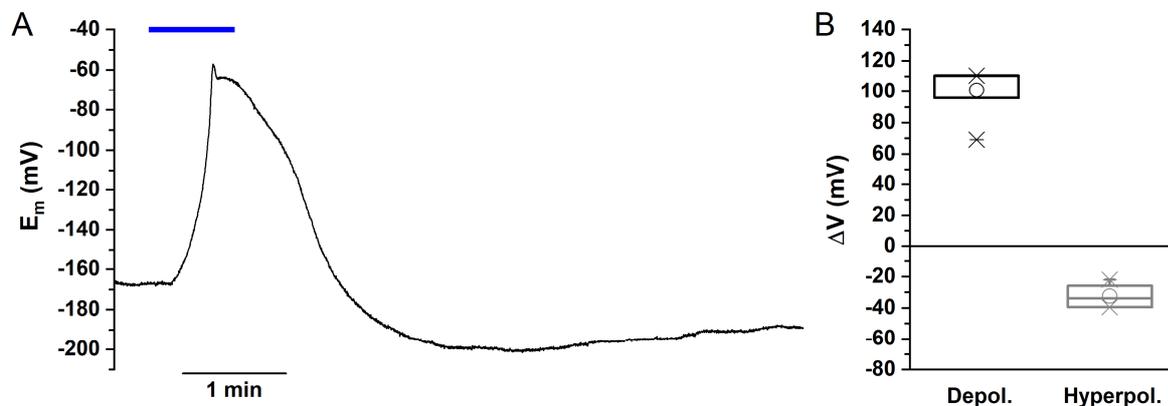


Abb. 3.3: Blaublicht bewirkt eine transiente Depolarisation des Membranpotentials in adulten Arabidopsis Mesophyllzellen

(A) Repräsentative Aufzeichnung des Membranpotentials mittels Einstichmethode in Mesophyllzellen von Arabidopsis WT in Antwort auf einen 50 s Blaublichpuls. Durch die Beleuchtung mit 50 s Blaublicht wurde eine schnelle Depolarisation des Membranpotentials auf -60 mV ausgelöst. Im Anschluss an die Depolarisation kam es zu einer schnellen Repolarisation des Membranpotentials und einer ausgeprägten transienten Hyperpolarisation, ehe die Zellen ihr, vor-Stimulus, Ruhepotential wieder einstellten. (B) Im Mittel wurde bei sieben untersuchten Pflanzen eine Depolarisation von $101,2 \pm 3,3$ mV (Minimum und Median 95,6 mV, Maximum 110,6 mV, Ausreißer 69 mV) erreicht, während eine anschließende Hyperpolarisation von $32,5 \pm 2,3$ mV (Minimum -39,2 mV, Maximum -21,6 mV, Median -33,8 mV) auftrat.

Eine genauere Betrachtung der Kinetik zeigte, dass direkt nach dem Einschalten des Blaublichts zunächst keine Änderung des Membranpotentials auftrat. Nach etwa 10 s setzte eine langsame Depolarisation ein, die nach weiteren 10–20 s in eine schnelle Depolarisation umschlug (Abb. 3.3 A). Dabei wurde eine hohe Depolarisationsgeschwindigkeit von ca. $3,5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, (vgl. Abb. 3.9) erreicht, die bis zum Erreichen der maximalen Amplitude ($101,2 \pm 3,3$ mV) beibehalten wurde. Die anschließende Repolarisation war typischerweise biphasisch (Abb. 3.3 A). Wie in Abb. 3.3 A zu erkennen, wurde das Ruhepotential 70 s nach Erreichen der maximalen Depolarisation wieder erreicht, jedoch resultierte die anschließende weiteren Erniedrigung des Membranpotentials in einer starken Hyperpolarisation (-33 mV). Diese blieb, für ca. 9 min bestehen, bevor sich die Zelle wieder dem Ausgangsruhepotential annäherte. Die Analyse mehrerer Experimente ergab, dass die in Abb. 3.3 A gezeigte Kurvenform in der Hälfte der gemessenen Zellen beobachtet wurde, im Mittel dauerte die Repolarisation $68,5 \pm 1,7$ s ($n = 7$, SE). In den anderen Fällen fehlte jedoch der doppelte Gipfel in der Repolarisationskinetik oder es trat nur eine abgeschwächte Hyperpolarisation auf. Insgesamt war die Reaktion der Mesophyllzellen auf intensives Blaublicht variabel.

Trotz der variablen Kinetik in der Blaublicht-induzierten Depolarisation konnte sie in verschiedenen Experimenten reproduziert werden, so dass es möglich war sowohl die maximale Depolarisation, als auch die Hyperpolarisation, sowie die

Repolarisationsgeschwindigkeit statistisch zu erfassen (Abb. 3.3 B). Die Blaulicht-induzierte Depolarisation lag zwischen 69 und 110 mV, im Durchschnitt bei 101 mV, wobei von sieben Pflanzen vier genau auf 110 mV depolarisierten. Die im Anschluss auftretende Hyperpolarisation lag durchschnittlich bei -32 mV mit einer Spannbreite von -39 bis -22 mV.

Es ist anzumerken, dass es sich im Gegensatz zur Blaulichtreaktion der Zellen des Hypokotyls (Spalding and Cosgrove 1989a), bei der Blaulicht-induzierten Depolarisation im adulten Mesophyll um eine einmalig auftretende Antwort handelte. Im vorliegenden Messzeitraum von 1 - 2 h ließ sie sich nicht mit vergleichbarer Kinetik durch eine weitere Blaulichtstimulation wiederholen (Abb. 3.4).

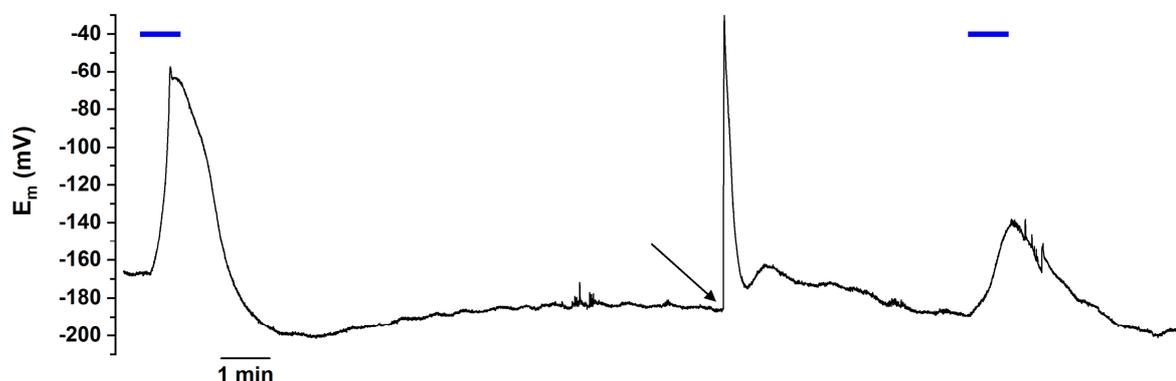


Abb. 3.4: Die Depolarisation des Membranpotentials durch Blaulicht ist ein singuläres Ereignis, dass nicht durch die allgemeinen Depolarisationsfähigkeit des Membranpotentials bedingt ist.

Exemplarische Aufzeichnung des Membranpotentials mittels Einstichttechnik von *Arabidopsis* WT Mesophyllzellen in Antwort auf verschiedene Stimuli. 20 s nach Beginn der Messung wurde ein 50 s Blaulichtpuls (blauer Balken) appliziert, der eine starke Depolarisation, mit anschließender Repolarisation und Hyperpolarisation des Membranpotentials induzierte. Nach 10 min Wartezeit wurde ein Kältestimulus (125 µL eiskalte Badlösung) appliziert, der zu einer raschen Depolarisation um 160 mV, mit anschließender Repolarisation des Membranpotentials führte und damit zeigte, dass die Zellen potentiell zur Depolarisation fähig waren. Nach einer Wartezeit von 5 min wurde ein weiterer 50 s Blaulichtpuls gegeben, dieser führte nur zu einer schwachen Depolarisation des Membranpotentials um 35 mV, wie sie beim Einsetzen der Photosynthese beobachtet werden konnte, siehe Abb. 3.2.

Während die Mesophyllzellen sehr wohl responsiv waren und zum Beispiel nach Kältestimulation (siehe Abb. 3.4) eine deutliche Depolarisation zeigten, konnte nach erneuter Blaulichtgabe nur noch eine Depolarisation mit reduzierter Amplitude und abweichender Kinetik gemessen werden (siehe Abb. 3.4). Die beobachtete Kinetik erinnerte dabei deutlich an typische, durch einsetzende Photosynthese verursachte Membranpotentialänderungen (siehe Abb. 3.2).

Ein diesbezüglicher Vergleich der Blaulicht-induzierten Depolarisation in Abwesenheit und Gegenwart von DCMU (Abb. 3.2, Abb. 3.5, Abb. 3.6) zeigt, dass DCMU die Blaulicht-induzierte Depolarisation nicht vollständig hemmte. DCMU führte jedoch zu

einer reduzierten Amplitude und die Hyperpolarisation war stark reduziert oder fehlte vollständig, siehe Abb. 3.6.



Abb. 3.5: DCMU inhibiert nicht die Blaulicht-induzierte Depolarisation des Membranpotentials in Arabidopsis Mesophyllzellen, aber sie moduliert die Depolarisationskinetik und verhindert eine Hyperpolarisation

Aufzeichnung der Depolarisation der überlagerten normierten Membranpotentiale (Einstichmethode) zweier verschiedener Arabidopsis WT in Antwort auf einen 50 s Blaulichtpuls ohne DCMU (dunkelgraue Kurve) und in Anwesenheit von 5 μ M DCMU (rote Kurve) in der Badlösung. DCMU verhinderte nicht die Blaulicht-induzierte Depolarisation des Membranpotentials, schwächte diese jedoch auf 75 mV, statt 100 mV ohne DCMU, ab. Die Repolarisation setzte mit DCMU kontinuierlicher ein und zeigte eine monophasische Kinetik, verglichen mit der Kontrolle, außerdem stockte die Repolarisation kurz vor Erreichen des Ruhepotentials und hemmte die Hyperpolarisation völlig.

Auch die Depolarisation an sich setzte langsamer ein, weil wahrscheinlich die photosynthetische Komponente fehlte, wie aus Abb. 3.5 ersichtlich wird. Eine Auswertung der Messungen hinsichtlich der Depolarisationsdauer ergab, dass ohne DCMU $33,6 \pm 2,3$ s (SE, n = 6) und unter Einfluss von DCMU durchschnittlich $46,0 \pm 2,9$ s (SE, n = 5) bis zur maximalen Depolarisation vergingen.

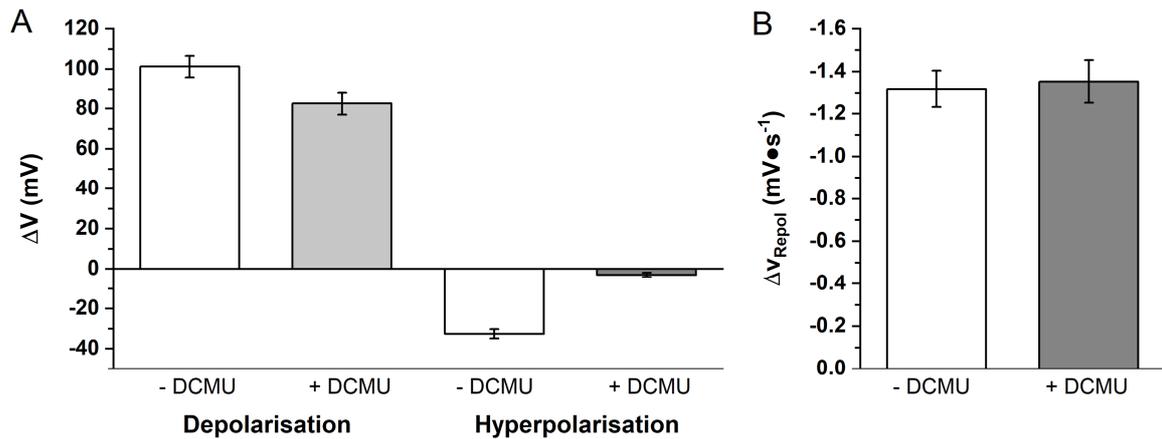


Abb. 3.6: DCMU verringert geringfügig die durch 50 s Blaulicht erzielte Depolarisation in Arabidopsis und hemmt die anschließende Hyperpolarisation, die Repolarisationsgeschwindigkeit ist jedoch unbeeinflusst

(A) Die Statistische Auswertung der im Experimentalaufbau von (Abb. 3.5) auftretenden Depolarisation ohne DCMU ($101,2 \pm 3,3$ mV, SE, $n = 7$) und mit DCMU ($82,6 \pm 5,6$ mV, SE, $n = 5$) zeigte, dass die Reaktion auf 50 s Blaulicht ablief, aber unter DCMU etwas geringer in der Depolarisation war. Die im Anschluss auftretende Hyperpolarisation wurde durch DCMU stark gehemmt, denn ohne DCMU lag sie bei $-32,5 \pm 2,3$ mV (SE, $n = 7$) und mit DCMU bei $-2,7 \pm 1,3$ mV (SE, $n = 5$). (B) Da sich die Repolarisationsgeschwindigkeit unter DCMU zum Ende der Repolarisationsphase stark verlangsamte, wurde für alle Messungen die Repolarisationsdauer bis zum Erreichen des Ruhemembranpotentials $+7$ mV bestimmt, sowie von der Depolarisationsamplitude -7 mV abgezogen, und daraus die Repolarisationsgeschwindigkeit berechnet. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Repolarisationsgeschwindigkeit zwischen Pflanzen ohne DCMU Behandlung ($-1,32 \pm 0,09$ mV·s⁻¹, SE, $n = 7$) und mit DCMU Behandlung ($-1,35 \pm 0,10$ mV·s⁻¹, SE, $n = 5$).

Die statistische Auswertung der maximalen blaulichtabhängigen Depolarisation mit und ohne DCMU zeigt, dass unter DCMU die Depolarisation geringfügig, aber signifikant nachlässt ($p = 0,047$). Ohne DCMU depolarisierten die Zellen im Durchschnitt um $101,2 \pm 3,3$ mV, mit DCMU kam es nur zu einer Depolarisation um $82,6 \pm 5,6$ mV. Deutlicher war der Effekt, den DCMU auf die Hyperpolarisation nach langer Blaulichtgabe hatte. Die Hyperpolarisation, die infolge einer langen Belichtung zu beobachten war, verschwand in Anwesenheit von DCMU fast vollständig. Ohne DCMU kam es im Durchschnitt zu einer Hyperpolarisation von $-32,5 \pm 2,3$ mV. Unter DCMU Behandlung hyperpolarisierten die Zellen oft gar nicht oder nur sehr schwach. Im Mittel trat nur eine Hyperpolarisation von $-2,7 \pm 1,3$ mV auf. –Dies könnte möglicherweise an der Hemmung der H⁺-ATPase durch DCMU liegen. Okumura et al. (2016; 2012) fanden in Marchantia und Arabidopsis eine Hemmung der Lichtaktivierten Phosphorylierung der H⁺-ATPase –. Schließlich konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von DCMU Auswirkungen auf die Kinetik der Kurve nach Blaulichtgabe hatte.

Es konnte gezeigt werden, dass die Blaulicht-induzierte Depolarisation nach der Gabe von DCMU immer noch ausgelöst wurde, jedoch mit einer veränderten Kinetik ablief. Durch die Inhibition der Photosynthese kam es zu einem verzögerten Einsetzen der Depolarisation. Auch der biphasische Charakter der Depolarisation wurde so modelliert, dass sich eine monophasische Kinetik zeigte (Abb. 3.5). Außerdem verlangsamte sich die Reaktion kurz vor dem Erreichen der maximalen Amplitude. Die

Depolarisationsgeschwindigkeit nahm immer weiter ab, bis sie sich umkehrte und direkt in die Repolarisation überging. Die Repolarisation verlief im Wesentlichen, wie in Pflanzen ohne DCMU Behandlung, jedoch mit einer eher monophasischen Kinetik und ohne Hyperpolarisation (Abb. 3.5). Die Berechnung der Repolarisationsgeschwindigkeit betrug für die Kontrollmessungen $-1,32 \pm 0,09 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ und für die Pflanzen mit DCMU Behandlung $-1,35 \pm 0,10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Diese bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Blaulicht-induzierte Depolarisation der Mesophyllzellen eine photosynthetische Komponente, sowie eine nicht-photosynthetische Komponente besitzt, deren molekulare Grundlage nicht genau geklärt ist, wobei die Beteiligung auf Anionenkanäle wahrscheinlich ist (Cho and Spalding 1996). Verschiedene Publikationen belegen jedoch, dass Starklichtereignisse zu einer Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen (Vandenabeele et al. 2004; Mullineaux et al. 2006). Eine Beteiligung von ROS an den Blaulicht-abhängigen Potentialänderungen sollte daher überprüft werden.

3.3 Die Applikation von H₂O₂ führt zu einer Depolarisation in Arabidopsis Mesophyllzellen

Um zu untersuchen, ob auch ROS bei der schnellen Depolarisation auf Blaulicht in Mesophyllzellen eine Rolle spielt, wurden zunächst Messungen mit einer ROS-sensitiven Elektrode bei gleichzeitigem Einstich der Mesophyllzellen ohne Epidermis durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass ein 50 s Blaulichtpuls zu einer Depolarisation des Membranpotentials, jedoch zu keiner messbaren ROS Produktion führte (Daten nicht gezeigt). Der Ansatz wurde daraufhin nicht weiter verfolgt.

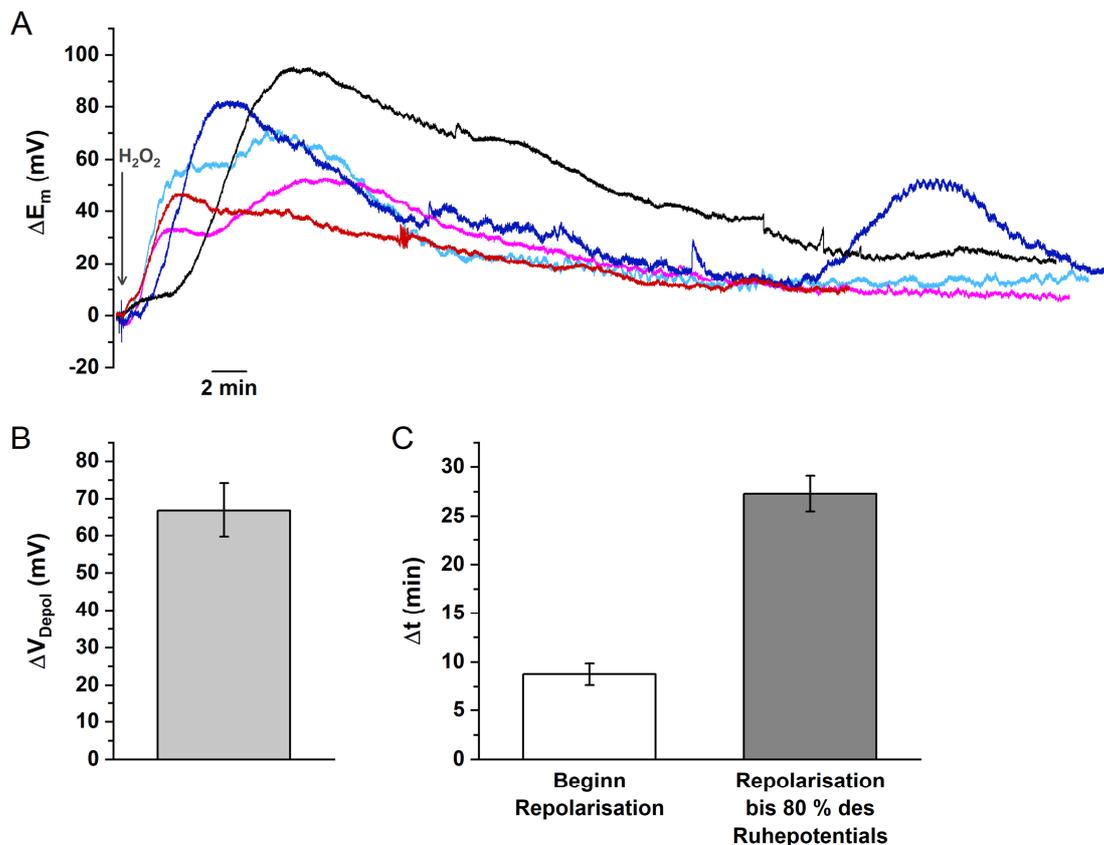


Abb. 3.7: H₂O₂ induziert in Arabidopsis Mesophyllzellen eine transiente Depolarisation des Membranpotentials.

(A) Aufzeichnung der überlagerten normierten Membranpotentiale der Mesophyllzellen mit der Einstichmethode von fünf Arabidopsis WT in Antwort auf die Applikation von 500 μM H₂O₂ (hellgrauer Pfeil). H₂O₂ führt zu einer kontinuierlichen, meist biphasischen, Depolarisation des Membranpotentials mit anschließender langsamer Repolarisation. (B) Statistische Auswertung der Depolarisationsamplituden ($67 \pm 7,2$ mV) nach Applikation von 500 μM H₂O₂ (SE, $n = 6$). (C) Statistische Auswertung der Dauer bis zum Einsetzen der Repolarisation ($8,8 \pm 1,1$ min) nach der Applikation von 500 μM H₂O₂ (weißer Balken, SE, $n = 5$) und der Dauer bis das Membranpotential auf 80 % des Ausgangsruhepotentials ($27,3 \pm 1,8$ min) repolarisiert war (grauer Balken, SE, $n = 5$).

In einem weiteren Ansatz wurden mit der Einstichtechnik Membranpotentialänderungen nach direkter H₂O₂ Gabe im Mesophyll von Arabidopsis Col0 untersucht. Wie in Abb. 3.7 gezeigt, reagierten Mesophyllzellen auf eine Gabe von 500 μM H₂O₂ mit einer transienten,

jedoch sehr variablen Depolarisation. Bei zwei Pflanzen verlief diese biphasisch mit zwei Maxima (rot, rosa und hellblau), bei zwei anderen monophasisch (schwarz und blau). 20 s nach Beginn der Aufzeichnung wurde H_2O_2 appliziert. Es kam innerhalb von 1 min nach H_2O_2 Gabe zum Einsetzen einer langsamen Depolarisation, deren mittlere maximale Amplitude bei $67 \pm 7,2$ mV lag (Abb. 3.7 B). Diese Depolarisation wurde nur langsam erreicht und ging nach $8,8 \pm 1,1$ min in eine Repolarisation über (Abb. 3.7 C). Das Niveau des Ruhepotentials vor Messbeginn stellte sich nur sehr langsam erneut ein oder wurde in manchen Fällen gar nicht mehr erreicht. Die Repolarisation (80 % Wert des anfänglichen Ruhepotentials) dauerte im Durchschnitt $27,3 \pm 1,8$ min und war somit ausgesprochen langsam (Abb. 3.7 C). Im weiteren Verlauf der Messungen wurde das ursprüngliche Ruhepotential fast immer wieder erreicht, jedoch nur, wenn die Zellen durch weitere Stimuli wie Blaulicht gereizt wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Kinetik der Membranpotentialänderung nach Applikation von H_2O_2 unterschied sich dabei stark von den Membranpotentialänderungen die durch Blaulicht oder Kälte hervorgerufen wurden. Da keine ROS-Produktion nach der Blaulicht-induzierten Depolarisation gemessen werden konnte und sich die Kinetik der Membranpotentialänderungen beider Stimuli stark unterschied, kann davon ausgegangen werden, dass die Blaulicht-induzierte Depolarisation ROS-unabhängig war.

Das Ziel dieser Arbeit war unter anderem die Identifizierung von molekularen Komponenten, die an der Generation und Modifikation elektrischer Signale in Pflanzen beteiligt sein könnten. Es ist aus Arbeiten mit der Patch-Clamp Technik bekannt, dass die rasche Depolarisation durch Blaulicht und Kälte durch den Efflux von Anionen verursacht wird (Cho and Spalding 1996; Lewis et al. 1997). Weiterhin wird vermutet, dass bei der Repolarisation die Umverteilung von Kationen aus dem Cytoplasma in den Apoplasten eine Rolle spielt (Felle and Zimmermann 2007; Cuin et al. 2018). Das einzige Kation, dessen elektrochemischer Gradient sich dafür anbieten würde, ist Kalium. Daher wurden Experimente mit einer Verlustmutante des Arabidopsis Kationenkanals GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K^+ CHANNEL (GORK) (Lacombe et al. 2000; Winter et al. 2007) durchgeführt.

3.4 Der Verlust von GORK führt nicht zu einer Veränderung der Repolarisationskinetik nach Depolarisation durch Blaulicht-Stimuli

2018 wurde eine Arbeit über elektrische Signale und die Rolle zweier Ionenkanäle veröffentlicht (Cuin et al. 2018). Darin konnte gezeigt werden, dass der Auswärtsgerichteter GORK bei der Repolarisation verwundungsinduzierter Membranpotentialänderungen beteiligt ist. Aus diesem Grund, wurden Blaulicht- und Kälte-abhängige Membranpotentialänderungen in GORK-Verlustmutanten (*gork1-2*; Col0-Hintergrund) und Wildtyp-Pflanzen (Col0) – mit besonderem Augenmerk auf das Repolarisationsverhalten – untersucht.

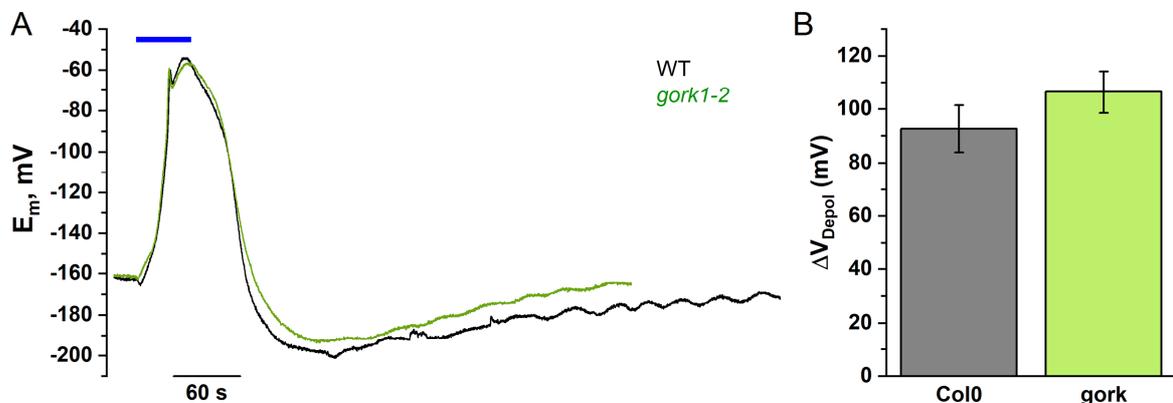


Abb. 3.8: Die Kinetik der Blaulicht-induzierten Depolarisation in Arabidopsis Mesophyllzellen wird nicht durch den Verlust des Kaliumkanals GORK beeinflusst.

(A) Die Exemplarische Überlagerung der Aufzeichnung der Depolarisation des Membranpotentials in Antwort auf einen 50- 60 s Blaulichtpuls ermittelt mit der Einstichmethode an Arabidopsis WT (schwarz) und *gork1-2* (grün) Verlustmutante zeigt keinen Unterschied in der Depolarisations- und Repolarisationskinetik. (B) Die Statistische Auswertung der durch das Experiment in (A) erzielten Depolarisationsamplituden zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen WT ($92,7 \pm 8,7$ mV, SE, $n = 5$) und *gork1-2* Verlustmutante ($106,4 \pm 7,8$ mV, SE, $n = 9$).

Bei der Betrachtung der Rohspuren zweier Beispielmessungen von Wildtyp – Columbia0 (Col0)– (WT) und GORK knock-out (*gork1-2*) Pflanzen (Abb. 3.8 A) zeigt sich, dass die Blaulicht-induzierte Membranpotentialänderung in den *gork1-2* identisch mit der Reaktion der Mesophyllzellen des Wildtyps war. Aus der statistischen Auswertung der durchgeführten Messungen ging hervor (Abb. 3.8 B), dass die mittlere maximale Blaulicht-induzierte Depolarisation im Wildtyp $92,7 \pm 8,7$ mV betrug. In der *gork1-2* Verlustmutante lag sie bei $106,4 \pm 7,8$ mV. Sie war im Mittel also bei den *gork1-2* Pflanzen etwas höher, jedoch nicht signifikant.

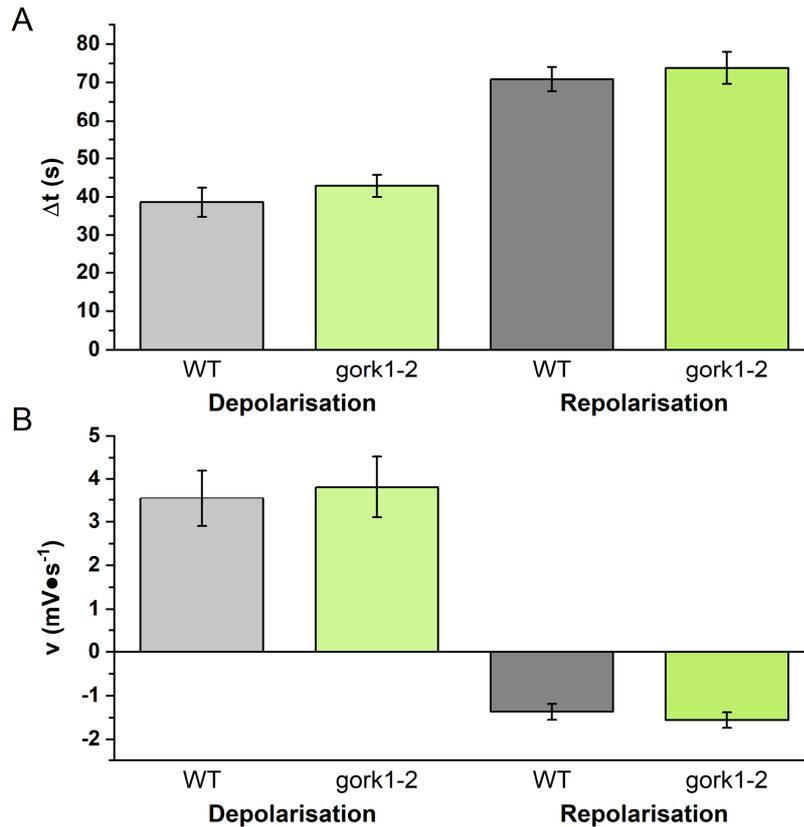


Abb. 3.9: Die Dauer und Geschwindigkeit von Depolarisation und Repolarisation nach 50 s BL in Arabidopsis Mesophyllzellen ist unbeeinflusst vom Verlust des Kaliumkanals GORK

(A) Die Statistische Auswertung der im Experimentalaufbau von (Abb. 3.8 A) benötigten Dauer bis zur vollständigen Depolarisation WT ($38,6 \pm 3,8$ s, SE, $n = 5$) und *gork1-2* Verlustmutante ($42,9 \pm 2,9$ s, SE, $n = 9$) und Repolarisation WT ($70,9 \pm 3,1$ s, SE, $n = 5$) und *gork1-2* Verlustmutante ($73,8 \pm 4,1$ s, SE, $n = 9$) zeigten keine signifikanten Unterschiede. (B) Die sich aus Depolarisationsamplitude und Depolarisations- bzw. Repolarisationsdauer ermittelte Depolarisationsgeschwindigkeit von WT ($3,5 \pm 0,6$ mV·s⁻¹, SE, $n = 5$) und *gork1-2* Verlustmutante ($3,8 \pm 0,7$ mV·s⁻¹, SE, $n = 9$) und Repolarisationsgeschwindigkeit von WT ($1,4 \pm 0,2$ mV·s⁻¹, SE, $n = 5$) und *gork1-2* Verlustmutante ($1,6 \pm 0,2$ mV·s⁻¹, SE, $n = 9$) unterschied sich ebenfalls nicht signifikant.

Es konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Länge der Depolarisations- und Repolarisationsphasen zwischen Wildtyp und *gork1-2* Mutanten gemessen werden (Abb. 3.9 A). Für Wildtyp und Mutante betrug die Dauer der Depolarisation im Mittel $38,6 \pm 3,8$ s bzw. $42,9 \pm 2,9$ s, während für die Repolarisation $70,9 \pm 3,1$ s bzw. $73,8 \pm 4,1$ s bestimmt wurde. Da die Dauer beider Phasen von der Maximalamplitude abhängig ist, wurden zusätzlich die Geschwindigkeiten der Depolarisation und der Repolarisation bestimmt (Abb. 3.9 B). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der *gork1-2* Verlustmutante und dem korrespondierenden Wildtyp. (Wildtyp: $v_{\text{Depol}} = 3,5 \pm 0,6$ mV·s⁻¹ und $v_{\text{Repol}} = 1,4 \pm 0,2$ mV·s⁻¹; *gork1-2*: $v_{\text{Depol}} = 3,8 \pm 0,7$ mV·s⁻¹ und $v_{\text{Repol}} = 1,6 \pm 0,2$ mV·s⁻¹).

Es war nicht möglich einen signifikanten Einfluss des Verlustes des auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanals GORK auf die Blaulicht-induzierte Änderung des

Membranpotentials in *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren. Zur weiteren Klärung wurde auch die Depolarisation des Membranpotentials durch einen Kältestimulus in WT und *gork1-2* und die damit einhergehende Repolarisation untersucht. Durch Kälte werden sehr viel größere Depolarisationsamplituden erzielt und somit positivere absolute Membranpotentiale erreicht, welche oberhalb von E_K liegen können.

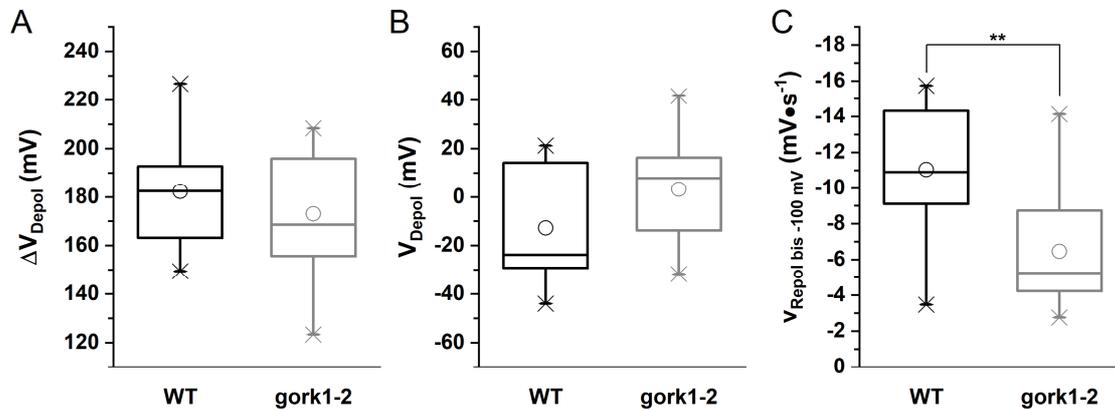


Abb. 3.10: Nach der Depolarisation des Membranpotentials durch einen Kältestimulus ist in *gork1-2 Arabidopsis* Mesophyllzellen die Repolarisation des Membranpotentials bis auf -100 mV verlangsamt

(A) In Einstichmessungen an *Arabidopsis* WT und *gork1-2* Verlustmutanten wurden die Änderungen des Membranpotentials nach der Applikation von $125 \mu\text{L}$ eiskalter Badlösung ermittelt und statistisch ausgewertet. Dabei ergab sich eine relative Depolarisationsamplitude für den WT von $173,1 \pm 7,1$ mV (SE, $n = 11$, Minimum 150 mV, Maximum 227mV, Median 182,4 mV) und für die *gork1-2* Verlustmutante von $182,3 \pm 6,1$ mV (SE, $n = 11$, Minimum 123,3 mV, Maximum 208,3 mV, Median 169 mV), dieser Unterschied war nicht signifikant. (B) Statistische Auswertung der absoluten Depolarisation wie in (A) ergab für den WT Membranpotentiale von $-12,7 \pm 6,9$ mV (SE, $n = 11$, Minimum $-44,2$ mV, Maximum 21,1 mV, Median $-23,5$ mV) und für die *gork1-2* Verlustmutante von $+3,3 \pm 6,1$ mV (SE, $n = 11$, Minimum $-31,7$ mV, Maximum 41,7 mV, Median 7,7 mV), dieser Unterschied war ebenfalls nicht signifikant. (C) Statistische Auswertung der Repolarisationsgeschwindigkeit — bis zum Erreichen eines Membranpotentials von -100 mV — des Experiments wie in (A) ergab für den WT $-11,1 \pm 1$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (SE, $n = 11$, Minimum $-3,5$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Maximum $-15,7$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Median $-10,9$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$) und für die *gork1-2* Verlustmutante $-6,5 \pm 0,9$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (SE, $n = 11$, Minimum $-2,7$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Maximum $-14,2$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Median $-5,2$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$) und zeigte damit dass der Verlust von GORK zu einer signifikant langsameren Repolarisationsgeschwindigkeit führt, t -Test $p \leq 0,01$.

Der Kältestimulus bewirkte eine mittlere relative Depolarisation von $173,1 \pm 7,1$ mV (SE) für Col0 und $182,3 \pm 6,1$ mV bei den *gork1-2*-Pflanzen (Abb. 3.10 A); t -Test: $p = 0,36$. Dies zeigt, dass die Depolarisationsamplitude der *gork1-2* Pflanzen sich nicht entscheidend von den wildtypischen Kontrollpflanzen unterschied. Da der auswärtsgerichtete Kaliumkanal GORK rechnerisch bereits bei einem Membranpotential negativer als -118 mV schließt (c_K innen 100 mM (Clarkson and Hanson 1980), c_K außen 1 mM), war es wichtig, nicht nur die relativen Änderungen des Membranpotentials zu betrachten, sondern auch die absoluten Werte, sowie die Ausgangsruehepotentiale auszuwerten. Die absoluten Membranpotentiale lassen die Ausgangsruehepotentiale außen vor, weil sie nur das positivste gemessene Membranpotential widerspiegeln. Es zeigte sich, dass die *gork1-2* Verlustmutanten zu leicht positiveren Membranpotentialen depolarisierten, die im Mittel bei $+3,3 \pm 6,1$ mV (SE) lagen (Abb. 3.10 B). Der Wildtyp depolarisierte im Durchschnitt

nur auf $-12,7 \pm 6,9$ mV (SE) (Abb. 3.10 B). Hierbei fand sich kein signifikanter Unterschied; t-Test: $p = 0,11$. Wurde jedoch die Repolarisationsgeschwindigkeit bis zum Erreichen eines Membranpotentials von -100 mV, also nahe E_K , bestimmt, so ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen WT und *gork1-2*-Pflanzen. Die Repolarisationsgeschwindigkeit war beim Wildtyp mit $-11,1 \pm 1$ mV \bullet s $^{-1}$ (SE) fast doppelt so schnell, wie in den *gork1-2* Pflanzen ($-6,5 \pm 0,9$ mV \bullet s $^{-1}$; SE). Es zeigt sich ein Einfluss von GORK auf die Repolarisation also nur bei depolarisierten Membranpotentialen oberhalb von E_K .

Zusammenfassend kann für diesen Teil der Arbeit festgehalten werden:

1. Mesophyllzellen reagieren auf Kälte mit schnellen (Dauer ca. 10 - 30 s), transienten und wiederholbaren Membranpotentialänderungen.
2. Kurze Blaulichtpulse im Bereich von 1 - 20 s induzieren in adultem Mesophyllzellen keine Membranpotentialänderungen.
3. Lange Blaulichtpulse im Bereich von 20 - 60 s (Starklichtstress) triggern einmalige, transiente Membranpotentialänderungen (Dauer ca. 70 s), die sich in ihrer Kinetik deutlich von Kälte-induzierten Membranpotentialänderungen unterscheiden.
4. Blaulicht-induzierte Membranpotentialänderungen besitzen eine photosynthetische und eine nicht-photosynthetische Komponente.
5. Obwohl durch unmittelbare ROS Applikation Membranpotentialänderungen in Mesophyllzellen ausgelöst werden, scheinen diese keine Komponente der Blaulicht-induzierten Membranpotentialänderungen darzustellen.

Nachdem die natürlichen elektrischen Signale durch Kälte, Blaulicht und H_2O_2 in Kontrollexperimenten detailliert untersucht worden waren, sollte im zweiten Teil der Arbeit die Eignung des Channelrhodopsin-2 als optogenetisches Werkzeug zur nicht-invasiven Induktion von Membranpotentialänderungen in Mesophyllzellen experimentell geprüft werden.

3.5 Elektrophysiologische Eigenschaften transient exprimierter ChR2 Varianten in *N. benthamiana*

Das Channelrhodopsin-2 der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gilt als Protagonist in der Etablierung optogenetischer Werkzeuge zum Studium neuronaler Signaltransduktionsprozesse. Mit der Generierung ChR2-Mutanten wird die Palette der optogenetischen Werkzeuge kontinuierlich erweitert und verbessert. Um ein effizientes, funktionelles ‚Screening‘ von ChR2 Mutanten in Pflanzenzellen zu ermöglichen, wurde das transiente Expressionssystem der *Nicotiana benthamiana* Mesophyllzellen eingesetzt. Aufbauend auf den Vorarbeiten von M. Baumann (Baumann 2013), sollten in der vorliegenden Arbeit weitere ChR2 Varianten/Mutanten elektrophysiologisch charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene ChR2-Konstrukte von M. Baumann ausgewählt, als auch eigene Konstrukte hergestellt und getestet. Zuerst wurden die ChR2 Mutanten C128A, C128T und L132C mit Hilfe der USER Methode in die pCambia2300 Vektoren kloniert. Diese Vektoren waren durch den Besitz eines 35S Promoters, einer USER-Kassette, eines C-terminalen YFPs und eines 35S Terminators charakterisiert. Siehe Vektorkarte

Zwei Tage nach Infiltration zeigten die C128A und L132C infiltrierte Blätter starke Nekrosen, während die C128T Mutante sowie die YFP Kontrolle lediglich Chlorosen aufwies. Anschließende mikroskopische Untersuchungen am LSM, zeigten eine sehr starke Fluoreszenz für die YFP Kontrolle mit hoher Transformationseffizienz. Hingegen, konnte in Mesophyllzellen, die mit ChR2-Mutanten infiltrierte worden waren nur eine geringe Fluoreszenz in einzelnen Zellen beobachtet werden.

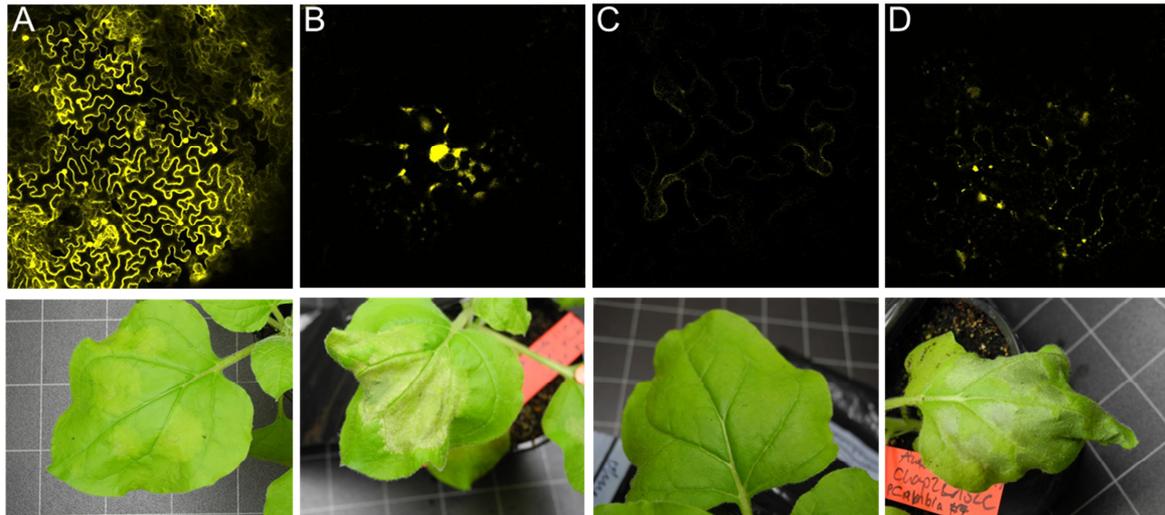


Abb. 3.11: Transiente Expression in *N. benthamiana* von ChR2-Varianten in pCambia 2300 2x35s::ChR2-YFP::35s-Term führte zu einer sehr ungleichmäßigen Expression mit schwacher Fluoreszenz am LSM

(A) Kontrolle mit transienter Expression von YFP in pCambia2300 2x35s::YFP::35s-Term führte zu guter, gleichmäßiger Expression und Fluoreszenz (oben) und nur zu schwachen Chlorosen auf den Tabakblättern (unten). (B) Expression von ChR2-C128A in pCambia2300 2x35s::ChR2-YFP::35s-Term führte zu ungleichmäßiger Expression und schwacher Fluoreszenz (oben) und nur zu starken Nekrosen auf den Tabakblättern (unten). (C) Expression von ChR2-C128T in pCambia2300 2x35s::ChR2-YFP::35s-Term führte zu ungleichmäßiger Expression und schwacher Fluoreszenz (oben), jedoch nur zu leichten Chlorosen auf den Tabakblättern (unten). (D) Expression von ChR2-L132C in pCambia2300 2x35s::ChR2-YFP::35s-Term führt zu ungleichmäßiger Expression und schwacher Fluoreszenz (oben) und zu starken Nekrosen auf den Tabakblättern (unten).

Da es sich bei ChR2 um einen durch Blaulicht-aktivierten Kationenkanal handelt, stellte sich die Frage, ob die Nekrosen auf eine Schädigung des Blattes durch ChR2 zurückzuführen seien. Durch das Abdunkeln der infiltrierten Blätter sowie die Inkubation der infiltrierten Pflanzen in einem Rotlichtkabinett konnten zwar die Nekrosen verhindert werden, die Expression bzw. Fluoreszenz verbesserte sich dadurch aber nicht messbar.

Je nach Zelltyp können insbesondere der Promoter- bzw. Terminator-Kontext einer Expressionskassette die Expressionsstärke eines Gens beeinflussen. Daher wurden im Folgenden ChR2-Konstrukte mit unterschiedlichen Promoter-Terminator Kombinationen getestet. Dabei kam es mit den Konstrukten 2xCaMV35S::C128T-YFP-nosT (pMDC32) und 2xCaMV35S::D156C-YFP-nosT (pMDC32) nur zu leichten Chlorosen und es war eine Elektrophysiologische Messung der ChR2-vermittelten Depolarisation nach Blaulichtpulsen möglich. Diese Konstrukte wurden deshalb für die elektrophysiologischen Untersuchungen ausgewählt, dabei wurden zunächst elektrische Ableitungen mit Oberflächen Elektroden durchgeführt.

3.5.1 Oberflächenelektroden

Den Messungen mit Oberflächenelektroden ging zunächst eine Vorbehandlung der infiltrierten Tabakpflanzen mit Retinal voraus, um die Rekonstitution des Channelopsins zum funktionalen Protein zu gewährleisten. Auf der Suche nach einer praktikablen Möglichkeit zur Retinalapplikation wurden verschiedene Verfahren getestet. Als optimales Verfahren stellte sich dabei heraus, Retinal ($c = 100 \mu\text{M}$) in Messlösung zu suspendieren und die Blätter 2 - 4 Stunden vor der Messung damit zu infiltrieren. Zur Fixierung der Oberflächenelektroden wurde eine Gelatinemischung entwickelt die es ermöglichte, Elektroden lokal zu fixieren und bei guter elektrischer Leitfähigkeit sowie der mechanischen Stabilität Ableitungen über längere Zeiträume durchführen zu können. Darüber hinaus gewährleistete die niedrige Erstarrungstemperatur von ca. $30 \text{ }^\circ\text{C}$ der Gelatinemixtur, dass die behandelten Blattareale keine sichtbaren bzw. messbaren Beeinträchtigungen/Verletzungen erlitten. Die aus feinem Silberdraht bestehenden Elektroden wurden mit einem großen Tropfen dieser Mischung auf die infiltrierten Blattareale aufgeklebt, meist auf die Mittelrippe und auf die Intercostalfelder. Die Applikation des Blaulichts erfolgte dann häufig auf die Blattfläche direkt unter einer der Elektroden. Es wurde mit maximal drei Elektroden gleichzeitig gemessen.

Alle vorhandenen ChR2-Mutanten wurden nach der Infiltration im Tabak auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften hin untersucht. ChR2 exprimierende Blätter zeigten deutliche, Blaulicht-abhängige Depolarisationen des Membranpotentials, wobei sich deutliche Unterschiede in der Amplitude und der Repolarisationskinetik zwischen den Mutanten darstellten. Als interne Kontrolle diente zunächst ChR2-C128T, welche bereits durch M. Baumann mittels Einstichttechnik im Tabakexpressionssystem charakterisiert wurde (Baumann 2013). In Übereinstimmung mit diesen Messungen konnte die ChR2-C128T Mutante auch mit Oberflächenelektroden als Variante mit schneller Depolarisation und mittlerer Amplitudenhöhe, bei gleichzeitig rascher Repolarisation charakterisiert werden (Abb. 3.12). Im Gegensatz zur Mutante ChR2 C128T, konnte ChR2 C128A nicht funktionell dargestellt werden (vergl. M. Baumann).

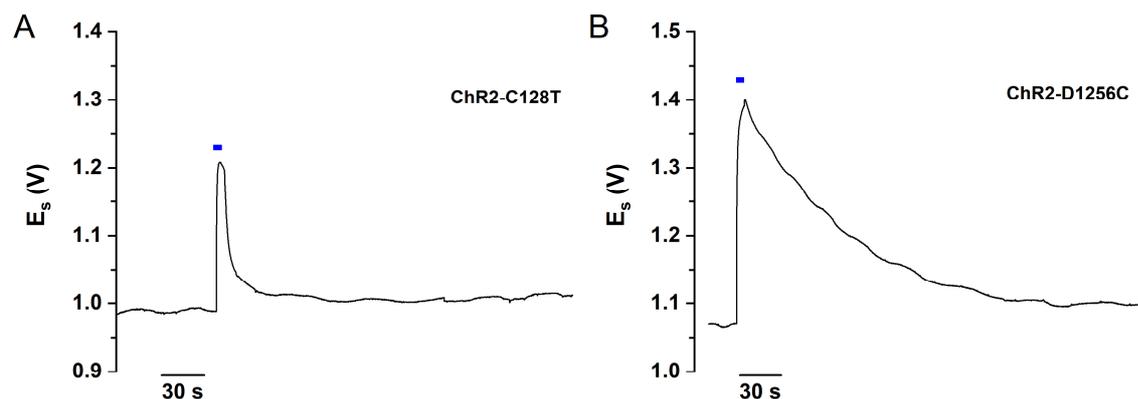


Abb. 3.12: Mittels Oberflächen Elektroden lässt sich die Blaulicht-induzierte Aktivität von transient in Tabak exprimiertem ChR2-C128T und -D156C aufzeichnen

(A) Repräsentative Aufzeichnung des sich ändernden Oberflächenpotentials eines Blattes an einer intakten Tabakpflanze mit transienter ChR2-C128T Expression in Folge eines 5 s Blaulichtpulses auf das Blattareal unter der Elektrode. Auch bei Messungen intakter Blätter an der Pflanze war es möglich durch Blaulichtpulse gleichförmige Änderungen des Oberflächenpotentials zu erzielen, wie schon im Einstich bei M. Baumann gezeigt. (B) Repräsentative Aufzeichnung des sich ändernden Oberflächenpotentials eines Blattes an einer intakten Tabakpflanze mit transienter ChR2-D156C Expression in Folge eines 5 s Blaulichtpulses auf das Blattareal unter der Elektrode. Es zeigte sich, dass sich auch ChR2-D156C transient im Tabak exprimieren ließ und dass Änderungen des Oberflächenpotentials durch Blaulicht herbeigeführt werden konnten. Die Rekonstitution von ChR2 war in beiden Experimenten durch die Infiltration von 100 μM Retinal 4 h vor Messbeginn erzielt worden.

Weitere vielversprechende ChR2 Kandidaten, waren die Mutanten L132C und D156C. Im Vergleich zum ChR2-WT weist die L132C Mutante eine stark erhöhte Calciumpermeabilität auf und ist daher auch als Catch Mutante bekannt (Kleinlogel et al. 2011). Dagegen zeichnet sich die ChR2-D156C durch einen größeren Photostrom und einer stark verlängerter Schließkinetik gegenüber dem ChR2-WT aus. Diese Mutante, die als XXL-Variante publiziert ist (Dawydow et al. 2014; Duan et al. 2019), benötigt darüber hinaus weniger Retinal und geringere Lichtintensitäten als der ChR2-WT. Da Calcium auch in Pflanzen eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion abiotischer und biotischer Stimuli einnimmt wurde auf ChR2-L132C ein besonderes Augenmerk gelegt. Leider konnten mit dieser Variante nur wenige Einstichmessungen vollzogen werden, da diese Variante von den Tabakpflanzen nur sehr ungleichmäßig exprimiert wurde. Die aufgenommenen Spannungsänderungen nach Blaulichtgabe zeigten jedoch eine deutliche Depolarisation mit geringer Amplitude und eine sehr schnelle Repolarisationskinetik, die dem ChR2-WT ähnelte siehe Abb. 3.14.

Der aussichtreichste Kandidat war die ChR2-D156C Mutante (XXL-Mutante). Diese erwies sich in *N. benthamiana* als sehr stabil. Die Expression erfolgte zuverlässig und gleichmäßig im Blattgewebe, da alle Teile des infiltrierten Blattgewebes bei elektrophysiologischen Messungen die für ChR2 typische Depolarisation zeigten. Darüber hinaus war ChR2-D156C bis zu fünf Tage nach der Infiltration noch elektrophysiologisch messbar. In den Messungen mit den Oberflächen Elektroden zeigte die ChR2-XXL-Mutante

eine rasche und starke Depolarisation mit einer eher langsameren Repolarisation im Bereich von 3 - 5 Minuten (Abb. 3.12).

Nachdem die Funktion der ChR2-C128T und D156C Mutanten erfolgreich in *N. benthamiana* dargestellt werden konnte, sollten diese im nächsten Schritt mit Hilfe der Einstichttechnik eingehender charakterisiert werden. Im Gegensatz zu den Oberflächenelektroden ermöglicht die Einstichmethode eine vergleichende quantitative Analyse der Ruhepotentiale, der Blaulicht-induzierbaren Depolarisationsamplitude.

3.5.2 Charakterisierung von ChR2-Mutanten in *N. benthamiana* mit der Einstichmessmethode

Für die Einstichmessungen am Tabak wurden die ausgestanzten Blattscheiben über Nacht aufgeklebt und in Messlösung mit 100 μ M Retinal inkubiert. Dieser ‚Erholungsschritt‘ war essenziell für den Aufbau eines stabilen Ruhemembranpotentials der Zellen. Das Abziehen der Epidermis hatte keine messbaren Auswirkungen auf die Funktion des Channelrhodopsins oder auf die Vitalität der Probe, beeinflusste jedoch die Stabilität der Messkonfiguration.

Zur Validierung des Systems wurde wie zuvor die bereits durch M. Baumann etablierte ChR2-C128T Variante genutzt.

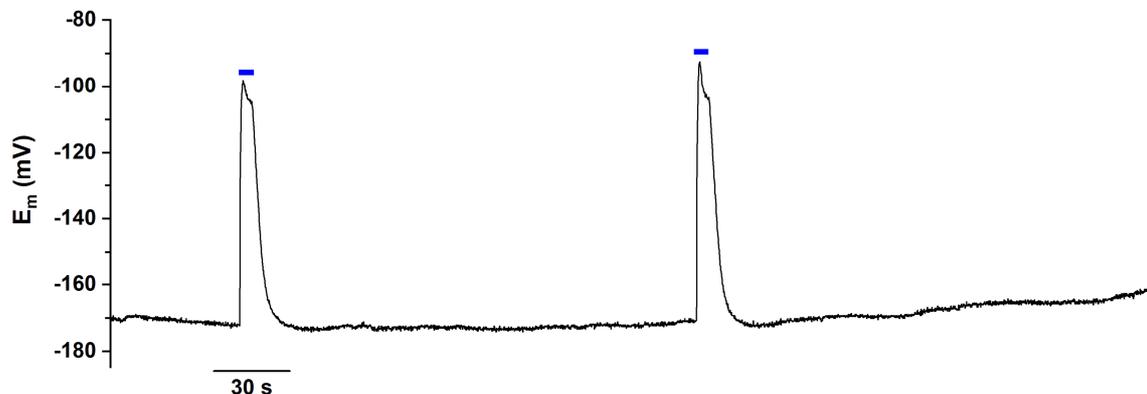


Abb. 3.13: Blaulicht aktiviert das transient in Tabak exprimierte ChR2-C128T und führt zu einer reproduzierbaren Depolarisation des Membranpotentials in Mesophyllzellen

Repräsentative schnelle Depolarisationen des Membranpotentials durch zwei 5 s Blaulichtpulse, gemessen mittels Einstichttechnik, in Tabak Mesophyllzellen mit transienter Expression von ChR2-C128T. Typisch war das Einsetzen einer geringen Repolarisation um ca. 5 mV, noch während der Belichtung mit Blaulicht. Ausgehend von einem Ruhepotential von -170 mV wurden Depolarisationen von 72 mV auf -98 mV (1. Blaulichtpuls) und 78 mV auf -92 mV (2. Blaulichtpuls) erreicht. Die Repolarisation erfolgt in 14,3 s (1. Blaulichtpuls) und 11 s (2. Blaulichtpuls).

Die exemplarischen Messungen in Abb. 3.13 von *N. benthamiana* mit transienter ChR2-C128T Expression zeigt das typische Muster dieser Mutante in Tabak. Ausgehend von

einem Ruhepotential von ca. -170 mV, konnte mit einem 5 s Blaulichtpuls eine maximale Depolarisation bei 72 mV (500 mA LS) bzw. 79 mV (1000 mA LS) beobachtet werden, welche bereits nach 2 - 2,5 s erreicht wurde. Während des 5 s Blaulichtpulses kam es bereits zu einer leichten Repolarisation um ca. 5 mV. Nach dem Abschalten des Lichts erfolgte eine rasche Repolarisation des Membranpotentials, so dass in 14,3 s (500 mA LS) bzw. 11 s (1000 mA LS) das Ruhepotential wieder erreicht wurde. Im Anschluss erfolgte eine leichte Hyperpolarisation von 2 - 3 mV, danach stellte sich das ursprüngliche Ruhepotential wieder ein.

Im nächsten Schritt wurde die ‚Catch‘ Mutante (ChR2-L132C) mit Hilfe der Einstichmethode nach transienter Expression charakterisiert.

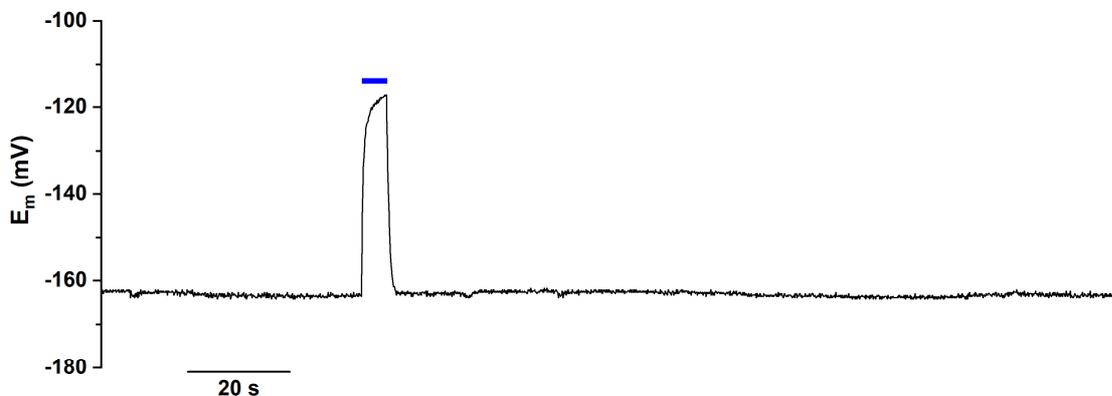


Abb. 3.14: Blaulicht aktiviert das transient in Tabak exprimierte ChR2-L132C und führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials in Mesophyllzellen

Repräsentative sehr schnelle Depolarisationen des Membranpotentials um 46 mV, auf -117 mV, durch einen 5 s Blaulichtpuls gemessen mittels Einstichtechnik, in Tabak Mesophyllzellen mit transienter Expression von ChR2-L132C. Die anschließende Repolarisation erfolgte in weniger als 2 s, mit einer Repolarisationsgeschwindigkeit von $23 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

In Abb. 3.14 ist eine exemplarische Messung von ChR2-L132C ‚Catch‘ in *N. benthamiana* gezeigt. Diese Variante des ChR2s zeigte in *N. benthamiana* als Antwort auf einen 5 s Blaulichtpuls nur eine geringe Depolarisation von etwa 46 mV. Im Gegensatz zur ChR2-C128T Mutante wurde die ‚Peak‘ Depolarisation mit verlangsamer Kinetik erst am Ende des Blaulichtpulses beobachtet und die Repolarisation setzte erst nach dem Ausschalten des Blaulichts ein. Diese war sehr schnell, so dass das Ruhepotential bereits nach 2 s wieder erreicht wurde. Eine Hyperpolarisation konnte nicht beobachtet werden. Da die Expression von ChR2-L132C nicht gleichmäßig im Blatt und darüber hinaus auch nicht immer zuverlässig erfolgte, wurden keine weiteren Experimente mit dieser Mutante gemacht.

Im Gegensatz zur ‚Catch‘ Mutante hatte die ChR2-D156C Mutante, auch ChR2-XXL genannt (Dawydow et al. 2014), bereits in den Messungen mit den Oberflächen Elektroden

eine gleichmäßige Expression gezeigt und wurde nun mit Hilfe der Einstichttechnik charakterisiert.

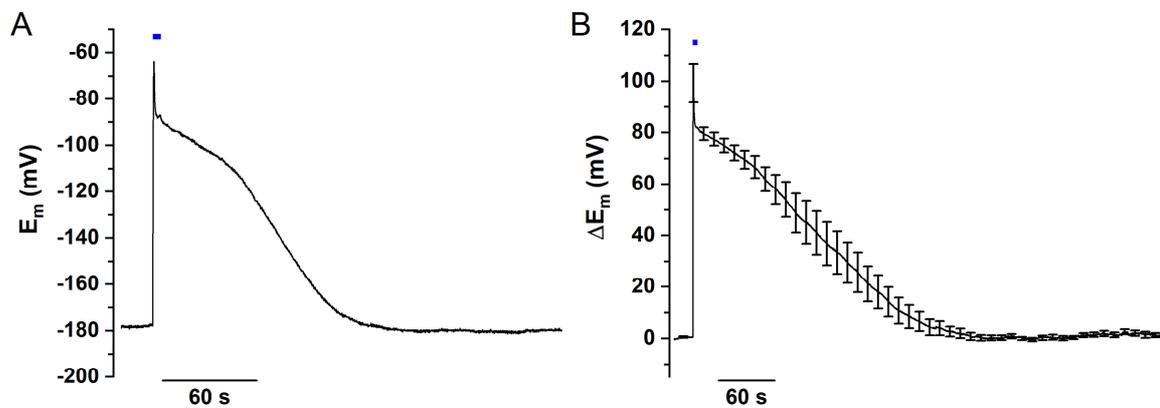


Abb. 3.15: Transient in Tabak exprimiertes ChR2-XXL führt zu einer durch Blaulicht induzierbaren Depolarisation des Membranpotentials in Mesophyllzellen

(A) Repräsentative Depolarisation des Membranpotentials in Folge eines 5 s Blaulichtpulses gemessen mit der Einstichmethode in Tabak Mesophyllzellen mit transienter ChR2-XXL Expression. Ein 5 s Blaulichtpuls löste eine schnelle, reproduzierbare Depolarisation des Membranpotentials aus. Die Spitzendepolarisation lag bei -62 mV, charakterisiert durch eine sofortige Repolarisation auf ein Depolarisationsplateau bei -88 mV. Es folgte eine biphasische Repolarisation mit sehr schwacher transienter Hyperpolarisation, ehe sich das Ruhepotential vor Blaulichtgabe erneut einstellte. (B) Auftragung des normalisierten mittleren Membranpotentials mit Standardfehler von 8 Pflanzen in Folge eines 5 s Blaulichtpulses gemessen mit der Einstichmethode in Tabak Mesophyllzellen mit ChR2-XXL Expression. Ein 5 s Blaulichtpuls löste in allen Pflanzen eine schnelle, reproduzierbare Depolarisation des Membranpotentials mit geringer Streuung aus. Die Spitzendepolarisation lag bei -101 mV, gefolgt von einer biphasischen Repolarisation, welche einer größeren Schwankung zwischen den Pflanzen unterlag, als die Depolarisation.

N. benthamiana Mesophyllzellen, welche ChR2-XXL transient exprimierten zeigten nach Applikation von 5 s Blaulicht eine starke Depolarisation des Membranpotentials von etwa 108 mV (Abb. 3.15 A). Ausgehend von einem Ruhepotential von ca. -170 mV wurde die maximale Depolarisation in der Beispielmessung 1 s nach Einschalten des Lichtstimulus erreicht und war durch ein charakteristisches Überschießen der Depolarisation charakterisiert, welche als ‚Spitze‘ in der Spannungsänderungskurve auffiel. Noch während der Blaulichtstimulation erfolgte eine sehr schnelle Repolarisation auf ein Depolarisationsplateau von ca. -88 mV, welches bis zum Ende des Blaulichtpulses stabil blieb. Mit dem Ausschalten des Blaulichtpulses kam es zum sofortigen Einsetzen einer biphasischen Repolarisation mit zunächst langsamer und dann schnellerer Geschwindigkeit. In der Beispielmessung wurde das Ruhepotential nach 203 s wieder erreicht, gefolgt von einer anschließenden Hyperpolarisation von etwa -8 mV. Es ist anzumerken, dass eine deutliche Hyperpolarisation nicht immer beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3.16). Die Auftragung der normalisierten Spannungsänderungen zeigt, dass die Depolarisation in allen Fällen sehr schnell war (Abb. 3.15 B). Das Überschießen und die daran anschließende schnelle, partielle Repolarisation bei eingeschalteter Lichtstimulation war ein gemeinsames Merkmal der dargestellten Messungen, wobei das individuelle

Niveau des dabei erreichten Spannungsplateaus variabel war. Die nach Ausschalten des Lichtpulses einsetzende eigentliche Repolarisation war in der ersten Phase der biphasischen Kinetik in allen Messungen äußerst langsam, wie aus Abb. 3.15 B und Abb. 3.16 ersichtlich wird – das Membranpotential blieb über einen Zeitraum von 5 – 10 s nahezu konstant. Nach Einsetzen der zweiten Phase der Repolarisation wurde das Ruhepotential erst nach ca. 260 s wieder erreicht und es konnte unter diesen experimentellen Bedingungen nur eine geringe Hyperpolarisation beobachtet werden.

Die Mutante ChR2-XXL erwies sich im Tabaksystem als äußerst robust. Wie in Abb. 3.15 B gezeigt, veranschaulicht eine Überlagerung verschiedener Messungen, dass die Expression reproduzierbar und zuverlässig erfolgte, sodass eine statistische Auswertung möglich war. Gleichzeitig zeigen die in der Repolarisationsphase großen Fehlerbalken, dass die größte Varianz zwischen den einzelnen Pflanzen in genau dieser Phase auftrat. Dies wird deutlich bei der Betrachtung sechs exemplarischer Individualmessungen in Abb. 3.16.

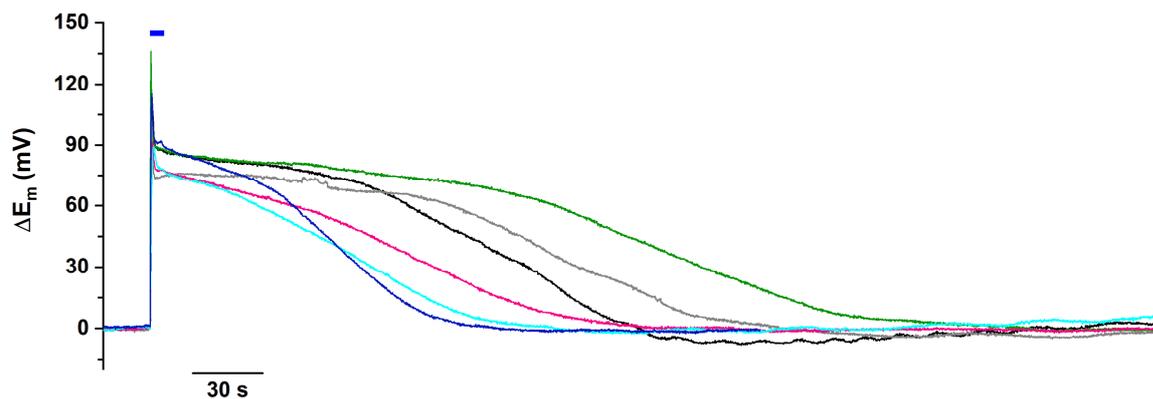


Abb. 3.16: Die Repolarisationskinetik nach einer ChR2-XXL vermittelten Depolarisation des Membranpotentials weist eine breitere Streuung, als die Depolarisationskinetik im Tabakexpressionssystem auf

(A) Repräsentative Überlagerung der Depolarisation des normierten Membranpotentials nach einem 5 s Blaulichtpuls von sechs Tabak Individuen mit transienter ChR2-XXL Expression gemessen mit der Einstichmethode in Mesophyllzellen. Es zeigt sich, dass die Repolarisationsphase eine große Spannbreite zwischen den Individuen aufweist, wohingegen die Depolarisationsphase sehr homogen ist.

Es konnte für ChR2-XXL in *N. benthamiana* durchschnittliche Depolarisationsamplitude von $109,5 \pm 3,9$ mV (SE) in Folge eines 5 s Blaulichtpulses ermittelt werden (Abb. 3.17 A). Dabei lag der Median bei 109,7 mV mit einer Spannbreite von 89,2 bis 139 mV). Der Depolarisationspeak wurde im Mittel in nur $0,9 \pm 0,1$ s (SE) erreicht, was einer mittleren Depolarisationsgeschwindigkeit von $154,1 \pm 25,9$ mV•s⁻¹ (SE) entspricht (Abb. 3.17 B; Median 115,7 mV•s⁻¹, Spanne von 60,5 bis 222,5 mV•s⁻¹). Wie schon in Abb. 3.15 und Abb. 3.16 gezeigt, war diese initiale Depolarisationsamplitude nur für wenige zehntel Sekunden stabil. Vergleichbar mit einer Inaktivierung des ChR2-XXL Kanals

repolarisierte das Membranpotential instantan auf ein Plateau welches bei Betrachtung der absoluten Membranpotentiale zwischen -87 und -68 mV lag und abhängig von der maximal erreichten Depolarisation war. Die biphasische Repolarisation des Membranpotentials hingegen benötigte, wie aus Abb. 3.17 C ersichtlich wird, insgesamt $260,3 \pm 19,1$ s (SE), also mehr als 4 min (Median 245,2 s, Spanne von 141 bis 410 s). Die aus der maximalen Amplitude und der Repolarisationsdauer bestimmte Repolarisationsgeschwindigkeit lag im Mittel bei $0,45 \pm 0,03$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (Abb. 3.17 D; Median $-0,44$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Spanne von $-0,22$ bis $-0,54$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$).

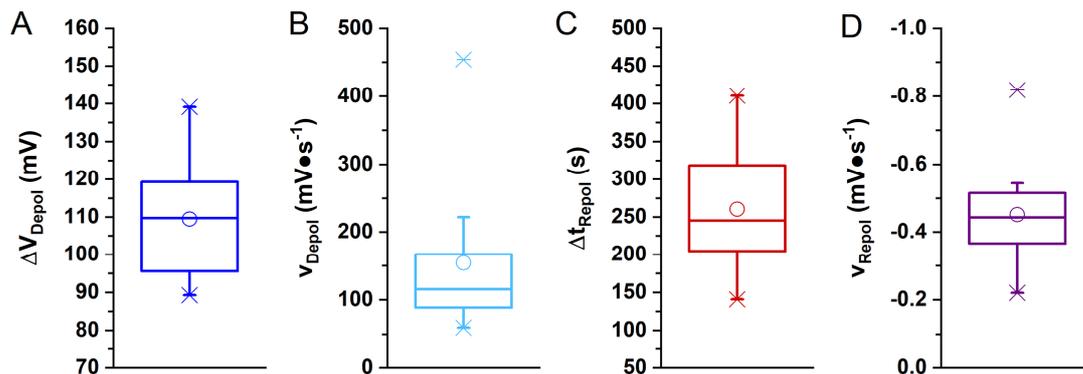


Abb. 3.17: Die Depolarisationsamplitude, die Repolarisationsdauer, sowie die Depolarisations- und Repolarisationsgeschwindigkeit der Blaulicht-induzierten ChR2-XXL Aktivität ist im transienten Tabakexpressionssystem statistisch erfassbar

(A) Statistische Auswertung der normalisierten Membranpotential Charakteristika nach 5 s Blaulichtgabe in 16 Individuen von Tabak Mesophyllzellen mit transienter ChR2-XXL Expression zeigten eine mittlere Depolarisation von $109,5 \pm 3,9$ mV (SE, Minimum 89,2 mV, Maximum 139 mV, Median 109,7 mV). (B) Die Auswertung wie in (A) ergab eine sehr schnelle Depolarisationsgeschwindigkeit von $154,1 \pm 25,9$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (SE, Minimum $60,5$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Maximum $222,5$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Median $115,7$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Ausreißer 455 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$). (C) Die Repolarisation war mit $260,3 \pm 19,1$ s (SE, Minimum 141 s, Maximum 410 s, Median 245,2 s) langsam. (D) Dies spiegelte sich auch in der Repolarisationsgeschwindigkeit von $0,45 \pm 0,03$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (SE, Minimum $-0,22$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Maximum $-0,54$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Median $-0,44$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, Ausreißer $-0,82$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$) wieder.

Da davon auszugehen ist, dass die Kinetik der Repolarisation maßgeblich von den Rückstellkräften der Zelle beeinflusst wurde, repräsentiert die ChR2-XXL Variante – vor allen anderen hier getesteten ChR2 Mutanten – ein geeignetes Werkzeug für elektrophysiologische Untersuchungen zur Charakterisierung der molekularen Grundlagen elektrischer Signale in Pflanzen.

3.6 Elektrophysiologische Eigenschaften von ChR2 in stabilen *Arabidopsis* Transformanten

Nachdem verschiedene ChR2-Varianten erfolgreich im transienten Expressionssystem von *N. benthamiana* charakterisiert werden konnten, sollten diese optogenetischen Werkzeuge auch in stabil exprimierenden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen implementiert werden. Mit Beginn der Untersuchungen standen drei verschiedene ChR2-Mutanten in *Arabidopsis thaliana* Col0 Aequorin (ab hier *Arabidopsis*) Pflanzen zur Verfügung (siehe Material und Methoden): ChR2-C128T Linie 66, ChR2-D156A Linie 9 und ChR2-D156C Linie 40 (ab hier ChR2-XXL). Diese drei *Arabidopsis*linien wurden mittels Einstichttechnik elektrophysiologisch charakterisiert. Aufgrund ihrer nur geringen Depolarisationsamplitude von ca. 25 mV sowie einer sehr langen Repolarisationszeit (>10 min) wurde die ChR2 Mutante D156A zunächst nicht weiter charakterisiert (Anhang Abb. 4.5).

3.6.1 Kultivierung unter Rotlichtregime als optimale Wachstumsbedingungen für Channelrhodopsin-2 Pflanzen

Da es sich bei Channelrhodopsin-2 um einen Blaulicht gesteuerten Ionenkanal handelt, war die Anzucht der Pflanzen unter normalem Weißlicht kritisch zu sehen. Obwohl der Kanal theoretisch ohne die Zugabe von Retinal inaktiv sein sollte, konnten trotzdem in Vorversuchen Effekte durch das Weißlicht auf die Expression des Proteins beobachtet werden. Deshalb wurden zunächst alle stabilen Transformanten unter Rotlichtbedingungen kultiviert (siehe Kap. 2.3.1.3). Im Vergleich von Pflanzen unter Rotlicht- und Weißlichtbedingungen fiel auf, dass das Rotlicht für einen starken Wachstumsphänotyp sorgte und auch die Vermehrung beeinträchtigte. Im Mischtag 12 h Licht 12 h Dunkel war die Fertilität deutlich herabgesetzt.

Die Anzucht unter Langtagbedingungen im Rotlicht führte zwar zu einem spezifischen Wachstumsphänotyp, aber beeinträchtigte die Fertilität nicht. Dieser Phänotyp war gekennzeichnet durch Blätter mit einer intensiv dunkelgrünen Farbe, die eher fest bzw. steif waren und die Blattränder rollen sich abaxial, zur Mittelrippe hin, ein (Abb. 3.18). Die Entwicklung war gut, aber es zeigte sich eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen und Schädlingen. Es kam nach sieben Wochen zur Ausbildung einer Infloreszenz, welche deutlich länger als im Weißlicht war und vermehrt starben Blüten ohne Schotenbildung ab. Unabhängig davon zeigten sich jedoch keine Einbußen in der Menge der gebildeten Samen. Die Samen waren keimfähig.



Abb. 3.18: Wachstum im Langtag unter Rotlichtbedingungen führt zu einem Phänotyp mit abaxial eingerollten festen Blättern

Links im Bild ist eine *Arabidopsis thaliana* Col0, die im Langtag unter Weißlichtbedingungen gewachsen ist. Rechts ist eine *Arabidopsis thaliana* Col0, die im Langtag unter Rotlichtbedingungen gewachsen ist. Die rechte Pflanze zeigt den, für die Rotlichtbedingungen typischen Phänotyp mit abaxial, zur Mittelrippe hin, eingerollten Blättern, welche zusätzlich eine erhöhte Blattsteifigkeit und Blattdicke aufwiesen.

Es wurden Arabidopsis Pflanzen, die unter Rotlichtbedingungen gewachsen waren, auf ihre elektrophysiologischen Charakteristika hin untersucht und mit solchen verglichen, die unter Weißlichtbedingungen kultiviert wurden. Es fanden sich dabei keine Unterschiede z.B. auf Basis der gemessenen Ruhepotentiale. Pflanzen unter Rotlichtbedingungen hatten ein mittleres Ruhepotential von $-176 \pm 2,4$ (n=16, SE), verglichen mit $-175.5 \pm 3,4$ (n=5, SE) in Arabidopsis die unter Weißlichtbedingungen wuchsen.

3.6.2 Die externe Retinalzufuhr wird auch *in planta* für die Funktion des Channelrhodopsin-2 benötigt

Das funktionelle Channelrhodopsin-2 erfordert die Rekonstitution des Apoproteins (Channelopsin-2) mit dem Cofaktor all trans-Retinal. In einer ersten Versuchsreihe sollte daher die Kinetik der Retinal-abhängigen Kanalaktivität am Beispiel des ChR2-XXL untersucht werden. In Einstichmessungen konnte in Abwesenheit von Retinal nur eine schwache Depolarisation infolge eines 5 s Blaulichtpulses beobachtet werden, welche allerdings eine ChR2-typische Kinetik aufwies, (Abb. 3.19 A). Ohne Retinalvorinkubation wurde lediglich eine mittlere Depolarisation von $14,3 \pm 2,4$ mV (SE) erreicht. Die Streuung war dabei sehr gering, der niedrigste Wert lag bei 12 mV der höchste bei 21 mV (Abb. 3.19 B). Im Gegensatz dazu, lag die mittlere Depolarisationsamplitude nach zweistündiger Zugabe von 100 μ M Retinal vor der Messung bei $92 \pm 2,9$ mV (SE); die

Einzelwerte lagen zwischen 74 und 100 mV. In Übereinstimmung mit den ChR2 Studien im transienten Expressionssystem von *N. benthamiana* zeigen diese Ergebnisse, dass die externe Retinalzugabe essentiell für die Funktion von ChR2 in Pflanzen ist.

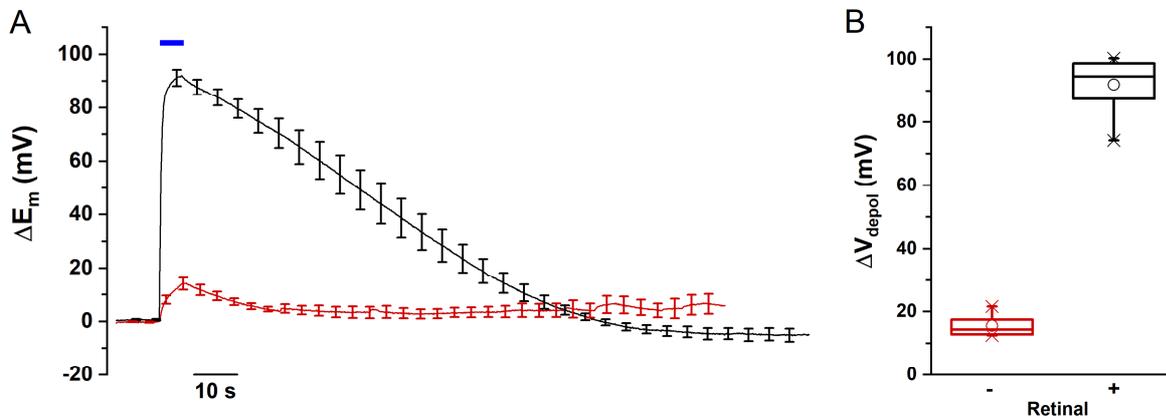


Abb. 3.19: Retinal ist essentiell für die Blaulicht-induzierte Depolarisation des Membranpotentials durch stabil exprimiertes ChR2-XXL in Arabidopsis

(A) Überlagerung der mittleren normalisierten Membranpotentialänderung (SE) von Arabidopsis Mesophyllzellen, die vollständig rekonstituiertes ChR2-XXL exprimieren (100 μ M Retinal, schwarze Kurve, $n = 8$) oder kein vollständig rekonstituiertes ChR2-XXL exprimieren (0 μ M Retinal, rote Kurve, $n = 7$) in Reaktion auf einen 5 s Blaulichtpuls, Messung mittels Einstichttechnik. (B) Statistische Auswertung der Depolarisationsamplituden aus (A). Ohne Retinal kam es im Mittel nur zu einer Depolarisation des Membranpotentials von $14 \pm 2,4$ mV (Minimum 12,5 mV, Maximum 21,6 mV, Median 14,3 mV, $n = 7$). Mit Retinal kam es im Mittel zu einer Depolarisation des Membranpotentials von $92 \pm 2,9$ mV (Minimum 74,3 mV, Maximum 100,2 mV, Median 94,5 mV, $n = 8$).

Nachdem nur eine geringe Aktivität des Channelrhodopsins ohne Retinalzugabe messbar war, wurde versucht die Rekonstitution des Apoproteins zum funktionellen Channelrhodopsin in Echtzeit zu verfolgen. Dazu wurden Blattscheiben wie gewöhnlich vorbereitet, aber mit Messlösung II ohne Retinal inkubiert. Anschließend wurde die Einstichmessung gestartet und die Aktivität, also die Depolarisation des Membranpotentials nach Blaulichtgabe beobachtet. Nach einigen Testpulsen von 5 s Länge wurde dann Retinal einer Endkonzentration von 100 μ M zur Messlösung gegeben. Die kontinuierliche Zunahme der Depolarisationsamplitude konnte dann durch sukzessive Applikation von 5 s Blaulichtstimuli in Echtzeit verfolgt werden (Abb. 3.20 A).

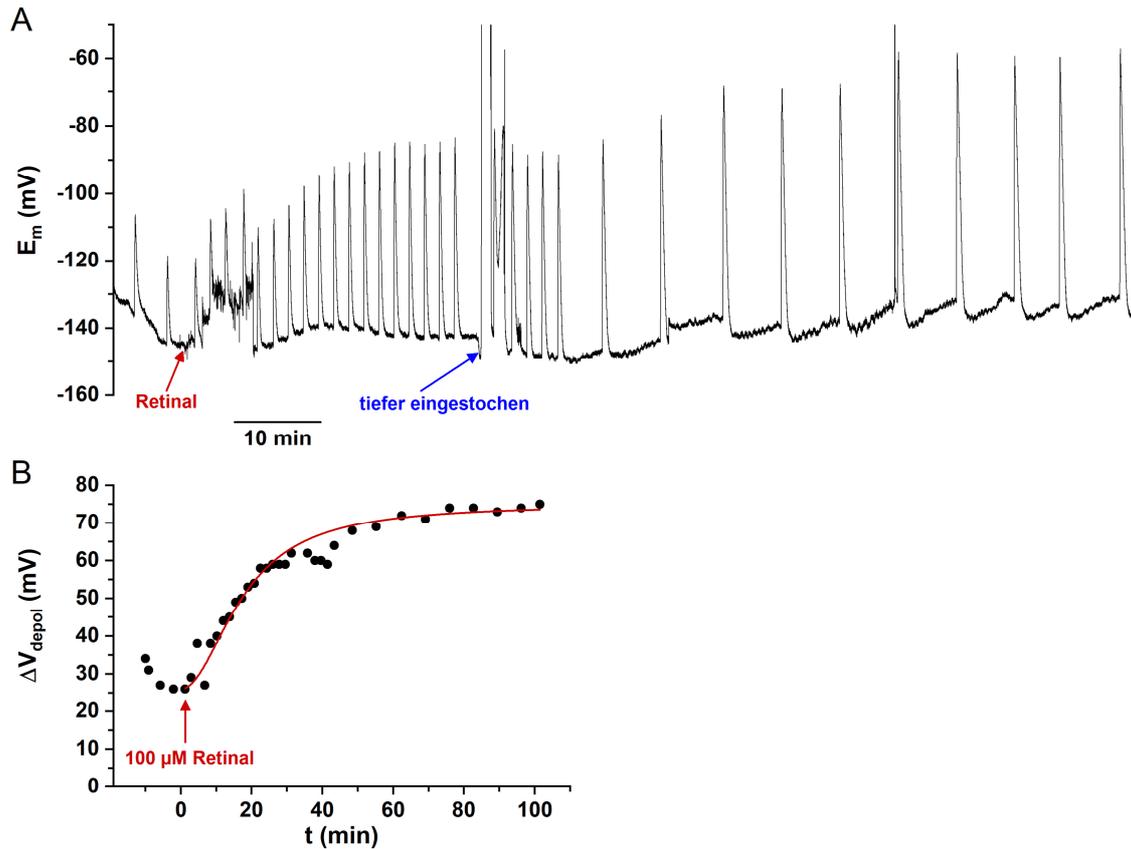


Abb. 3.20: Die Rekonstitution von Channelopsin-2 mit all trans-Retinal zu aktivem ChR2 lässt sich in Echtzeit indirekt über die ChR2-vermittelte Depolarisationsamplitude nach Blaulichtgabe in Arabidopsis messen

Exemplarische Aufzeichnung des Membranpotentials mittels Einstichttechnik von Arabidopsis ChR2-XXL exprimierenden Mesophyllzellen in Antwort auf repetitive 5 s Blaulichtpulse. Jede Depolarisation des Membranpotentials wurde durch einen Blaulichtpuls ausgelöst. Vor der Zugabe von Retinal wurden nur geringe Depolarisationen von 24 mV beobachtet. Die Zugabe von Retinal (roter Pfeil, $c = 100 \mu\text{M}$) wurde in der laufenden Einstichmessung durchgeführt und anschließend durch weitere Blaulichtpulse im Abstand von 3 – 5 min die Zunahme der Depolarisationsamplitude beobachtet. Nach einer halben Stunde wurden die Blaulichtpulse nur noch in Abständen von 6–8 min gegeben. (B) Die statistische Auswertung der maximal in (A) erreichten relativen Depolarisation für jeden Blaulichtpuls. Ab der Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Retinal (roter Pfeil) konnte eine erst schnelle und nach 20 min eine langsamere Zunahme der Depolarisationsamplitude beobachtet werden. Die gemessenen Werte ließen sich mit einer Hill-Funktion beschreiben (rote Kurve). Die maximale Depolarisation lag bei 75 mV, ohne Retinal wurden 26 mV gemessen, dies entsprach einem Zuwachs von 49 mV über zwei Stunden. In den ersten 20 min nach Retinalapplikation wurde bereits eine Depolarisation von 53 mV gemessen, ein Zuwachs von 27 mV und mehr als die Hälfte des zu erzielenden Zuwachses. Bereits nach 20 min Inkubation mit Retinal war genug ChR2-XXL rekonstituiert, um die Hälfte der durch ChR2-XXL möglichen Depolarisation zu erreichen und eine Retinalinkubation von zwei Stunden ist ausreichend zur vollständigen Rekonstitution.

Vor der Retinalzugabe lag die Blaulicht-induzierbare, ChR2-bedingte Änderung des Membranpotentials bei ca. 26 mV (Abb. 3.20 B). Mit Applikation des Retinals konnte bereits nach 6,75 min eine Depolarisation um 38 mV beobachtet werden und nach 20,75 min war mit 53 mV bereits eine Verdoppelung der Anfangsamplitude erreicht worden. 35,8 min nach Retinalapplikation konnte eine Depolarisation von 62 mV gemessen werden. Danach nahm die Amplitudenhöhe nur noch langsam zu. Nach 105 min sättigte die Kurve und es wurde eine Enddepolarisation von ca. 75 mV erreicht. Die

Kinetik dieser Rekonstitution konnte mit Hilfe einer Hill-Funktion beschrieben werden (Abb. 3.20 B). Die in diesem Experiment bestimmte Amplitudenhöhe lag mit 75 mV am unteren Ende der sonst gemessenen Spanne (Abb. 3.24 B). Dabei ist zu bedenken, dass die Zugabe der retinalhaltigen Lösung auf das frische noch nicht benetzte Pflanzenmaterial zu einer effektiveren Rekonstitution führt, als die Zugabe auf bereits mit Puffer durchtränktes Material. Dies könnte sich über die starke Hydrophobizität des Retinals und der pflanzlichen Kutikula erklären. Wenn die Kutikula vorher bereits benetzt ist, wird die physikalische Zugangsmöglichkeit für das Retinal möglicherweise beeinträchtigt. Die gegenüber dem Durchschnitt verringerte Amplitude könnte sich also aus der schlechteren Gewebegängigkeit des Retinals unter den gegebenen Versuchsbedingungen erklären.

3.6.3 Die Chr2-Mutanten C128T und D156C weisen spezifische Charakteristika bei der stabilen Expression in *Arabidopsis* auf

Nachdem die Pflanzenanzucht- und Rekonstitutionsbedingungen optimiert worden waren, wurde im Folgenden zunächst die Chr2-C128T exprimierende *Arabidopsis* Linie elektrophysiologisch mittels Einstichttechnik charakterisiert (Abb. 3.21 A). Die Depolarisation in der Chr2-C128T Mutante wies eine mittlere maximale Amplitude von $40 \pm 4,1$ mV (SE) auf und zeigte nur eine geringe Hyperpolarisation von $-4,6 \pm 0,9$ mV (SE) (Abb. 3.21 B). Damit war die mittlere Depolarisationsamplitude etwas geringer, als zuvor im transienten Expressionssystem von *N. benthamiana* ermittelt. Hier zeigten eigene Messungen Depolarisationsamplituden von ca. 72 mV (siehe Abschnitt 3.5.2), während M. Baumann im Tabak für die Chr2-C128T Mutante durchschnittlich 66 ± 2 mV (Schwankung zwischen 46 - 89 mV) bestimmen konnte bei 15 s Blaulicht-Gabe (Baumann 2013). Die Dauer bis zur maximalen Depolarisation nach Beginn der Blaulichtgabe betrug in stabil exprimierenden *Arabidopsis* Mesophyllzellen $3,7 \pm 0,2$ s (SE) (Abb. 3.21 D). Die Repolarisationsdauer ergibt sich aus der Differenz aus den Zeitpunkten des Erreichens des Ruhepotentials und der maximalen Depolarisation und lag bei $7,5 \pm 0,75$ s (SE) (Abb. 3.21 D). Sie war damit deutlich schneller als die zuvor in *N. benthamiana* bestimmte Repolarisationsdauer von im Mittel 27 ± 2 s (Baumann 2013). Zur Charakteristik der Chr2-C128T in *Arabidopsis* gehörte, dass die maximale Depolarisation schon vor dem Ende des Blaulichtpulses erreicht wurde und anschließend bereits eine langsame Repolarisation einsetzte (Abb. 3.21 A und C). Nach Beendigung der Blaulichtstimulation erfolgte eine sehr schnelle Repolarisation mit einer Repolarisationsgeschwindigkeit von $5,5 \pm 0,7$ mV•s⁻¹ (SE) (Abb. 3.21 E), welche mit einer etwa 50% langsameren, im Tabak ermittelten Repolarisationsgeschwindigkeit von $2,6 \pm 0,15$ mV•s⁻¹ (SE) zu vergleichen ist.

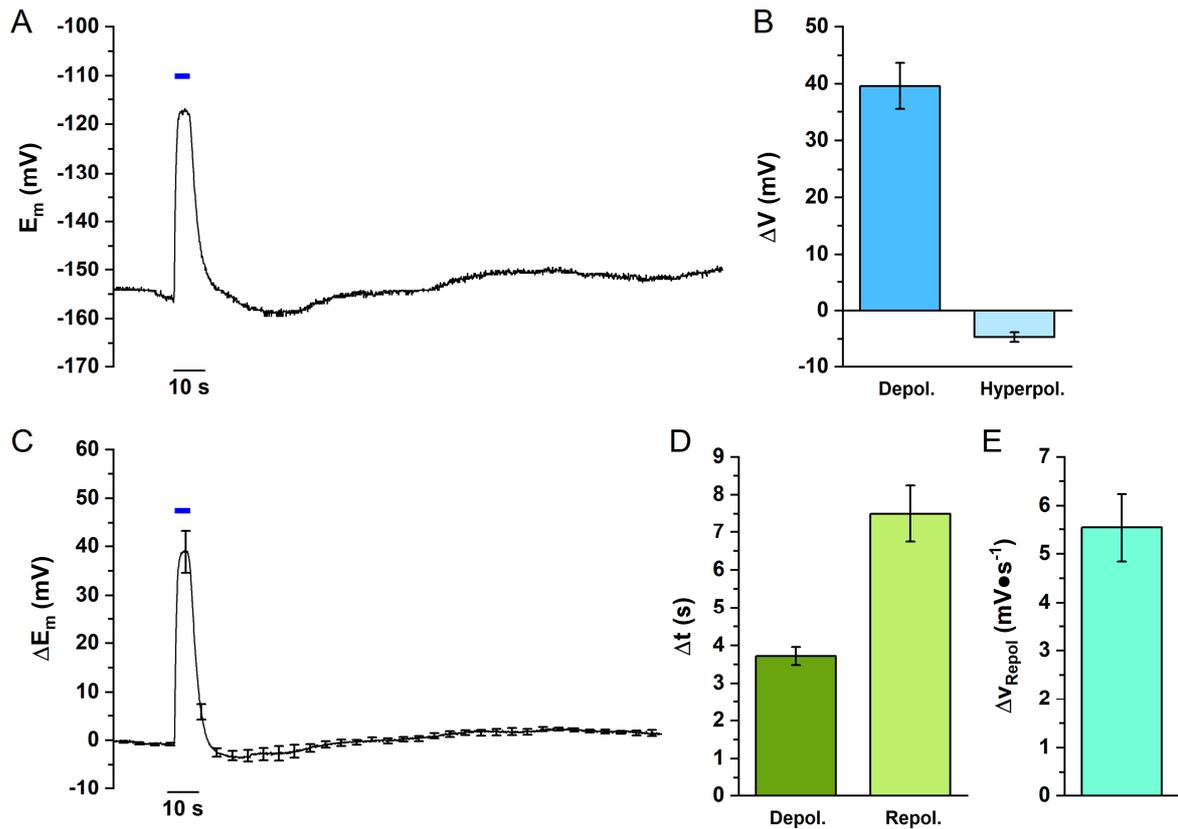


Abb. 3.21: Stabil in Arabidopsis exprimiertes ChR2-C128T vermittelt die reproduzierbare Depolarisation des Membranpotentials durch Blaulicht in Mesophyllzellen

(A) Repräsentative Aufzeichnung des Membranpotentials in Folge eines 5 s Blaulichtpulses gemessen mit der Einstichmethode in Arabidopsis Mesophyllzellen mit ChR2-C128T Expression. Ein 5 s Blaulichtpuls löste eine schnelle, reproduzierbare Depolarisation des Membranpotentials aus. Die Spitzendepolarisation lag bei -114 mV, gefolgt von einer schnellen Repolarisation und einer sehr schwachen transienten Hyperpolarisation, ehe sich das Ruhepotential vor Blaulichtgabe erneut einstellte. (B) Mittlere relative Depolarisation ($40 \pm 4,1$ mV) und Hyperpolarisation ($-4,6 \pm 0,86$ mV) in Antwort auf einen 5 s Blaulichtpuls (SE, $n = 6$). (C) Änderung des mittleren normierten Membranpotentials (SE) in Antwort auf einen 5 s Blaulichtpuls von sechs Arabidopsis Individuen mit ChR2-C128T-Expression zeigt nur eine geringe Streuung. (D) Mittlere Dauer der Depolarisation ($3,7 \pm 0,2$ s) und Repolarisation ($7,5 \pm 0,75$ s) in Antwort auf einen 5 s Blaulichtpuls (SE, $n = 6$). (E) Die aus Depolarisation und Repolarisationsdauer resultierende mittlere Repolarisationsgeschwindigkeit lag bei $5,5 \pm 0,7$ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Im Anschluss wurde die stabile Arabidopsis ChR2-Mutante XXL charakterisiert, welche auch kurz als ChR2-XXL bezeichnet wird (Dawydow et al. 2014). Diese Mutante hatte bereits bei transienter Expression in *N. benthamiana* eine starke mittlere Depolarisation von 109 mV gezeigt und eine mit $0,45$ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ langsamere Repolarisationsgeschwindigkeit (siehe Kap. 3.5.2) als ChR2-C128T. Ähnlich wie die ChR2-C128T Variante, zeigte die ChR2-XXL Mutante sehr gut reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich Expression und Funktion in *N. benthamiana* (vergl. Kap. 3.5).

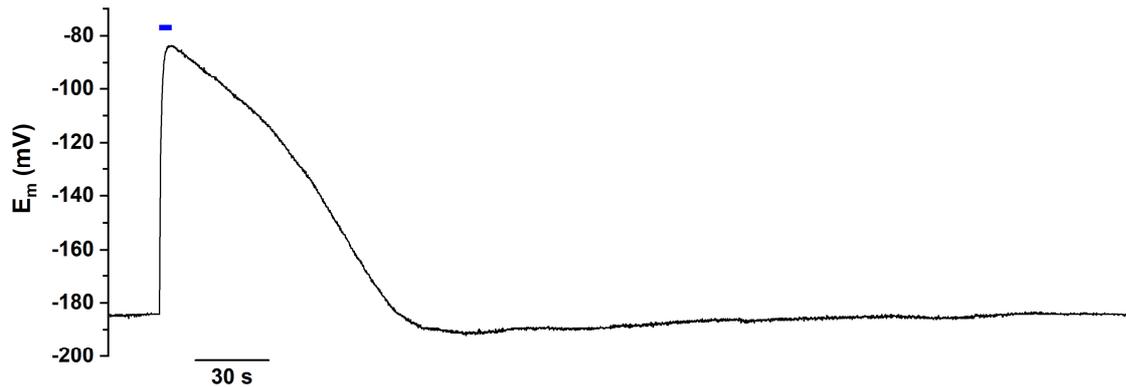


Abb. 3.22: Stabil in Arabidopsis exprimiertes ChR2-XXL ermöglicht die Depolarisation des Membranpotentials durch Blaulich

Repräsentative Aufzeichnung des Membranpotentials in Folge eines 5 s Blaulichtpulses gemessen mit der Einstichmethode in Arabidopsis Mesophyllzellen mit ChR2-XXL Expression. Während des Einstichs wurde typischerweise ein Ruhepotential von -165 - -190 mV gemessen. Ein 5 s Blaulichtpuls löste eine schnelle, reproduzierbare Depolarisation des Membranpotentials aus. Die Spitzendepolarisation lag bei -85 mV, gefolgt von einer raschen Repolarisation und einer schwachen transienten Hyperpolarisation, ehe sich das Ruhepotential vor Blaulichgabe erneut einstellte.

Anhand von Einstichmessungen an Mesophyllzellen, die das ChR2-XXL stabil exprimierten, konnte das Ruhepotential dieser Zellen mit ca. -180 mV bestimmt werden (Abb. 3.22). Die Spannungsmessungen zeigten, dass unmittelbar nach Einschalten des Blaulichs das Membranpotential der Mesophyllzellen um 101 mV depolarisierte, und dass bereits nach 2 s die maximale Depolarisation erreicht worden war. Unmittelbar nach dem Ausschalten des Lichts erfolgte ein Spannungsabfall. Diese Repolarisationsphase dauerte in der Beispielmessung 93 s und war damit im Vergleich zur ChR2-C128T Mutante deutlich langsamer (7,5 s). Im gezeigten Beispiel konnte eine Hyperpolarisation von -7 mV beobachtet werden, ehe sich das Ruhepotential wieder einstellte. Es ist jedoch anzumerken, dass die Amplitude der Hyperpolarisation, ebenso wie die Repolarisationskinetik, in unterschiedlichen Experimenten verschieden war (Abb. 3.23, Abb. 3.24 A).

Abb. 3.24 A verdeutlicht, dass die ChR2-XXL-vermittelte Depolarisation in vier verschiedenen Pflanzen sehr gut reproduzierbar und relativ gleichförmig war. Die Repolarisationskinetik wies allerdings zwischen individuellen Pflanzen eine größere Variabilität auf. Beispielsweise zeigt die Aufzeichnung des Membranpotentials in grün, dass diese Pflanze eine starke Hyperpolarisation aufwies, wohingegen die Aufzeichnung in blau fast gar keine Hyperpolarisation erkennen ließ, dafür aber eine sehr schnelle Repolarisation zeigte. Bei der Repolarisation traten zwischen Pflanzen größere Spannbreiten im Verlauf der Membranpotentiale auf, während die Depolarisation durch das ChR2 relativ uniform war. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Unterschiede in der Repolarisation auf intrinsische Faktoren zurückzuführen sein müssen.

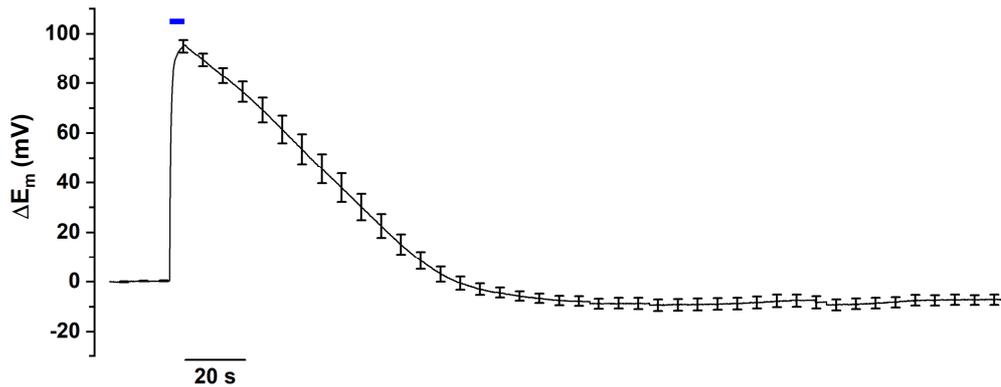


Abb. 3.23: Die Blaulicht-vermittelte Depolarisation des Membranpotentials von Arabidopsis Mesophyllzellen durch ChR2-XXL ist in verschiedenen Individuen ähnlich

Auftragung des normalisierten mittleren Membranpotentials von 14 Pflanzen in Folge eines 5 s Blaulichtpulses gemessen mit der Einstichmethode in Arabidopsis Mesophyllzellen mit ChR2-XXL Expression. Ein 5 s Blaulichtpuls löste in allen Pflanzen eine schnelle, reproduzierbare Depolarisation des Membranpotentials mit geringer Streuung aus. Die Spitzendepolarisation lag bei 95 mV, gefolgt von einer raschen Repolarisation, welche einer größeren Schwankung zwischen den Pflanzen unterlag, als die Depolarisation.

Durch die Normierung der Membranpotentiale wurde es möglich, die gemessenen Spannungsänderungen verschiedener Pflanzen zu mitteln (Abb. 3.23), und den Mittelwert samt Standardfehler aufzutragen. Die dabei auftretende Streuung, die sich in Abb. 3.23 zeigt, lässt sich auch statistisch erfassen und untersuchen. Dazu wurden von je einer Messung die maximalen Depolarisationen, die Repolarisationsdauer und die Repolarisationsgeschwindigkeit, sowie die Hyperpolarisation nach 5 s Blaulicht von 15 verschiedenen Pflanzen erfasst und in Form von Box Plots ausgewertet (Abb. 3.24 B). Darin zeigte sich, dass die Blaulicht-induzierte Depolarisation in stabilen *Arabidopsis* ChR2-XXL zwischen 74 und 108 mV lag, der Mittelwert betrug 95 mV (Abb. 3.24 B). Die Repolarisationsdauer lag zwischen 50 und 105 s und betrug im Mittel 83 s (Abb. 3.24 B). Anhand des größeren Standardfehlers in Abb. 3.23 wurde ebenfalls deutlich, dass die stärkste Varianz in der gesamten Kinetik während der Repolarisationsphase auftrat (Abb. 3.24 A und B). Sie wird zum einen von der Deaktivierungskinetik des ChR2-XXL Proteins bestimmt, scheint aber gleichzeitig auch stärker von intrinsischen Komponenten abhängig zu sein als die Depolarisation. Die Repolarisationsdauer wird darüber hinaus von der Höhe der Depolarisationsamplitude beeinflusst. Eine Zelle, deren Membranpotential stärker depolarisiert, wird – bei gegebenen Rückstellkräften – länger brauchen, um zu repolarisieren. Um diesem Sachverhalt gerecht zu werden, wurde die mittlere Repolarisationsgeschwindigkeit bestimmt. Die Repolarisationsgeschwindigkeit gemittelt über die gesamte Repolarisationsphase lag zwischen $-0,78$ und $-1,69 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, mit einem Ausreißer bei $-2,0 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; im Mittel betrug sie $-1,1 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (Abb. 3.24 B). Schließlich sind intrinsische Rückstellkräfte auch für die beobachtete Hyperpolarisation

verantwortlich. Die maximale Hyperpolarisation bei den ausgewerteten Messungen lag zwischen -2,2 und -14,1 mV und der Mittelwert betrug $-10,2 \pm 2\text{ mV}$ (Abb. 3.24 B).

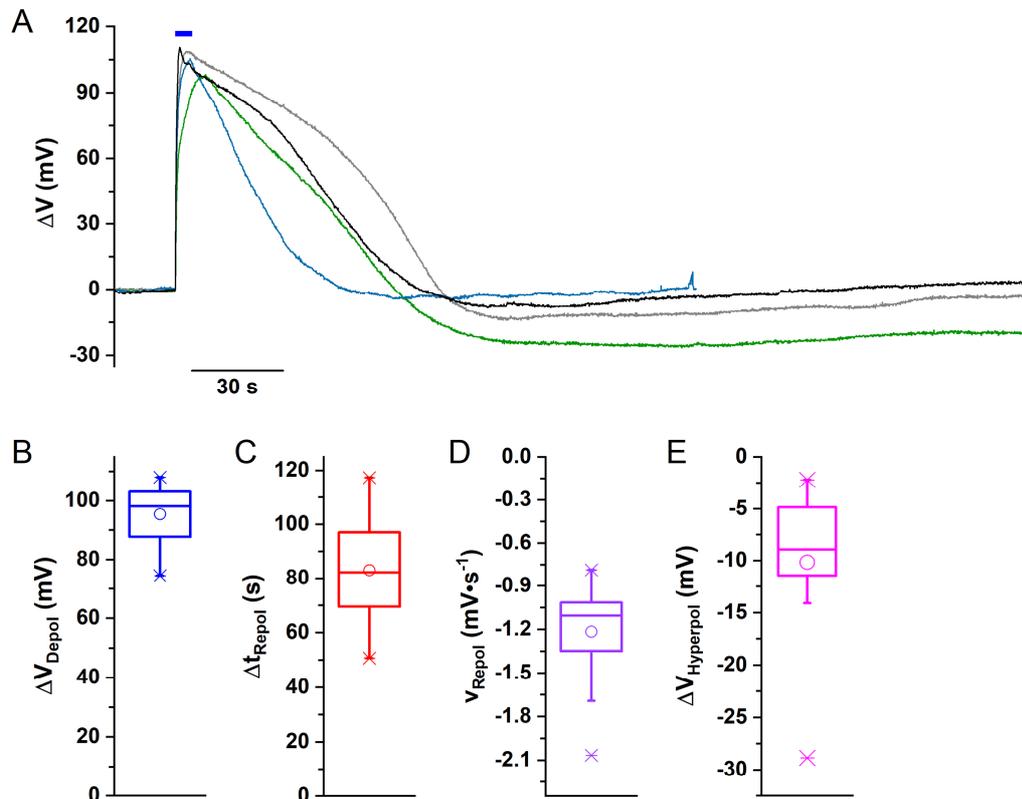


Abb. 3.24: Die Blaulicht-vermittelte Depolarisation des Membranpotentials von Arabidopsis Mesophyllzellen durch Chr2-XXL in verschiedenen Individuen weist statistisch erfassbare geringe Unterschiede in der Depolarisation und größere Unterschiede in der Repolarisationskinetik auf

(A) Repräsentative, überlagerte Aufzeichnung des normierten Membranpotentials nach einem 5 s Blaulichtpuls von vier Arabidopsis Individuen mit Chr2-XXL Expression, gemessen mit der Einstichmethode im Mesophyll. (B) Statistische Auswertung der normalisierten Membranpotential Charakteristika von 16 verschiedenen Pflanzen zeigten eine Mittlere Depolarisation von $95 \pm 2,3$ mV, mit einem Minimum bei 74 mV, einem Maximum bei 108 mV und einem Median von 98 mV. (C) Nach der Chr2-XXL-vermittelten Depolarisation repolarisierten die Mesophyllzellen in $83 \pm 4,5$ s (Minimum 51 s, Maximum 107 s und Median 82 s) zurück zu ihrem Ruhepotential. (D) Die daraus errechnete Repolarisationsgeschwindigkeit betrug $-1,2 \pm 0,08$ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (Minimum $-0,78$ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Maximum $-1,69$ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Median $-1,1$ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ und ein Ausreißer von $-2,06$ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$). (E) Im Anschluss an die Repolarisation trat eine mittlere Hyperpolarisation von $-10,2 \pm 2$ mV (Minimum $-2,2$ mV, Maximum $-14,2$ mV und Median $-8,9$ mV).

Aus den Abb. 3.23 und Abb. 3.24 wird auch deutlich, warum sich die Chr2-XXL Mutante des Channelrhodopsins besonders gut als Werkzeug zur Untersuchung von elektrischen Signalen in Pflanzen eignet: die Depolarisation ist sehr schnell, bis zur fast maximalen Depolarisation vergingen weniger als 2 s, und die Amplitude der Depolarisation war ausreichend hoch, im Mittel 95 mV, bei gleichzeitig guter Reproduzierbarkeit zwischen individuellen Pflanzen. Die lange Offenwahrscheinlichkeit (langsame Deaktivierungskinetik) der XXL Mutante gegenüber der C128T Mutante resultierte in langanhaltenden Depolarisationen, auch nach Ausschalten der Belichtung. Dadurch kann

mit nur 5 s dauernden Blaulichtpulsen das Membranpotential stark und anhaltend depolarisiert werden. Dies könnte dazu genutzt werden, die an der Repolarisation des Membranpotentials beteiligten Komponenten zu entschlüsseln und deren Anteil an diesem Prozess zu studieren (s. unten).

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von möglichen stabil exprimierten optogenetischen Werkzeugen *in planta*. Durch die eingehende elektrophysiologische Charakterisierung der beiden stabil in *Arabidopsis* exprimierten ChR2 Mutanten C128T und D156C (XXL) wurde dieses Vorhaben erfolgreich umgesetzt. Dabei zeigte ChR2-XXL sich für physiologische Experimente ChR2-C128T aufgrund der Depolarisationsamplitude überlegen.

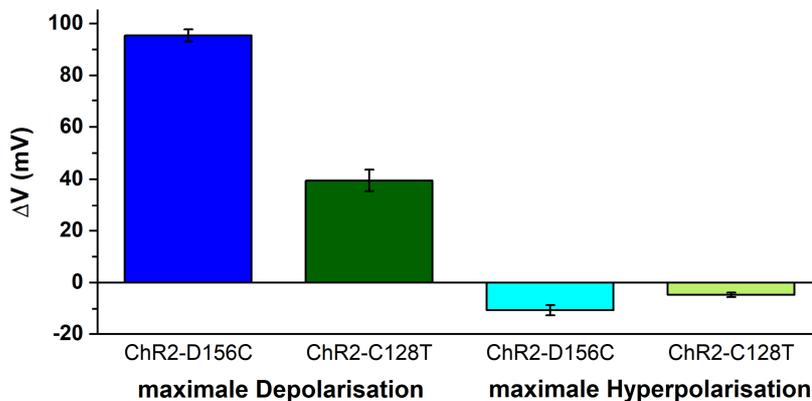


Abb. 3.25: ChR2-XXL zeigt eine stärkere Blaulicht-vermittelte Depolarisation des Membranpotentials als ChR2-C128T bei stabiler Expression in Arabidopsis Mesophyllzellen

Vergleich der maximalen relativen Depolarisation und Hyperpolarisation zwischen den stabilen Arabidopsis Linien ChR2-C128T ($40 \pm 4,1$ mV, SE; $n=6$) und -D156C (ChR2-XXL, $95 \pm 2,3$ mV, SE; $n=16$) nach 5 s Blaulichtgabe.

Die Gegenüberstellung der maximalen Depolarisation von ChR2-XXL und ChR2-C128T in Abb. 3.25 zeigt, dass nach 5 s Blaulichtgabe das Membranpotential der Pflanzen mit der stabilen ChR2-XXL Expression 2,4-fach stärker depolarisiert war, als das der Pflanzen die stabil ChR2-C128T exprimierten. Auch die Hyperpolarisation war bei den Pflanzen mit der XXL Variante des Channelrhodopsins stärker ausgeprägt. Da sowohl die Amplitudenhöhe, als auch die Neigung zu einer ausgeprägteren Hyperpolarisation bei ChR2-XXL, natürlich auftretenden pflanzlichen Reaktionen auf Stressoren, ähnelt wurde diese Mutante für die weiteren Experimente ausgewählt. Zu den weiteren Experimenten zählte unter anderem auch die Fragestellung, ob sich die durch das ChR2 induzierten Depolarisationen im Gewebe verbreiten konnten, was in Kapitel 3.6.4 behandelt wird.

Für weiterführende Experimente wurden zusätzliche Eigenschaften von ChR2-XXL in Arabidopsis bestimmt. Dazu gehörte, dass ein erneuter Blaulichtpuls am Ende einer vollständigen Repolarisation in einer gleichförmigen Folgedepolarisation resultierte, wie in

Abb. 3.26 zu sehen ist. Dies ließ sich beliebig oft und reproduzierbar wiederholen. Im Rahmen der hier durchgeführten Messungen konnte keine Dämpfung bzw. Abschwächung des Potentialverlaufs oder Ermüdungserscheinungen beobachtet werden.

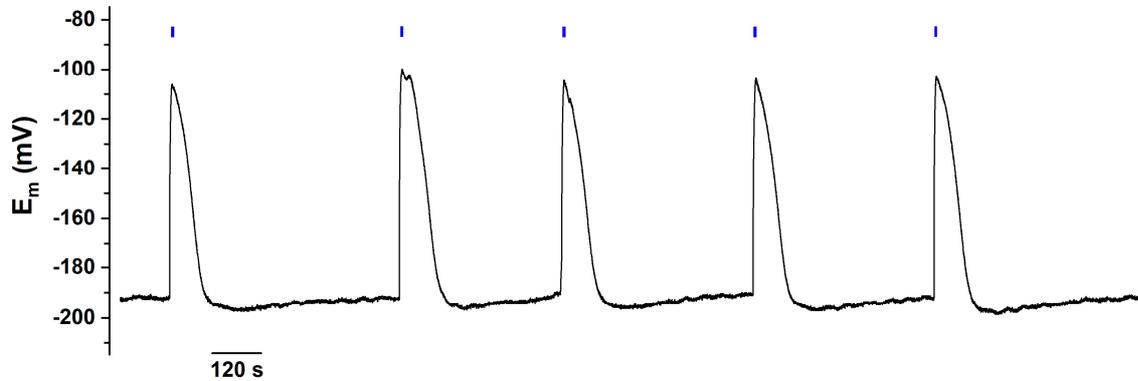


Abb. 3.26: Die Blaulicht-induzierte Depolarisation des Membranpotentials durch ChR2-XXL ist in den gleichen Zellen ein reproduzierbarer Prozess

Repräsentative Aufzeichnung des Membranpotentials in Folge repetitiver 5 s Blaulichtpulsen gemessen mit der Einstichmethode in *Arabidopsis* Mesophyllzellen mit ChR2-XXL Expression. Jeder 5 s Blaulichtpuls löste eine schnelle, reproduzierbare Depolarisation des Membranpotentials aus.

Es wurde auch untersucht, wie sich längere Belichtungszeiten als 5 s auf den Potentialverlauf von *Arabidopsis* ChR2-XXL Pflanzen auswirkten (Abb. 3.27). Schon in der Arbeit von M. Baumann waren verschieden lange Belichtungszeiten im Tabak untersucht worden. Standardmäßig wurde dort mit 15 s BL Pulsen gearbeitet.

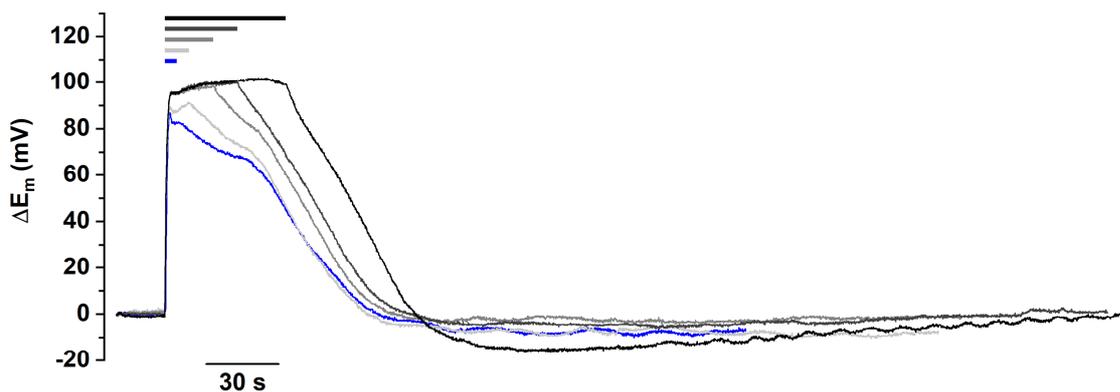


Abb. 3.27: ChR2-XXL ermöglicht die anhaltende Depolarisation des Membranpotentials, gesteuert über die Länge des Blaulichtpulses

Überlagerte Aufzeichnung des normierten Membranpotentials in Folge repetitiver verschieden langer Blaulichtpulse (5s-blau, 10 s-hellgrau, 20 s-mittelgrau, 30 s-dunkelgrau, 50 s-schwarz) gemessen mit der Einstichmethode in *Arabidopsis* Mesophyllzellen mit ChR2-XXL Expression. Die erreichte Depolarisation blieb auch bei anhaltender Blaulichtbestrahlung konstant. Bei Blaulichtpulsen von 50 s kam es zu einer weiteren Depolarisation, zusätzlich zu der ChR2-XXL bedingten, vgl. Abb. 3.3. Gefolgt wurde ein 50 s Blaulichtpuls von einer ausgeprägten Hyperpolarisation, wie sie für die Blaulicht-induzierte Depolarisation in *Arabidopsis* WT typisch ist siehe Abb. 3.3.

Es wurden dafür an mehreren Pflanzen die Belichtungsdauer: 5, 10, 20, 30, und 50 s getestet, wobei eine Messreihe immer an derselben Pflanze in einer kontinuierlichen Einstichmessung erfolgte. An der oben gezeigten Beispielmessung ist ersichtlich, dass bereits nach 5 s BL die nahezu maximal mögliche, ChR2-XXL vermittelte, Depolarisation erreicht wurde (Abb. 3.27). Mit zunehmender Anzahl und Dauer der Blaulichtpulse wurde eine Hyperpolarisation des Ruhepotentials um ca. -5 - -10 mV beobachtet. Daraus resultierte eine Erhöhung der relativen Depolarisationsamplituden nach aufeinanderfolgenden längeren Blaulicht-Pulsen. Auch ein Einfluss der Photosynthese auf die Depolarisationskinetik des Membranpotentials muss berücksichtigt werden, wenn die Belichtungsdauer ca. 20 s übersteigt, siehe Kapitel 3.2. Ein messbarer Einfluss von Blaulicht auf die H⁺-ATPase wurde vielfach, vor allem in Schließzellen, gezeigt (Yamauchi et al. 2016; Hayashi et al. 2011; Okumura et al. 2012; Okumura et al. 2016), und war auch in Mesophyllzellen bei einer Belichtungsdauer von 50 s Dauer deutlich an einer ausgeprägten Hyperpolarisation um -15 mV zu erkennen, die etwa 4,5 min anhielt.

3.6.4 Oberflächenelektroden

Nachdem in den vorherigen Abschnitten die ChR2-XXL Variante als geeignetes optogenetisches Werkzeug zur nicht-invasiven Generierung von Membranpotentialänderungen in Pflanzen charakterisiert werden konnte, sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob sich die ChR2-XXL vermittelten Membranpotentialänderungen nicht nur lokal manifestieren, sondern sich eventuell systemisch ausbreiten können. Um zu untersuchen, ob „künstlich“ erzeugte Depolarisationen sich im Gewebe ebenso verbreiten können bzw. weitergeleitet werden wie natürliche, z.B. durch Kältereiz erzeugte, Depolarisationen, wurde die Einstichmethode durch Messungen von Oberflächenpotentialen ergänzt. Diese Messmethode liefert zusätzliche Möglichkeiten elektrische Signale zu untersuchen, gerade im Hinblick auf ihre Ausbreitung im Gewebe. Zu diesem Zweck wurde die ChR2-XXL Mutante genutzt.

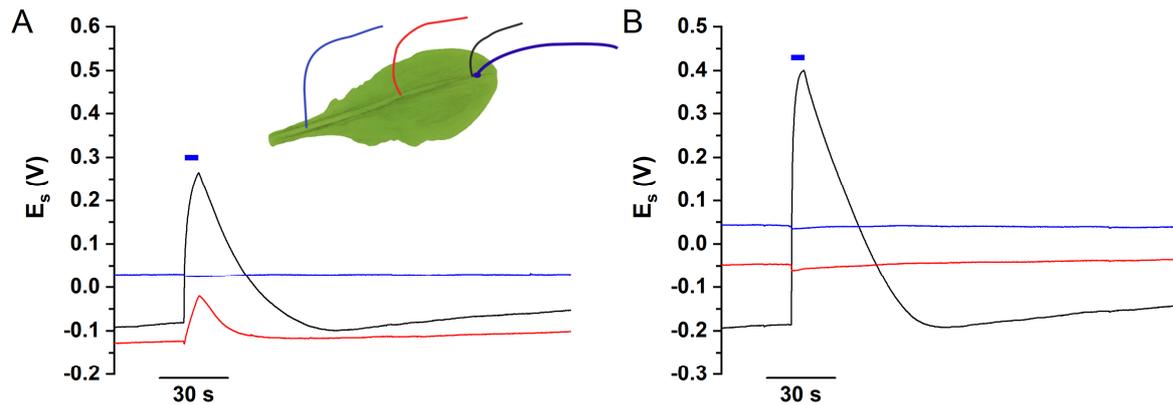


Abb. 3.28: Mittels Oberflächenelektroden lässt sich die Blaulicht-induzierte Aktivität von ChR2-XXL an drei Stellen auf dem Blatt zeitgleich aufzeichnen, eine Verbreitung der Depolarisation entlang der Leitbündel jedoch nicht nachweisen

(A) Repräsentative Aufzeichnung des sich ändernden Oberflächenpotentials an drei Stellen eines Blattes an einer intakten Arabidopsis mit ChR2-XXL Expression in Folge eines 5 s Blaulichtpulses auf die schwarze Elektrode durch einen nicht abgeschirmten Lichtleiter. Streulicht erreichte auch das Blattareal unter der roten Elektrode, was in einer Depolarisation resultierte, welche mit einem weitgeleiteten Signal verwechselt werden konnte. Schema in (A) zeigt die Platzierung der Elektroden auf der Petiole, Farben der Elektroden im Schema korrespondierend mit den Farben der aufgezeichneten Oberflächenpotentiale, in Blau der Lichtleiter an der schwarzen Elektrode. (B) Repräsentative Aufzeichnung wie (A) jedoch mit gegen Streulicht abgeschirmtem Lichtleiter. Der Blaulichtpuls wurde auf das Blattareal unter der schwarzen Elektrode appliziert und es konnte keine Fortleitung des Signals entlang der Petiole beobachtet werden.

Nach weiteren Untersuchungen mit Hilfe von mehreren gleichzeitig fixierten Oberflächenelektroden an verschiedenen Stellen der Blatt-Mittelrippe wurde deutlich, dass die Streuung des Lichts auf der Blattoberfläche zur Anregung von ChR2 im Gewebe unter benachbarten Elektroden führen konnte und das dabei aufgezeichnete Potentialänderung fälschlicherweise als sich ausbreitendes elektrisches Signal interpretiert werden konnte (Abb. 3.28 A). In diesen Experimenten waren die Elektroden bei den meisten Messungen entlang der Mittelrippe und der Petiole fixiert, um zu untersuchen, ob sich die ChR2-XXL induzierte Depolarisation entlang der Mittelrippe im Gewebe ausbreiten kann. Die Position der farblich markierten Elektroden ist schematisch in Abb. 3.28 A Inset zu sehen. Die Anregung des ChR2-XXL mit Hilfe des Blaulichtleiters erfolgte direkt auf der Blattoberfläche unter der schwarzen Elektrode. Dort konnte eine Depolarisation durch ChR2-XXL aufgezeichnet werden. Dabei kam es jedoch zur Streuung des Blaulichts an der Blattoberfläche und aus dem Lichtleiter, so dass auch die benachbarte rote Elektrode eine verminderte ChR2-XXL typische Depolarisation aufzeichnete, welche zeitgleich mit der Depolarisation an der schwarzen Elektrode einsetzte (Abb. 3.28 A). In weiterführenden Experimenten mit simultanen Oberflächenableitungen wurde daher ein optimal abgeschirmter Lichtleiter eingesetzt, woraufhin nur noch von dem Areal mit direkter Blaulichtapplikation eine Änderung des Oberflächenpotentials gemessen werden konnte (Abb. 3.28 B). Eine Verbreitung des ChR2-XXL vermittelten elektrischen Signals im Gewebe, speziell entlang der Leitbündel konnte bei keiner Messung beobachtet werden. Es

ist davon auszugehen, dass das ChR2-XXL nur zu einer lokalen Depolarisation im mit Blaulicht beleuchteten Gewebe führt.

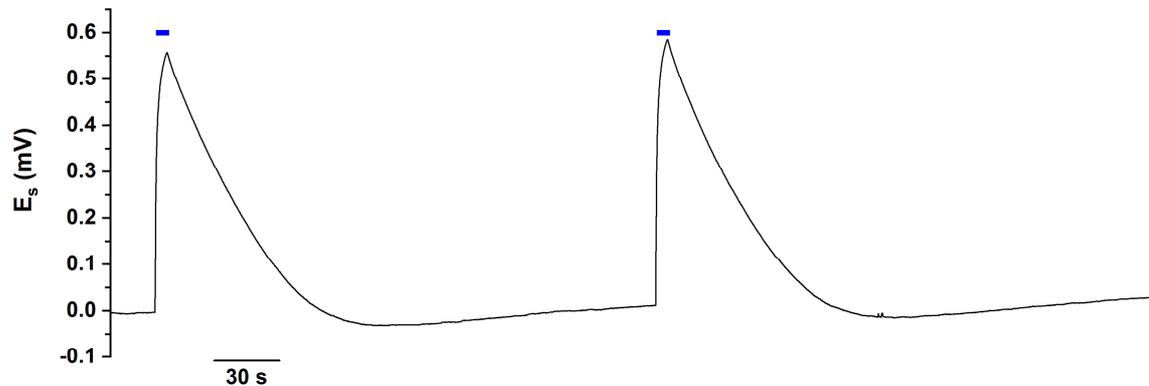


Abb. 3.29: ChR2-XXL zeigt auch in intakten Arabidopsis Pflanzen seine typischen Charakteristika, messbar als die Blaulicht-induzierte Depolarisation des Oberflächenpotentials

Repräsentative Aufzeichnung des sich ändernden Oberflächenpotentials eines Blattes an einer intakten Arabidopsis mit ChR2-XXL Expression in Folge zweier 5 s Blaulichtpulse auf das Blatt unter der Elektrode. Auch bei Messungen intakter Blätter an der Pflanze war es möglich, durch repetitive Blaulichtpulse gleichförmige Änderungen des Oberflächenpotentials zu erzielen, wie schon im Einstich gezeigt (Abb. 3.26).

In Abb. 3.29 ist exemplarisch eine typische Aufzeichnung eines Oberflächenpotentials von ChR2-XXL exprimierenden Arabidopsis zu sehen. Die Kinetik der abgeleiteten Oberflächenpotentiale war vergleichbar mit den Potentialmessungen der Einstichmessungen. Nach Blaulichtgabe unmittelbar an der ableitenden Elektrode erfolgte innerhalb von etwa 3 s eine schnelle Depolarisation, anschließend depolarisierten die Zellen langsamer, bis das Maximum mit dem Ausschalten des Blaulichts erreicht wurde. Durch die sofort einsetzende, rasche Repolarisation erreichten die Zellen innerhalb von 72,4 s (1. Blaulichtpuls) bzw. 74,5 s (2. Blaulichtpuls) nach Ausschalten des Lichts wieder ihr Ausgangspotential. Es schloss sich eine geringe Hyperpolarisation an (4,7 % der Depolarisation), bis die Zellen endgültig ihr Ruhepotential erreichten.

3.7 Beteiligung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen an der Repolarisation

Nachdem die biophysikalischen Eigenschaften des Chr2-XXL in *N. benthamiana* und *Arabidopsis* erfolgreich bestimmt worden waren, wurde das Chr2-XXL im Folgenden genutzt, um die molekularen Komponenten der pflanzlichen Repolarisation zu untersuchen. Aufgrund der vorherrschenden Ionengradienten wird die Beteiligung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen an der Repolarisation intensiv diskutiert (Cuin et al. 2018). Da die Kaliumgradienten für Pflanzenzellen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen auswärtsgerichtet sind, werden insbesondere spannungsabhängige, auswärts gleichrichtende Kaliumkanäle favorisiert, da durch einen Kaliumausstrom aus der Zelle eine Repolarisation erzielt werden könnte. Von den beiden im Arabidopsis Genom kodierten Shaker-ähnlichen K_{out} Kanälen wird der STELAR K⁺ OUTWARD RECTIFIER (SKOR) in den Xylemparenchymzellen der Wurzel exprimiert (Winter et al. 2007). Demgegenüber exprimiert der GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K⁺ CHANNEL (GORK) ubiquitär (Lacombe et al. 2000; Winter et al. 2007). Wie sich der Verlust von GORK auf die Repolarisation auswirkt, wurde bereits in Kap. 3.4 mit den Stimuli Blaulicht und Kälte untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied im Repolarisationsverhalten zwischen *gork1-2*-Verlustmutante und dem korrespondierenden Wildtyp Col0 nach 50 s Blaulichtpulsen gefunden werden. Nach der Depolarisation durch Kältestimuli war die Repolarisationsgeschwindigkeit in *gork1-2*-Verlustmutanten nur halb so schnell wie in den Kontrollen, jedoch galt dies nur für die Repolarisation des Membranpotentials bis auf -100 mV, also nahe E_K . Die danach verbleibende Repolarisationsphase bis zum Ruhepotential war unabhängig von GORK. Da im Rahmen dieser Arbeit eine Kreuzung der *gork1-2*-Verlustmutante mit den Chr2-XXL Linien aus zeitlichen Gründen nicht möglich war, wurde ein pharmakologischer Ansatz gewählt. Als Inhibitoren kamen entweder 5 mM BaCl₂ oder 5 mM CsCl zum Einsatz. Es ist bekannt, dass BaCl₂ den auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanal GORK (Ache et al. 2000; Roelfsema and Prins 1997) und den schwach einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal AKT2/3 inhibiert (Marten et al. 1999). CsCl dagegen inhibiert spannungsabhängig die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle KAT1 und AKT1 sowie ebenfalls den schwach einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal AKT2/3 (Lacombe et al. 2000; Hedrich et al. 1995; Michard et al. 2005). Im Experiment wurden im kontinuierlichen Einstich zuerst 5 s Blaulicht-Pulse ohne Inhibitor gegeben, anschließend der Inhibitor appliziert und in 6 - 60 min Abstand weitere Blaulicht-Pulse gegeben. Es wurde die Änderung der Depolarisationsamplitude, der Repolarisationszeit und der daraus resultierenden Repolarisationsgeschwindigkeit, sowie das Ruhepotential bestimmt.

Die Applikation von 5 mM CsCl in Einstichmessungen hatte keinen Effekt auf die Repolarisationsgeschwindigkeit, sie betrug ohne CsCl $0,9 \pm 0,2 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ und mit CsCl $0,92 \pm 0,2 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (SE n = 4). Die in Gegenwart von CsCl₂ zu beobachtende Hyperpolarisation des Ruhepotentials von durchschnittlich $-9,2 \pm 2,5 \text{ mV}$ (SE, n = 4) war sehr variabel, wie sich im großen Standardfehler niederschlug. Es konnte jedoch unter CsCl eine, um den Faktor $1,13 \pm 0,04$ (SE, n = 4), erhöhte relative Depolarisation gemessen werden.

Die Applikation von BaCl₂ dagegen hatte einen reproduzierbaren Einfluss auf das Ruhepotential, die relative Depolarisation und auch die Repolarisationsgeschwindigkeit. 5 mM BaCl₂ bewirkten innerhalb von 10 - 20 min eine Hyperpolarisation des Ruhepotentials um $-17,5 \pm 2,3 \text{ mV}$ (SE, n = 10) (Abb. 3.30 A). Damit einhergehend stieg die relative Depolarisationsamplitude von $82,5 \pm 4,1 \text{ mV}$ auf $93 \pm 3,9 \text{ mV}$ (SE, n = 10). Dies entsprach einer Erhöhung um den Faktor 1,16 (Abb. 3.30). Die Repolarisationsgeschwindigkeit wuchs um den Faktor 1,8, von $0,69 \pm 0,09 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ohne BaCl₂ auf $1,1 \pm 0,06 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ nach BaCl₂ Gabe (Abb. 3.30 B). Auch die exemplarische Auftragung der Spannungsänderungen zeigen, dass die Kinetik durch BaCl₂ beeinflusst wird (Abb. 3.30 A).

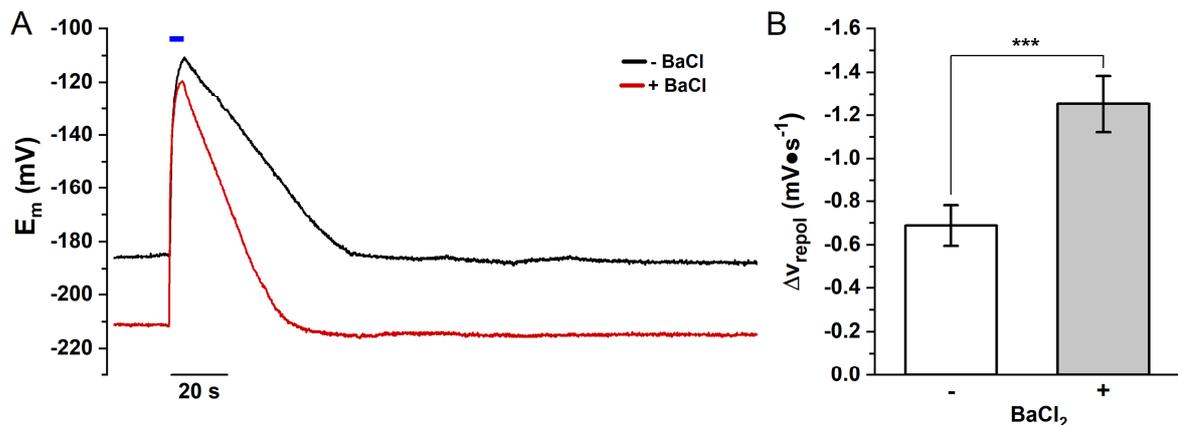


Abb. 3.30: BaCl₂ hyperpolarisiert das Ruhepotential und beschleunigt die Repolarisation nach der Depolarisation durch ChR2-XXL in Arabidopsis Mesophyllzellen

(A) Repräsentative, überlagerte Aufzeichnung der Depolarisation des Membranpotentials der gleichen Arabidopsis Mesophyllzellen mit ChR2-XXL Expression in Folge eines 5 s Blaulichtpulses (ohne BaCl₂, schwarze Kurve) und (nach 26 min mit BaCl₂, rote Kurve) gemessen mit der Einstichmethode zeigen, dass BaCl₂ das Ruhepotential hyperpolarisiert und die Repolarisationsdauer verkürzt. (B) Statistische Auswertung des Experimentalaufbaus wie in (A) ergibt eine signifikant schnellere Repolarisationsgeschwindigkeit nach der Inkubation ($37,7 \pm 12,7 \text{ min}$) mit BaCl₂ ($1,1 \pm 0,06 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, SE, n = 10), verglichen mit der Repolarisationsgeschwindigkeit ohne BaCl₂ ($0,69 \pm 0,09 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, SE, n = 10) in den gleichen Zellen, t-Test $p < 0,001$.

Die Versuche mit Kaliumkanalinhibitoren zeigten, dass Kaliumkanäle das Ruhepotential beeinflussen, aber ihre Hemmung nicht zu einer verlangsamten Repolarisation führen, wie dies der Fall wäre, wenn sie eine Hauptkomponente der Repolarisation darstellen würden. Daher sollte im Folgenden die Rolle der Plasmamembran H⁺-ATPasen als primär aktive

Komponenten der Membranpotentialkontrolle in der Repolarisationsphase untersucht werden.

3.8 Die PM-H⁺-ATPasen als Hauptkomponente der Repolarisation

Die plasmamembranständigen (PM) H⁺-ATPasen AHA1, AHA2 und AHA3 sind obligat für die Generierung und Aufrechterhaltung des pflanzlichen Membranpotentials im *Arabidopsis* Mesophyll. Eine homozygote Doppelverlustmutation für AHA1 und AHA2 führt zu einer Letalität bereits im Embryonalstadium (Haruta et al. 2010). Dies erschwert experimentelle Ansätze, die Rolle beider Proteine in biologischen Prozessen zu untersuchen. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass die Pumpen nicht nur das Membranpotential aufrechterhalten, sondern auch an der Generation und Modifikation pflanzlicher elektrischer Signale beteiligt sind (Kumari et al. 2019).

Da keine Doppelverlustmutanten der beiden im Mesophyll wichtigen H⁺-ATPasen AHA1 und 2 existieren, wurde auch im Folgenden ein pharmakologischer Ansatz verwendet, um die Aktivität der H⁺-ATPasen zu manipulieren. Für die Hemmung der H⁺-ATPasen wurde Natriumorthovanadat gewählt, für eine Stimulation das Toxin Fusicoccin des Deuteromyceten *Fusicoccum amygdali* (Johansson et al. 1993). Der Einfluss beider Substanzen auf das Membranpotential vor und nach Depolarisation durch ChR2-XXL wurde mit der Einstichmethode untersucht. Da die H⁺-ATPasen pH abhängig sind, wurde zunächst jedoch die Auswirkung des pH-Wertes in der Badlösung auf die Repolarisationskinetik untersucht. Dazu wurden Blattscheiben über Nacht aufgeklebt und im Rotlicht bei pH 6,0 inkubiert. Zwei Stunden vor der Messung wurde die Messlösung durch eine Lösung mit gleicher Zusammensetzung, aber unterschiedlichem pH-Wert ersetzt. In Abb. 3.31 A sind die Messungen von Proben des gleichen Blatts bei pH_{ext} 5,5; 6,0 und 7,5 gezeigt.

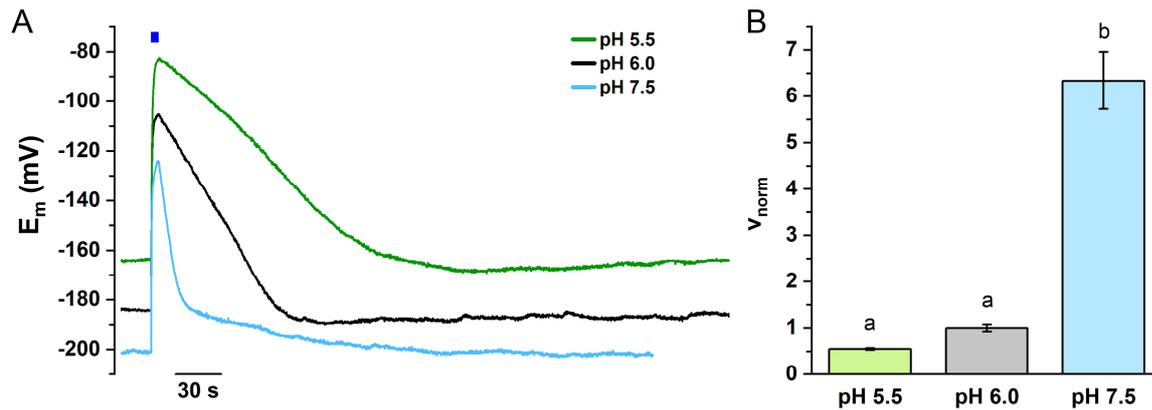


Abb. 3.31: Der extrazelluläre pH-Wert verändert die Repolarisationskinetik nach Blaulicht-vermittelter Depolarisation des Membranpotentials durch Chr2 in Arabidopsis Mesophyllzellen

(A) Repräsentative, überlagerte Aufzeichnung der Einstichmessungen von Mesophyllzellen desselben Blattes in Badlösung mit verschiedenen externen Protonenkonzentrationen nach der Gabe eines 5 s Blaulichtpulses. Die Proben wurden ohne Epidermis über Nacht in retinalhaltiger Badlösung mit pH 6,0 inkubiert und zwei Stunden vor Messbeginn wurde die Badlösung gegen solche mit dem indizierten pH-Wert getauscht. Saurere Bedingungen bei pH 5,5 (grüne Kurve) führten zu einer Depolarisation des Ruhepotentials (+20 mV) und verdoppelte die Repolarisationsphase. Alkalischere Bedingungen bei pH 7,5 (blaue Kurve) bewirkten eine Hyperpolarisation des Ruhepotentials (-17 mV) und eine starke Beschleunigung der Repolarisation in den ersten 70 % der Gesamtrepolarisationsphase. Bei etwa -180 mV verlangsamte sich die Repolarisation dann bis zum Erreichen des Ruhepotentials, wobei keine Hyperpolarisation beobachtet werden konnte. (B) Statistische Auswertung der Messungen aus dem Experimentalaufbau von (A) zeigt die Repolarisationsgeschwindigkeit in den ersten 70 % der Repolarisation. Es wurden auf diese Weise die Repolarisationsgeschwindigkeiten von fünf verschiedenen Pflanzen bei pH 5,5, 6,0 und 7,5 bestimmt und auf die Repolarisationsgeschwindigkeit der korrespondierenden Probe bei pH 6,0 normiert. Bei pH 5,5 war die Repolarisationsgeschwindigkeit um den Faktor $0,5 \pm 0,02$ kleiner als bei pH 6,0. Im Gegensatz dazu, war die Repolarisationsgeschwindigkeit bei pH 7,5 um den Faktor $6,3 \pm 0,62$ höher als bei pH 6,0. One-way ANOVA.

Im Vergleich zu Kontrollbedingungen (pH_{ext} 6,0) bewirkte die Ansäuerung des pH Werts um eine halbe pH Einheit bereits eine Verschiebung des Ruhepotentials um +20 mV, während eine Alkalisierung des pH-Werts um 1,5 pH Einheiten eine Hyperpolarisation des Ruhepotentials um -15 mV verursachte (Abb. 3.31). Im Vergleich zum Spannungsverlauf unter Kontrollbedingungen (pH_{ext} 6,0) ist zu sehen, dass eine Erniedrigung des pH-Werts um eine halbe pH Einheit oder die Erhöhung des pH Werts um 1,5 pH Einheiten zu einer deutlichen Veränderung des Repolarisationsverhaltens führten (Abb. 3.31 A). Dabei war bei allen Messungen zu beobachten, dass bei alkalischen pH Werten die Repolarisation ausgeprägt biphasisch verlief, mit einer erst schnellen Repolarisation, die dann in eine sehr langsame umschlug. Aus diesem Grund wurde die partielle Repolarisationsgeschwindigkeit bis zum Erreichen von 70 % Repolarisation bestimmt, auf die Repolarisationsgeschwindigkeit bei pH 6,0 (Kontrolle) normiert und verglichen (Abb. 3.31 B). Die vollständige Repolarisationsdauer war bei im Beispiel in Abb. 3.31 A bei pH 5,5 mit 157 s doppelt so lang wie unter Kontrollbedingungen (79,5 s). Daraus folgte eine halbierte normierte Repolarisationsgeschwindigkeit bei pH_{ext} 5,5 ($0,55 \pm 0,02$) im Vergleich mit der Kontrolle bei pH_{ext} 6,0 ($1 \pm 0,07$). Bei alkalischem extrazellulären pH

(pH_{ext} 7,5) war die normierte Repolarisationsgeschwindigkeit mit $6,34 \pm 0,62$ mehr als 6 mal schneller als unter Kontrollbedingungen (pH_{ext} 6,0).

Das Toxin Orthovanadat (eingesetzt als Natriumorthovanadat), im Folgenden nur noch als Vanadat bezeichnet, ist eine Vanadatverbindung, welche je nach pH-Wert der Lösung verschiedene Polymere aus Orthovanadationen ausbilden kann. Nicht alle dieser Vanadatcluster wirken dabei gleich toxisch. (Aureliano and Crans 2009). Die Versuche bei Badlösungen mit pH 6,5; 6,8; 7,0; und 7,5 wiesen darauf hin, dass Vanadat nur bei pH 6,0 einen physiologischen Effekt auf das Membranpotential von *Arabidopsis* hatte. Bereits bei pH 6,5 konnte keine Wirkung des Vanadats in den Potentialmessungen gezeigt werden, dies liegt wahrscheinlich an der fehlenden Aufnahme in die Zelle.

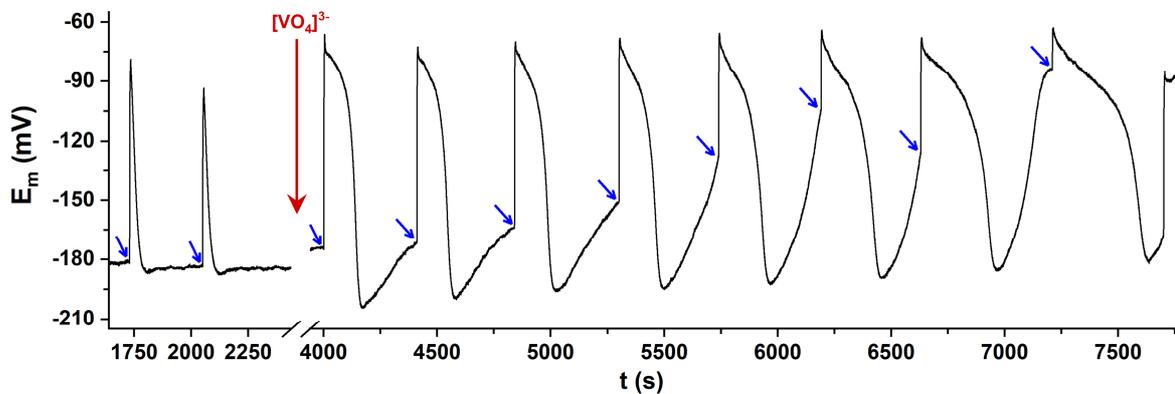


Abb. 3.32: Natriumorthovanadat depolarisiert das Ruhepotential und verlangsamt die Repolarisation nach Blaulicht-induzierter Depolarisation des Membranpotentials durch ChR2-XXL, kann diese aber über mehr als 1 h nicht vollständig hemmen

Repräsentative, kontinuierliche Aufzeichnung des Membranpotentials mittels Einstichttechnik von *Arabidopsis* ChR2-XXL exprimierenden Mesophyllzellen in Antwort auf repetitive 5 s Blaulichtpulse (blauer Pfeil indiziert Blaulichtpuls). Vor der X-Achsen-Unterbrechung sind zwei ChR2-XXL vermittelte Depolarisationen vor Zugabe von Vanadat zu sehen. Es wurde in die laufende Einstichmessung 1 mM Natriumorthovanadat (roter Pfeil) appliziert. Ein 5 s Blaulichtpuls führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials, mit anschließender Repolarisation, welche eine immer längere Repolarisationsphase mit ausgeprägter biphasische Kinetik aufwies. Das Ruhepotential verschob sich mit zunehmender Geschwindigkeit zu -80 mV. Trotzdem gelang bis zum Exitus der Zellen die ChR2-XXL-vermittelte Depolarisation nach Blaulichtgabe und es folgte immer eine Repolarisation.

In einem typischen Langzeit-Einstichexperiment an *Arabidopsis* ChR2-XXL Pflanzen wurde zunächst unter Kontrollbedingungen die typische ChR2-XXL vermittelte Depolarisation mittels 5 s Blaulichtpuls ausgelöst. Nach Rückkehr des Membranpotentials zum Ruhepotential erfolgte dann die Zugabe von 1 mM Natriumorthovanadat in die Badlösung (pH 6,0). Anschließende konsekutive Blaulichtstimulationen zeigten, dass bereits nach weniger als 3 min der Vanadatzugabe eine Änderung im Repolarisationsverhalten beobachtet werden konnte (Abb. 3.33).

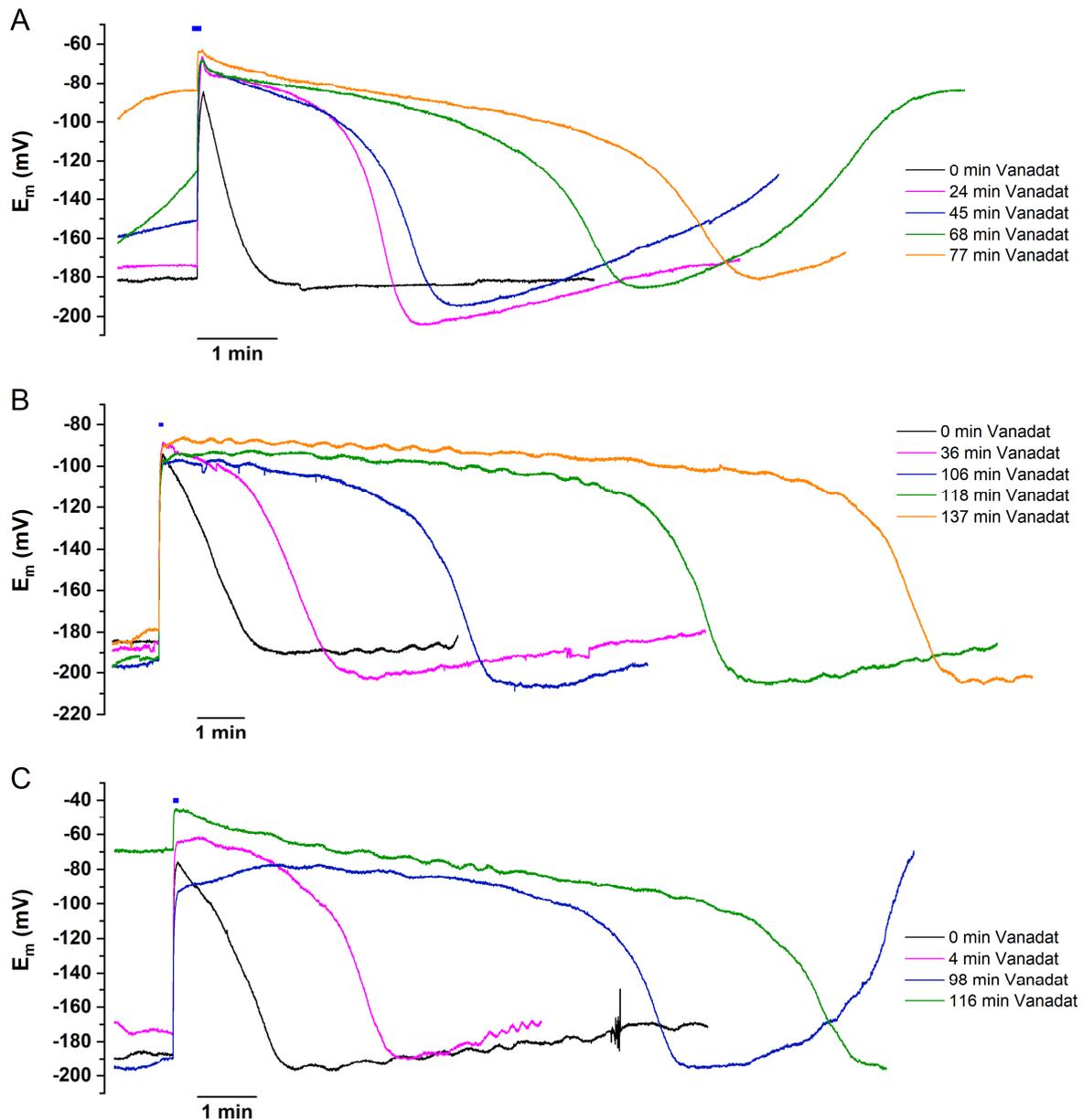


Abb. 3.33: Nach der Blaulicht-induzierten Depolarisation des Membranpotentials in Arabidopsis Mesophyllzellen wird die Repolarisationskinetik durch Orthovanadat moduliert, wobei eine Förderung einer langen ersten Repolarisationsphase, gefolgt von einer zweiten schnellen Phase charakteristisch ist

(A-C) Repräsentative Überlagerung mehrerer Depolarisationen durch 5 s Blaulicht, zusammengestellt aus der kontinuierlichen Aufzeichnung des Membranpotentials mittels Einstichttechnik von Arabidopsis ChR2-XXL exprimierenden Mesophyllzellen, von drei verschiedenen Pflanzen, zeigt den Effekt von Vanadat auf die Repolarisation. Es wurden zuerst immer Kontrollmessungen an den Proben ohne Vanadat durchgeführt (0 min Vanadat, schwarze Kurve, Ruhepotential zwischen -180 - -190 mV) und im Anschluss 1 mM Vanadat während der laufenden Einstichmessung zugegeben. Im Anschluss wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten weitere 5 s Blaulichtpulse appliziert. Die in den Kontrollmessungen monophasische Repolarisation wurde durch den Einfluss von Vanadat ausgeprägt biphasisch, vor allem mit einer stark verlängerten ersten Phase, gefolgt von einer schnellen zweiten Phase. Außerdem setzte nach der Repolarisation, welche zum Teil sogar mit einer Hyperpolarisation einherging, eine ausgeprägte Verschiebung des Ruhepotentials zu positiveren Membranpotentialen ein. Auch stark depolarisierte Zellen waren durch ChR2-XXL nach 5 s Blaulicht zu depolarisieren und reagierten mit einer Repolarisation, siehe (A) 77 min Vanadat und (C) 116 min Vanadat.

Unter dem Einfluss von Vanadat war es nach wie vor möglich durch Blaulichtpulse Chr2-XXL vermittelte Depolarisationen herbeizuführen, wie in Abb. 3.33 (A - C) zu sehen ist. Der biphasische Charakter der Repolarisation, welcher unter Kontrollbedingungen oft nur schwer zu erkennen war, trat in Gegenwart von Vanadat deutlich hervor. Im Einklang mit einer Inhibition der H⁺-ATPase konnte nach Erreichen des Depolarisationspeaks eine deutliche Ausdehnung der ersten Phase der Repolarisation gemessen werden, welche sich in einer anhaltenden Depolarisation äußerte. Als Antwort auf weitere, anschließende Blaulicht-ausgelöste Chr2-XXL-vermittelte Depolarisationen, verlängerte sich die Dauer dieser Plateauphase mit zunehmender Einwirkzeit des Vanadats. An einem nicht vorhersagbaren Punkt jedoch, ‚kippte‘ dieser metastabile Zustand und die typische ‚schnelle‘ zweite Repolarisationsphase war zu erkennen, welche schließlich von einer ausgeprägten Hyperpolarisation gefolgt wurde. Die während der Messungen zu beobachtende zunehmende Drift im Membranpotential zu depolarisierenden Werten war ein weiteres Indiz für die erfolgreiche Inhibition der PM H⁺-ATPase durch Vanadat. Bemerkenswerterweise konnten jedoch auch bei depolarisierten Ruhepotentialen mit Hilfe von Blaulicht Chr2-XXL abhängige Depolarisationen ausgelöst werden. In Übereinstimmung mit einer Depolarisationsaktivierung der Plasmamembran H⁺-ATPase, wurde diese jedoch am Endpunkt des Depolarisationsplateaus scheinbar Vanadat insensitiv und leitete dann die ‚schnelle‘ Repolarisation des Membranpotentials ein. In dieser Phase wurden kurzfristig Membranpotentiale erreicht, welche ursprünglich an derselben Pflanze unter Kontrollbedingungen (-180 - -190 mV) gemessen wurden. Unter diesen hyperpolarisierten Bedingungen trat die Vanadat-abhängige Inhibition der PM H⁺-ATPase wiederum zu Tage, so dass der erreichte hyperpolarisierte Status lediglich von transientser Natur war, das Membranpotential nicht gehalten werden konnte und die Zellen langsam depolarisierten. Die Geschwindigkeit dieser ‚langsamen‘ Depolarisation steigerte sich mit zunehmender Wirkungsdauer des Vanadats.

Wenn eine Inhibition der Plasmamembran H⁺-ATPase zu einer Verlängerung der Depolarisationsphase führt, dann – so war die Überlegung – sollte eine zusätzlich Aktivierung der H⁺-ATPase die Repolarisationsphase verkürzen. Daher wurde eine Aktivierung der Protonen-ATPase durch Fusicoccin an den Chr2-XXL Pflanzen getestet. Fusicoccin bindet am autoinhibitorischen C-Terminus der AHA Proteine und sorgt für eine konstante maximale Überaktivierung der Pumpen durch die irreversible Stabilisierung der Interaktion mit 14-3-3 Proteinen (Alsterfjord et al. 2004). Zu diesem Zweck wurden Einstichmessungen an Arabidopsis Chr2-XXL durchgeführt. Wie auch in den anderen Versuchen wurden zunächst mit Blaulichtpulsen (5 s) Chr2-XXL vermittelte Depolarisationen unter Kontrollbedingungen aufgezeichnet. Anschließend wurde während der Langzeitmessung das Fusicoccin (c = 4 µM) zugegeben. Die Fusicoccin-abhängige Aktivierung der Plasmamembran H⁺-ATPase resultierte bereits nach wenigen Minuten in einer kontinuierliche Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials von -182 mV

auf -215 mV (Abb. 3.34 A). Fusicoccin führte zu einer mittleren Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials um $-26,4 \pm 1,9$ mV (SE; $n = 10$). Außerdem halbierte sich die Repolarisationsdauer von 185 s unter Kontrollbedingungen auf 75 s 25 min nach Fusicoccingabe (Abb. 3.34 A). Gleichzeitig kam es zu einer leichten Zunahme der Depolarisationsamplitude um 10 mV, wie aus Abb. 3.34 B ersichtlich wird. Die daraus resultierende Repolarisationsgeschwindigkeit betrug initial $-0,82 \pm 0,05$ mV \cdot s $^{-1}$ (SE) und nach Fusicoccinbehandlung wurde eine Repolarisationsgeschwindigkeit von $-1,68 \pm 0,07$ mV \cdot s $^{-1}$ (SE) bestimmt (Abb. 3.34 C). Dies entsprach einer Verdopplung durch Fusicoccin um einen Faktor $2,1$.

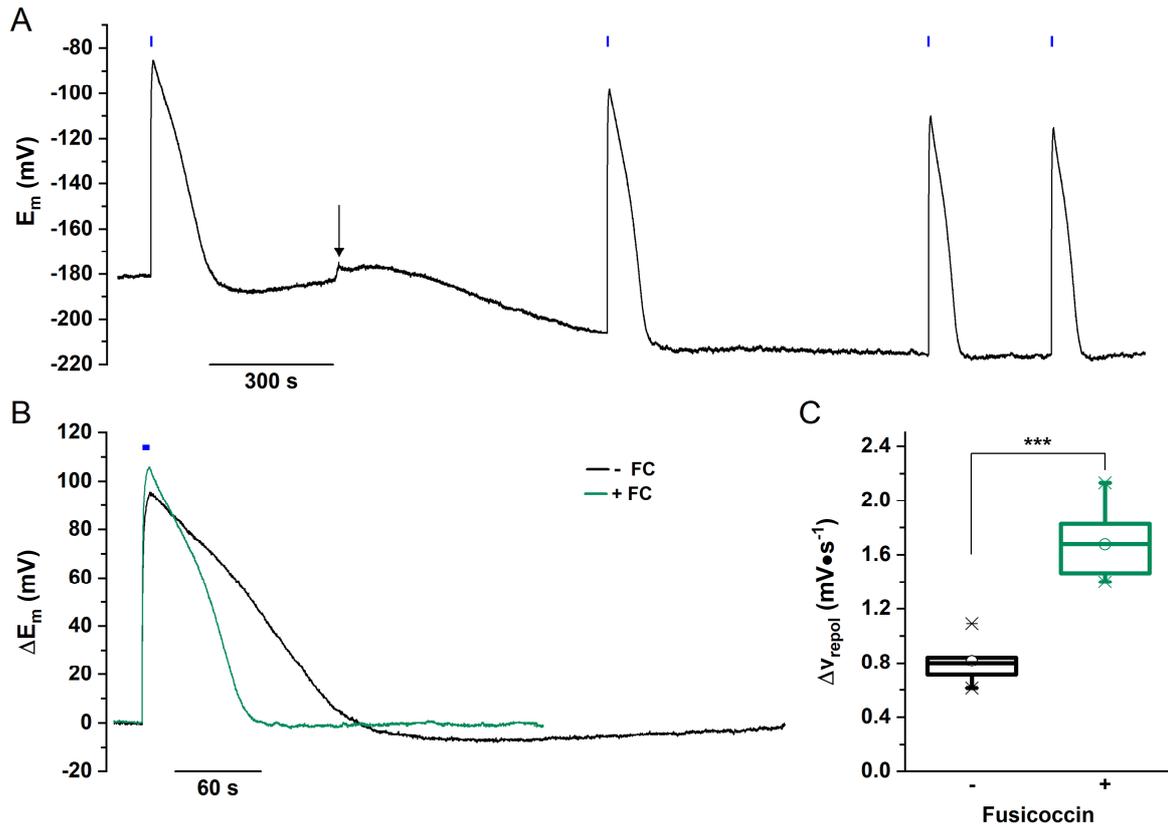


Abb. 3.34: Fusicoccin hyperpolarisiert das Membranpotential von Arabidopsis ChR2-XXL Mesophyllzellen und verdoppelt die Repolarisationsgeschwindigkeit nach der Blaulicht-induzierten Depolarisation des Membranpotentials signifikant

(A) Repräsentative, kontinuierliche Aufzeichnung des Membranpotentials mittels Einstichttechnik von Arabidopsis ChR2-XXL exprimierenden Mesophyllzellen zeigt die Depolarisation des Membranpotentials in Antwort auf repetitive 5 s Blaulichtpulse. Die erste Depolarisation zeigt den Zustand vor Fusicoccingabe (FC), Ruhepotential -182 mV und transiente Hyperpolarisation. Die Zugabe von 4 μ M FC (schwarzer Pfeil) bewirkt in 5 min eine Hyperpolarisation des Ruhepotentials. Die Gabe eines weiteren Blaulichtpulses zeigt, dass die Repolarisationsdauer bereits verkürzt war. 20 min nach FC Gabe hyperpolarisierte das Ruhepotential nicht weiter und lag bei -215 mV. Nach dieser Zeit hatte sich die Repolarisationsdauer von 185 s auf 75 s mehr als halbiert und es trat im Anschluss an die ChR2-XXL vermittelte Depolarisation auch keine transiente Hyperpolarisation auf. (B) Überlagerte normalisierte Membranpotentiale aus einer Messung wie in (A) zeigen, dass nach 25 min Inkubation mit FC (grüne Kurve) die Depolarisationsamplitude leicht von 95,2 mV (schwarze Kurve, Kontrolle) auf 105,7 mV gestiegen war. Die Repolarisationsdauer hatte sich von 170 s (- FC) auf 80 s (+ FC) verkürzt. Die in der Kontrolle (C) Statistische Auswertung des Experimentdesgins aus (A) von zehn verschiedenen Pflanzen ergab eine Repolarisationsgeschwindigkeit von $-0,82 \pm 0,05 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ vor FC-Gabe und $42,3 \pm 9,5 \text{ min (SE)}$ nach FC Gabe $-1,68 \pm 0,07 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Dies entsprach einer hochsignifikanten Verringerung der Repolarisationsgeschwindigkeit um den Faktor $2,1 \pm 0,13$, $p \leq 0,001$.

Die Messungen an den Arabidopsis ChR2-XXL Pflanzen unter verschiedenen extrazellulären pH-Werte sowie in Gegenwart von Natriumorthovanadat und Fusicoccin zeigten, dass sich die Kinetik der Repolarisationsphase nach der Depolarisation durch ChR2 veränderte, wenn durch diese Effektoren die Aktivität der Protonen-ATPase beeinflusst wurde. Die Hemmung der H⁺-ATPasen durch Vanadat, oder durch einen saureren pH-Wert in der Messlösung, resultierte in einer Verlängerung der Repolarisationsdauer, welche mit zunehmender Einwirkdauer des Vanadats zunahm. Wurde die Aktivität der H⁺-ATPasen hingegen durch Fusicoccin oder einen alkalischen

extrazellulären pH-Wert gesteigert, so verkürzte sich die Repolarisationsdauer, bzw. es kam zu einer Beschleunigung der Repolarisationsgeschwindigkeit. Übereinstimmend unterstreichen diese Experimente eine zentrale Bedeutung der PM H⁺-ATPase bei der Kontrolle elektrischer Signale in Mesophyllzellen.

4 Diskussion

Pflanzen verfügen wie Tiere über die Fähigkeit elektrische Signale zu generieren. Eine Vielzahl externer und intrinsischer Stimuli führen zur Änderung des Potentials der Plasmamembran pflanzlicher Zellen. Trotzdem ist das Wissen über elektrische Signale, vor allem deren Generierung in der Zelle und die Informationsweitergabe durch sie in Pflanzen, im Gegensatz zu Tieren, nur wenig verstanden.

Das Ruhepotential lebender Zellen wird vorrangig durch die Gleichgewichtspotentiale für Kaliumionen, Natrium- und Chloridionen, sowie deren Leitfähigkeit über die Plasmamembran bestimmt. Die Grundvoraussetzungen für die Generierung elektrischer Signale in Tieren (Eumetazoen) und Pflanzen sind jedoch verschieden. Zum einen liegt dies in den vorherrschenden unterschiedlichen Ionengradienten in pflanzlichen und tierischen Zellen begründet. In tierischen Zellen sorgt die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase für den Aufbau eines auswärtsgerichteten Kaliumgradienten, sowie eines einwärtsgerichteten Natriumgradienten. In Pflanzen tritt an die Stelle der Natriumionen ein einwärtsgerichteter H^+ Gradient, welcher durch die H^+ -ATPase der Plasmamembran generiert wird. Während der Chloridgradient tierischer Zellen typischerweise einwärtsgerichtet ist, ist dieser in Pflanzenzellen auswärtsgerichtet. Hinzu kommt, dass die für erregbare tierische Zellen typischen spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle in höheren Pflanzen nicht existieren. Schließlich sind auch die anatomischen Voraussetzungen für die Weiterleitung elektrischer Signale in Tieren und Pflanzen grundverschieden, so dass zusammengenommen sowohl für die Generierung, als auch die Weiterleitung elektrischer Signale in Pflanzen grundsätzlich andere Modelle diskutiert werden. Obwohl spannungsabhängige Protonenkanäle in den Genomen höherer Pflanzen gefunden wurden, wird derzeit ein Efflux von Chloridionen über Anionenkanäle der Plasmamembran ursächlich für die Stimulus-induzierte Depolarisation des Membranpotentials in Pflanzen angesehen. Anionenkanäle der SLAC/SLAH- oder der ALMT-Familie, sowie der bisher nicht charakterisierte Ca^{2+} -aktivierte Anionenkanal ANO1 könnten diese Funktion erfüllen. Da im Gegensatz zu den Kaliumkanälen, diese Anionenkanäle per se nicht spannungsabhängig sind, wird eine Aktivierung der Anionenkanäle über Ca^{2+} - bzw. Ca^{2+} -abhängige Kinasen diskutiert. Als mögliche Eintrittspforten für Calciumionen über die pflanzliche Plasmamembran könnten Mitglieder der GLR-Familie, der CNGC-Familie oder OSCA-Kanäle fungieren. Die Repolarisation des Membranpotentials könnte unter Beteiligung spannungsabhängiger K^+ -Effluxkanäle, sowie der Plasmamembran (PM) H^+ -ATPasen erfolgen.

Eine Fülle abiotischer und biotischer Stimuli führen in Pflanzen zur Erzeugung elektrischer Signale an der Plasmamembran. Bei klassisch-erregbaren Pflanzen wie *Dionaea muscipula* und *Mimosa pudica* ist der Zusammenhang zwischen diesem elektrischem Signal (Aktionspotential) und physiologischer Reaktion gut aufgeklärt. Das durch Berührung induzierte Aktionspotential löst in diesen Pflanzen eine gerichtete Bewegung aus. Für die Venusfliegenfalle konnte gezeigt werden, dass Aktionspotential-basierte elektrische Signale zur Bildung des Phytohormons Jasmonsäure führen, welche wiederum die Sekretion von extrazellulären Hydrolaseenzymen zur Verdauung der Beute steuert. Auch in *Arabidopsis* führen Verwundungs-induzierte, lokale elektrische Signale zur systemischen Induktion von Jasmonsäure ((Mousavi et al. 2013)). Wie bei diesen Pflanzen das elektrische Signal genau auf zellulärer Ebene verarbeitet wird und zur beobachtenden Reaktion führt, ist jedoch bisher nicht aufgeklärt. Grundsätzlich ist das Wissen um die exakten molekularen Grundlagen der Generierung und Weiterleitung, sowie die Verarbeitung elektrischer Signale in Pflanzen derzeit rudimentär.

Um einen ersten Beitrag zur Schließung dieser Wissenslücken zu leisten, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit erstmals das optogenetische Werkzeug Channelrhodopsin-2 zur nicht-invasiven Erzeugung von Änderungen des Membranpotentials in Pflanzen implementiert.

4.1 Blaulicht-abhängige und Kälte-induzierte Depolarisation in *Arabidopsis thaliana* Mesophyll

4.1.1 Änderungen des Membranpotentials als Reaktion auf abiotische Stimuli

Jede Pflanze besitzt ein Temperaturoptimum und Änderungen der Umgebungstemperatur, vor allem außerhalb dieses Optimums, werden wahrgenommen, um metabolische und entwicklungsspezifische Prozesse anpassen zu können. Sowohl plötzliche Kältereize, als auch Hitzeeinwirkung, resultieren in elektrischen Signalen. Über die molekularen Mechanismen der Temperaturwahrnehmung, also die direkte Perzeption der Temperaturänderung, ist bisher nur wenig bekannt.

Bekannt ist jedoch, dass Temperaturreize zu einer schnellen Änderung des Membranpotentials der Zellen führen und dass dieses Signal weitergeleitet wird. Ebenfalls ist bekannt, dass es durch Kälte- und Hitzestimuli zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumspiegel kommt (Meyerhoff et al. 2005; Fisahn et al. 2004; Carpaneto et al. 2007). Die durch Hitze ausgelösten elektrischen Signale gehen meist mit einer Beschädigung des Gewebes und damit mit der Freisetzung von DAMPs (damage associated molecular

pattern) einher (Boller and Felix 2009). Das durch Hitze ausgelöste elektrische Signal ist durch eine Depolarisation mit langsamer Repolarisation gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu bewirkt die spontane Abkühlung eines Zellareals eine extrem schnelle Depolarisation gefolgt von einer raschen Repolarisation. Da Kälte-induzierte elektrische Signale reproduzierbar und repetitiv generiert werden können, wurde der Stimulus Kälte im Rahmen dieser Arbeit zur experimentellen Validierung des Systems genutzt. *Arabidopsis thaliana* reagierte bei der Applikation einer kleinen Menge eiskalten Wassers mit einer unmittelbaren starken Depolarisation des Membranpotentials der Mesophyll- und Epidermiszellen um 173 ± 7 mV (Abb. 3.1 A und B, Abb. 3.10). In der Folge wurde das ursprüngliche Ruhepotential meist innerhalb von 20 – 40 s wieder eingestellt. Die in intakten *Arabidopsis* Mesophyll- und Epidermiszellen beobachtete Reaktion ist vergleichbar mit Messungen an Gurkenwurzelzellen (Minorsky and Spanswick 1989). In diesen Experimenten wurde durch Kälte eine relative Depolarisation im Bereich von 135 - 155 mV ausgelöst, ausgehend von Ruhepotentialen zwischen -175 und -225 mV (Minorsky and Spanswick 1989). In einer anderen Arbeit, in der elektrische Signale durch Kälte untersucht wurden, kam es nur zu einer mittleren Depolarisation von 67 ± 3 mV in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen bei einem Ruhepotential von -150 mV (Krol et al. 2004). Diese Werte sind um mehr als die Hälfte kleiner, als die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Depolarisationsamplituden. Dies könnte möglicherweise an dem von Krol et al. verwendeten Puffer liegen, der nur 0,1 mM CaCl_2 und 0,1 mM KCl enthielt. Übereinstimmend mit dieser Vermutung, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass geringe Calciumkonzentration (0,1 mM CaCl_2) zu verringerten Ruhepotentialen führten. Es erscheint möglich, dass die extrazelluläre Ca^{2+} Konzentration einen unmittelbaren Einfluss auf die durch Kälte ausgelöste Depolarisationsamplitude haben kann. Dafür spräche, dass bei Krol et al. (2004) das mittlere Ruhepotential lediglich bei -150 mV lag, während in der vorliegenden Arbeit durchschnittliche Ruhepotentiale von -176 mV (Abb. 4.1) gemessen wurden. Viele Arbeiten belegen, dass die Kälte-induzierte Depolarisation mit einem schnellen und starken Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration einhergeht und durch Calciumchelatoren oder Calciumkanalblocker im Badmedium reduziert wird (Krol et al. 2004; Minorsky and Spanswick 1989; Meyerhoff et al. 2005; Lewis et al. 1997; Lewis and Spalding 1998; Carpaneto et al. 2007). Die Tatsache das Calcium eine entscheidende Rolle bei diesem elektrischen Signal spielt, und dass die Erniedrigung des freien Calciums im Badmedium zu einer reduzierten Depolarisationsamplitude führt (Minorsky and Spanswick 1989), könnte somit erklären warum die Depolarisationsamplitude bei Krol et al. (2004) weniger als halb so groß war, wie in der vorliegenden Arbeit.

4.1.2 Blaublicht führt zu einer spezifischen Depolarisation der Plasmamembran von adulten *Arabidopsis* Mesophyllzellen

Da Channelrhodopsin-2 durch Blaublicht geschaltet wird, wurde neben dem Kältereiz zur Validierung der Responsivität, der Einfluss von Blaublicht auf die elektrischen Eigenschaften der Mesophyll-Plasmamembran untersucht. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass die Depolarisation der Plasmamembran des Hypokotyls dikotyledoner Keimlinge durch Blaublicht ein elektrisches Signal darstellt, welches in direktem Kontext einer physiologischen Reaktion steht (Spalding and Cosgrove 1992, 1989a). Keimlinge zeigen in der Dunkelheit einen etiolierten Phänotyp. Beim Durchbruch des Erdreichs wird die Etiolierung aufgehoben: durch Licht wird das schnelle Streckungswachstum gestoppt und geht in Ergrünung, sowie ein langsames Erstarkungswachstum über. Pflanzen können dabei im Wesentlichen nur Rotlicht und Blaublicht wahrnehmen, wobei sich im Rotlicht das Streckungswachstum im Laufe von 2 -3 h verlangsamt (Meijer 1968). Wird das etiolierte Hypokotyl von Dikotyledonen aus der Dunkelheit heraus jedoch für 20 s mit Blaublicht bestrahlt, so kommt es in der Folge aufgrund eines initialen Stopps des Wachstums zu einer sehr schnellen Verlangsamung des Streckungswachstums (Meijer 1968; Cosgrove 1988; Cosgrove and Green 1981). Blaublicht induziert eine starke Depolarisation der Plasmamembran des Hypokotyls, welche im Gewebe fortgeleitet wird und anschließend zu einem 10 minütigen Wachstumsstopp führt (Spalding and Cosgrove 1989a). Im Keimling erfüllt die Depolarisation der Plasmamembran auf den Blaublichtreiz hin eine wichtige physiologische Signalfunktion, in dem das Ressourcen-zehrende Streckungswachstum eingestellt wird, sobald dieses elektrische Signal generiert und perzipiert wurde (Spalding and Cosgrove 1992, 1989a). Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Arbeit auch in adultem Mesophyll von *Arabidopsis thaliana* durch Blaublicht hoher Intensität eine Depolarisation hervorgerufen werden (Abb. 3.3 A). Dabei zeigte sich die gleiche Kinetik, wie bei den Experimenten mit *Arabidopsis* Hypokotyl von Lewis et al. (1997). Die Literatur beschreibt im Hypokotyl von *Arabidopsis* Depolarisationsamplituden zwischen 39 mV (Lewis et al. 1997) und 50 mV (Cho and Spalding 1996). Im Mesophyll adulter *Arabidopsis* konnte eine durchschnittliche Depolarisationsamplitude von 101 mV gemessen werden (Abb. 3.3 B). Im Unterschied zur Situation im Hypokotyl, war die Blaublicht-induzierte Depolarisation in Mesophyllzellen jedoch eine einmalige Reaktion. Im Hypokotyl lässt sich die Depolarisation nach einer 10 minütigen Latenzzeit wiederholen (Spalding and Cosgrove 1989a). Dies konnte in adultem Mesophyll nicht beobachtet werden (Abb. 3.4). Dort zeigte sich nach 15 min lediglich die, für die Photosynthese typische Depolarisation des Membranpotentials. Da auch die Photosynthese eine transiente Depolarisation des Membranpotentials bewirkt (Elzenga et al. 1995), wurden ebenfalls Versuche zum Einfluss der Photosynthese auf das Membranpotential durchgeführt.

4.1.2.1 Die Blaulicht-abhängige Depolarisation ist unabhängig von der Photosynthese

Wurde Blattgewebe von *Arabidopsis thaliana* für mindestens 15 Minuten in Dunkelheit gehalten, so konnte nach Einschalten einer Lichtquelle eine transiente Depolarisation des Membranpotentials der Mesophyll- und Epidermiszellen beobachtet werden (Abb. 3.2). Durch den Einsatz des Photosyntheseinhibitors DCMU, konnte gezeigt werden, dass diese Membranpotentialänderung an der Plasmamembran mit dem Einsetzen der Photosynthese zusammenhängt. Es ist bekannt, dass die Gabe von DCMU nach einer Inkubationszeit von 10 min die Photosynthese inhibiert (Elzenga et al. 1995; Stahlberg and Van Volkenburgh 1999). Durch die Zugabe von DCMU im laufenden Einstichexperiment wurde die Weißlicht-induzierte Depolarisation verhindert (Abb. 3.5). Gleichzeitig schloss dieses Experiment aus, dass es sich bei der Blaulicht-induzierten Depolarisation allein um einen Photosynthesebeitrag handelte. Auch unter DCMU zeigten die Mesophyllzellen die typische Depolarisation auf Blaulicht (Abb. 3.2, Abb. 3.5). Beim Vergleich der Kinetik der elektrischen Signale in Abwesenheit und Gegenwart von DCMU (Abb. 3.5) wird deutlich, dass die Blaulicht-induzierte Depolarisation eine photosynthetische Komponente hat. Unter Einfluss von DCMU setzt die Depolarisation später ein und fällt in der Amplitude geringfügig schwächer aus (Abb. 3.5, Abb. 3.6). Da die Grundreaktion durch DCMU jedoch nicht inhibiert werden konnte, kann gefolgert werden, dass die Blaulicht-induzierte Depolarisation ein von der Photosynthese unabhängiges Signal darstellt. Diese Beobachtung deckt sich wiederum mit den veröffentlichten Daten zur Blaulicht-induzierten Depolarisation im etiolierten Hypokotyl, in dem noch keine ausgereiften, Photosynthese-fähigen Chloroplasten vorliegen. Die physiologische Bedeutung dieses elektrischen Signals in adulten Blättern kann äußerst vielfältig sein und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Denkbar wäre, dass dieses Signal in der Natur einen Teil der bekannten ‚Schattenvermeidungsreaktion‘ darstellt. Wenn beschattete Blätter durch Auxin-reguliertes Wachstum das Sonnenlicht erreichen, könnte das Blaulicht ein Signal zur Einstellung des Schattenwachstums darstellen. Hier stellt sich ebenfalls die Frage, ob Wurzeln mit einer ähnlichen Depolarisation auf Blaulicht reagieren, wie Blätter, da sie versuchen Licht zu vermeiden und ein negativ phototropes Wachstum aufweisen.

4.1.2.2 Die Blaulicht-abhängige Depolarisation steht nicht im Kontext mit der ROS Produktion und unterscheidet sich in ihrer Kinetik von der Depolarisation durch externe ROS Zufuhr

Im Mesophyll adulter Pflanzen konnte die Blaulicht-abhängige Depolarisation nur durch hochenergetisches Blaulicht beobachtet werden und die Zellen mussten mindestens 40 s bestrahlt werden. In den Experimenten am Hypokotyl reichten häufig 7 s mit einer Photonenflussdichte von $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, um eine Depolarisation zu induzieren (Spalding and Cosgrove 1989a). Dabei konnten Spalding und Cosgrove (1989a) beobachten, dass 7 s $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zu einer langsamer einsetzenden Reaktion mit geringerer Amplitude (37

± 7 mV) führte, 7 s mit $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ jedoch zu einer schneller einsetzenden Reaktion mit einer deutlich größeren Amplitude (94 ± 5 mV). Während das etiolierte Hypokotyl kaum Licht-absorbierende Farbstoffe wie Chlorophyll besitzt, welche zu Lichtverlusten führen, ist im Blattgewebe von *Arabidopsis* jedoch eine große Menge lichtabsorbierender Pigmente vorhanden. Darüber hinaus war in den durchgeführten Experimenten zu beobachten, dass jüngere Pflanzen auf kürzere Belichtungszeiten eher mit einer Depolarisation reagierten, als ältere Pflanzen ein bis zwei Wochen vor Blühbeginn (Daten nicht gezeigt). Da die Pflanzen mit Licht einer hohen Intensität behandelt wurden, um die Reaktion auszulösen, musste auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Auslöser der Reaktion in Betracht gezogen werden. Es ist bekannt, dass Starklichtereignisse zur Produktion von ROS führen können und dass für die Produktion von ROS während der hypersensitiven Reaktion (HR) Licht benötigt wird (Torres et al. 2006; Suzuki et al. 2012). ROS spielen in vielen Bereichen der pflanzlichen Physiologie eine entscheidende Rolle. ROS sind auch an der Generierung und Signaltransduktion in Pflanzen beteiligt, vor allem bei der systemischen Pathogenantwort (Torres et al. 2006; Gilroy et al. 2016). Eingehend erforscht ist die Produktion von ROS nach Kontakt der Pflanze mit Herbivoren und Pathogenen im Rahmen der pflanzlichen Immunantwort (Torres et al. 2006; Wu and Baldwin 2009). In dieser Arbeit wurde im Einstich an *Arabidopsis* Mesophyll ohne Epidermis die Produktion von H_2O_2 mit einer Platinelektrode gemessen, während gleichzeitig durch die Gabe von 60 s BL, die Blaulicht-induzierte Depolarisation beobachtet wurde. Es konnte an der Zelloberfläche kein Anstieg der ROS gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine längere Belichtung von mehreren Minuten führte nicht zur Abgabe von ROS an der Zelloberfläche. In zahlreichen publizierten Arbeiten wurde der Einfluss einer externen Zugabe von H_2O_2 und die physiologische Reaktion der Pflanze beschrieben. In den meisten Arbeiten wurden Konzentrationen im Bereich zwischen 1 - 10 mM H_2O_2 (5 mM (Pei et al. 2000), 0,3 - 24 mM (Maffei et al. 2006), 0,001 - 10 mM (Demidchik et al. 2007)). eingesetzt. Häufig wurden sehr hohe, und damit unphysiologische, Konzentrationen gewählt (15 mM (Maffei et al. 2006) und 10 mM (Demidchik et al. 2007)). Der physiologische Bereich der Generation von ROS liegt deutlich niedriger. So konnten Guzel Deger et al. (2015) nach der Gabe von 20 nM flg22 parallel zur Depolarisation des Membranpotentials mit einer ROS-sensitiven Elektrode den Anstieg der H_2O_2 Konzentration an der Oberfläche der Mesophyllzellen im Maximum von $15 \Delta\mu\text{M} \text{H}_2\text{O}_2$ beobachten.

Als Kontrollexperiment wurde in dieser Arbeit die Änderung des Membranpotentials von *Arabidopsis* Mesophyllzellen ohne Epidermis durch die Zugabe von 50 μM , 500 μM sowie 1 mM H_2O_2 gemessen. Dabei wurden mit 500 $\mu\text{M} \text{H}_2\text{O}_2$ reproduzierbare Ergebnisse erhalten (Abb. 3.7 A), welche zu einer deutlichen mittleren relativen Depolarisation von $67 \pm 7,2$ mV (Abb. 3.7 A und B) führten. Gleichzeitig konnten die Zellen, ohne Auswaschen oder Katalasezusatz, wieder das Ruhepotential vor H_2O_2 Zugabe erreichen.

Die mit H_2O_2 erzielte Depolarisationsamplitude lag deutlich unter der, welche durch einen langen Blaulicht-Puls erzielt wurde (101 mV). Die H_2O_2 – induzierte Depolarisationskinetik war deutlich langsamer und unterschied sich stark von der Kinetik der Blaulicht-induzierten Depolarisation. Nach Zugabe von H_2O_2 setzte die Depolarisation innerhalb einer Minute ein, setzte sich dann oft biphasisch fort und erreichte die Maximalamplitude. Nach Applikation von H_2O_2 vergingen durchschnittlich $8,8 \pm 1,1$ min bevor die Repolarisation einsetzte (Abb. 3.7 B). Bis 80 % des ursprünglichen Ruhepotentials wieder erreicht wurden vergingen durchschnittlich $27,3 \pm 1,8$ min (Abb. 3.7 B). Zusammen mit der Beobachtung, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen kein H_2O_2 an der Zelloberfläche gemessen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die Blaulicht-induzierte Depolarisation ROS-unabhängig ist.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass Kältestimuli ein geeignetes Verfahren zur experimentellen Validierung der Mesophyllzellen Responsivität darstellen und dass Blaulichtstimuli – unterhalb der Reizschwelle der Aktivierung endogener elektrischer Antworten – genutzt werden könnten, um Blaulicht-aktivierbare Channelrhodopsine in Mesophyllzellen zu schalten.

4.2 Channelrhodopsin-2 als optogenetisches Werkzeug in Pflanzen

Channelrhodopsin-2 (ChR2) ist ein Licht-gesteuerter Kationenkanal aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Seit 2005 wurde ChR2 in der Neurobiologie als wichtiges optogenetisches Werkzeug etabliert und stellte das erste optogenetische Werkzeug überhaupt dar (Nagel et al. 2005a; Method of the Year 2010 2010). Im Rahmen ihrer Doktorarbeit konnte M. Baumann zeigen, dass ChR2-Mutanten prinzipiell in Pflanzen funktionell exprimiert werden können, der ChR2-WT jedoch nur in Protoplasten (Baumann 2013). Des Weiteren führte sie eine grundlegende Charakterisierung verschiedener ChR2-Varianten in transienten Expressionssystemen durch, überwiegend in *N. benthamiana* (Baumann 2013). Dabei lag der Schwerpunkt auf den ChR2-Punktmutanten C128A, C128T und D156A. Baumann fand ebenfalls heraus, dass die stabile Expression von ChR2 in Arabidopsis und *N. benthamiana* problembehaftet war. Dennoch gelang es E. Reisberg und D. Waffler im Anschluss an die Arbeit von M. Baumann mehrere stabile Arabidopsis Linien zu generieren. Diese Pflanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit eingehend charakterisiert und für weiterführende Experimente genutzt. Die transiente Expression von ChR2 ist hingegen meist möglich, wie schon M. Baumann zeigen konnte.

4.2.1 *Nicotiana benthamiana* eignet sich als Test- und Modellsystem für Channelrhodopsin-2 in Pflanzen

Die transiente Expression von Genen in *N. benthamiana* nach vorangegangener Agrobakterien vermittelter Transformation ist ein effizientes System, um die Lokalisation und Funktion von (Fremd)Proteinen in Pflanzen zu untersuchen (Yang et al. 2000; Kapila et al. 1997). Auch in dieser Arbeit wurde zunächst die transiente Expression von ChR2 in *N. benthamiana* eingesetzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die transiente Expression von ChR2 im Tabak nicht mit jedem Vektor gleichermaßen funktionierte. Von den ChR2-Varianten, welche unter Kontrolle des 2xCaMV35S-Promoters und CaMV35S-Terminator (pCAMBIA Vektor) exprimiert wurden, zeigten ChR2-C128A und ChR2-L132C transformierte Pflanzen nach zwei Tagen Expression deutliche Nekrosen (Abb. 3.11). Die mit ChR2-C128T transformierten Pflanzen zeigten lediglich die nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation typischen leichten Chlorosen. Die Lokalisation der ChR2-YFP Fusionsproteine war in den Pflanzen mit Nekrosen nicht möglich, da mit dem LSM keine Fluoreszenz detektiert werden konnte (Abb. 3.11). Auch konnte keine Depolarisation des Membranpotentials in diesen Pflanzen im Einstich gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Es wurden daraufhin ChR2-Varianten im pMCD32-Vektor unter Kontrolle des 2xCaMV35S -Promoters und des NOS-Terminators in *N. benthamiana*

exprimiert. Mit diesen Konstrukten traten keine Nekrosen auf, sondern nur die typischen Chlorosen. Die infiltrierten Pflanzen wurden elektrophysiologisch mittels der Ableitung von Oberflächenpotentialen und durch die Ableitung des Membranpotentials im Einstich untersucht. Es zeigte sich, dass vor allem ChR2-C128T und -XXL funktional exprimiert wurden. ChR2-C128T diente als Kontrolle, da diese Variante bereits eingehend von M. Baumann in *N. benthamiana* untersucht worden war. Die von M. Baumann ermittelten Werte für die Depolarisationsamplitude, Repolarisationszeit und -geschwindigkeit konnten auch hier im Einstich verifiziert werden (Abb. 3.13). Für Pflanzen, die ChR2-C128T transient exprimierten, konnten darüber hinaus erfolgreich Blaulicht-induzierte Membranpotentialänderungen mit Hilfe von Oberflächenpotentialelektroden abgeleitet werden (Abb. 3.12). Daneben gelang es auch einzelne Einstichmessungen von ChR2-L132C durchzuführen (Abb. 3.14), welche sich jedoch nicht zuverlässig wiederholen ließen. Die zuverlässigste Expression lieferte die ChR2-XXL Variante, auch als ChR2-XXL bekannt (Duan et al. 2019; Dawydow et al. 2014), für die jedoch bis dato keine Charakterisierung in der Pflanze vorgenommen worden war. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ChR2-XXL eingehend elektrophysiologisch untersucht.

ChR2-XXL zeigte im Tabakexpressionssystem eine einzigartige Kinetik. Die mit dieser Mutante in Pflanzen zu messende Depolarisationsamplitude war die größte aller untersuchten ChR2 Varianten. Nach dem Einschalten des Blaulichts depolarisierte ChR2-XXL das Membranpotential mit einer Geschwindigkeit von $154,1 \pm 25,9 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (Abb. 3.17 B) um durchschnittlich $109,5 \pm 3,9 \text{ mV}$ (Abb. 3.15 A und B, Abb. 3.17 A). Die Spitzendepolarisation wurde dabei nur für Bruchteile einer Sekunde gehalten und repolarisierte unter Blaulicht auf ein Depolarisationsplateau. Dieses Plateau lag bei $82 \pm 2,8 \text{ mV}$ (Abb. 3.15 A und B) und bezogen auf, das absolute Membranpotential, bei $-78 \pm 2,8 \text{ mV}$ (Daten nicht gezeigt). Durch dieses Verhalten wiesen die aufgezeichneten Membranspannungsverläufe eine typische Spitze – in der Art eines Überschwingens – auf. Nach Ausschalten des Blaulichts erfolgte die Repolarisation mit einer erst langsamen, dann schneller werdenden biphasischen Kinetik (Abb. 3.15 B, Abb. 3.16). Die Repolarisationsdauer betrug im Schnitt $250,3 \pm 19,1 \text{ s}$ (Abb. 3.17 C). Daraus ergab sich, ausgehend vom Depolarisationsmaximum, eine Repolarisationsgeschwindigkeit von $0,45 \pm 0,03 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (Abb. 3.17 D). Die Repolarisationsdauer und Kinetik wird von zwei verschiedenen Faktoren beeinflusst. Zum einen durch die Schließkinetik des Channelrhodopsins und zum anderen durch die intrinsische Ausstattung der Zellen mit Ionenkanälen und -pumpen. Die Schließkinetik des wildtypischen ChR2 ist sehr schnell, eine einzelne Punktmutation kann sehr starke Auswirkungen auf die verschiedenen biophysikalischen Eigenschaften haben, unter anderem auch auf die Schließkinetik. Es ist für die Aminosäure Asparaginsäure an Position 156 im ChR2 bekannt, dass eine Mutation zu Alanin (A), Cystein (C) oder Histidin (H) zu starken Änderungen in den biophysikalischen Eigenschaften des Proteins führt (Bamann et al. 2010a; Dawydow et al.

2014; Duan et al. 2019). Im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten zeigen alle drei Punktmutationen eine stark verlängerte Schließkinetik. D156H und D156C zeigen dort auch größere Ströme als der ChR2-Wildtyp. Außerdem benötigen die ChR2 Varianten D156H und D156C für Aktivierung weniger Licht (Bamann et al. 2010a; Dawydow et al. 2014). Da im Mesophyll der Pflanzen durch Plasmodesmata eine elektrische Verbindung zwischen allen Zellen besteht, ist es dort nicht möglich, die Spannung experimentell zu klemmen und die durch das Blaulicht induzierten ChR2-vermittelten Ströme im Voltage-Clamp zu messen. In diesem Gewebe ist es jedoch möglich mit einem Blaulicht-Stimulus im Current-Clamp die Änderung des Membranpotentials in einem ‚elektrisch gekoppelten‘ Ensemble von Mesophyllzellen zu verfolgen. Der direkte Vergleich zwischen den Daten aus den Oozytenexperimenten und dem Einstich ins Mesophyll war also nicht möglich. Aus den Oozyten ist jedoch bekannt, dass die Schließkinetik von ChR2-D156C (XXL) monophasisch ist und $\tau_{\text{off}} 71 \pm 2,9$ s beträgt (Dawydow et al. 2014; Duan et al. 2019). Für die Experimente in den Pflanzen kann daraus geschlossen werden, dass während dieser Zeit noch immer Kationen den ChR2-Kanal passieren und damit das Membranpotential in einem depolarisierten Zustand halten. Aufgrund der ChR2-XXL Schließkinetik wird der Einfluss des ‚Restkationenstroms‘ jedoch mit zunehmender Repolarisationsdauer immer geringer. Eine unmittelbare Übertragung der ChR2-XXL Deaktivierungskinetik wäre jedoch nur richtig unter der Annahme, dass die biophysikalischen Eigenschaften von ChR2-XXL in der pflanzlichen Plasmamembran identisch zu den Eigenschaften des Proteins in den Oozyten sind bzw. dass die pflanzenspezifische Zusammensetzung der Plasmamembran die biophysikalischen Eigenschaften des ChR2 nicht beeinflusst. Genauerem Aufschluss darüber könnten nur durch Zwei-Elektroden-Spannungsklemmemessungen an elektrisch isolierten pflanzlichen Zellen, wie z.B. Schließzellen oder Pollenschläuchen liefern. Unter der Annahme, dass die biophysikalischen ChR2-XXL Eigenschaften gleich wären, ist die Repolarisationsphase in den ersten 71 s durch die Restkationenströme und gleichzeitig durch die Rückstellkräfte der pflanzlichen Zelle beeinflusst. Nach dem Verstreichen dieser Zeit, ist die verbliebene Depolarisation mutmaßlich vor allem auf durch ChR2 verschobene Ladungen zurückzuführen, die durch Pflanzen-endogene Transportprozesse wieder ausgeglichen werden müssen. Mit einer Dauer von ca. 260 s dauerte die Repolarisation in Tabak Mesophyllzellen sehr lange, aus Abb. 3.15 B kann abgelesen werden, dass 71 s nach Ausschalten des Blaulichts im Mittel erst auf $62 \pm 4,6$ mV repolarisiert worden war. Dieser Wert muss der Repolarisationskinetik in *A. thaliana* gegenübergestellt werden (4.2.4).

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass das transiente Expressionssystem *N. benthamiana* den Vorteil einer schnellen, zuverlässigen Validierung der Funktion und Lokalisation der ChR2 Proteine bietet. Darüber hinaus ermöglicht es die Co-Expression ChR2 mit pflanzlichen Ionenkanälen und -pumpen. Dadurch könnte der Einfluss einzelner Komponenten auf die Repolarisation untersucht werden. Nachteilig an

der transienten Expression im Tabak ist, dass über die intrinsischen Ionenkanäle und -pumpen in *N. benthamiana* weniger Informationen vorliegen, als es bei der Modellpflanze Arabidopsis der Fall ist. Dies erschwert es, die Repolarisationskinetik im Tabak im Detail zu bewerten. Weiterführende Experimente am ChR2 wurden daher an stabil transformierten Arabidopsis Pflanzen durchgeführt.

4.2.2 Channelrhodopsin-2 lässt sich stabil in *Arabidopsis* implementieren

Die eingehende Charakterisierung dieser stabilen ChR2 exprimierenden Arabidopsis war ein Schwerpunkt dieser Arbeit. Es existierten drei verschiedene ChR2 Varianten, die stabil in Arabidopsis exprimieren, ChR2-C128T, D156A und D156C (XXL). Alle drei wiesen eine geringe, aber detektierbare YFP-Fluoreszenz auf.

Für Arabidopsis ChR2-D156A erfolgte keine eingehende Untersuchung. Zwar wurde ChR2-D156A funktionell in Mesophyllzellen exprimiert, jedoch zeigten erste Messungen, dass die Depolarisationsamplitude mit 25 mV gering war. Übereinstimmend mit der extrem verlangsamten Schließkinetik dieser Mutante, welche im Vergleich zum ChR2-WT mehr als 100 mal langsamer ist, benötigten Blaulicht-stimulierte Zellen, die diese Variante exprimierten, für die Repolarisation mehr als 10 min (Abb. 4.5) (Bamann et al. 2010a). Die ChR2-Varianten C128T und XXL wurden eingehender Charakterisierung unterzogen. ChR2-C128T zeigte eine schnelle Depolarisation ($3,7 \pm 0,2$ s, SE, Abb. 3.21 D) mit mittlerer Amplitude $40 \pm 4,1$ mV (Abb. 3.21 A, B und C), aber rascher Repolarisation ($7,5 \pm 0,75$ s, Abb. 3.21 C). Daraus ergab sich eine Repolarisationsgeschwindigkeit von $-5,5 \pm 0,7$ mV \cdot s $^{-1}$ (Abb. 3.21 E). In der Literatur finden sich zur Schließkinetik des ChR2-C128T in Oozyten Werte von τ_{off} 1,5 s (Stehfest et al. 2010). Unter der Annahme ähnlicher Deaktivierungskinetiken in Oozyten und Arabidopsis Mesophyllzellen, würden bereits nach 2 s keine Kationen mehr durch ChR2-C128T in die Zelle gelangen. Bereits 2 s nach Ende des Blaulichtpulses hatten die Zellen ein mittleres Membranpotential von $-145 \pm 5,8$ mV, bzw. waren noch um $16,8 \pm 3,6$ mV depolarisiert (Daten nicht gezeigt). Eine ‚überschießende‘ Hyperpolarisation des Membranpotentials trat bei ChR2-C128T nur in geringem Umfang auf (Abb. 3.21 B). Da die durch ChR2-C128T vermittelten Depolarisationen in ihrer Amplitude deutlich geringer waren, als für viele physiologische elektrische Signale in Pflanzen beobachtet, wurde diese Variante für weiterführende Experimente nicht in Betracht gezogen. Ihr einziger Vorteil wäre die vergleichsweise schnelle Schließkinetik, die einen Nachstrom von Kationen nach dem Ende der Belichtung minimieren würde.

In den Versuchen mit *N. benthamiana* hatte sich die ChR2-Variante D156C (XXL) als vielversprechend gezeigt, da sie sehr zuverlässig in der Expression war und eine hohe Depolarisationsamplitude aufwies. Für diese Variante stand auch eine stabile homozygote

Arabidopsis Linie zur Verfügung. Die erfolgreiche elektrophysiologische Charakterisierung dieser Pflanze zeigte als Antwort auf einen 5 s Blaulichtstimulus eine rasche Depolarisation des Membranpotentials um $95 \pm 2,3$ mV (Abb. 3.24 B) (von -175 mV auf $-80 \pm 3,3$ mV). Die typische Kinetik mit Spitzen- und Plateaudepolarisation, die im Tabak zu beobachten war fehlte (Abb. 3.22). Nach dem Ende des Blaulichtpulses kam es zum sofortigen Einsetzen der Repolarisation, für die $83 \pm 4,5$ s (Abb. 3.24 B) benötigt wurden. Die resultierende Repolarisationsgeschwindigkeit lag bei $-1,2 \pm 0,1$ mV \bullet s $^{-1}$ (Abb. 3.24 C). Im Vergleich zu ca. $0,5$ mV \bullet s $^{-1}$ war die Repolarisationsgeschwindigkeit damit mehr als doppelt so schnell wie zuvor in *N. benthamiana* gemessen. Trotz der vergleichsweise langsamen Deaktivierungskinetik des ChR2-XXL (71 s in Oozyten), waren Arabidopsis Mesophyllzellen in der Lage, den durch ChR2-XXL Restkationentransport zu kompensieren und das Membranpotential zu repolarisieren. Bereits 71 s nach Ende des Blaulichtpulses hatten die Pflanzen im Schnitt ein Membranpotential von $-161 \pm 4,2$ mV erreicht, das heißt die Plasmamembran war zu diesem Zeitpunkt noch lediglich um $15 \pm 3,9$ mV depolarisiert. Dieser Wert unterscheidet sich stark zu den vergleichbaren Werten im Tabak (eine ausführliche Betrachtung beider Systeme findet sich in Kap. 4.2.4.) Nachdem in Arabidopsis das Ruhepotential wieder erreicht wurde folgte typischerweise eine Phase in der das Membranpotential transient hyperpolarisierte ($-10 \pm 1,9$ mV, Abb. 3.24 D). Diese Hyperpolarisation kann vermutlich auf die Überaktivierung der Rückstellkräfte der Zelle zurückgeführt werden, denn nach einer Wartezeit von 10 min wurde in fast allen Fällen das vorherige Ruhepotential wiedereingestellt. Außerdem erwiesen sich die ChR2-vermittelten Depolarisationen als reproduzierbar und mit unterschiedlich langer Blaulichtdauer war es möglich das Membranpotential länger in einem depolarisierten Zustand zu klemmen Abb. 3.27. Die stabilen Arabidopsis ChR2-XXL wurden nach Abschluss der Charakterisierung für weiterführende Experimente ausgewählt, denn die Expression war zuverlässig, es wurde eine ausreichende Depolarisationsamplitude durch eine Belichtung mit 5 s BL erzielt und die Repolarisation erfolgte in einem optimalen Zeitfenster.

Es konnte mit ChR2-XXL in Arabidopsis ebenfalls gezeigt werden, dass die Blaulicht-induzierte ChR2-vermittelte Depolarisation mit hoher Wahrscheinlichkeit durch den Einstrom von H⁺ erfolgt. Dies konnte zum einen von Dr. Shouguang Huang durch Voltage-clamp Messungen an Schließzellen von Arabidopsis ChR2-XXL bei verschiedenen extrazellulären pH Werten gezeigt werden. Bei pH 7,5 konnte kein Blaulicht-induzierter ChR2-vermittelter Strom mehr gemessen werden. Auch zeigten seine Versuche, dass in Pflanzen durch ChR2-XXL sog. Photoströme gemessen werden können (Reyer et al. 2020). Ein weiterer Beleg für die ChR2-XXL vermittelte Depolarisation durch den Einstrom von H⁺ waren non-invasive scanning ion-selective (SISE) microelectrodes Messungen durch Dr. Sönke Scherzer an Arabidopsis mit ChR2-XXL Expression. Hierbei

konnte ein Abfall der extrazellulären Protonenkonzentration durch den 5 s Blaulichtpuls gemessen werden (Reyer et al. 2020).

4.2.3 Allgemeine Eigenschaften von ChR2 in Pflanzen

Für alle untersuchten ChR2-Varianten zeigten sich in *A. thaliana* und *N. benthamiana* gemeinsame Eigenschaften, die über die biophysikalischen Grundeigenschaften des ChR2 hinausgingen, aber von großer Relevanz für weiterführende Versuche waren. Dazu gehörten die Reproduzierbarkeit der Depolarisation bei repetitiven Blaulicht-Pulsen an der gleichen Probe, die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Proben, die Dauer und Intensität der erforderlichen Blaulichtpulse, das Wachstum im Rotlicht und die Retinalabhängigkeit des Channelopsins.

Unter der Berücksichtigung einer gewissen Latenzzeit ließ sich die Depolarisation des Membranpotentials durch ChR2-C128T und -XXL repetitiv und beliebig oft durchführen (Abb. 3.26). Die benötigte Latenzzeit war in erster Linie abhängig von der verwendeten ChR2-Variante und deren Photozyklus. Außerdem war eine vollständige Depolarisation mit vergleichbarer Amplitude erst nach der vollständigen Repolarisation des Membranpotentials wieder möglich. Dabei war die benötigte Latenzzeit für die ChR2-C128T Variante kürzer als bei ChR2-XXL, und in Arabidopsis kürzer als in *N. benthamiana*. Ein ‚Run-down‘ der ChR2 Aktivität konnte selbst in kontinuierlich durchgeführten Experimenten von 5 h Messdauer nicht beobachtet werden. Diese positive Eigenschaft des ChR2 ermöglicht es, im pflanzlichen System sehr reproduzierbar in den gleichen Zellen Depolarisationen herbeizuführen und das ‚elektrische Signaling‘ über einen langen Zeitraum zu studieren. Die hohe Reproduzierbarkeit der durch das ChR2 hervorgerufenen Depolarisation erlaubte es, Datensätze biologischer Replikate aus verschiedenen Jahren (2017 - 2020) miteinander zu vergleichen. Die Reproduzierbarkeit der ChR2 vermittelten Depolarisationen konnte durch Optimierung der im Experiment verwendeten Lichtintensitäten optimiert werden. Innerhalb der gleichen Proben fiel die Amplitude der Depolarisation tendenziell mit der maximal möglichen Intensität (1000 mA apparente LED Leistung $\hat{=} 17,5 \text{ mW/mm}^2$) höher aus, als mit der niedrigsten möglichen apparenten LED-Leistung (200 mA LS). Der absolute Unterschied schwankte von Pflanze zu Pflanze und war unter anderem auch von der Position des Lichtleiters abhängig. Die meisten Versuche wurden bei der halbmaximalen möglichen Leistung der Anregungslichtquelle durchgeführt (500 mA LS).

Da aus Vorversuchen von M. Baumann und E. Reisberg bekannt war, dass es zu einem besonders starken Gen-Silencing bei Arabidopsis mit ChR2-Konstrukten kommen konnte, wurden alle Pflanzen unter Rotlichtbedingungen kultiviert. Diese Maßnahme sollte verhindern, dass die Pflanzenzellen durch möglicherweise aktives ChR2 geschädigt

werden und so eher ein Gen-Silencing herbeiführen. Wie zu erwarten, führten die Rotlichtbedingungen zu einem Wachstumsphänotyp, der sich jedoch nicht auf das gemessene Ruhepotential auswirkte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Expression und Aktivität von Ionenkanälen und -pumpen nur geringfügig durch die Lichtbedingungen beeinflusst wurden. Wenn im Rotlicht angezogene Versuchspflanzen ins Weißlicht transferiert wurden, konnten keine offensichtlichen Phänotypen beobachtet werden. Die durch das ChR2-XXL ausgelöste Depolarisationsamplitude war unter diesen Bedingungen zwar geringfügig niedriger, jedoch aufgrund der großen Streuung im Experiment nicht aussagekräftig (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung, dass im Weißlicht keine Beeinträchtigung der Aktivität des ChR2s gemessen werden konnte, könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Channelopsin für seine aktive Form, das Channelrhodopsin, den Cofaktor Retinal benötigt, Pflanzen jedoch nicht über nennenswerte endogene Retinalmengen verfügen (interne Analysen). Die externe Zugabe von Retinal vor den Messungen war deshalb eine essentielle Grundlage für die funktionelle Rekonstitution dieses optogenetischen Werkzeugs. Diese Notwendigkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit eingehend anhand der ChR2-XXL Variante in Arabidopsis untersucht.

M. Baumann hatte für die ChR-C128A Variante im Tabak bereits gezeigt, dass die Zugabe von Retinal für die ChR2 Funktion notwendig ist. Die ChR2-XXL Variante benötigt geringere Retinalkonzentrationen zur vollen Funktionsfähigkeit als der ChR2-WT (Dawydow et al. 2014). Bei stabilen Arabidopsis ChR2-XXL konnte ohne Retinalzugabe nur eine schwache Depolarisation um 14 mV beobachtet werden, während die Zugabe von 100 μ M Retinal 2 h vor Messbeginn zu einer Depolarisation von 92 mV führten (Abb. 3.19 A und B). Darüber hinaus wurde der Verlauf der Rekonstitution des Apoproteins Channelopsin mit seinem Cofaktor Retinal *in vivo* verfolgt (Abb. 3.20 A). Bereits wenige Minuten nach der Zugabe von Retinal konnte ein Zuwachs der Depolarisationsamplitude beobachtet werden, welche nach 105 min konstant bei 75 mV blieb (Abb. 3.20 A und B). In diesem Versuchsansatz benötigte das ChR2 weniger als 2 h zur vollständigen bzw. maximal möglichen Rekonstitution. Die Zunahme der Amplitudenhöhe konnte durch einen Hillplot beschrieben werden (Abb. 3.20 B). Die in diesem Experiment erzielten Werte lagen etwas hinter den sonst gemessenen durchschnittlichen Depolarisationsamplituden, jedoch befanden sie sich im Rahmen der üblichen Streuung.

4.2.4 Unterschiede zwischen ChR2 in *A. thaliana* und *N. benthamiana*

Die Auswertungen der beiden ChR2-Mutanten -C128T und -XXL in Tabak und Arabidopsis im Einstich ergab, dass sich die Charakteristiken der beiden Varianten je nach pflanzlichem Expressionssystem deutlich unterschieden. Aus diesem Grund wurden die Kenngrößen der beiden Varianten in beiden Expressionssystemen miteinander verglichen.

Ein wichtiger Faktor der sich zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* unterschied, war das durchschnittliche im Einstich gemessene Ruhepotential. Dies lag in ChR2-XXL exprimierenden Mesophyllzellen im Mittel bei -182 ± 2 mV für *A. thaliana* Col0 Aequirin und bei $-170,4 \pm 2,7$ mV für *N. benthamiana* (Abb. 4.1 B) und war somit hoch signifikant niedriger im Tabak ($p = 0,001$). Das Ruhepotential wird in pflanzlichen Zellen überwiegend durch die Aktivität der Protonen-ATPasen sowie einer Kalium Hintergrundleitfähigkeit bestimmt (Brownlee 2002; Bisson and Walker 1981). Das niedrigere Ruhepotential in *N. benthamiana* könnte also ein Hinweis darauf sein, dass die H^+ -ATPase in Tabak weniger aktiv ist, als in Arabidopsis bzw. dass die Hintergrundleitfähigkeit für Kalium im Tabak höher ist als in Arabidopsis.

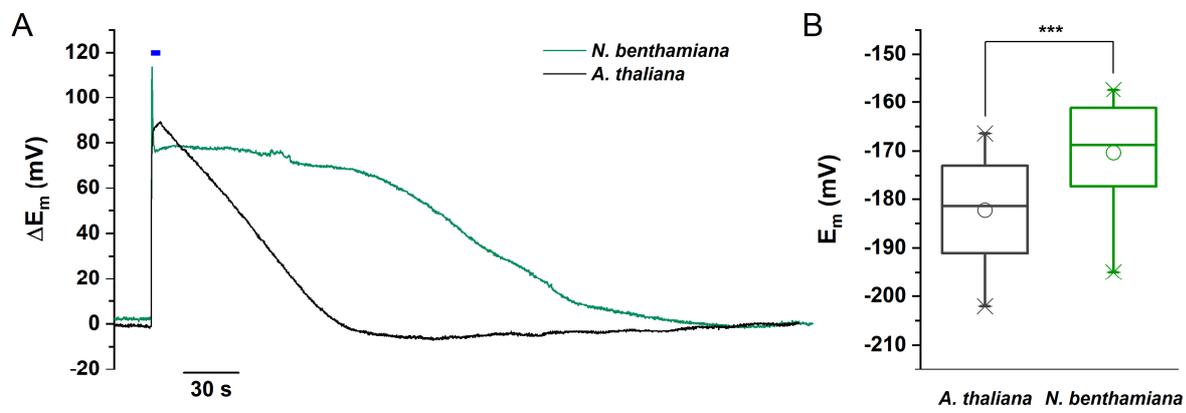


Abb. 4.1: Die Repolarisation des Membranpotentials ist in transient ChR2-XXL exprimierenden Tabak Mesophyllzellen langsamer als in Arabidopsis ChR2-XXL, außerdem ist das Ruhepotential von Arabidopsis Mesophyllzellen niedriger als von Tabak Mesophyllzellen

(A) Repräsentative, überlagerte Aufzeichnung des normierten Membranpotentials nach einem 5 s Blaulichtpuls von Arabidopsis mit ChR2-XXL Expression (graue Kurve) und Tabak mit transienter ChR2-XXL Expression (grüne Kurve) gemessen mit der Einstichmethode in Mesophyllzellen. In Arabidopsis wurde eine Depolarisation um 89 mV ausgelöst und das Membranpotential repolarisierte in 101 s vollständig. Im Tabak zeigte sie die typische ‚Peakdepolarisation‘ um 114 mV mit einem anschließenden Depolarisationsplateau bei 84 mV. Die Repolarisation erfolgte ausgeprägt biphasisch in 295 s. (B) Statistische Auswertung der Ruhemembranpotentiale zeigt, dass Arabidopsis (graue Box) mit -182 ± 2 mV (SE, $n = 25$, Minimum -202 mV, Maximum -167 mV und Median -181 mV) ein hoch signifikant niedrigeres Ruhepotential aufwies als Tabak (grüne Box) mit $-170 \pm 2,7$ mV (SE, $n = 16$, Minimum -194 mV, Maximum -157 mV und Median -168,6 mV), t -Test, $p = 0,001$.

Beim direkten Vergleich von Rohspuren der ChR2-XXL Mutante in Arabidopsis und *N. benthamiana* wurde deutlich, dass sich sowohl die Depolarisation, als auch die Repolarisation in ihren Kinetiken in beiden Pflanzenexpressionssystem unterschieden (Abb. 4.1 A). Die initiale Depolarisation war in der ersten Sekunde nach Blaulicht-Stimulation ähnlich. In *N. benthamiana* konnte dann aber eine Spitzendepolarisation beobachtet werden, die nach weniger als 2 s in ein Depolarisationsplateau überging. In Arabidopsis hingegen wurde nach 2 s eine spontanen Abnahme der Depolarisationsgeschwindigkeit verzeichnet. Das Membranpotential depolarisierte nur noch wenig und die Repolarisation trat erst mit Ausschalten des Blaulichts ein (Abb. 4.1

A). Im Vergleich zum Tabak verlief die Repolarisation im Arabidopsis Mesophyll deutlich schneller und war in ihrer Kinetik nur leicht biphasisch. Im Tabak hingegen, war die Repolarisation durchweg biphasisch und verlief erst mit langsamer Zeitkonstante, welche dann schneller wurde (Abb. 4.1 A). Tabak Mesophyllzellen erreichten aber zu keiner Zeit die Repolarisationsgeschwindigkeit, welche in Arabidopsis zu beobachten war.

Ein Vergleich der Kenngrößen Depolarisationsamplitude, Repolarisationsdauer und die daraus resultierende Repolarisationsgeschwindigkeit ergab für die beiden untersuchten Mutanten C128T und XXL (Abb. 4.2) ein einheitliches Bild: Die Depolarisationsamplitude und Repolarisationsdauer in Arabidopsis war bei beide Mutanten geringer, und die daraus resultierende Repolarisationsgeschwindigkeit war deutlich schneller.

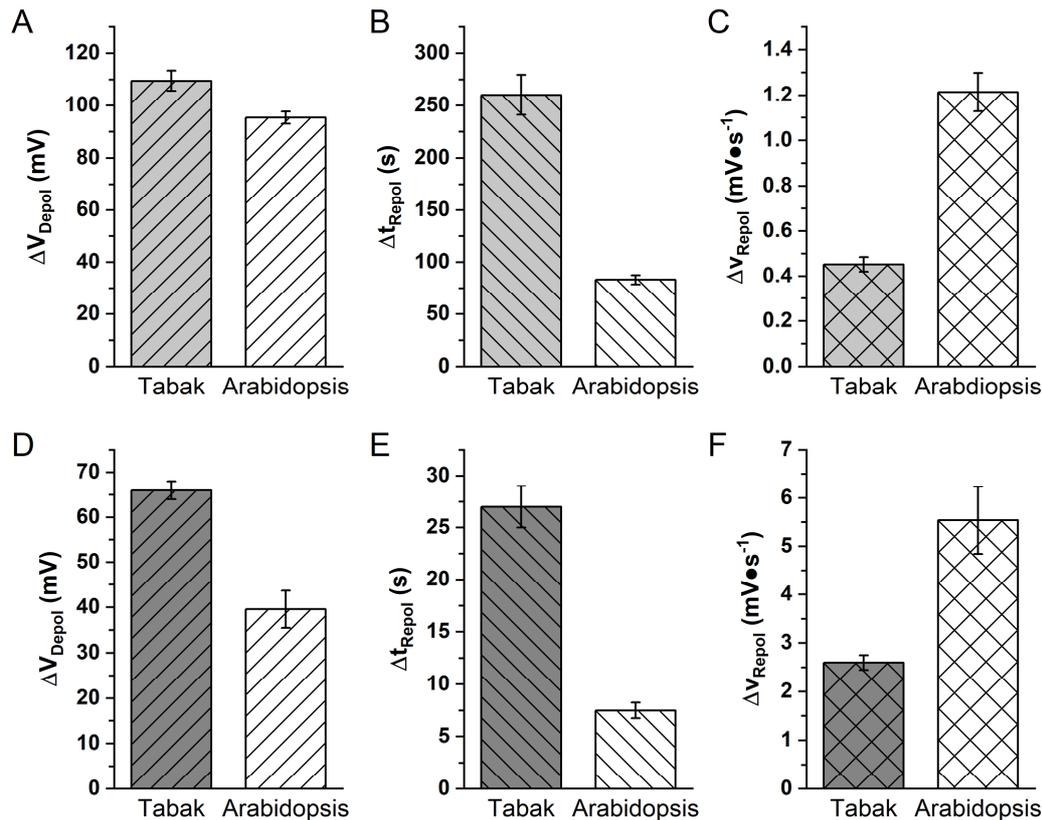


Abb. 4.2: In Mesophyllzellen Tabak mit transienter Expression von Chr2-C128T bzw. Chr2-XXL ist die Depolarisationsamplitude größer, aber die Repolarisation deutlich langsamer, als in Arabidopsis Mesophyllzellen der gleichen Chr2-Variante

(A-C) Statistische Auswertung der Charakteristika der Depolarisation und Repolarisation vermittelt durch Chr2-C128T bei transienter Expression in Tabak (graue Balken) und stabiler Expression in Arabidopsis nach der Gabe von 15 s Blaulichtpulsen (Tabak, Daten von M. Baumann, SE, $n = 21$) bzw. 5 s Blaulichtpulsen (Arabidopsis, SE, $n = 7$). (A) In Tabak war die maximale Depolarisation mit 66 ± 2 mV 1,65 mal höher als in Arabidopsis mit $40 \pm 4,1$ mV. (B) In Tabak war die Repolarisationsdauer jedoch mit 27 ± 2 s 3,6 mal langsamer als in Arabidopsis mit $7,5 \pm 0,7$ s. (C) Die resultierende Repolarisationsgeschwindigkeit war somit in Tabak $2,6 \pm 0,15$ mV·s⁻¹ und damit um den Faktor 0,47 langsamer als in Arabidopsis mit $5,5 \pm 0,7$ mV·s⁻¹. (D-E) Statistische Auswertung der Charakteristika der Depolarisation und Repolarisation vermittelt durch Chr2-XXL bei transienter Expression in Tabak (graue Balken, SE, $n = 16$) und stabiler Expression in Arabidopsis (weiße Balken, SE, $n = 16$) nach der Gabe eines 5 s Blaulichtpulses. (D) In Tabak war die maximale Depolarisation mit $109,4 \pm 3,9$ mV 1,15 mal höher als in Arabidopsis mit $95,4 \pm 2,3$ mV. (E) In Tabak war die Repolarisationsdauer dafür mit $260 \pm 19,1$ s 3,1 mal langsamer als in Arabidopsis mit $83 \pm 4,5$ s. (C) Die resultierende Repolarisationsgeschwindigkeit war somit in Tabak $0,45 \pm 0,03$ mV·s⁻¹ und damit um den Faktor 0,38 langsamer als in Arabidopsis mit $1,2 \pm 0,08$ mV·s⁻¹.

Der direkte Vergleich der Chr2-C128T Mutante ergab für Arabidopsis eine um 40 % geringere Depolarisation. Die Repolarisation dauerte im Tabak jedoch 3,6-mal länger, so dass die Repolarisationsgeschwindigkeit, die sich daraus ergab, in Arabidopsis 2,1-mal schneller war als in Tabak (Abb. 4.2 A-C). Dieses Muster fand sich auch bei Chr2-XXL (Abb. 4.2 D-F).

Es zeigte sich in Arabidopsis für die Chr2-XXL Mutante eine um 33 % reduzierte maximale Depolarisation bezogen auf die Spitzendepolarisation im Tabak. Dafür war die

Repolarisationsdauer im Tabak 3,1-mal länger als in Arabidopsis. Die daraus resultierende Repolarisationsgeschwindigkeit war in Arabidopsis damit 2,6-mal schneller als im Tabak.

Zusammen mit dem in *N. benthamiana* hoch signifikant niedrigeren Ruhepotential liefert dies einen Hinweis auf die möglicherweise reduzierte Aktivität der Protonen-ATPase in *N. benthamiana* verglichen mit *A. thaliana*. Zum Nachweis dessen müsste jedoch die Aktivität der Pumpen bzw. deren Expressionsniveau und Phosphorylierungsstatus verglichen werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

4.2.5 Einsatz von ChR2 zur Untersuchung elektrischer Signale in Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung von ChR2-XXL zur Untersuchung elektrischer Signale in Pflanzen ermittelt werden. Dabei wurde die weitgefasste Definition des elektrischen Signals als Änderung des Membranpotentials auf einen Stimulus hin und das erneute Einstellen eines Ruhepotentials im Anschluss an diesen Stimulus zugrunde gelegt. Da die durch das ChR2 verursachte Depolarisation des Membranpotentials auf den Einstrom von Kationen (vor allem H^+) ins Cytoplasma bedingt wird, eignet sich dieses Werkzeug nur zum Studium der Repolarisations- und Hyperpolarisationsphase. Elektrische Signale, die sich in einer Depolarisation zeigen, werden in Pflanzen sonst durch den Efflux von Anionen und zu Teilen durch die Erhöhung cytosolischer Calciumspiegel verursacht (Lewis et al. 1997; Jeworutzki et al. 2010). Der Vergleich der Depolarisationskinetiken sollte trotzdem gemacht werden, denn die Repolarisation wird auch durch die Kinetik und die Amplitude der Depolarisation beeinflusst.

4.2.5.1 Vergleich der Depolarisations- und Repolarisationskinetiken natürlicher elektrischer und ChR2-induzierter Signale in Arabidopsis

Die unterschiedlichen Kinetiken elektrischer Signale in Pflanzen werden maßgeblich durch die Natur des applizierten Stimulus und den zellulären Kontext bestimmt, siehe auch (Abb. 4.3). Ein Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten elektrischen Signale ergab, dass Depolarisationsgeschwindigkeit von Blaulicht-stimulierten ChR2-XXL exprimierenden Zellen vergleichbar ist mit der Geschwindigkeit, die durch die Applikation eines Kältestimulus in Arabidopsis Mesophyllzellen erzielt wurde. Dabei lag jedoch die Amplitude der Kälte-induzierten Depolarisation deutlich über der, die nach einem 5 s Blaulicht-Stimulus durch das ChR2-XXL vermittelt wurde. Durch intensives Blaulicht einer Dauer von ≥ 50 s wurde in Mesophyllzellen von Arabidopsis WT-Pflanzen eine starke Depolarisation erzielt. Diese war jedoch durch ein verzögertes Einsetzen nach Beginn der Blaulichtbestrahlung gekennzeichnet (Abb. 4.3 B). Darüber hinaus war die Depolarisationsgeschwindigkeit der endogenen Blaulicht-Antwort deutlich geringer, als dies bei Kälte oder ChR2-XXL gemessen wurde. Die Amplitude dieses Signals war vergleichbar zu der von ChR2-XXL generierten Depolarisation.

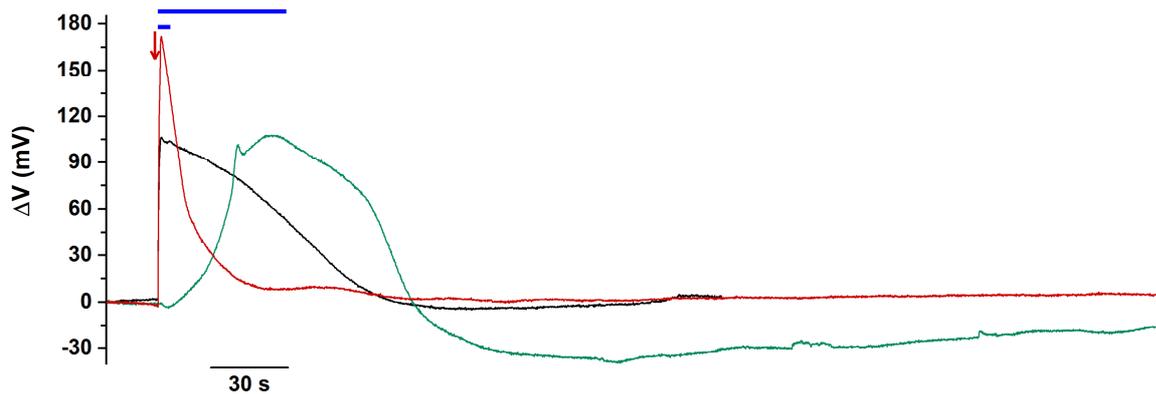


Abb. 4.3: Die Änderungen des Membranpotentials durch Kälte und 50 s Blaulicht in Arabidopsis WT Mesophyllzellen haben klar voneinander abgrenzbare Kinetiken, die sich wiederum von der Kinetik der Membranpotentialänderung durch Chr2-XXL unterscheiden

Repräsentative, überlagerte Aufzeichnung des normierten Membranpotentials der Depolarisation des Membranpotentials durch verschiedene Stimuli, aufgezeichnet mit der Einstichmethode im Mesophyll. Gezeigt ist die Depolarisation durch Kälte (roter Pfeil) in Arabidopsis WT (rote Kurve) mit sehr schneller, starker Depolarisation in 1 s um 184 mV und schneller Repolarisation in 40 s. Die Depolarisation durch 50 s Blaulicht (langer blauer Balken) in Arabidopsis WT (grüne Kurve) innerhalb von 40 s um 103 mV und die anschließende Repolarisation des Membranpotentials in 54 s mit anschließender transienter Hyperpolarisation um -30 mV. Dazu im Vergleich die Depolarisation des Membranpotentials durch einen 5 s Blaulichtpuls in Arabidopsis mit stabiler Chr2-XXL Expression. Die Chr2-vermittelte Depolarisation um 101 mV erfolgte so schnell, wie die durch Kälte im WT ausgelöste und die Repolarisation dauerte 96 s. Es erfolgte nur eine leichte Hyperpolarisation um -5 mV.

Aus Abb. 4.3 ist ersichtlich, dass auch die Repolarisationen mit unterschiedlicher Kinetik verliefen. Ein Kältestimulus führte zu einer schnellen Repolarisation, die in ihrer Kinetik bi- oder häufig auch triphasisch war. Die Repolarisationsphase, die der Chr2-XXL bedingten Depolarisation nachfolgte, war auf den ersten Blick meist biphasisch und in ihrer Geschwindigkeit ähnlich zu der Repolarisation nach 50 - 60 s Blaulichtpuls im Wildtyp. Die Repolarisation nach langen Blaulichtpulsen im Arabidopsis Wildtyp war ebenfalls biphasisch, langsamer in ihrer Geschwindigkeit, als die der vorherigen Stimuli und durch eine deutliche Hyperpolarisationsphase charakterisiert. Auch nach 5s Blaulicht-Stimulation von Chr2-XXL Pflanzen wurde in Mesophyllzellen häufig eine moderate Hyperpolarisation beobachtet, welche jedoch nach Kältestimulation nie auftrat. Zusammenfassend legen diese Beobachtungen nahe, dass die molekulare Identität der für einen gegebenen Stimulus spezifischen Rezeptoren und deren Signalwege, aber auch die im Gewebe bzw. Zelltyp exprimierten Ionenkanäle, Pumpen und Transporter Parameter wie Amplitude und Dauer eines elektrischen Signals und somit die Kinetik der Depolarisation bzw. Repolarisation determinieren.

4.2.5.2 Mögliche molekulare Mechanismen der Repolarisation in Pflanzen

Während es für Depolarisationsprozesse unter anderem einige Patch-Clamp- Daten gibt, die Hinweise auf die Beteiligung von Anionen- und Calciumkanälen liefern (Cho and Spalding 1996; Krol and Trębacz 1999; Lewis et al. 1997), sind die

Repolarisationsprozesse elektrischer Signale bisher nur wenig untersucht worden (Cuin et al. 2018). Aufgrund der in Pflanzen vorherrschenden Ionengradienten werden für die Beteiligung an der Repolarisationsphase insbesondere spannungsabhängige, auswärtsgerichtete Kaliumkanäle, sowie die H^+ -ATPase der Plasmamembran diskutiert (Cuin et al. 2018; Shao et al. 2020; Felle and Zimmermann 2007; Vodeneev et al. 2016; Vodeneev et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche Beteiligung des spannungsabhängigen, auswärtsgerichteten Kaliumeffluxkanals GORK (Ache et al. 2000) an der Repolarisation des Membranpotentials nach Stimulation von Mesophyllzellen durch intensives Blaulicht (≥ 50 s), sowie Kälte untersucht. Sowohl in Kontrollpflanzen als auch in der *gork1-2* Verlustmutante, konnte durch 50 - 60 s Blaulicht eine Depolarisation ausgelöst werden (Abb. 3.8 A). Diese war in ihrer Kinetik jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Die Depolarisationsamplitude war bei Arabidopsis Col0 Pflanzen mit $92,7 \pm 8,7$ mV geringfügig, aber nicht signifikant niedriger als bei der *gork1-2*-Verlustmutante ($106 \pm 7,8$ mV (Abb. 3.8 B)). Dies weist gewisse Parallelen zur Arbeit von Cuin et al. (2018) auf. Sie fanden in *gork1-2*-Verlustmutanten ebenfalls etwas größer Depolarisationsamplituden, als bei Kontrollpflanzen. Cuin et al. (2018) haben in dieser Arbeit untersucht, welchen Beitrag die Arabidopsis Kaliumkanäle AKT2/3 und GORK am Repolarisationsverhalten, bzw. der Signalweiterleitung im Phloem haben. Durch 50 – 60 s Blaulicht konnte keine signifikanten Unterschiede in der Dauer der Depolarisation oder Repolarisation zwischen der *gork1-2* Mutante und dem Wildtyp beobachtet werden (Abb. 3.9 A). Auch die Geschwindigkeit der Depolarisation und Repolarisation waren nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 3.9 B). Intensives Blaulicht depolarisierte die Mesophyllzellen lediglich auf absolute Membranpotentiale von etwa -80 mV – einem Wert, der unter den in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Bedingungen nahe am Gleichgewichtspotential für Kaliumionen lag (E_K liegt bei 1 mM K^+ in der Badlösung und 100 mM K^+ im Cytosol bei -118 mV). Der Spannungssensor pflanzlicher K^+ -Effluxkanäle wie GORK ist an einen intrinsischen Kaliumsensor gekoppelt. Dies führt dazu, dass der GORK Kanal erst bei Membranspannungen positiv von E_K öffnet (Dreyer and Blatt 2009). Die durch intensives Blaulicht induzierte Depolarisation liegt am Schwellenwert der GORK Aktivierung und konnte daher möglicherweise nicht ausreichend gewesen sein, um einen Einfluss dieses Kanals auf die Repolarisationskinetik zu beobachten.

Aus diesem Grund wurde die Depolarisation durch Kälte eingesetzt, um eine mögliche Beteiligung von GORK an der Repolarisation untersuchen zu können. Ein Kältereiz generierte eine relative Depolarisation von 173 ± 7 (Col0) bzw. $182 \pm 4,8$ mV (*gork1-2*) (Abb. 3.10 A). Auch mit dem Stimulus Kälte konnte eine etwas größere Depolarisationsamplitude für die *gork1-2* Verlustmutanten gemessen werden, die jedoch nicht signifikant war. Da für das Öffnen von GORK E_K wichtig ist, wurden auch die

absoluten Membranpotentiale bestimmt. Dies ergab für Col0 eine absolute Depolarisation auf $-12,7 \pm 6,9$ mV und für *gork1-2*-Verlustmutanten eine absolute Depolarisation auf $+3,6 \pm 5$ mV (Abb. 3.10 B). Trotz der Tendenz bei den *gork1-2*-Verlustmutanten einer stärkeren absoluten Depolarisation, ergab ein t-Test, dass diese nicht signifikant höher war als beim Wildtyp ($p = 0,07$). Unter Berücksichtigung, dass GORK erst oberhalb von E_K öffnet, wurde die Repolarisationsdauer und damit korrelierte Repolarisationsgeschwindigkeit in diesem Experiment nur bis zur Repolarisation des Membranpotentials auf -100 mV berechnet (Abb. 3.10 C). Dadurch wurde es möglich den Einfluss von GORK auf die Repolarisation bis -100 mV zu bestimmen mit dem Ergebnis, dass bei *gork1-2* Verlustmutanten ($-6,5 \pm 0,9$ mV \bullet s $^{-1}$) fast eine Halbierung der Repolarisationsgeschwindigkeit, verglichen mit den WT-Kontrollen ($-11,1 \pm 1$ mV \bullet s $^{-1}$), auftrat. Negativer von -100 mV konnte dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden. Eine Verlängerung des elektrischen Signals, also ein längeres Verbleiben im depolarisierten Zustand, wie bei Cuin et al. (Cuin et al. 2018), konnte somit nur in einem sehr kleinen Maße und nur oberhalb von -100 mV beobachtet werden. Außer Kälte gibt es derzeit keine gut steuerbaren, nicht invasiven Stimuli, die zu einer, in kurzen Zeitabständen, wiederholbaren Depolarisation führen. Da Kälte jedoch im Vergleich zu anderen elektrischen Signalen in Pflanzen (Blaulicht oder Elicitoren) eine sehr schnelle Repolarisation aufweist, ist Kälte nur ein bedingt geeignetes Werkzeug zur Untersuchung der pflanzlichen Repolarisation.

4.2.5.3 ChR2 als optogenetisches Werkzeug zur Untersuchung der Repolarisation in *Arabidopsis*

ChR2 ermöglicht es, in Pflanzen das Membranpotential schnell und nicht-invasiv zu depolarisieren. Die Methode ist im engeren Sinne nicht invasiv, da das Membranpotential von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen durch einen 5 s Blaulichtpuls nicht beeinflusst wird (Abb. 4.4). Der Einfluss auf die Genexpression oder andere physiologische Änderungen wurde nicht untersucht. Durch die Implementierung von ChR2 wurde es möglich, die Repolarisation in *Arabidopsis* an der gleichen Probe repetitiv im kontinuierlichen Einstich über Stunden zu messen. Dadurch kann der Einfluss externer Faktoren oder auch verschiedener Ionenkanalinhibitoren auf die Repolarisation untersucht werden. Im Folgenden wurde daher der Effekt der Kaliumkanalblocker BaCl₂ und CsCl auf das Repolarisationsverhalten ChR2-XXL exprimierender Mesophyllzellen nach 5 s Blaulichtstimulation untersucht. Es ist bekannt, dass CsCl einwärtsgerichtete Kaliumkanäle spannungsabhängig blockiert, wie beispielsweise, die im Mesophyll exprimierten KAT1 (Hedrich et al. 1995), AKT1 oder AKT2/3 (Michard et al. 2005; Lacombe et al. 2000; Dennison et al. 2001). BaCl₂ hemmt auswärtsgerichtete Kaliumkanäle wie GORK und SKOR (Li and Assmann 1993; Ache et al. 2000; Roelfsema and Prins 1997) und den schwach gleichrichtenden Kaliumkanal AKT2/3 (Marten et al.

1999). Die Messungen unter dem Einfluss von CsCl zeigten bei der Repolarisationsgeschwindigkeit, welche die Amplitudenhöhe und die Repolarisationsdauer ins Verhältnis setzt, keine Änderung im Vergleich zu den Kontrollmessungen an der gleichen Pflanze, obwohl sowohl das Ruhepotential erniedrigt als auch die Depolarisationsamplitude leicht erhöht war. Ein Beitrag spannungsabhängiger K^+ _{in} Kanäle war daher unwahrscheinlich. Wenige Minuten nach Zugabe von 5 mM BaCl₂ zur Badlösung war jedoch zu beobachten, dass das Membranpotential auf einen neuen Ruhepotentialwert hyperpolarisierte ($-17,5 \pm 2,3$ mV) (Abb. 3.30 A). Im Anschluss an die ChR2-XXL vermittelte Depolarisationen, welche durch BaCl₂ 1,16-fach höher ausfiel, verkürzte sich in Gegenwart von BaCl₂ die Repolarisationsdauer wesentlich (Abb. 3.30 A). Dies widerspiegelte sich auch in der 1,6-fach gesteigerten Repolarisationsgeschwindigkeit, die von $0,69 \pm 0,09$ mV•s⁻¹ bei den Kontrollen auf $1,1 \pm 0,06$ mV•s⁻¹ nach BaCl₂ Gabe anstieg (Abb. 3.30 B). In Übereinstimmung mit den Expressionsmustern der Kaliumkanäle und bisherigen Messungen mit intensivem Blaulicht, Kälte und Cäsium, sowie der Tatsache, dass in Arabidopsis das Membranpotential durch das Channelrhodopsin XXL auf durchschnittlich -80 mV depolarisiert wurde, könnten weder der Kaliumauswärtsgerichteter GORK noch spannungsabhängige K^+ _{in} Kanäle die beschleunigte Repolarisationsgeschwindigkeit in Gegenwart von Bariumionen erklären. Der schwach spannungsabhängige AKT2/3 Kanal könnte hier jedoch eine Rolle spielen. AKT2/3 wird im Blatt von Arabidopsis exprimiert (Winter et al. 2007; Lacombe et al. 2000; Dennison et al. 2001) und ist über einen weiten Spannungsbereich aktiv. Dadurch kann er maßgeblich durch die H⁺-ATPase generierte Ruhepotential mitbestimmen, indem er einen konstanten, schwachen Kaliumstrom („Leak“) in die Zelle ermöglicht. Entsprechend dem sog. „Pump and Leak“ Modell (Brownlee 2002; Bisson and Walker 1981) regulieren Protonenpumpe und Kaliumkanäle im Wechselspiel das Ruhepotential und halten es bei unveränderten äußeren Bedingungen konstant - bei *Arabidopsis thaliana* typischerweise bei ca. -180 mV bei 1 mM K⁺ im Außenmedium. Die bei Zugabe von BaCl₂ beobachtete Hyperpolarisierung der ChR2-XXL Pflanzen lässt sich mit einer Hemmung des AKT2/3 vermittelten Kaliumlecks erklären. Die beschleunigte Repolarisation impliziert weiterhin, dass die Plasmamembran H⁺-ATPase eine entscheidende Rolle bei der Repolarisation in Pflanzen spielen könnte.

4.2.6 Protonen-ATPase und Repolarisation

Das Genom von Arabidopsis kodiert für 11 funktionelle Plasmamembran (PM) H⁺-ATPasen (*AHA1 – AHA11*). Von diesen werden 8 AHA Gene (*AHA1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, und 11*) in Wurzeln und acht AHA Gene (*AHA1, 2, 3, 5, 7, 8, 10, und 11*) in Blättern exprimiert. Die PM H⁺-ATPasen *AHA1, 2, und 11* sind ubiquitär exprimiert (Ueno et al. 2005). PM H⁺-ATPasen sind für Pflanzen essentiell und ihre Funktion in gewissem

Rahmen redundant. Dies zeigt sich in der Embryoletalität der *aha1/aha2* Doppelverlustmutante (Haruta et al. 2010). Den Beitrag der PM H^+ -ATPasen zum Beispiel an der Repolarisation des Membranpotentials zu untersuchen, wird dadurch erschwert. Das stabil in *Arabidopsis thaliana* etablierte ChR2-XXL ermöglichte erstmalig repetitive gleichförmige Depolarisationen herbeizuführen und im Anschluss die Repolarisationsprozesse zu studieren. Bereits beim Vergleich von ChR2-Varianten in Arabidopsis und *N. benthamiana* fiel auf, dass die Repolarisationsdauer und -geschwindigkeit zwischen beiden Arten stark abwich (siehe Kap. 4.2.4.). Diese Abweichungen waren nicht allein durch die Eigenschaften des ChR2 zu erklären, da das Verhältnis der Abweichung zwischen den Pflanzenarten konstant war, unabhängig von der eingesetzten ChR2-Variante. Es ist daher anzunehmen, dass trotz der unterschiedlichen Deaktivierungskinetiken der beiden ChR2-Varianten die Repolarisationsphase durch die intrinsisch aktiven Ionenkanäle und Pumpen im Tabak bzw. Arabidopsis Mesophyllzellen bestimmt wurde. In Tabak dauerte die Repolarisation deutlich länger als in Arabidopsis und die Geschwindigkeit war in Arabidopsis 2,1 (C128T) bzw. 2,6 (XXL) mal schneller als in Tabak. Das Ruhepotential lag gleichzeitig bei identischen Bedingungen im Tabak signifikant positiver als in Arabidopsis. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass im Tabak die PM H^+ -ATPasen weniger aktiv waren oder schwächer exprimiert wurden. Zum anderen könnte dies auch an der stärkeren Aktivität intrinsischer Kaliumkanäle liegen (siehe oben), die der protonenmotorischen Kraft der PM H^+ -ATPasen entgegenwirken.

Um die Bedeutung der PM H^+ -ATPasen bei der Repolarisation aufzuklären, wurden Experimente konzipiert, die es ermöglichten, die Aktivität der PM H^+ -ATPase zu beeinflussen. Da die PM H^+ -ATPasen in ihrem Reaktionszyklus sowohl eine intrazelluläre als auch eine extrazelluläre pH-Abhängigkeit besitzen, der intrazelluläre pH-Wert im Experiment aber nicht kontrolliert werden kann, wurden in einem ersten Ansatz die Bedingungen der Badlösung so verändert, dass die PM H^+ -ATPase gegen einen veränderten Protonengradienten arbeiten musste. Durch eine Ansäuerung des Badmediums um eine halbe pH-Einheit (pH 5,5) wurde beobachtet, dass die Repolarisationsgeschwindigkeit nur noch halb so groß war wie bei pH 6,0 (Abb. 3.31 B). Gleichzeitig war das Ruhepotential unter diesen Bedingungen um +20 mV verschoben. Im Gegensatz dazu führte eine Alkalisierung der Badlösung um 1,5 pH-Einheiten zu einer Erniedrigung des Ruhepotentials um -15 mV und einer deutlich geänderten Repolarisationskinetik (Abb. 3.31 A). Diese war durch eine extrem schnelle Repolarisation bis etwa -180 mV gekennzeichnet, gefolgt von einer sehr langsamen Repolarisation bis zum Erreichen des Ausgangs-Ruhepotentials, welches zwischen -200 und -210 mV lag. In Übereinstimmung mit der pH-Abhängigkeit der PM H^+ -ATPase zeigen diese Experimente, dass eine Ansäuerung des Badmediums zu einer Verlangsamung der Repolarisation führt und eine Alkalisierung zu einer Beschleunigung der Repolarisation. Dies kann als Hinweis auf die Protonenpumpe als Hauptakteur der Repolarisation gewertet werden. Gleichzeitig

muss beachtet werden, dass die Ansäuerung oder Alkalisierung des Mediums auch einen Effekt auf die im Mesophyll exprimierte Kaliumkanäle wie AKT2/3, AKT1 und KAT1 hat. Dieser Effekt ist jedoch komplex, da AKT2/3 durch eine Alkalisierung aktiver wird und AKT1 sowie KAT1 aber durch Ansäuerung aktiviert werden (Hoth et al. 2001; Marten et al. 1999; Hedrich et al. 1995). Die beobachtete sehr langsame Repolarisation bis zum Erreichen des Ausgangs-Ruhepotentials unter alkalischen pH-Bedingungen könnte sich durch die spannungsabhängige Aktivität der P-Typ H^+ -ATPase erklären. Diese weist eine maximale Aktivität bei Membranspannungen positiver als -100 mV auf und scheint kaum noch Aktivität bei -180 bis -220 mV aufzuweisen (Becker et al. 1993; Lohse and Hedrich 1992). Messungen von Sönke Scherzer nach funktioneller Expression der PM H^+ -ATPase im heterologen Oozytenexpressionssystem konnten eine halbmaximale Aktivität der AHA2 bei -140 mV bestimmen (Reyer et al. 2020). Den pH-Effekt auf das Ruhepotential konnte bereits durch Lohse und Hedrich (1992) in *Vicia faba* Schließzelleprotoplasten gezeigt werden.

Um die mögliche Rolle der PM H^+ -ATPase zu verifizieren, wurde in einem weiteren experimentellen Ansatz der Effekt des P-Typ ATPase Inhibitors Natriumorthovanadat untersucht. Vanadat ist in der Lage, die Aktivität der PM H^+ -ATPase konzentrationsabhängig zu inhibieren, indem an die katalytische Seite der H^+ -ATPase bindet, wenn diese sich im phosphorylierten E2-Status befindet (Clausen et al. 2016). Die Inhibition der PM H^+ -ATPase durch Vanadat führt zu einer deutlichen Reduktion der über die Membran transportierten Protonen (Palmgren 2001). Durch die Zugabe von 1 mM Natriumorthovanadat in eine laufende Einstichmessung konnte gezeigt werden, dass sich mit zunehmender Einwirkzeit die Repolarisationskinetik stark veränderte (Abb. 3.33). Die oftmals biphasische Kinetik wurde durch Natriumorthovanadat dahingehend betont, dass sich die erste Phase der Repolarisation mit zunehmender Einwirkzeit des Inhibitors kontinuierlich verlängerte. Interessanterweise wurde die zweite, schnelle Phase kaum beeinträchtigt. Im Gegensatz zu Arabidopsis Wildtyp Pflanzen, die 30 - 40 min nach Vanadatgabe bereits stark depolarisiert waren und ein Ruhepotential nahe E_K (-118 mV) aufwiesen, konnten Chr2-XXL exprimierende Mesophyllzellen durch repetitive 5 s Blaulicht-Pulse über einen Zeitraum von 2 – 3 h oder länger immer wieder auf Membranpotentiale repolarisieren, die dem Ruhepotential der Zellen vor Vanadatgabe entsprachen. Zu beobachten war jedoch, dass die ‚Ruhepotentiale‘ nicht stabil gehalten werden konnten, sondern transient waren und die Zellen sofort anschließend in Richtung E_K depolarisierten. Diese Repolarisationsphase konnte durch eine Blaulicht-induzierte Aktivierung des Chr2-XXL immer wieder unterbrochen werden, wobei sich an eine durch Chr2-XXL induzierte Depolarisation reproduzierbar Repolarisation anschloss. Natriumorthovanadat kann nur intrazellulär wirken und wird wahrscheinlich über einen Phosphattransporter im Symport mit Protonen aufgenommen (interne Kommunikation Julian Dindas). Übereinstimmend mit dieser Annahme konnte das Vanadat Experiment

ausschließlich bei pH 6,0 erfolgreich durchgeführt werden, bei alkalischeren pH-Werten schien Vanadat nicht in die Zellen aufgenommen zu werden. Dennoch lieferte dieses Experiment einen wichtigen Hinweis auf die Bedeutung der PM H⁺-ATPase für die Repolarisation, denn die Hemmung der Protonenpumpe führte zu einer signifikanten Verlangsamung der Repolarisation.

Im Umkehrschluss müsste eine Überaktivierung der Protonenpumpe zu einer Beschleunigung der Repolarisation führen. Das Toxin Fusicoccin ist dazu in der Lage, die H⁺-ATPase in ihrem aktiven Zustand zu arretieren und somit die zelleigene Regulation über Dephosphorylierung auszuschalten (Johansson et al. 1993; Lanfermeijer and Prins 1994). Durch die Gabe von Fusicoccin im laufenden Einstich wurde es möglich, den Effekt auf die Repolarisation an der gleichen Probe zu beobachten. Im Einklang mit einer Aktivierung der PM H⁺-ATPase führte die Zugabe von Fusicoccin zur Hyperpolarisation des Membranpotentials (Abb. 3.34 A) um $-26 \pm 1,9$ mV. Wurden die Mesophyllzellen anschließend durch 5 s Blaulicht-Aktivierung des ChR2-XXL depolarisiert, war die Repolarisationsgeschwindigkeit 2,1 mal größer, als unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.34 B). Die absolute Repolarisationsdauer mit Fusicoccin lag bei $58,5 \pm 4,2$ s, verglichen mit $119 \pm 5,9$ s vor der Zugabe von Fusicoccin. Unter der Annahme ChR2-XXL würde in Pflanzen die gleiche Deaktivierungskinetik wie in Oozyten aufweisen (71 s), würde dies bedeuten, dass die PM H⁺-ATPase das Membranpotential wieder auf das Ruhepotential klemmen könnte, obwohl noch immer Protonen durch das ChR2-XXL in die Zelle fließen. Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass im Gegensatz zu tierischen Zellen, wo spannungsabhängige Kaliumkanäle die Repolarisationskinetik bestimmen, in Arabidopsis Mesophyllzellen die PM H⁺-ATPase eine Schlüsselposition bei der Wiedereinstellung des Ruhepotentials nach elektrischer Stimulation einnimmt.

4.3 Ausblick

Am Beispiel des *Chlamydomonas* ChR2-XXL konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Einsatz lichtgesteuerter Rhodopsine einen vielversprechenden Ansatz zum Studium elektrischer Signale in Pflanzen darstellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden dabei zunächst die Grundlagen eines möglichen neuen Forschungsansatzes auf dem Gebiet der pflanzlichen Elektrophysiologie und Signaltransduktion. Die von M. Baumann initiierten Ansätze zur Etablierung eines optogenetischen Werkzeugs auf Basis des ChR2 wurden weiter ausgebaut, ein stabiles Expressionssystem verifiziert und erstmalig zur Untersuchung pflanzlicher elektrophysiologischer Fragestellungen eingesetzt. Die Beobachtung, dass H⁺-ATPasen, die treibende Kraft der Repolarisation in Mesophyllzellen darstellen, ist jedoch nicht zwangsläufig auf andere Zellen oder Gewebe übertragbar, welche eine eigene, spezifische Ausstattung an Transportern, Kanälen und Pumpen exprimieren. Zum einen könnte das transiente Tabak-Expressionssystem hier eine einfache Möglichkeit bieten, um mittels Co-Expression von ChR2-XXL und ausgewählten Ionenkanälen und Pumpen deren Beteiligung am Repolarisationsprozess zu untersuchen. Zum anderen würde sich die Einkreuzung oder Transformation von ChR2-XXL in Verlustmutanten solcher Kandidatenionenkanäle und -pumpen anbieten, ebenso wie die Expression des ChR2-XXL unter Kontrolle zell- bzw. gewebespezifischer Promotoren für die Expression des ChR2-XXL in den Modellsystemen Pollenschläuchen, Wurzelhaaren oder Schließzellen. Dass die Beeinflussung des Öffnungsverhaltens von Schließzellen durch einen lichtgesteuerten Kaliumkanal möglich ist, wurde von Papanatsiou (2019) gezeigt. Der Einsatz des lichtregulierten BLINK Kaliumkanals greift jedoch massiv in die Kaliumhomöostase der Schließzelle ein und führt damit rein passiv eine zusätzliche spannungs-unabhängige Kaliumleitfähigkeit ein, welche – gezeigt in Wurzeln – nur eine 15 mV Depolarisation bewirkt. Dies entspricht keiner Depolarisation, die mit anderen elektrischen Signalen vergleichbar ist (Papanatsiou et al. 2019). Wie sich die nicht-invasive Depolarisation oder Hyperpolarisation des Membranpotentials, also ein lokal erzeugtes elektrisches Signal z.B. in der Schließzelle auf die Bewegungskinetik, die Transporteigenschaften, die Genexpression oder die Sensitivität gegenüber z.B. ABA auswirkt, könnte durch Rhodopsin-basierte optogenetische Methoden eingehender erforscht werden.

Auf dem Gebiet der pflanzlichen Optogenetik hat es neben diesem Ansatz aktuell weitere Entwicklungen gegeben. Zum einen – wie oben erwähnt – die Steuerung der Stomatabewegung mittels Optogenetik (Papanatsiou et al. 2019) über einen lichtgesteuerten Kaliumkanal, zum anderen die Steuerung der Genexpression durch Licht (Ochoa-Fernandez et al. 2020). Die breite Palette optogenetischer Werkzeuge (Govorunova et al. 2017) bietet weitere aussichtsreiche Ansätze. Dazu gehört

beispielsweise die Etablierung der ChR2-D156H (ChR2-XXM) Variante (Duan et al. 2019). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch ChR2-vermittelten Depolarisationen im Wesentlichen durch einen Protoneneinstrom verursacht werden – im Einklang mit der Tatsache, dass die H^+ Leitfähigkeit des ChR2-XXL Leitfähigkeit gegenüber anderen Kationen etwa 10^6 -fach höher ist (Nagel et al. 2003). ChR2-XXM weist jedoch eine deutlich erhöhte Leitfähigkeit für Ca^{2+} auf. Da der Ca^{2+} Gradient in Pflanzen ca. 100-fach steiler ist als für Protonen, könnte dies nach Expression des ChR2-XXM eine physiologische Relevanz darstellen. Derzeit wird die systemische Transmission elektrischer Signale in Pflanzen im Kontext mit Calciumwellen und Wellen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert (Shao et al. 2020; Farmer et al. 2020). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels der Oberflächenelektroden gezeigt werden, dass lokal erzeugte, ChR2-vermittelte Depolarisationen nicht systemisch weitergeleitet werden. Diese Beobachtung könnte mit der Protonen-basierten Natur der Depolarisation erklärt werden. Hier eröffnen neue ChR2-Varianten, wie das Ca^{2+} permeabel ChR2-XXM, zusätzliche Möglichkeiten zur Prüfung des Calcium/ROS-Modells zur Transmission elektrischer Signale. Im Zentrum dieses Modells stehen u.a. die Ca^{2+} -permeablen GLR Proteine GLR3.3/3.6, welche im Phloem/Bündelscheidezellen des Blattes exprimiert werden. Die Expression von ChR2-XXL oder -XXM unter phloemspezifischen Promotoren, wie dem SUC2 oder den GLR3.3/3.6 Promotern könnte helfen, die molekularen Grundlagen der Transmission elektrischer Signale in Pflanzen zu entschlüsseln.

Die funktionelle Expression lichtgesteuerter Anionenpumpen (ACRs (Govorunova et al. 2015)) aus verschiedenen Algen in Pflanzen würde es ermöglichen, eine Depolarisation des Membranpotentials in Pflanzen durch den Efflux von Anionen aus der Zelle zu ermöglichen. Dies käme einer ‚natürlichen‘ Depolarisationen in Pflanzen viel näher, als die Kationen-basierte Depolarisation durch ChR2. Darüber hinaus exprimieren Pflanzen hyperpolarisationsaktivierte Calciumkanäle, deren molekulare Natur bisher unbekannt ist. Durch den Einsatz lichtgesteuerter Protonenpumpen aus z. B. *Chlorella vulgaris* (CvRH; (Zhang et al. 2011)) oder den Archaeorhodopsinen (ARC1-3, (Govorunova et al. 2015; Govorunova et al. 2017)) in Pflanzen könnten Membranpotentiale auch hyperpolarisiert und die nachgeschalteten Prozesse studiert werden. Darüber hinaus könnten die spektralen Varianten lichtgesteuerter Kanalrhodopsine und Pumpen genutzt werden, um nach Co-Expression dieser definierte Membranpotentialfluktuationen zu generieren, um deren ‚Informationsgehalt‘ zu untersuchen. Es ist bekannt, dass sowohl in Arabidopsis aber auch in karnivoren Pflanzen wie *Dionaea* oder *Drosera* elektrische Signale in die Biosynthese des ‚Stresshormons‘ Jasmonsäure umgesetzt werden (Farmer et al. 2020; Mousavi et al. 2013; Scherzer et al. 2017). Wie die ‚Verschaltung‘ auf molekularer Ebene erfolgt, ist jedoch nicht bekannt. Lichtgesteuerte Channelrhodopsine und Pumpen könnten ein geeignetes Werkzeug darstellen, um diesen Prozess auch nicht-invasiv zu erforschen und

mit Hilfe von RNA-Seq Experimenten Markergene zu identifizieren und den Informationsgehalt elektrischer Signale in Pflanzen zu entschlüsseln.

Darüber hinaus haben die Experimente dieser Arbeit zu den natürlichen Depolarisationen in Pflanzen aber auch gezeigt, dass es wichtig wäre, die intrinsischen Anionenkanäle oder Transporter zu identifizieren, welche die Depolarisation auf Kälte oder Blaulicht vermitteln. Die Beteiligung von Ca^{2+} und Anionenkanälen bei Blaulicht-induzierbaren Depolarisationen im Arabidopsis Hypokotyl ist unstrittig, jedoch ist der Calcium-abhängige Anionenkanal bis dato nicht bekannt. Seit den entscheidenden Arbeiten, vor allem von Spalding und Kollegen, gab es nur noch wenig Forschung auf diesem Gebiet. Spalding konnte zwar in den Patch-Clamp-Messungen zeigen, dass die Anionenausströme die Depolarisation bewirken, jedoch nicht welche Kanäle dies im Einzelnen sind (Cho and Spalding 1996; Lewis et al. 1997; Lewis and Spalding 1998). Zur damaligen Zeit waren aber nur wenige Kanäle einem Gen zugeordnet. Mit den heutigen Methoden wäre ein Reihentest aller bekannten Anionenkanäle möglich, um die beteiligten Kanäle zu identifizieren. Die Identifikation eines solchen Kanals wäre ein bedeutender Schritt in der Aufklärung elektrischer Signale in Pflanzen.

Insgesamt stehen wir, trotz aller Erkenntnisse auf dem Gebiet ‚elektrischer Signalwege in Pflanzen‘, fast 150 Jahre nachdem Burdon-Sanderson (1872) das erste Mal elektrische Signale aus *Dionaea* veröffentlicht hat, immer noch am Anfang der Dechiffrierung der elektrischen Signale von Pflanzen. Der Einsatz optogenetischer Methoden könnte hier neue Erkenntnisse bringen.

A Anhang

A.1 Zusätzliche Daten

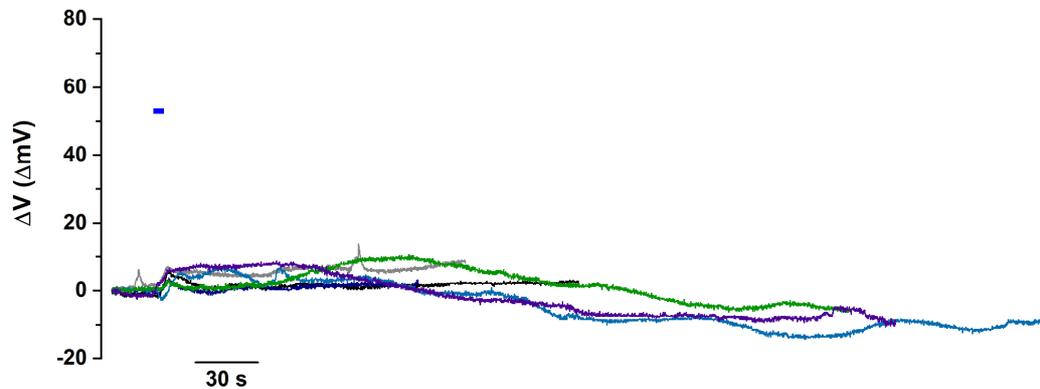


Abb. 4.4: In *Arabidopsis* Wildtyp führt ein 5 s Blaulichtpuls nur zu einer sehr schwachen transienten Depolarisation

Repräsentative Aufzeichnung des normierten Membranpotentials nach Gabe eines 5 s Blaulichtpulses in *Arabidopsis* WT Mesophyllzellen, gemessen mit der Einstichtchnik. Es konnte eine transiente Depolarisation des Membranpotentials von weniger als 10 mV gemessen werden. Das Membranpotential von *Arabidopsis* WT ist somit nicht responsiv auf 5 s Blaulichtpulse ($n = 6$).

Es wurde in Kontrollexperimenten untersucht, ob die Beleuchtung mit 5 s BL, mit maximaler Leistung, zu einer Änderung des Membranpotentials in *Arabidopsis thaliana* Col0 führt. Es konnte dabei nur eine schwache Depolarisation beobachtet werden, die immer kleiner als 10 mV war, siehe Abb. 4.4

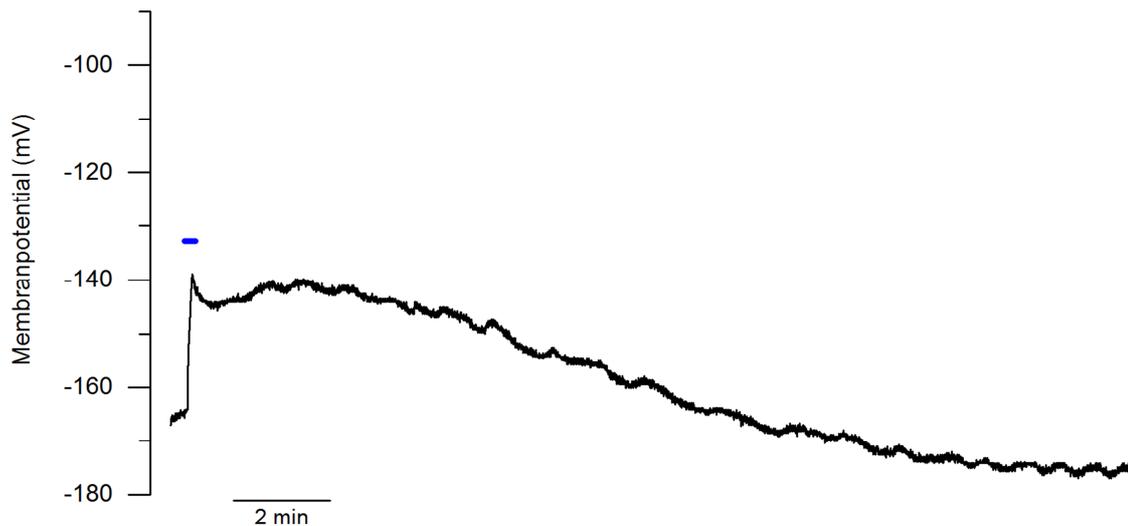


Abb. 4.5: Stabil in Arabidopsis exprimiertes ChR2-D156A ermöglicht die Depolarisation des Membranpotentials durch Blaulich

Repräsentative Aufzeichnung des Membranpotentials in Folge eines 5 s Blaulichpulses gemessen mit der Einstichmethode in Arabidopsis Mesophyllzellen mit stabiler ChR2-D156C Expression. Ein 5 s Blaulichpuls löste eine schnelle, reproduzierbare Depolarisation des Membranpotentials aus. Die Spitzendepolarisation lag bei -25 mV, gefolgt von einer sehr langsamen Repolarisation, die mehr als 10 min dauerte.

Exemplarische Messung von Arabidopsis ChR2-D156A, siehe Abb. 4.5.

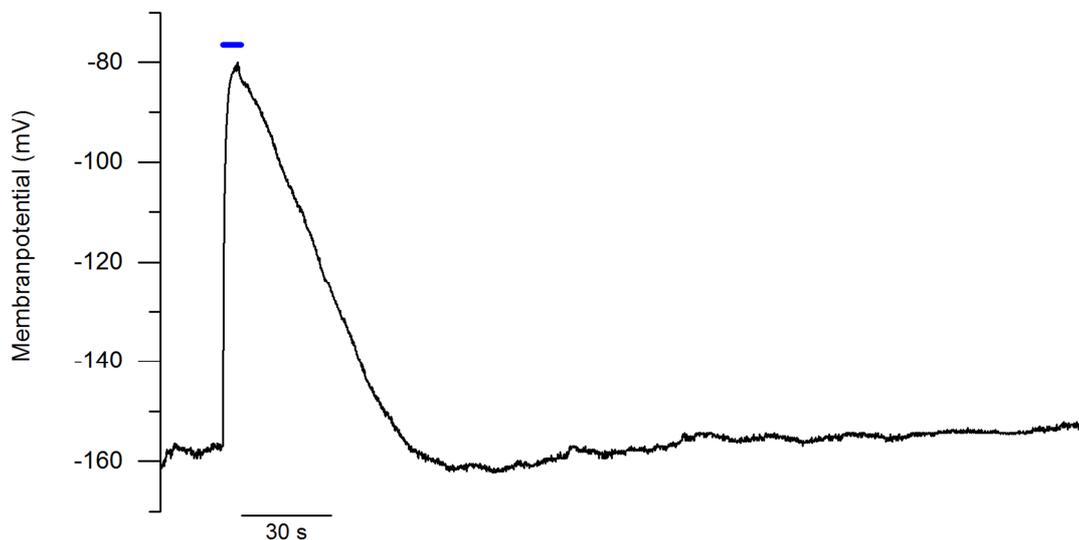


Abb. 4.6: Die Applikation von Retinal-haltiger Badlösung über Nacht auf Ober- und Unterseite des Blattes ist ausreichend um die vollständige Rekonstitution des ChR2-XXL in Arabidopsis Mesophyllzellen herbeizuführen

Die Depolarisation des Membranpotentials um 80 mV von Arabidopsis Mesophyllzellen mit ChR2-XXL Expression nach der Gabe eines 5 s Blaulichpulses zeigt, dass die Applikation von Retinal in Badlösung auf die Kutikula des Blattes ausreicht, um ChR2-XXL vollständig zu rekonstituieren.

Identifikation einer Methode der Retinalapplikation auf der intakten Pflanze, zur Rekonstitution des ChR2-XXL vor der Messung mit Oberflächenelektroden.

Zur Anwendung dieser Methode mussten die Pflanzen wieder zuerst mit Retinal vorbehandelt werden. Im Unterschied zum Tabak, war es bei Arabidopsis möglich, ein bis drei Tage vor der Messung, die Retinallösung auf Blattunter- und -oberseite mit einer Glaspasteurpipette zu applizieren. Dazu wurde unter das zu messende Blatt ein Stück Parafilm mit Schutzpapier gelegt und die Lösung unter das Blatt gegeben. Durch die Oberflächenspannung zog sich die Lösung auf dem Parafilm unter das Blatt und benetzte die Blattunterseite vollständig. Auf die Oberseite des Blatts wurde ebenfalls Lösung als Tropfen appliziert. Durch die starke Hydrophobizität der Kutikula wurde das Retinal scheinbar rasch aufgenommen, da die Pflanzen am Folgetag sehr gut gemessen werden konnten. Um die ausreichende Rekonstitution des ChR2 mit dem Retinal zu beweisen, wurden Blätter, die mit Retinal unter dem Blatt inkubiert wurden, mittels der Einstichmethode auf funktionales ChR2-XXL getestet. Die Pflanzen wurden nach der Präparation nur mit Messlösung II ohne Retinal überschichtet.

Wie aus Abb. 4.6 hervorgeht, war die Applikation von Retinallösung auf die Blattoberfläche an der intakten Pflanze ausreichend, um das Channelrhodopsin-2 zu rekonstituieren. Der 5 s BL Puls hatte eine Depolarisation des Membranpotentials von 80 mV zur Folge. Dies lag im Bereich der sonst auch bei der Inkubation der Blattscheiben in Retinallösung erreicht wurde. Die externe Applikation von Retinal auf Blätter der intakten Pflanze war also möglich und ausreichend. Somit war diese Methode für die Messung der ChR2 Pflanzen mittels Oberflächenelektroden geeignet.

A.2 Generation weiterer stabiler ChR2 Pflanzen

Neben den bereits existierenden stabilen ChR2 Arabidopsis Pflanzen sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere Mutanten generiert werden, bzw. Pflanzen die das ChR2 gewebespezifisch exprimieren. Dazu wurden verschiedene Konstrukte generiert, kloniert und mit der Floral-Dip Methode die Pflanzen transformiert. Zum einen diente als genetischer Hintergrund Col0 zum anderen Col0 mit einem stabilen R-GECO Calcium Reportersystem, analog zu den Col0 Aequorin Pflanzen, welche den genetischen Hintergrund in den bereits existenten ChR2 Pflanzen bildeten.

Bereits aus der Arbeit von M. Baumann war bekannt, dass die Herstellung von stabilen ChR2 Pflanzen gewisse Herausforderungen birgt. Die Integration des ChR2 ins Genom

funktioniert im Allgemeinen gut, jedoch wird häufig das Gen nicht transkribiert bzw. translatiert.

Bei der gewebespezifischen Expression wurde sich für zwei verschiedene Promoter entschieden. Zum einen für den Promoter des GardCell1 Gens und zum anderen ein verkürzter Promoter des SUC2 Gens zur Expression in den Schließzellen bzw. im Phloem. Es wurden beide Promoter mit drei verschiedenen ChR2 Mutanten kloniert und transformiert, alle Konstrukte sowohl in Col0, als auch in Col0 R-GECO Pflanzen. Die Col0 R-GECO Pflanzen stammten von M. Krebs Heidelberg.

Nach dem Floral-Dipping und der Samengewinnung wurde das fertige Saatgut auf Selektionsmedium ausgebracht und die sich entwickelnden Kanamycin-resistenten Keimlinge wurden auf sterile Erde überführt.

Vor dem Überführen wurde die Floreszenz am Keyence Automatikmikroskop überprüft. Bereits zu diesem Zeitpunkt fiel auf, dass die Fluoreszenz nur sehr schwach ausgeprägt war und nur bei einer hohen Belichtungszeit überhaupt noch detektierbar war. Die Samen dieser T1 Generation, in der alle Pflanzen heterozygot für das ChR2 Gen waren, wurden getrennt gesammelt und jede Pflanze gründete ihre eigene Linie. Alle Pflanzen wurden mittels PCR genotypisiert. Im nächsten Schritt wurden die Samen der T1 Generation erneut ausgesät, sie bildeten die Pflanzen der T2 Generation. Diese Pflanzen wurden wieder genotypisiert. Die Samen dieser Pflanzen bilden die T3 Generation. Säht man diese Samen auf Selektionsplatten, so kann durch Auszählen ein Rückschluss auf den Genotyp der Mutterpflanze ziehen, da sich die Zahl der überlebenden Keimlinge direkt proportional zum Genotyp der Mutterpflanze verhält (Erbgang nach Mendel).

Weitere Mikroskopie der Pflanzen der T2 Generation ergab allerdings bereits keine nennenswerte Fluoreszenz mehr. Auch Versuche die Pflanzen elektrophysiologisch zu charakterisieren misslangen. Das Projekt wurde daraufhin eingestellt.

A.3 Verwendete Chemikalien

Substanz	Spezifikation	Hersteller	Bestellnummer		
2-Propanol	BioChemica	AppliChem GmbH	A3465	67-63-0	
Acetosyringon (3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone)	97%	Sigma-Aldrich	D134406	2478-38-8	
Agar-Agar, Kobe I	für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG	5210	9002-18-0	
Agarose LE - Standardagarose	entfällt	Genaxxon bioscience GmbH	M3044	9012-36-6	
Bariumchlorid - Dihydrat	zur Analyse, ACS, ISO	AppliChem GmbH	131182	10326-27-9	
BTP (Bis-Tris-Propan)	für Pufferlösungen	AppliChem GmbH	A1135, nicht mehr lieferbar	64431-96-5	
Calciumchlorid - Dihydrat Pulver	zur Analyse, ACS	AppliChem GmbH	131232	10035-04-8	
Cäsiumchlorid	für die Molekularbiologi, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich	C4036	7647-17-8	
D(+)-Saccharose	(USP-NF, BP, Ph. Eur., JP) reinst, Pharma-Qualität	AppliChem GmbH	141621	57-50-1	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Reag. Ph. Eur.) zur Analyse, ACS	AppliChem GmbH	131954	67-68-5	
EDTA - Dinatriumsalz - Dihydrat	(Reag. Ph. Eur.) zur Analyse, ACS	AppliChem GmbH	131669	6381-92-6	
Eichlösung pH 4,0	entfällt	Hartenstein			
Eichlösung pH 7,0	entfällt	Hartenstein			
Eichlösung pH 9,0	entfällt	Hartenstein			
Essigsäure	$\geq 99.7\%$	Sigma-Aldrich	695092-2.5L	64-19-7	
Ethanol	96 % V/V vergällt mit 1 % MEK	---	---	---	
Fusicoccin	$\geq 90\%$	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-200754	20108-30-9	
Gelgreen		Biotium			

Gentamycinsulfat	BioChemica	AppliChem GmbH	A1492	1405-41-0	
Glycerin 87 %	BioChemica	AppliChem GmbH	A0970	56-81-5	
Hefeextrakt	BioChemica	AppliChem GmbH	A1552	entfällt	
Hydrogenperoxid	50 %	Sigma-Aldrich			
Kaliumacetat	for molecular biology, $\geq 99.0\%$	Sigma-Aldrich	P1190-100G	127-08-2	
Kaliumchlorid	zur Analyse, ACS, ISO	AppliChem GmbH	131494	7447-40-7	
Kaliumhydroxid 85% Plätzchen	zur Analyse	AppliChem GmbH	121515	1310-58-3	
Kanamycinsulfat	BioChemica	AppliChem GmbH	A1493	5965-95-7	
LB-Medium - Pulver nach Miller (LB-Medium)	entfällt	AppliChem GmbH	A0954	entfällt	
Magnesiumchlorid ●6 H ₂ O	ACS reagent, 99.0-102.0%	Sigma-Aldrich	M9272-1KG	7791-18-6	
Magnesiumsulfat - Heptahydrat	zur Analyse, ACS	AppliChem GmbH	131404	10034-99-8	
MES - Monohydrat	für Pufferlösungen	AppliChem GmbH	A1074	145224-94-8	
Natriumacetat wasserfrei	für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH	A4555	127-09-3	
Natriumchlorid	zur Analyse, ACS, ISO	AppliChem GmbH	131659	7647-14-5	
Natriumhydroxid - Plätzchen	zur Analyse, ACS, ISO	AppliChem GmbH	131687	1310-73-2	
Natriumhypochloritlösung	12 % Cl technisch	Carl Roth GmbH + Co. KG	9062.3	7681-52-9	
Natriumorthovanadat	99.98%	Sigma-Aldrich	450243-10G	13721-39-6	
Phosphinotricin		Duchefa Biochemie	P0159	77182-82-2	
all trans-Retinal	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich	R2500-25MG	116-31-4	
Rifampicin	$\geq 97\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich	R3501-5G	13292-46-1	
Salzsäure	ACS Reagent, 37%	Sigma-Aldrich	320331-500ML	7647-01-0	
SDS Pellets	für die Biochemie	Carl Roth	CN30	151-21-3	

		GmbH + Co. KG			
Silwet					
SOB-Medium	für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG	AE27	entfällt	
Tetracyclin - Hydrochlorid	BioChemica	AppliChem GmbH	A2228	64-75-5	
Tris ultrapure	ultrapure	AppliChem GmbH	A1086	77-86-1	
Triton X-100		Sigma- Aldrich	T8787- 50ML		
Trypton	BioChemica	AppliChem GmbH	A1553	91079-40-2	
Wasser HPLC Grade		Carl Roth			

A.4 Zusammensetzung von Puffern und Medien

Zusammensetzung 25xTAE Puffer für Agarosegelelektrophorese:

484 g	TRIS
114,2 ml	Essigsäure 96 %
74,4 g	Natrium-EDTA Dihydrat
Substanzen in 3,5 l VE-Wasser lösen, pH \geq 8, add Wasser auf 4 l	

Zusammensetzung $\frac{1}{2}$ MS-Medium für Arabidopsis, laut Hersteller Duchefa Biochemie (RV Haarlem, Niederlande):

Mikroelemente	mg/l	μM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0125	0,055
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0125	0,05
FeNaEDTA	18,35	50
H ₃ BO ₃	3,1	50,135
KI	0,415	2,5
MnSO ₄ .H ₂ O	8,45	50
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,125	0,515
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,3	14,955
Makroelemente	mg/l	mM
CaCl ₂	166,01	1,495
KH ₂ PO ₄	85	0,625
KNO ₃	950	9,395
MgSO ₄	90,27	0,75
NH ₄ NO ₃	825	10,305
Puffer	mg/l	mM
MES	250	1,175
Vitamine	mg/l	μM
Glycine	1,00	13,32
myo-Inositol	50,00	277,47
Nicotinsäure	0,25	2,03
Pyridoxine HCl	0,25	1,215
Thiamine HCl	0,05	0,15

<https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0255/name/murashige-skoog-medium-incl-vitamins-mes>

Zusammensetzung Edwardspuffer zur Extraktion genomischer DNA:

200 mM	TRIS-HCL pH 7,5
250 mM	NaCl
25 mM	EDTA pH 8,0
0,5 %	SDS

YEB-Medium: 0,5 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % Saccharose, 50 mM MgSO₄, für festes Platten Medium zusätzlich 1,5 % Agar-Agar Kobe I

Antibiotikakonzentrationen zur Selektion für:

E. coli: Kanamycin (25 µg/ml Medium)

A. tumefaciens: Gentamycin (25 µg/ml Medium), Rifampicin (10 µg/ml Medium), Kanamycin (50 µg/ml Medium)

Abkürzungsverzeichnis

μL	Mikroliter, 1/1000 mL μL
μM	Mikromolar (Stoffmengenkonzentration) eigentlich $\mu\text{M/L}$
ALMT	<u>A</u> I-activated <u>m</u> alate <u>t</u> ransporter
AtAKT1	<u>A</u> rabidopsis <u>t</u> haliana <u>A</u> rabidopsis <u>K</u> ⁺ transporter 1
AtAKT2	<u>A</u> rabidopsis <u>t</u> haliana <u>A</u> rabidopsis <u>K</u> ⁺ transporter 2
AtGORK	<u>A</u> rabidopsis <u>t</u> haliana guard cell <u>o</u> utward <u>r</u> ectifying <u>K</u> ⁺ channel
AtKAT1	<u>K</u> ⁺ transporter of <u>A</u> rabidopsis <u>t</u> haliana 1
AtSKOR	<u>A</u> rabidopsis <u>t</u> haliana <u>s</u> telar <u>K</u> ⁺ <u>o</u> utward <u>r</u> ectifier
<i>c</i>	Stoffmengenkonzentration
ChR2	Channelrhodopsin 2
Col0	Columbia0
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
Depol	Depolarisation
E_m	Membranpotential
E_s	Oberflächenpotential
FC	
g	Gramm
h	Stunde
L	Liter
min	Minute
min.	minimal
mL	Milliliter; 1/1000 Liter
mM	Millimolar (Stoffmengenkonzentration) eigentlich mM/L
mV	Millivolt 1/1000 Volt
Repol	Repolarisation
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen)
s	Sekunde
SLAC	<u>S</u> low-type <u>a</u> nion <u>c</u> hannel
SLAH	<u>S</u> LAC1- <u>h</u> omologs
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- Abe T (1981) Chloride ion efflux during an action potential in the main pulvinus of *Mimosa pudica*. *The botanical magazine = Shokubutsu-gaku-zasshi* 94 (4):379-383. doi:10.1007/BF02493398
- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K(+)-selective, K(+)-sensing ion channel. *FEBS Lett* 486 (2):93-98
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2012) *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 4 edn. John Wiley & Sons,
- Alberts B, Johnson A, Lewis Jea (2002) Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes. In: *Molecular Biology of the Cell*. 4 edn. Garland Science, New York,
- Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH, Tumlinson JH (1997) An Elicitor of Plant Volatiles from Beet Armyworm Oral Secretion. *Science* 276 (5314):945. doi:10.1126/science.276.5314.945
- Allison C, Hughes C (1991) Bacterial swarming: an example of prokaryotic differentiation and multicellular behaviour. *Science Progress (1933-)*:403-422
- Alsterfjord M, Sehnke PC, Arkell A, Larsson C, Svennelid F, Rosenquist M, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson H (2004) Plasma Membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 Isoforms of *Arabidopsis* Leaves: Evidence for Isoform Specificity in the 14-3-3/H⁺-ATPase Interaction. *Plant and Cell Physiology* 45 (9):1202-1210. doi:10.1093/pcp/pch136
- Aureliano M, Crans DC (2009) Decavanadate (V₁₀O₂₈6-) and oxovanadates: Oxometalates with many biological activities. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (4):536-546. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.11.010>
- Avelar Gabriela M, Schumacher Robert I, Zaini Paulo A, Leonard G, Richards Thomas A, Gomes Suely L (2014) A Rhodopsin-Guanylyl Cyclase Gene Fusion Functions in Visual Perception in a Fungus. *Current Biology* 24 (11):1234-1240. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.009>
- Bamann C, Gueta R, Kleinlogel S, Nagel G, Bamberg E (2010a) Structural Guidance of the Photocycle of Channelrhodopsin-2 by an Interhelical Hydrogen Bond. *Biochemistry* 49 (2):267-278. doi:10.1021/bi901634p
- Bamann C, Nagel G, Bamberg E (2010b) Microbial rhodopsins in the spotlight. *Current Opinion in Neurobiology* 20 (5):610-616. doi:<https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.07.003>
- Baumann M (2013) *Optogenetische Simulation und Analyse elektrischer und Calcium-basierter Signale in Pflanzen*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg
- Baunsgaard L, Venema K, Axelsen KB, Villalba JM, Welling A, Wollenweber B, Palmgren MG (1996) Modified plant plasma membrane H⁺-ATPase with improved transport coupling efficiency identified by mutant selection in yeast. *The Plant Journal* 10 (3):451-458. doi:10.1046/j.1365-313X.1996.10030451.x
- Becker D, Zeilinger C, Lohse G, Depta H, Hedrich R (1993) Identification and biochemical characterization of the plasma-membrane H⁺-ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 190 (1):44-50. doi:10.1007/bf00195673
- Bertholon de Saint-Lazare P (1783) *De l'Electricité des Végétaux: Ouvrage dans lequel on traite de l'electricite de l'atmosphere sur les plantes, de ses effets sur l'economie des vegetaux, de leurs vertus medicaux*. P.F. Didotjeune, Paris
- Bisson MA, Walker NA (1981) The Hyperpolarization of the Chara Membrane at High pH: Effects of External Potassium, Internal pH, and DCCD. *Journal of Experimental Botany* 32 (5):951-971. doi:10.1093/jxb/32.5.951
- Biswal D, Yanthan S, Konhar R, Debnath M, Kumaria S, Tandon P (2017) Phylogeny and biogeography of the carnivorous plant family Droseraceae with representative *Drosera* species from Northeast India [version 1; peer review: 1 approved, 1 not approved]. *F1000Research* 6 (1454). doi:10.12688/f1000research.12049.1

- Blatt MR, Gradmann D (1997) K⁺-Sensitive Gating of the K⁺ Outward Rectifier in Vicia Guard Cells. *The Journal of Membrane Biology* 158 (3):241-256. doi:10.1007/s002329900261
- Blume B, Nürnberger T, Nass N, Scheel D (2000) Receptor-Mediated Increase in Cytoplasmic Free Calcium Required for Activation of Pathogen Defense in Parsley. *The Plant Cell* 12 (8):1425. doi:10.1105/tpc.12.8.1425
- Bohm J, Scherzer S, Krol E, Kreuzer I, von Meyer K, Lorey C, Mueller TD, Shabala L, Monte I, Solano R, Al-Rasheid KA, Rennenberg H, Shabala S, Neher E, Hedrich R (2016) The Venus Flytrap *Dionaea muscipula* Counts Prey-Induced Action Potentials to Induce Sodium Uptake. *Curr Biol* 26 (3):286-295. doi:10.1016/j.cub.2015.11.057
- Boller T, Felix G (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60 (1):379-406. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience* 8:1263. doi:10.1038/nrn1525
- Brinckmann E, Lüttge U (1974) Light-triggered membrane potential oscillations and electric coupling in variegated photosynthetic mutants of *Oenothera*. *Planta* 119 (1):47-57. doi:10.1007/BF00390821
- Brownlee C (2002) Plant K⁺ Transport: Not Just an Uphill Struggle. *Current Biology* 12 (11):R402-R404. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00886-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00886-2)
- Bueso E, Bissoli G, Planes MD, Gonzalez-Guzmán M, Rodriguez PL, Niñoles R, Alejandro S, Serrano R, Fernández JA, Rubio L, García-Sánchez MJ, Hedrich R (2014) A mechanism of growth inhibition by abscisic acid in germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* based on inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase and decreased cytosolic pH, K⁺, and anions. *Journal of Experimental Botany* 66 (3):813-825. doi:10.1093/jxb/eru442
- Burdon-Sanderson JS (1872) Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionaea muscipula* in the excited and unexcited states, vol 21. doi:10.1098/rspl.1872.0092
- Caesar K, Elgass K, Chen Z, Huppenberger P, Witthöft J, Schleifenbaum F, Blatt MR, Oecking C, Harter K (2011) A fast brassinolide-regulated response pathway in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 66 (3):528-540. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04510.x
- Carpaneto A, Ivashikina N, Levchenko V, Krol E, Jeworutzki E, Zhu J-K, Hedrich R (2007) Cold Transiently Activates Calcium-Permeable Channels in *Arabidopsis* Mesophyll Cells. *Plant Physiology* 143 (1):487-494. doi:10.1104/pp.106.090928
- Chen Y, Hoehenwarter W, Weckwerth W (2010) Comparative analysis of phytohormone-responsive phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana* using TiO₂-phosphopeptide enrichment and mass accuracy precursor alignment. *The Plant Journal* 63 (1):1-17. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04218.x
- Cho MH, Spalding EP (1996) An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (15):8134-8138
- Clarkson DT, Hanson JB (1980) The mineral nutrition of higher plants. *Annual review of plant physiology* 31 (1):239-298
- Clausen Johannes D, Bublitz M, Arnou B, Olesen C, Andersen Jens P, Møller Jesper V, Nissen P (2016) Crystal Structure of the Vanadate-Inhibited Ca²⁺-ATPase. *Structure* 24 (4):617-623. doi:<https://doi.org/10.1016/j.str.2016.02.018>
- Cosentino C, Alberio L, Gazzarrini S, Aquila M, Romano E, Cermenati S, Zuccolini P, Petersen J, Beltrame M, Van Etten JL, Christie JM, Thiel G, Moroni A (2015) Engineering of a light-gated potassium channel. *Science* 348 (6235):707. doi:10.1126/science.aaa2787
- Cosgrove DJ (1988) Mechanism of rapid suppression of cell expansion in cucumber hypocotyls after blue-light irradiation. *Planta* 176 (1):109-116. doi:10.1007/BF00392486
- Cosgrove DJ, Green PB (1981) Rapid Suppression of Growth by Blue Light : BIOPHYSICAL MECHANISM OF ACTION. *Plant physiology* 68 (6):1447-1453

- Cuin T, Dreyer I, Michard E (2018) The Role of Potassium Channels in *Arabidopsis thaliana* Long Distance Electrical Signalling: AKT2 Modulates Tissue Excitability While GORK Shapes Action Potentials. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4):926
- Darwin C (1875) *Insectivorous Plants*.
- Dawydow A, Gueta R, Ljaschenko D, Ullrich S, Hermann M, Ehmann N, Gao S, Fiala A, Langenhan T, Nagel G, Kittel RJ (2014) Channelrhodopsin-2-XXL, a powerful optogenetic tool for low-light applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (38):13972-13977. doi:10.1073/pnas.1408269111
- de Angeli A, Thomine S, Frachisse J-M, Ephritikhine G, Gambale F, Barbier-Brygoo H (2007) Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Letters* 581 (12):2367-2374. doi:<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.003>
- De Jaeger G, Julien JL, Frachisse JM, Desbiez MO (1991) Characteristics of the Wave of Depolarization Induced by Wounding in *Bidens pilosa* L. *Journal of Experimental Botany* 42 (1):131-137. doi:10.1093/jxb/42.1.131
- Degli Agosti R (2014) Touch-induced action potentials in *Arabidopsis thaliana*, vol 67.
- Deisseroth K, Hegemann P (2017) The form and function of channelrhodopsin. *Science* 357 (6356). doi:10.1126/science.aan5544
- Demidchik V, Shabala SN, Davies JM (2007) Spatial variation in H₂O₂ response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca²⁺ flux and plasma membrane Ca²⁺ channels. *The Plant Journal* 49 (3):377-386. doi:10.1111/j.1365-3113.2006.02971.x
- Dennison KL, Robertson WR, Lewis BD, Hirsch RE, Sussman MR, Spalding EP (2001) Functions of AKT1 and AKT2 potassium channels determined by studies of single and double mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127 (3):1012-1019
- Di Palma JR, Mohl R, Best W, Jr. (1961) Action potential and contraction of *Dionaea muscipula* (Venus flytrap). *Science* 133 (3456):878-879
- DiPalma JR, McMichael R, DiPalma M (1966) Touch receptor of venous flytrap, *Dionaea muscipula*. *Science* 152 (3721):539-540
- Dreyer I, Blatt MR (2009) What makes a gate? The ins and outs of Kv-like K⁺ channels in plants. *Trends in Plant Science* 14 (7):383-390. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.04.001>
- Duan X, Nagel G, Gao S (2019) Mutated Channelrhodopsins with Increased Sodium and Calcium Permeability. *Applied Sciences* 9 (4). doi:10.3390/app9040664
- Eckardt NA (2008) Chitin Signaling in Plants: Insights into the Perception of Fungal Pathogens and Rhizobacterial Symbionts. *The Plant Cell* 20 (2):241. doi:10.1105/tpc.108.058784
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* 19 (6):1349
- Ekberg K, Palmgren MG, Veierskov B, Buch-Pedersen MJ (2010) A Novel Mechanism of P-type ATPase Autoinhibition Involving Both Termini of the Protein. *Journal of Biological Chemistry* 285 (10):7344-7350
- Elzenga JTM, Prins HBA, Van Volkenburgh E (1995) Light-induced membrane potential changes of epidermal and mesophyll cells in growing leaves of *Pisum sativum*. *Planta* 197 (1):127-134. doi:10.1007/BF00239948
- Escalante-Pérez M, Krol E, Stange A, Geiger D, Al-Rasheid KAS, Hause B, Neher E, Hedrich R (2011) A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (37):15492. doi:10.1073/pnas.1112535108
- Falhof J, Pedersen Jesper T, Fuglsang Anja T, Palmgren M (2016) Plasma Membrane H⁺-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Molecular Plant* 9 (3):323-337. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.11.002>
- Farmer EE, Gao Y-Q, Lenzone G, Wolfender J-L, Wu Q (2020) Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytologist* 227 (4):1037-1050. doi:10.1111/nph.16646
- Favre P, Greppin H, Degli Agosti R (2001) Repetitive action potentials induced in *Arabidopsis thaliana* leaves by wounding and potassium chloride application. *Plant Physiology and Biochemistry* 39 (11):961-969. doi:[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01317-1](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01317-1)

- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* 18 (3):265-276. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x
- Felle HH, Zimmermann MR (2007) Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta* 226 (1):203. doi:10.1007/s00425-006-0458-y
- Fisahn J, Herde O, Willmitzer L, Peña-Cortés H (2004) Analysis of the Transient Increase in Cytosolic Ca²⁺ during the Action Potential of Higher Plants with High Temporal Resolution: Requirement of Ca²⁺ Transients for Induction of Jasmonic Acid Biosynthesis and PINII Gene Expression. *Plant and Cell Physiology* 45 (4):456-459. doi:10.1093/pcp/pch054
- Flügge U-I (1999) PHOSPHATE TRANSLOCATORS IN PLASTIDS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50 (1):27-45. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.27
- Förster S, Schmidt LK, Kopic E, Anschütz U, Huang S, Schlücking K, Köster P, Waadt R, Larrieu A, Batistič O, Rodriguez PL, Grill E, Kudla J, Becker D (2019) Wounding-Induced Stomatal Closure Requires Jasmonate-Mediated Activation of GORK K⁺ Channels by a Ca²⁺ Sensor-Kinase CBL1-CIPK5 Complex. *Developmental Cell* 48 (1):87-99.e86. doi:https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.014
- Fromm J, Bauer T (1994) Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *Journal of Experimental Botany* 45 (4):463-469. doi:10.1093/jxb/45.4.463
- Fromm J, Hajirezaei M, Wilke I (1995) The Biochemical Response of Electrical Signaling in the Reproductive System of Hibiscus Plants. *Plant Physiol* 109 (2):375-384
- Fromm J, Hajirezaei MR, Becker VK, Lautner S (2013) Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf. *Front Plant Sci* 4:239. doi:10.3389/fpls.2013.00239
- Fromm J, Lautner S (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell & Environment* 30 (3):249-257. doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01614.x
- Fuglsang AT, Borch J, Bych K, Jahn TP, Roepstorff P, Palmgren MG (2003) The Binding Site for Regulatory 14-3-3 Protein in Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase: INVOLVEMENT OF A REGION PROMOTING PHOSPHORYLATION-INDEPENDENT INTERACTION IN ADDITION TO THE PHOSPHORYLATION-DEPENDENT C-TERMINAL END. *Journal of Biological Chemistry* 278 (43):42266-42272
- Fuglsang AT, Guo Y, Cuin TA, Qiu Q, Song C, Kristiansen KA, Bych K, Schulz A, Shabala S, Schumaker KS, Palmgren MG, Zhu J-K (2007) Arabidopsis Protein Kinase PKS5 Inhibits the Plasma Membrane H⁺-ATPase by Preventing Interaction with 14-3-3 Protein. *The Plant Cell* 19 (5):1617. doi:10.1105/tpc.105.035626
- Fuglsang AT, Kristensen A, Cuin TA, Schulze WX, Persson J, Thuesen KH, Ytting CK, Oehlenschläger CB, Mahmood K, Sondergaard TE, Shabala S, Palmgren MG (2014) Receptor kinase-mediated control of primary active proton pumping at the plasma membrane. *The Plant Journal* 80 (6):951-964. doi:10.1111/tpj.12680
- Fuglsang AT, Visconti S, Drumm K, Jahn T, Stensballe A, Mattei B, Jensen ON, Aducci P, Palmgren MG (1999) Binding of 14-3-3 Protein to the Plasma Membrane H⁺-ATPase AHA2 Involves the Three C-terminal Residues Tyr946-Thr-Val and Requires Phosphorylation of Thr947. *Journal of Biological Chemistry* 274 (51):36774-36780
- Gaba V, Black M (1979) Two separate photoreceptors control hypocotyl growth in green seedlings. *Nature* 278 (5699):51-54. doi:10.1038/278051a0
- Galvani L (1791) *De Viribus Electricitatis in Motu Musculari Commentaries*, vol 7.
- Gao S, Nagpal J, Schneider MW, Kozjak-Pavlovic V, Nagel G, Gottschalk A (2015) Optogenetic manipulation of cGMP in cells and animals by the tightly light-regulated guanylyl-cyclase opsin CyclOp. *Nature Communications* 6:8046. doi:10.1038/ncomms9046

<https://www.nature.com/articles/ncomms9046#supplementary-information>

Geibel S, Friedrich T, Ormos P, Wood PG, Nagel G, Bamberg E (2001) The Voltage-Dependent Proton Pumping in Bacteriorhodopsin Is Characterized by Optoelectric

- Behavior. *Biophysical Journal* 81 (4):2059-2068. doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75855-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75855-9)
- 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 (173):ra32. doi:10.1126/scisignal.2001346
- Gilroy S, Białasek M, Suzuki N, Górecka M, Devireddy AR, Karpiński S, Mittler R (2016) ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants. *Plant Physiology* 171 (3):1606. doi:10.1104/pp.16.00434
- Glantz ST, Carpenter EJ, Melkonian M, Gardner KH, Boyden ES, Wong GK-S, Chow BY (2016) Functional and topological diversity of LOV domain photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (11):E1442. doi:10.1073/pnas.1509428113
- Gómez-Gómez L, Boller T (2000) FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* 5 (6):1003-1011. doi:[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80265-8)
- Govorunova EG, Sineshchekov OA, Janz R, Liu X, Spudich JL (2015) Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics. *Science* 349 (6248):647. doi:10.1126/science.aaa7484
- Govorunova EG, Sineshchekov OA, Li H, Spudich JL (2017) Microbial Rhodopsins: Diversity, Mechanisms, and Optogenetic Applications. *Annual Review of Biochemistry* 86 (1):845-872. doi:10.1146/annurev-biochem-101910-144233
- Gunaydin LA, Yizhar O, Berndt A, Sohal VS, Deisseroth K, Hegemann P (2010) Ultrafast optogenetic control. *Nature Neuroscience* 13:387. doi:10.1038/nn.2495
- <https://www.nature.com/articles/nn.2495#supplementary-information>
- Gutermuth T, Herbell S, Lassig R, Brosché M, Romeis T, Feijó JA, Hedrich R, Konrad KR (2018) Tip-localized Ca²⁺-permeable channels control pollen tube growth via kinase-dependent R- and S-type anion channel regulation. *New Phytologist* 218 (3):1089-1105. doi:10.1111/nph.15067
- Guzel Deger A, Scherzer S, Nuhkat M, Kedzierska J, Kollist H, Brosché M, Unyayar S, Boudsocq M, Hedrich R, Roelfsema MRG (2015) Guard cell SLAC1-type anion channels mediate flagellin-induced stomatal closure. *New Phytologist* 208 (1):162-173. doi:10.1111/nph.13435
- Hafke JB, Ehlers K, Föllner J, Höll S-R, Becker S, van Bel AJE (2013) Involvement of the Sieve Element Cytoskeleton in Electrical Responses to Cold Shocks. *Plant Physiology* 162 (2):707. doi:10.1104/pp.113.216218
- Harper JF, Surowy TK, Sussman MR (1989) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) of Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (4):1234-1238
- Haruta M, Burch HL, Nelson RB, Barrett-Wilt G, Kline KG, Mohsin SB, Young JC, Otegui MS, Sussman MR (2010) Molecular characterization of mutant Arabidopsis plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M110.101733
- Haruta M, Sabat G, Stecker K, Minkoff BB, Sussman MR (2014) A Peptide Hormone and Its Receptor Protein Kinase Regulate Plant Cell Expansion. *Science* 343 (6169):408. doi:10.1126/science.1244454
- Haruta M, Sussman MR (2012) The Effect of a Genetically Reduced Plasma Membrane Protonmotive Force on Vegetative Growth of Arabidopsis. *Plant Physiology* 158 (3):1158. doi:10.1104/pp.111.189167
- Hayashi M, Inoue S-i, Takahashi K, Kinoshita T (2011) Immunohistochemical Detection of Blue Light-Induced Phosphorylation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Stomatal Guard Cells. *Plant and Cell Physiology* 52 (7):1238-1248. doi:10.1093/pcp/pcr072
- Hedrich R, Geiger D (2017) Biology of SLAC1-type anion channels - from nutrient uptake to stomatal closure. *New Phytol* 216 (1):46-61. doi:10.1111/nph.14685
- Hedrich R, Moran O, Conti F, Busch H, Becker D, Gambale F, Dreyer I, Kück A, Neuwinger K, Palme K (1995) Inward rectifier potassium channels in plants differ

- from their animal counterparts in response to voltage and channel modulators. *European Biophysics Journal* 24 (2):107-115. doi:10.1007/BF00211406
- Heindl JE, Wang Y, Heckel BC, Mohari B, Feirer N, Fuqua C (2014) Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. *Frontiers in Plant Science* 5 (176). doi:10.3389/fpls.2014.00176
- Hille B (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3 edn. Sinauer Associates, Sunderland
- Hoffmann MD, Bubeck F, Eils R, Niopek D (2018) Controlling Cells with Light and LOV. *Advanced Biosystems* 2 (9):1800098. doi:10.1002/adbi.201800098
- Hohmann-Marriott MF, Blankenship RE (2011) Evolution of Photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 62 (1):515-548. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103811
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Porée F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Véry A-A, Simonneau T, Thibaud J-B, Sentenac H (2003) The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (9):5549. doi:10.1073/pnas.0733970100
- Hoth S, Geiger D, Becker D, Hedrich R (2001) The Pore of Plant K⁺ Channels Is Involved in Voltage and pH Sensing: Domain-Swapping between Different K⁺ Channel α -Subunits. *The Plant Cell* 13 (4):943. doi:10.1105/tpc.13.4.943
- Hou C, Tian W, Kleist T, He K, Garcia V, Bai F, Hao Y, Luan S, Li L (2014) DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes. *Cell Research* 24:632. doi:10.1038/cr.2014.14
- <https://www.nature.com/articles/cr201414#supplementary-information>
- Houwink AL (1935) The conduction of excitation in *Mimosa pudica*. *Recueil des travaux botaniques néerlandais* 32 (1):51-91
- Hürter A-L, Fort S, Cottaz S, Hedrich R, Geiger D, Roelfsema MRG (2018) Mycorrhizal lipochitinoligosaccharides (LCOs) depolarize root hairs of *Medicago truncatula*. *PLOS ONE* 13 (5):e0198126. doi:10.1371/journal.pone.0198126
- Inoue S-i, Kinoshita T (2017) Blue Light Regulation of Stomatal Opening and the Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology* 174 (2):531. doi:10.1104/pp.17.00166
- Jeworutzki E, Roelfsema MRG, Anshütz U, Krol E, Elzenga JTM, Felix G, Boller T, Hedrich R, Becker D (2010) Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant Journal* 62 (3):367-378. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04155.x
- Jing Y, Zheng X, Zhang D, Shen N, Wang Y, Yang L, Fu A, Shi J, Zhao F, Lan W, Luan S (2019) Danger-Associated Peptides Interact with PIN-Dependent Local Auxin Distribution to Inhibit Root Growth in Arabidopsis. *The Plant Cell* 31 (8):1767. doi:10.1105/tpc.18.00757
- Johansson F, Sommarin M, Larsson C (1993) Fusicoccin Activates the Plasma Membrane H⁺-ATPase by a Mechanism Involving the C-Terminal Inhibitory Domain. *The Plant Cell* 5 (3):321. doi:10.1105/tpc.5.3.321
- Jorgensen PL, Håkansson KO, Karlsh SJD (2003) Structure and Mechanism of Na,K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annual Review of Physiology* 65 (1):817-849. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142558
- Kaiser D (2001) Building a Multicellular Organism. *Annual Review of Genetics* 35 (1):103-123. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090145
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122 (1):101-108. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(96\)04541-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04541-4)
- Katicheva L, Sukhov V, Akinchits E, Vodenev V (2014) Ionic Nature of Burn-Induced Variation Potential in Wheat Leaves. *Plant and Cell Physiology* 55 (8):1511-1519. doi:10.1093/pcp/pcu082
- Keinath NF, Waadt R, Brugman R, Schroeder Julian I, Grossmann G, Schumacher K, Krebs M (2015) Live Cell Imaging with R-GECO1 Sheds Light on flg22- and Chitin-Induced Transient [Ca²⁺]_{cyt} Patterns in Arabidopsis. *Molecular Plant* 8 (8):1188-1200. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.006>

- Kleinlogel S, Feldbauer K, Dempski RE, Fotis H, Wood PG, Bamann C, Bamberg E (2011) Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci* 14 (4):513-518. doi:10.1038/nn.2776
- Koers S, Guzel-Deger A, Marten I, Roelfsema MRG (2011) Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels. *The Plant Journal* 68 (4):670-680. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04719.x
- Koselski M, Trebacz K, Dziubinska H, Krol E (2008) Light- and dark-induced action potentials in *Physcomitrella patens*. *Plant Signaling & Behavior* 3 (1):13-18. doi:10.4161/psb.3.1.4884
- Krol E, Dziubinska H, Stolarz M, Trebacz K (2006) Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. *Biologia Plantarum* 50 (3):411-416. doi:10.1007/s10535-006-0058-5
- Krol E, Dziubinska H, Trebacz K (2003) Low-Temperature Induced Transmembrane Potential Changes in the Liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant and Cell Physiology* 44 (5):527-533. doi:10.1093/pcp/pcg070
- Krol E, Dziubińska H, Trebacz K (2004) Low-temperature-induced transmembrane potential changes in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus* and *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum* 120 (2):265-270. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.0244.x
- Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, Boller T, Felix G, Kemmerling B, Postel S, Arents M, Jeworutzki E, Al-Rasheid KAS, Becker D, Hedrich R (2010) Perception of the *Arabidopsis* Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor AtPEPR1 and Its Close Homologue AtPEPR2. *Journal of Biological Chemistry* 285 (18):13471-13479
- Krol E, Trebacz K (1999) Calcium-Dependent Voltage Transients Evoked by Illumination in the Liverwort *Conocephalum conicum*, vol 40. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029470
- Kumari A, Chételat A, Nguyen CT, Farmer EE (2019) Arabidopsis H⁺-ATPase AHA1 controls slow wave potential duration and wound-response jasmonate pathway activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (40):20226. doi:10.1073/pnas.1907379116
- Lacombe B, Pilot G, Michard E, Gaymard F, Sentenac H, Thibaud J-B (2000) A Shaker-like K⁺ Channel with Weak Rectification Is Expressed in Both Source and Sink Phloem Tissues of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12 (6):837. doi:10.1105/tpc.12.6.837
- Ladwig F, Dahlke RI, Stührwohldt N, Hartmann J, Harter K, Sauter M (2015) Phytosulfokine Regulates Growth in *Arabidopsis* through a Response Module at the Plasma Membrane That Includes CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL17, H⁺-ATPase, and BAK1. *The Plant Cell* 27 (6):1718. doi:10.1105/tpc.15.00306
- Lanfermeijer FC, Prins HBA (1994) Modulation of H⁺-ATPase Activity by Fusicoccin in Plasma Membrane Vesicles from Oat (*Avena sativa* L.) Roots (A Comparison of Modulation by Fusicoccin, Trypsin, and Lysophosphatidylcholine). *Plant Physiology* 104 (4):1277. doi:10.1104/pp.104.4.1277
- Lewis BD, Karlin-Neumann G, Davis RW, Spalding EP (1997) Ca²⁺-activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 114 (4):1327-1334
- Lewis BD, Spalding EP (1998) Nonselective block by La³⁺ of *Arabidopsis* ion channels involved in signal transduction. *J Membr Biol* 162 (1):81-90
- Li W, Assmann SM (1993) Characterization of a G-protein-regulated outward K⁺ current in mesophyll cells of *vicia faba* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (1):262-266. doi:10.1073/pnas.90.1.262
- Lin JY, Lin MZ, Steinbach P, Tsien RY (2009) Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J* 96 (5):1803-1814. doi:10.1016/j.bpj.2008.11.034
- Lohse G, Hedrich R (1992) Characterization of the plasma-membrane H⁺-ATPase from *Vicia faba* guard cells. *Planta* 188 (2):206-214. doi:10.1007/bf00216815
- Maffei ME, Mithöfer A, Arimura G-I, Uchtenhagen H, Bossi S, Berteza CM, Cucuzza LS, Novero M, Volpe V, Quadro S, Boland W (2006) Effects of Feeding *Spodoptera littoralis* on Lima Bean Leaves. III. Membrane Depolarization and Involvement of Hydrogen Peroxide. *Plant Physiology* 140 (3):1022. doi:10.1104/pp.105.071993

- Marten I, Deeken R, Hedrich R, Roelfsema MR (2010) Light-induced modification of plant plasma membrane ion transport. *Plant Biol (Stuttg)* 12 Suppl 1:64-79. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00384.x
- Marten I, Hoth S, Deeken R, Ache P, Ketchum KA, Hoshi T, Hedrich R (1999) AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked by protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (13):7581. doi:10.1073/pnas.96.13.7581
- Meijer G (1968) RAPID GROWTH INHIBITION OF GHERKIN HYPOCOTYLS IN BLUE LIGHT. *Acta Botanica Neerlandica* 17 (1):9-14. doi:10.1111/j.1438-8677.1968.tb00060.x
- Method of the Year 2010 (2010). *Nature Methods* 8:1. doi:10.1038/nmeth.f.321
- 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 (3):418-427. doi:10.1007/s00425-005-1551-3
- Michard E, Dreyer I, Lacombe B, Sentenac H, Thibaud J-B (2005) Inward rectification of the AKT2 channel abolished by voltage-dependent phosphorylation. *The Plant Journal* 44 (5):783-797. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02566.x
- Mills E, Chen X, Pham E, Wong S, Truong K (2012) Engineering a Photoactivated Caspase-7 for Rapid Induction of Apoptosis. *ACS Synthetic Biology* 1 (3):75-82. doi:10.1021/sb200008j
- Minorsky PV, Spanswick RM (1989) Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings. *Plant, Cell & Environment* 12 (2):137-143. doi:10.1111/j.1365-3040.1989.tb01925.x
- Mithöfer A, Boland W (2008) Recognition of Herbivory-Associated Molecular Patterns. *Plant Physiology* 146 (3):825. doi:10.1104/pp.107.113118
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (49):19613. doi:10.1073/pnas.0705147104
- Möglich A, Yang X, Ayers RA, Moffat K (2010) Structure and Function of Plant Photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology* 61 (1):21-47. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112259
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500:422. doi:10.1038/nature12478
- <https://www.nature.com/articles/nature12478#supplementary-information>
- Mullineaux PM, Karpinski S, Baker NR (2006) Spatial Dependence for Hydrogen Peroxide-Directed Signaling in Light-Stressed Plants. *Plant Physiology* 141 (2):346. doi:10.1104/pp.106.078162
- Murthy SE, Dubin AE, Whitwam T, Jojoa-Cruz S, Cahalan SM, Mousavi SAR, Ward AB, Patapoutian A (2018) OSCA/TMEM63 are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels. *eLife* 7:e41844. doi:10.7554/eLife.41844
- 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 (24):2279-2284. doi:10.1016/j.cub.2005.11.032
- 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 (5577):2395-2398. doi:10.1126/science.1072068
- 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 (24):13940-13945. doi:10.1073/pnas.1936192100
- Nagel G, Szellas T, Kateriya S, Adeishvili N, Hegemann P, Bamberg E (2005b) Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochemical Society Transactions* 33 (4):863. doi:10.1042/BST0330863
- Nelson EC (1989) *Dionaea D. Solander ex J. Ellis (Droseraceae): notes on the nomenclature and typification of Venus's Fly-trap*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 99 (3):249-254. doi:10.1111/j.1095-8339.1989.tb00402.x

- Neurosciences (2013). 1 edn. Springer Spektrum,
- Nour-Eldin HH, Hansen BG, Nørholm MHH, Jensen JK, Halkier BA (2006) Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic acids research* 34 (18):e122-e122. doi:10.1093/nar/gkl635
- Ochoa-Fernandez R, Abel NB, Wieland F-G, Schlegel J, Koch L-A, Miller JB, Engesser R, Giuriani G, Brandl SM, Timmer J, Weber W, Ott T, Simon R, Zurbriggen MD (2020) Optogenetic control of gene expression in plants in the presence of ambient white light. *Nature Methods* 17 (7):717-725. doi:10.1038/s41592-020-0868-y
- Okumura M, Inoue S-i, Kuwata K, Kinoshita T (2016) Photosynthesis Activates Plasma Membrane H⁺-ATPase via Sugar Accumulation. *Plant Physiology* 171 (1):580. doi:10.1104/pp.16.00355
- Okumura M, Inoue S-i, Takahashi K, Ishizaki K, Kohchi T, Kinoshita T (2012) Characterization of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiology* 159 (2):826-834. doi:10.1104/pp.112.195537
- Ottmann C, Marco S, Jaspert N, Marcon C, Schauer N, Weyand M, Vandermeeren C, Duby G, Boutry M, Wittinghofer A, Rigaud J-L, Oecking C (2007) Structure of a 14-3-3 Coordinated Hexamer of the Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase by Combining X-Ray Crystallography and Electron Cryomicroscopy. *Molecular Cell* 25 (3):427-440. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.017>
- Palmgren MG (2001) PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52 (1):817-845. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.817
- Palmgren MG, Sommarin M, Serrano R, Larsson C (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 266 (30):20470-20475
- Papanatsiou M, Petersen J, Henderson L, Wang Y, Christie JM, Blatt MR (2019) Optogenetic manipulation of stomatal kinetics improves carbon assimilation, water use, and growth. *Science* 363 (6434):1456. doi:10.1126/science.aaw0046
- Pedersen JT, Falhof J, Ekberg K, Buch-Pedersen MJ, Palmgren M (2015) Metal Fluoride Inhibition of a P-type H⁺ Pump: STABILIZATION OF THE PHOSPHOENZYME INTERMEDIATE CONTRIBUTES TO POST-TRANSLATIONAL PUMP ACTIVATION. *Journal of Biological Chemistry* 290 (33):20396-20406
- Pei Z-M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406 (6797):731-734. doi:10.1038/35021067
- Pham E, Mills E, Truong K (2011) A Synthetic Photoactivated Protein to Generate Local or Global Ca²⁺ Signals. *Chemistry & Biology* 18 (7):880-890. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.04.014>
- Pickard BG (1973) Action potentials in higher plants. *The Botanical Review* 39 (2):172-201. doi:10.1007/BF02859299
- Raffelberg S, Wang L, Gao S, Losi A, Gärtner W, Nagel G (2013) A LOV-domain-mediated blue-light-activated adenylyl (adenylyl) cyclase from the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* PCC 7420. *Biochemical Journal* 455 (3):359. doi:10.1042/BJ20130637
- Reyer A, Häbler M, Scherzer S, Huang S, Pedersen JT, Al-Rasheid KAS, Bamberg E, Palmgren M, Dreyer I, Nagel G, Hedrich R, Becker D (2020) Channelrhodopsin-mediated optogenetics highlights a central role of depolarization-dependent plant proton pumps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (34):20920-20925. doi:10.1073/pnas.2005626117
- Rhodes JD, Thain JF, Wildon DC (1996) The pathway for systemic electrical signal conduction in the wounded tomato plant. *Planta* 200 (1):50-57. doi:10.1007/BF00196648
- Rodríguez-Navarro A, Benito B (2010) Sodium or potassium efflux ATPase: A fungal, bryophyte, and protozoal ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798 (10):1841-1853. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.009>
- Roelfsema MRG, Levchenko V, Hedrich R (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *The Plant Journal* 37 (4):578-588. doi:10.1111/j.1365-3113X.2003.01985.x

- Roelfsema MRG, Prins HBA (1997) Ion channels in guard cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 202 (1):18-27. doi:10.1007/s004250050098
- 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):1-13. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01000.x
- Saito S, Uozumi N (2019) Guard Cell Membrane Anion Transport Systems and Their Regulatory Components: An Elaborate Mechanism Controlling Stress-Induced Stomatal Closure. *Plants* 8 (1). doi:10.3390/plants8010009
- Scheib U, Stehfest K, Gee CE, Körschen HG, Fudim R, Oertner TG, Hegemann P (2015) The rhodopsin-guanylyl cyclase of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* enables fast optical control of cGMP signaling. *Science Signaling* 8 (389):rs8. doi:10.1126/scisignal.aab0611
- Scherzer S, Federle W, Al-Rasheid KAS, Hedrich R (2019) Venus flytrap trigger hairs are micronewton mechano-sensors that can detect small insect prey. *Nature Plants* 5 (7):670-675. doi:10.1038/s41477-019-0465-1
- Scherzer S, Shabala L, Hedrich B, Fromm J, Bauer H, Munz E, Jakob P, Al-Rasheid KAS, Kreuzer I, Becker D, Eiblmeier M, Rennenberg H, Shabala S, Bennett M, Neher E, Hedrich R (2017) Insect haptoelectrical stimulation of Venus flytrap triggers exocytosis in gland cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (18):4822. doi:10.1073/pnas.1701860114
- Schopfer PB, Axel; (2010) *Pflanzenphysiologie*. 7 edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Shao Q, Gao Q, Lhamo D, Zhang H, Luan S (2020) Two glutamate- and pH-regulated Ca²⁺ channels are required for systemic wound signaling in *Arabidopsis*. *Science Signaling* 13 (640):eaba1453. doi:10.1126/scisignal.aba1453
- Shiina T, Tazawa M (1986) Action Potential in *Luffa cylindrica* and its Effects on Elongation Growth. *Plant and Cell Physiology* 27 (6):1081-1089. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a077191
- Sibaoka T (1991) Rapid plant movements triggered by action potentials. *The botanical magazine = Shokubutsu-gaku-zasshi* 104 (1):73-95. doi:10.1007/BF02493405
- Sineshchekov OA, Jung K-H, Spudich JL (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (13):8689. doi:10.1073/pnas.122243399
- Spalding EP, Cosgrove DJ (1989a) Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta* 178 (3):407-410. doi:10.1007/BF00391869
- Spalding EP, Cosgrove DJ (1989b) Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta* 178:407-410
- Spalding EP, Cosgrove DJ (1992) Mechanism of blue-light-induced plasma-membrane depolarization in etiolated cucumber hypocotyls. *Planta* 188 (2):199-205
- Spartz AK, Ren H, Park MY, Grandt KN, Lee SH, Murphy AS, Sussman MR, Overvoorde PJ, Gray WM (2014) SAUR Inhibition of PP2C-D Phosphatases Activates Plasma Membrane H⁺-ATPases to Promote Cell Expansion in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 26 (5):2129-2142. doi:10.1105/tpc.114.126037
- Stahlberg R, Cosgrove DJ (1994) Comparison of electric and growth responses to excision in cucumber and pea seedlings. I. Short-distance effects are a result of wounding. *Plant, Cell & Environment* 17 (10):1143-1151. doi:10.1111/j.1365-3040.1994.tb02012.x
- Stahlberg R, Van Volkenburgh E (1999) The effect of light on membrane potential, apoplastic pH and cell expansion in leaves of *Pisum sativum* L. var. *Argenteum*. *Planta* 208 (2):188-195. doi:10.1007/s004250050549
- Stehfest K, Ritter E, Berndt A, Bartl F, Hegemann P (2010) The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T. *J Mol Biol* 398 (5):690-702. doi:10.1016/j.jmb.2010.03.031
- Strickland D, Moffat K, Sosnick TR (2008) Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (31):10709. doi:10.1073/pnas.0709610105

- Sukhov V, Akinchits E, Katicheva L, Vodeneev V (2013) Simulation of variation potential in higher plant cells. *J Membr Biol* 246 (4):287-296. doi:10.1007/s00232-013-9529-8
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler RON, Miller GAD (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* 35 (2):259-270. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x
- Suzuki T, Yamasaki K, Fujita S, Oda K, Iseki M, Yoshida K, Watanabe M, Daiyasu H, Toh H, Asamizu E, Tabata S, Miura K, Fukuzawa H, Nakamura S, Takahashi T (2003) Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 (3):711-717. doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)03079-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)03079-6)
- Takahashi K, Hayashi K-i, Kinoshita T (2012) Auxin Activates the Plasma Membrane H⁺-ATPase by Phosphorylation during Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology* 159 (2):632. doi:10.1104/pp.112.196428
- Takahashi K, Inoue S-i, Hayashi Y, Kinoshita T (2014) Abscisic Acid Suppresses Hypocotyl Elongation by Dephosphorylating Plasma Membrane H⁺-ATPase in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* 55 (4):845-853. doi:10.1093/pcp/pcu028
- Takemiya A, Inoue S-i, Doi M, Kinoshita T, Shimazaki K-i (2005) Phototropins Promote Plant Growth in Response to Blue Light in Low Light Environments. *The Plant Cell* 17 (4):1120. doi:10.1105/tpc.104.030049
- Takemiya A, Sugiyama N, Fujimoto H, Tsutsumi T, Yamauchi S, Hiyama A, Tada Y, Christie JM, Shimazaki K-i (2013) Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nature Communications* 4:2094. doi:10.1038/ncomms3094
- <https://www.nature.com/articles/ncomms3094#supplementary-information>
- Thomine S, Lelievre F, Boufflet M, Guern J, Barbier-Brygoo H (1997) Anion-Channel Blockers Interfere with Auxin Responses in Dark-Grown Arabidopsis Hypocotyls. *Plant Physiology* 115 (2):533. doi:10.1104/pp.115.2.533
- Tolker-Nielsen T (2015) Biofilm Development. *Microbiology Spectrum* 3 (2). doi:10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* 141 (2):373. doi:10.1104/pp.106.079467
- Trebst A (2007) Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system. *Photosynthesis Research* 92 (2):217-224. doi:10.1007/s11120-007-9213-x
- Truitt CL, Wei H-X, Paré PW (2004) A Plasma Membrane Protein from *Zea mays* Binds with the Herbivore Elicitor Volicitin. *The Plant Cell* 16 (2):523. doi:10.1105/tpc.017723
- Ueno K, Kinoshita T, Inoue S-i, Emi T, Shimazaki K-i (2005) Biochemical Characterization of Plasma Membrane H⁺-ATPase Activation in Guard Cell Protoplasts of Arabidopsis thaliana in Response to Blue Light. *Plant and Cell Physiology* 46 (6):955-963. doi:10.1093/pcp/pci104
- Van Leene J, Han C, Gadeyne A, Eeckhout D, Matthijs C, Cannoot B, De Winne N, Persiau G, Van De Slijke E, Van de Cotte B, Stes E, Van Bel M, Storme V, Impens F, Gevaert K, Vandepoele K, De Smet I, De Jaeger G (2019) Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nature Plants* 5 (3):316-327. doi:10.1038/s41477-019-0378-z
- Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 39 (1):45-58. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02105.x
- Vodeneev V, Akinchits E, Sukhov V (2015) Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Plant Signaling & Behavior* 10 (9):e1057365. doi:10.1080/15592324.2015.1057365
- Vodeneev VA, Katicheva LA, Sukhov VS (2016) Electrical signals in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Biophysics* 61 (3):505-512. doi:10.1134/S0006350916030209

- Vodeneev VA, Opritov VA, Pyatygin SS (2006) Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo*. *Russian Journal of Plant Physiology* 53 (4):481-487. doi:10.1134/S102144370604008X
- Volkov AG, Lang RD, Volkova-Gugeshashvili MI (2007) Electrical signaling in *Aloe vera* induced by localized thermal stress. *Bioelectrochemistry* 71 (2):192-197. doi:10.1016/j.bioelechem.2007.04.006
- Wang Y, Noguchi K, Ono N, Inoue S-i, Terashima I, Kinoshita T (2014) Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (1):533. doi:10.1073/pnas.1305438111
- Weiler EW, Nover L (2008) *Allgemeine und molekulare Botanik*, vol 1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Williams SE, Pickard BG (1972) Receptor potentials and action potentials in *Drosera* tentacles. *Planta* 103 (3):193-221. doi:10.1007/BF00386844
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLOS ONE* 2 (8):e718. doi:10.1371/journal.pone.0000718
- Wu J, Baldwin IT (2009) Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant, Cell & Environment* 32 (9):1161-1174. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.01943.x
- Xue Y, Yang Y, Yang Z, Wang X, Guo Y (2018) VAMP711 Is Required for Abscisic Acid-Mediated Inhibition of Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity. *Plant Physiology* 178 (3):1332. doi:10.1104/pp.18.00499
- Yamauchi S, Takemiya A, Sakamoto T, Kurata T, Tsutsumi T, Kinoshita T, Shimazaki K-i (2016) The Plasma Membrane H⁺-ATPase *AHA1* Plays a Major Role in Stomatal Opening in Response to Blue Light. *Plant Physiology* 171 (4):2731. doi:10.1104/pp.16.01581
- Yang Y, Li R, Qi M (2000) In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal* 22 (6):543-551. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00760.x
- Yuan F, Yang H, Xue Y, Kong D, Ye R, Li C, Zhang J, Theprungsirikul L, Shrift T, Krichilsky B, Johnson DM, Swift GB, He Y, Siedow JN, Pei Z-M (2014) *OSCA1* mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature* 514:367. doi:10.1038/nature13593
- <https://www.nature.com/articles/nature13593#supplementary-information>
- Zhang F, Vierock J, Yizhar O, Fenno LE, Tsunoda S, Kianianmomeni A, Prigge M, Berndt A, Cushman J, Polle J, Magnuson J, Hegemann P, Deisseroth K (2011) The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools. *Cell* 147 (7):1446-1457. doi:10.1016/j.cell.2011.12.004
- Ziegler T, Möglich A (2015) Photoreceptor engineering. *Frontiers in molecular biosciences* 2:30-30. doi:10.3389/fmolb.2015.00030
- Zimmermann MR, Maischak H, Mithöfer A, Boland W, Felle HH (2009) System Potentials, a Novel Electrical Long-Distance Apoplastic Signal in Plants, Induced by Wounding. *Plant Physiology* 149 (3):1593. doi:10.1104/pp.108.133884
- Zimmermann MR, Mithöfer A, Will T, Felle HH, Furch ACU (2016) Herbivore-Triggered Electrophysiological Reactions: Candidates for Systemic Signals in Higher Plants and the Challenge of Their Identification. *Plant physiology* 170 (4):2407-2419. doi:10.1104/pp.15.01736
- Zimmermann S, Frachisse J-M, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Guern J (1998) Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. *Plant Physiology and Biochemistry* 36 (9):665-674. doi:[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80015-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80015-6)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Blätter von <i>Dionaea muscipula</i> sind umgebildet zu Fallen mit sensorischen Haaren (Triggerhaaren)	21
Abb. 1.2:	<i>Dionaea muscipula</i> reagiert auf die Berührung eines Triggershaars mit einem schnellen Aktionspotential, welches mehr als 20 mal schneller ist, als ein durch Kälte ausgelöstes Aktionspotential in <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
Abb. 2.1:	Exemplarische Vektorkarte pCambia mit 2x35s-Promoter::ChR2-YFP::35s-Terminator	52
Abb. 2.2:	Exemplarische Vektorkarte pMDC32 mit 2x35s-Promoter::ChR2-YFP::NOS-Terminator	53
Abb. 2.3:	Aufbau Messplatz Foto	65
Abb. 3.1:	Kälte induziert eine Depolarisation des Membranpotentials in <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllzellen	71
Abb. 3.2:	Die photosynthese-bedingte, transiente Depolarisation des Membranpotentials, wird vollständig durch den Photosyntheseinhibitor DCMU gehemmt, nicht jedoch die Depolarisation durch 50 s Blaulicht	73
Abb. 3.3:	Blaulicht bewirkt eine transiente Depolarisation des Membranpotentials in adulten <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen.....	74
Abb. 3.4:	Die Depolarisation des Membranpotentials durch Blaulicht ist ein singuläres Ereignis, dass nicht durch die allgemeinen Depolarisationsfähigkeit des Membranpotentials bedingt ist.	75
Abb. 3.5:	DCMU inhibiert nicht die Blaulicht-induzierte Depolarisation des Membranpotentials in <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen, aber sie moduliert die Depolarisationskinetik und verhindert eine Hyperpolarisation	76
Abb. 3.6:	DCMU verringert geringfügig die durch 50 s Blaulicht erzielte Depolarisation in <i>Arabidopsis</i> und hemmt die anschließende Hyperpolarisation, die Repolarisationsgeschwindigkeit ist jedoch unbeeinflusst	77
Abb. 3.7:	H ₂ O ₂ induziert in <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen eine transiente Depolarisation des Membranpotentials.	79
Abb. 3.8:	Die Kinetik der Blaulicht-induzierten Depolarisation in <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen wird nicht durch den Verlust des Kaliumkanals GORK beeinflusst.	81
Abb. 3.9:	Die Dauer und Geschwindigkeit von Depolarisation und Repolarisation nach 50 s BL in <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen ist unbeeinflusst vom Verlust des Kaliumkanals GORK.....	82
Abb. 3.10:	Nach der Depolarisation des Membranpotentials durch einen Kältestimulus ist in gork1-2 <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen die Repolarisation des Membranpotentials bis auf -100 mV verlangsamt.....	83

Abb. 3.11: Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> von ChR2-Varianten in pCambia 2300 2x35s::ChR2-YFP::35s-Term führte zu einer sehr ungleichmäßigen Expression mit schwacher Fluoreszenz am LSM	86
Abb. 3.12: Mittels Oberflächenelektroden lässt sich die Blaulicht-induzierte Aktivität von transient in Tabak exprimiertem ChR2-C128T und -D156C aufzeichnen	88
Abb. 3.13: Blaulicht aktiviert das transient in Tabak exprimierte ChR2-C128T und führt zu einer reproduzierbaren Depolarisation des Membranpotentials in Mesophyllzellen	89
Abb. 3.14: Blaulicht aktiviert das transient in Tabak exprimierte ChR2-L132C und führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials in Mesophyllzellen	90
Abb. 3.15: Transient in Tabak exprimiertes ChR2-XXL führt zu einer durch Blaulicht induzierbaren Depolarisation des Membranpotentials in Mesophyllzellen	91
Abb. 3.16: Die Repolarisationskinetik nach einer ChR2-XXL vermittelten Depolarisation des Membranpotentials weist eine breitere Streuung, als die Depolarisationskinetik im Tabakexpressionssystem auf.....	92
Abb. 3.17: Die Depolarisationsamplitude, die Repolarisationsdauer, sowie die Depolarisations- und Repolarisationsgeschwindigkeit der Blaulicht-induzierten ChR2-XXL Aktivität ist im transienten Tabakexpressionssystem statistisch erfassbar	93
Abb. 3.18: Wachstum im Langtag unter Rotlichtbedingungen führt zu einem Phänotyp mit abaxial eingerollten festen Blättern.....	95
Abb. 3.19: Retinal ist essentiell für die Blaulicht-induzierte Depolarisation des Membranpotentials durch stabil exprimiertes ChR2-XXL in Arabidopsis.....	96
Abb. 3.20: Die Rekonstitution von Channelopsin-2 mit all trans-Retinal zu aktivem ChR2 lässt sich in Echtzeit indirekt über die ChR2-vermittelte Depolarisationsamplitude nach Blaulichtgabe in Arabidopsis messen.....	97
Abb. 3.21: Stabil in Arabidopsis exprimiertes ChR2-C128T vermittelt die reproduzierbare Depolarisation des Membranpotentials durch Blaulicht in Mesophyllzellen ...	99
Abb. 3.22: Stabil in Arabidopsis exprimiertes ChR2-XXL ermöglicht die Depolarisation des Membranpotentials durch Blaulicht.....	100
Abb. 3.23: Die Blaulicht-vermittelte Depolarisation des Membranpotentials von Arabidopsis Mesophyllzellen durch ChR2-XXL ist in verschiedenen Individuen ähnlich	101
Abb. 3.24: Die Blaulicht-vermittelte Depolarisation des Membranpotentials von Arabidopsis Mesophyllzellen durch ChR2-XXL in verschiedenen Individuen weist statistisch erfassbare geringe Unterschiede in der Depolarisation und größere Unterschiede in der Repolarisationskinetik auf	102

- Abb. 3.25: ChR2-XXL zeigt eine stärkere Blaulicht-vermittelte Depolarisation des Membranpotentials als ChR2-C128T bei stabiler Expression in Arabidopsis Mesophyllzellen..... 103
- Abb. 3.26: Die Blaulicht-induzierte Depolarisation des Membranpotentials durch ChR2-XXL ist in den gleichen Zellen ein reproduzierbarer Prozess 104
- Abb. 3.27: ChR2-XXL ermöglicht die anhaltende Depolarisation des Membranpotentials, gesteuert über die Länge des Blaulichtpulses 104
- Abb. 3.28: Mittels Oberflächenelektroden lässt sich die Blaulicht-induzierte Aktivität von ChR2-XXL an drei Stellen auf dem Blatt zeitgleich aufzeichnen, eine Verbreitung der Depolarisation entlang der Leitbündel jedoch nicht nachweisen 106
- Abb. 3.29: ChR2-XXL zeigt auch in intakten Arabidopsis Pflanzen seine typischen Charakteristika, messbar als die Blaulicht-induzierte Depolarisation des Oberflächenpotentials 107
- Abb. 3.30: BaCl₂ hyperpolarisiert das Ruhepotential und beschleunigt die Repolarisation nach der Depolarisation durch ChR2-XXL in Arabidopsis Mesophyllzellen 109
- Abb. 3.31: Der extrazelluläre pH-Wert verändert die Repolarisationskinetik nach Blaulicht-vermittelter Depolarisation des Membranpotentials durch ChR2 in Arabidopsis Mesophyllzellen..... 112
- Abb. 3.32: Natriumorthovanadat depolarisiert das Ruhepotential und verlangsamt die Repolarisation nach Blaulicht-induzierter Depolarisation des Membranpotentials durch ChR2-XXL, kann diese aber über mehr als 1 h nicht vollständig hemmen 113
- Abb. 3.33: Nach der Blaulicht-induzierten Depolarisation des Membranpotentials in Arabidopsis Mesophyllzellen wird die Repolarisationskinetik durch Orthovanadat moduliert, wobei eine Förderung einer langen ersten Repolarisationsphase, gefolgt von einer zweiten schnellen Phase charakteristisch ist..... 114
- Abb. 3.34: Fusicoccin hyperpolarisiert das Membranpotential von Arabidopsis ChR2-XXL Mesophyllzellen und verdoppelt die Repolarisationsgeschwindigkeit nach der Blaulicht-induzierten Depolarisation des Membranpotentials signifikant 117
- Abb. 4.1: Die Repolarisation des Membranpotentials ist in transient ChR2-XXL exprimierenden Tabak Mesophyllzellen langsamer als in Arabidopsis ChR2-XXL, außerdem ist das Ruhepotential von Arabidopsis Mesophyllzellen niedriger als von Tabak Mesophyllzellen..... 134
- Abb. 4.2: In Mesophyllzellen Tabak mit transients Expression von ChR2-C128T bzw. ChR2-XXL ist die Depolarisationsamplitude größer, aber die Repolarisation deutlich langsamer, als in Arabidopsis Mesophyllzellen der gleichen ChR2-Variante..... 136

- Abb. 4.3: Die Änderungen des Membranpotentials durch Kälte und 50 s Blaulicht in Arabidopsis WT Mesophyllzellen haben klar voneinander abgrenzbare Kinetiken, die sich wiederum von der Kinetik der Membranpotentialänderung durch ChR2-XXL unterscheiden.....138
- Abb. 4.4: In Arabidopsis Wildtyp führt ein 5 s Blaulichtpuls nur zu einer sehr schwachen transienten Depolarisation.....148
- Abb. 4.5: Stabil in Arabidopsis exprimiertes ChR2-D156A ermöglicht die Depolarisation des Membranpotentials durch Blaulicht.....149
- Abb. 4.6: Die Applikation von Retinal-haltiger Badlösung über Nacht auf Ober- und Unterseite des Baltes ist ausreichend um die vollständige Rekonstitution des ChR2-XXL in Arabidopsis Mesophyllzellen herbeizuführen.....149

Publikationsliste

Hashimoto, K., Eckert, C., Anschütz, U., Scholz, M., Held, K., Waadt, R., **Reyer, A.**, Hippler, M., Becker, D., Kudla, J. (2012). Phosphorylation of calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting protein kinases (CIPKs) is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins. *The Journal of biological chemistry*, 287(11): 7956-68. doi: 10.1074/jbc.M111.279331

Publikation, die aus der Doktorarbeit hervorgegangen ist:

Reyer, A. †, Häßler, M. †, Scherzer, S., Huang, S., Pedersen, J. T., Al-Rascheid, K.A.S., Bamberg, E., Palmgren, M., Dreyer, I., Nagel, G., Hedrich, R.*, Becker, D.*(2020). Channelrhodopsin-mediated optogenetics highlights a central role of depolarization-dependent plant proton pumps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (34): 20920-20925. doi: 10.1073/pnas.2005626117

† gleichberechtigte Erstautoren, * corresponding authors

Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: **„Charakterisierung des Channelrhodopsin-2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* als nicht-invasives, optogenetisches Werkzeug zur funktionellen Analyse elektrischer Signale in Pflanzen“**, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Würzburg, den _____

Signature PhD-student

Danksagung

Es gibt sehr viele Menschen, die mit kleinen und großen Taten geholfen haben diese Arbeit zum Erfolg zu führen. Doch einige möchte ich im Besondern hervorheben, denn ohne sie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Mein großer Dank gilt daher:

Prof. Dr. Dirk Becker, der mir die spannende Thematik zur Verfügung gestellt und mich stets gut betreut hat. Der darüber hinaus immer ein offenes Ohr hat, mir bei allen Problemen stets geholfen hat und der mich vor allem immer unterstützt.

PD Dr. Susanne Berger für die Übernahme meines Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Rainer Hedrich, der mir nicht nur ermöglicht hat an seinem Lehrstuhl zu forschen, sondern auch mit vielen Ideen und Anregungen meine Arbeit unterstützt hat. Außerdem möchte ich ihm dafür danken, dass er mir nach dem Ende des praktischen Teils meiner Dissertation für ein weiteres Jahr ein spannendes Forschungsfeld zur Verfügung gestellt hat.

Dr. Sönke Scherzer, für die Beantwortung zahlloser Fragen, die hilfreichen Diskussionen, die zusätzlichen Versuche und Daten, sowie für die sonstige Unterstützung.

Dr. Jennifer Scherzer und **Dr. Frances Sussmilch** für das Korrekturlesen und die moralische Unterstützung.

Elfriede Reisberg, die mir im richtigen Augenblick eine große Hilfe war.

Der „**AG Becker**“ für die freundliche Aufnahme und den Beistand. Hervorheben will ich **Katharina Adam**, die mich in den letzten zwei Jahren nicht nur durch die Anzucht von tausenden Arabidopsen unterstützt hat, sondern vor allem mit vielen Gesprächen und Zuspruch. Auch gilt mein Dank **Kevin Bongers**. Du bist der Chemiker meines Vertrauens.

Allen Mitarbeitern der Botanik I, für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die nette Atmosphäre. Ohne euch wäre das alles nichts geworden. Besonders erwähnen möchte ich **Kerstin**, die den Laborbetrieb am Laufen hält, **Matze**, für die Abwicklung der Bürokratie, **Michael**, für die Lösung aller elektrischer und kältetechnischer Probleme, den **Kollegen aus der Werkstatt** und natürlich der **Gärtnerei**, vor allem **Joachim**.

Meinen jetzigen und ehemaligen Bürogenossen, im Besondern **Franzi** und **Jan**, für den Spaß bei der Arbeit, die schönen Mittagspausen und die großartigen Unterhaltungen.

Der „erweiterten“ **AG Geiger**, die mich in ihrer Mitte aufgenommen hat. Danke für eure Hilfsbereitschaft, eure Unterstützung, die vielen spannenden Gespräche und die tolle Zeit.

Meinen Freunden und meiner Familie, die immer hinter mir stehen und mir Zuspruch geben. Vor allem meiner **Mutter**, die mir immer zuhört und meinem **Vater**, der mich unterstützt. **Flavia**, **Peter** und **meine Oma**, ich bin froh, dass es euch gibt. **Maria**, danke für deine Freundschaft. **Florian**, der mir immer beisteht, mich immer zum Lachen bringt und das hoffentlich für immer tun wird.

