

**Cytosolische Calciumionenkonzentrationen
von Winterweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida)
unter dem Einfluß von Kälte und Phytohormonen**

**Untersuchungen mittels stabiler Expression des
Calciumreporters Apoaequorin**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von
Jürgen Nagel-Volkmann**

2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. K. DÖRFFLING

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. H. QUADER

Tag der Disputation: 28. März 2003

Hamburg, den 13. März 2003



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Signaltransduktion durch Calcium	1
1.2	Die Beteiligung cytosolischer Calciumionen an der Kältesignaltransduktion	3
1.3	Methoden zur Bestimmung der Calciumionenkonzentration	6
1.4	Problemstellung und Zielsetzung	9
2	Material	11
2.1	Organismen	11
2.1.1	Pflanzenmaterial	11
2.1.2	Bakterienstamm	11
2.2	Vektoren	11
2.3	Antikörper	13
2.4	Wasser	13
3	Methoden	14
3.1	Erzeugung transgener Weizenpflanzen	14
3.1.1	Klonierung	14
3.1.2	Stabile Transformation von <i>Triticum aestivum</i> L.	15
3.1.3	Etablierung transgener Zellsuspensionen	17
3.2	Molekulare Analyse (potentiell) transgener Weizenpflanzen	17
3.2.1	Isolierung genomischer DNA und Southern Blot-Analyse	17
3.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA und Northern Blot-Analyse	18
3.2.3	Proteinbiochemische Nachweise	19
3.3	Physiologische Experimente an transgenem Weizen	22
3.3.1	Bestimmung der $[Ca^{2+}]_c$ mittels heterologer Apoaequorinexpression	22
3.3.2	Experimente zum Einfluß der Temperatur auf die $[Ca^{2+}]_c$	26
3.3.3	Experimente zum Einfluß von ABA auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizenkeimlingen	30
3.3.4	Experimente zum Einfluß von Auxin auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizenkoleoptilen	30
3.4	Computergestützte Berechnungen	32

4	Ergebnisse	33
4.1	Erzeugung und Analyse transgener Weizenpflanzen	33
4.2	Der Einfluß der Temperatur auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizen	36
4.2.1	Die Wirkung einer schnellen Temperaturabsenkung (Kälteschock) auf die $[Ca^{2+}]_c$	36
4.2.2	Die Wirkung langsamer Temperaturabsenkung auf die $[Ca^{2+}]_c$	40
4.2.3	Der Einfluß einer Kälteakklimatisation auf kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$	46
4.2.4	Die Beteiligung des Cytoskelettes an kälteinduzierten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$	47
4.2.5	Hitzeinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$	50
4.3	Der Einfluß von Phytohormonen auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizen	51
4.3.1	Abscisinsäure	51
4.3.2	Auxininduziertes Streckungswachstum	52
5	Diskussion	54
5.1	Erzeugung und Analyse transgener Weizenpflanzen	54
5.2	Der Einfluß der Temperatur auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizen	56
5.2.1	Die Wirkung schneller Temperaturabsenkung (Kälteschock) auf die $[Ca^{2+}]_c$	56
5.2.2	Die Wirkung langsamer Temperaturabsenkung auf die $[Ca^{2+}]_c$	58
5.2.3	Der Einfluß einer Kälteakklimatisation auf kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$	59
5.2.4	Der Einfluß des Cytoskelettes auf kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$	60
5.2.5	Hitzeinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$	61
5.3	Der Einfluß von Phytohormonen auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizen	62
5.3.1	Abscisinsäure	62
5.3.2	Auxininduziertes Steckungswachstum	63
5.4	Zusammenfassende Diskussion	64
6	Zusammenfassung	66
7	Literaturverzeichnis	68
8	Anhang	79
9	Danksagung	81

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABA	Abscisinsäure
[Ca ²⁺] _c	cytosolische, freie Calciumionenkonzentration
cDNA	Komplementär-DNA
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA ₃	Gibberellinsäure A3
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
IAA	3-Indolessigsäure
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger (Boten)-Ribonukleinsäure
NPT	Neomycinphosphotransferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAT	Phosphinothrizinacyltransferase
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethylsulfonsäure)
PPT	Phosphinothrizin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RUBISCO ...	Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelstrang (single stranded)-DNA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UAS	Upstream-Aktivatorsequenz

Einheiten

mol	Mol
M	mol l ⁻¹
bp	Basenpaar(e)
kb	Kilobasenpaar(e)
Da	Dalton
upm	Umdrehungen pro Minute
V x V ⁻¹	Volumen pro Volumen
g x V ⁻¹	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion durch Calcium

Die pflanzliche Signaltransduktion basiert, wie Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt haben, keineswegs auf der Interaktion jeweils zweier Moleküle; vielmehr stehen verschiedene Signaltransduktionskaskaden miteinander in Wechselwirkung und ergeben eine Art von Signaltransduktionsnetz (Genoud und Métraux, 1999; Møller und Chua, 1999), in welchem intrazellulärem Calcium eine Schlüsselrolle zugesprochen wird (Trewavas und Malho, 1998). Die Calciumionenkonzentration pflanzlicher Zellen unterliegt einer komplexen Regulation durch Calciumkanäle in den Membranen nahezu sämtlicher intrazellulären Kompartimente („Calciumhomöostase“; Webb, 1996; Muir et al., 1997; Pineros und Tester, 1997; White, 2000; Fox und Guerinot; Harper, 2001; Miedema et al., 2001). Sie beträgt in ungestreßten Zellen etwa 100 nM im Cytosol, 1 mM in der Vakuole (Webb, 1996) und, nach Messungen von Plieth (Universität Kiel, persönliche Mitteilung) im Apoplasten unter 50 µM. Die cytosolische Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_c$) kann sich infolge einer großen Anzahl verschiedener, abiotischer und biotischer Umgebungsfaktoren sowie endogener Signale ändern (Webb et al., 1996; Sanders et al., 1999; Knight und Knight, 2001; Rudd und Franklin-Tong, 2001).

Calciumbindende Proteine, wie Calmodulin (Snedden und Fromm, 1998; Zielinski, 1998) und calcium- oder calmodulinabhängige Enzyme (Proteinkinasen, Calrineurin; Sheen, 1996; Sopory und Munshi, 1998; Kudla et al., 1999; Harmon et al., 2000; Anil und Rao, 2001; Cheng et al., 2002) scheinen ubiquitär und an den physiologischen Reaktionen auf derartige Signale beteiligt zu sein.

Dies hat zu der „Calciumhypothese“ geführt, nach welcher Konzentrationsänderungen der intrazellulären und insbesondere der cytosolischen Calciumionen für die Transduktion der Signale in physiologische Antworten notwendig seien.

Die Funktion von Calcium als „Signalmolekül“ wird intensiv (McAinsh und Hetherington, 1998; Trewavas und Malho, 1998; Malho, 1999; Trewavas, 1999; Sanders et al., 1999; Knight, 2000; Reddy, 2001) und kontrovers (Plieth, 2001; Sanders et al., 2002) diskutiert. Ein Schwerpunkt dieser Diskussion wird am Beispiel von Spaltöffnungen deutlich: Auxin führt zum Öffnen, ABA zum Schließen der Spaltöffnungen, beide Phytohormone aber verändern die Calciumionenkonzentration im Cytosol der Schließzellen (Schroeder et al., 2001). Die Frage, inwieweit und auf welche Weise verschiedene physiologische Antworten durch ein- und dasselbe Signalmolekül - Calcium - reguliert werden können, konnte bislang nur teilweise beantwortet werden.

Eine der Vorstellungen hierzu geht von der Beobachtung aus, daß sich die Calciumreaktionen in ihrer zeitlichen Kinetik unterscheiden (Malho et al., 1998): Singuläre Erhöhungen der Calciumionenkonzentration (Spikes) unterscheiden sich in ihrer Amplitude und Dauer, repetitive Spikes (Oscillationen) in der Frequenz der Calciumpeaks. Diese „Calciumsignaturen“ könnten für den auslösenden Stimulus spezifisch sein und diesen kodieren.

Ein Modell von Putney (1998), das auf experimentellen Befunden von DeKonick und Schulman (1998) basiert, beschreibt die mögliche Dekodierung von Calciumoszillationen durch die Interaktion von Calcium, Calmodulin und calcium-calmodulinabhängiger Proteinkinase II (CaM-Kinase II). Die CaM-Kinase II besitzt acht Untereinheiten mit jeweils einer Bindestelle für calciumaktiviertes Calmodulin. Die Calmodulinbindung führt zur Autophosphorylierung und Aktivierung des Moleküls, in deren Folge Fremdproteine phosphoryliert werden können (Dupont und Goldbeter, 1998). Je höher der Autophosphorylierungsgrad ist, desto langsamer dissoziiert das Calmodulin („calmodulin trapping“), wodurch die Aktivität des Enzyms zwischen zwei Calciumspikes erhalten bleiben kann („short term molecular memory“). Bei kürzerer Dauer des Spikes ist eine höhere Frequenz der Oszillation erforderlich, um die maximale Aktivität zu erreichen, die danach mit einer niedrigeren Frequenz aufrecht erhalten werden kann. Die Dekodierung von Calciumoszillationen mit Hilfe von CaM-Kinasen in Pflanzen ist seit dem Nachweis einer CaM-Kinase in Tabak (Liu et al., 1998) denkbar.

Calciumoscillationen wurden bislang jedoch nur für wenige pflanzliche Systeme beschrieben (Evans et al., 2001), beispielsweise für Pollenschläuche (Cai et al., 1997; Franklin-Tong et al., 1997; Holdaway-Clarke et al., 1997; Messerli und Robinson, 1997; Malho, 1998; Franklin-Tong, 1999; Malho et al., 2000) und Schließzellen (McAinsh et al., 1995; Allen et al., 1999; Blatt, 1999; Allen et al., 2000; Allen et al., 2001). Bei den meisten Calciumreaktionen in Pflanzen handelt es sich um singuläre, transiente Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_c$ (Gilroy et al., 1993). Der Nachweis einer Signalfunktion dieser Erhöhungen erfordert entweder die künstliche Induktion der Calciumsignatur in Abwesenheit des Stimulus, der diese Signatur natürlicherweise auslöst, oder die Hemmung der Entstehung der Calciumsignatur bei Einwirken des Stimulus.

Die letztgenannte Strategie wurde oft unter Verwendung von Calcium“inhibitoren“ verfolgt; diese beeinflussen jedoch selbst die zelluläre Calciumhomöostase (Polisensky und Braam, 1996; Lewis und Spalding, 1998; Plieth, 2001). Die Worte Heilbrunn, „Calcium macht alles“ (Malho, 1999), sind somit nach wie vor umstritten. Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ ohne eine Signalfunktion des Calciums könnte dennoch physiologisch relevant sein, da Calcium auf Membranen generell stabilisierend wirken kann (Marschner, 1995).

1.2 Die Beteiligung cytosolischer Calciumionen an der Kältesignaltransduktion

Die Frosttoleranz vieler Pflanzen der gemäßigten und kalten Klimazonen kann sich bei mehrtägiger Temperaturexposition zwischen 0 °C und +10 °C erhöhen (Kälteakklimatisation, Brunold et al., 1996). Eine solche Kälteakklimatisation setzt die Perzeption der Temperatur und deren Transduktion in physiologische Reaktionen voraus. Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA), die $[Ca^{2+}]_c$ und das Cytoskelett könnten an der Transduktion des Kältesignals beteiligt sein und als Bestandteile eines Kältesignaltransduktionsnetzes miteinander interagieren.

ABA und Kältesignaltransduktion

In den ersten Tagen der Kälteakklimatisierung von Weizen findet sich ein transienter Anstieg der endogenen ABA-Konzentration (Blum und Sinmena, 1995; Abromeit 1996; Cowan et al., 1997). Die Verhinderung der ABA-Biosynthese mit dem Carotinoidbiosynthesehemmstoff Norflurazon (Abromeit und Dörffling, 1994; Abromeit, 1996) sowie die Applikation von ABA (Flores und Dörffling, 1990; Heino et al., 1990; Gau et al., 1993; Dallaire et al., 1994) weisen auf die Notwendigkeit dieses Anstiegs für die Frosttoleranzsteigerung hin.

Die ABA-defiziente *Arabidopsis*-Mutante *aba-1* läßt sich nicht kälte härten, entwickelt nach Applikation von ABA aber eine höhere Frosttoleranz. Die ABA-insensitive *Arabidopsis*-Mutante *abi-1* zeigt erwartungsgemäß keine erhöhte Frosttoleranz nach ABA-Applikation, läßt sich aber dennoch kälte härten (Thomas et al., 1997). Das *abi-1*-Gen kodiert für eine Proteinphosphatase und besitzt die Sequenz für eine Calciumbindestelle (Leung et al., 1994, Meyer et al., 1994). Dies spricht für die Existenz von ABA-abhängigen und ABA-unabhängigen, calciumregulierten Kältesignaltransduktionswegen, schließt die Existenz eines ABA- und calciumregulierten Kältesignaltransduktionsweges aber nicht aus.

Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ durch ABA sind in Schließzellen nachgewiesen worden, und die Beteiligung dieser Veränderung an der Regulation der Spaltöffnungen gilt als evident (Allen und Sanders, 1996; Allen et al., 1998; Hetherington et al., 1998; Allen et al., 1999). Gehring et al. (1990) beschreiben eine ABA-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_c$ in Maiskoleoptilen von 240 nM auf 320 nM, die mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 (1.3) gemessen wurde.

Calcium und Kältesignaltransduktion

Knight et al. (1991) zeigten, daß ein Kälteschock einen singulären, transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ in Tabak induziert. Campbell et al. (1996) fanden, ebenfalls in transgenen Tabakkeimlingen, bei Kühlung der Wurzeln Calciumoszillationen in den Kotyledonen.

Die cytosolische Expression von Apoaequorin im Bereich des Tonoplasten mittels Membranproteininfusion zeigte in *Arabidopsis*-Keimlingen, daß die kälteschock-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_c$ sowohl durch einen Einstrom über die Plasmamembran als auch durch eine Freisetzung aus der Vakuole zustande kommt (Knight et al. , 1996). Monroy und Dhindsa (1995), DeNisi und Zocchi (1996) und Polisensky und Braam (1996) postulierten aufgrund von Experimenten mit Calciumkanalhemmstoffen ebenfalls einen kälteinduzierten Calciumioneneinstrom aus dem Apoplasten. Jian et al. (1999) kamen durch Antimonatfällung und nachfolgende elektronenmikroskopische Untersuchung zu dem Schluß, daß ein Kälteschock von Winterweizen die Calciumionenkonzentration sowohl im Cytosol als auch im Zellkern ansteigen läßt.

Kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ von *Arabidopsis* hängen weniger von der Temperatur als vielmehr von der Temperaturrate ab (Plieth et al., 1999), und kälteschockinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ in derselben Spezies sind zelltypspezifisch (Kiegle et al., 2000).

Desweiteren verändert die Kälteakklimatisation nachfolgende kälteschock-induzierte Calciumsignaturen in *Arabidopsis*-Keimlingen (Knight et al., 1996; Knight und Knight, 2000). *Medicago*-Zellen in Suspensionskultur, die mit Calciuminhibitoren inkubiert wurden, ließen sich weniger kälteakklimatisieren als nichtinkubierte Zellen (Monroy et al., 1993).

Cytoskelett und Kältesignaltransduktion

Niedrige Temperaturen beeinflussen nicht nur die $[Ca^{2+}]_c$, sondern auch die Organisation des Cytoskelettes (Woods et al., 1984). Wang und Nick (2001) beschreiben eine kälteschockinduzierte Fragmentierung der Mikrotubuli in Weizenwurzelzellen, die in kälteakklimatisierten und in ABA inkubierten Pflanzen geringer ausfällt. In Protoplasten von *Medicago*-Zellen aus Suspensionskultur führt Kälte zu einem Influx des Radioisotops ^{45}Ca , der nach Inkubation mit den Aktinfilamenthemmstoffen Jasplakinolid und Cytochalasin-D geringer bzw. erhöht ausfällt (Örvar et al., 2000). Aufgrund dessen wird die mögliche Regulation der Aktivität von Calciumkanälen in der Plasmamembran durch Veränderungen der Organisation der Aktinfilamente diskutiert.

Mazars et al. (1997) beschreiben eine Erhöhung der kälteinduzierten $[Ca^{2+}]_c$ in Apoaequorin exprimierenden Protoplasten von *Nicotiana* nach Inkubation mit Cytochalasin-D, was ebenfalls auf die Interaktion zwischen Kälte, Aktinfilamenten und $[Ca^{2+}]_c$ hinweist. Ergebnisse von Sangwan et al. (2001) sprechen für die physiologische Relevanz einer solchen Interaktion: In intakten *Brassica*-Keimlingen führte die Destabilisierung von Aktinfilamenten durch Latrunculin-B sowie die Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration durch den Calciumionophor A23187 zu einer Aktivierung des kälteinduzierbaren „BN115“-Promotors und einer Erhöhung der Frosttoleranz.

Nach Ergebnissen von Yokota et al. (2000) hat hingegen die $[Ca^{2+}]_c$ einen Einfluß auf die Organisation des Cytoskelettes: Eine $[Ca^{2+}]_c$ im mikromolaren Bereich und calciumaktiviertes Calmodulin würden die Aktivität eines filamentöses Aktin bindenden Proteins in *Lilium*-Pollenschläuchen inhibieren. Hwang und Lee (2001) folgern aus Untersuchungen mit verschiedenen Hemmstoffen, daß in Schließzellen von *Commelina* die ABA-induzierte Depolymerisierung der Aktinfilamente durch Calcium, Proteinkinasen und Proteinphosphatasen reguliert wird. Eine solche Calciumregulation wird auch von Grabski et al. (1998) postuliert.

1.3 Methoden zur Bestimmung der Calciumionenkonzentration

Die intrazelluläre Calciumionenkonzentration kann mit calciumsensitiven Mikroelektroden und Calciumindikatoren bestimmt werden. Die Calciumindikatoren sind nichtinvasiv und ermöglichen Messungen unter physiologischen Bedingungen. Sie lassen sich in drei Gruppen einteilen: calciumsensitive Fluoreszenzfarbstoffe, fluoreszierende Proteine und lumineszierende Photoproteine (Nuccitelli, 1994).

Calciumsensitive Fluoreszenzfarbstoffe

Eine Gruppe calciumsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe wird bei einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt und emittiert Licht im Spektralbereich einer anderen Wellenlänge (single-excitation-single-emission dyes).

Bei ungleichmäßiger Verteilung dieser Farbstoffe kann die Fluoreszenzintensität die Farbstoffkonzentration anstatt der Calciumionenkonzentration widerspiegeln (Roos, 2000). Zur Gruppe dieser Farbstoffe gehören Fluo-3 und Calcium Green-1 (beide von Molecular Probes, Niederlande). Ratiometrische, calciumsensitive Fluoreszenzfarbstoffe werden entweder bei einer Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt und emittieren im Spektralbereich zweier Wellenlängen, oder umgekehrt, und ermöglichen die Quantifizierung der Calciumionenkonzentration. Indo-1 (Molecular Probes, Niederlande) ist ein solcher ratiometrischer Farbstoff.

Calciumsensitive Fluoreszenzfarbstoffe können in Form von Acetoxymethylesterderivaten (AM-Ester) in die Zelle eingebracht werden. Diese diffundieren durch die Plasmamembran in das Cytosol und werden dort von zelleigenen Esterasen in eine membranimpermeable und photoaktive Form überführt (Haugland, 1996). In pflanzlichen Zellen kann der AM-Ester jedoch nach Eintritt in die Zelle unzureichend lysiert und in der Vakuole akkumuliert werden (Nagel-Volkmann, 1997). Zellwandgebundene Esterasen können den Farbstoff bereits im Apoplasten abspalten und dadurch den Eintritt in die Zelle verhindern (Zhang et al., 1998).

Fluoreszierende Proteine

Miyawaki et al. (1997) konstruierten ein „Cameleon“ genanntes Fusionsprotein, in dem ein „cyan fluorescent protein“ (CFP) über ein Linkerpolypeptid aus Calmodulin und einem Calmodulinbindepeptid mit einem „yellow fluorescent protein“ (YFP) verbunden ist. Die Calciumionenbindung an die Calmodulin-domäne bewirkt eine Konformationsänderung und - bei Anregung mit UV-Licht - einen erhöhten „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) zwischen CFP und YFP, der ratiometrische Fluoreszenzmessungen und die Bestimmung der Calciumionenkonzentration ermöglicht (Miyawaki, 2000). Nakai et al. (2001) konstruierten einen ähnlichen Calciumsensor auf der Basis nur eines GFPs. Ein Nachteil dieser Calciumsensoren besteht in der pH- und Chloridsensitivität der Fluoreszenzproteine, deren Minimierung experimentell verfolgt wird (Miyawaki et al., 1999; Tsien und Miyawaki, 2000; Plieth, 2001).

Rekombinante Aequorintechnik

Die dritte Gruppe schließlich umfaßt die lumineszierenden Photoproteine, von denen sich das Aequorin zur Bestimmung der Calciumionenkonzentration in Pflanzen etabliert hat. Aequorin ist ein 21 kDa großes Protein aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* (Murbach & Shearer), das aus dem Apoprotein Apoaequorin, dem Chromatophor Coelenterazin sowie intramolekular gebundenem Sauerstoff besteht. Coelenterazin ist ein Derivat des 3,7-Dihydroimidazo[1,2- α]pyrazin-3-ons. Apoaequorin besitzt drei Calciumbindestellen.

Die Bindung von mindestens zwei Calciumionen bewirkt eine Konformationsänderung, infolge derer Coelenterazin zu Coelenteramid oxidiert, Kohlendioxid freigesetzt und blaues Licht emittiert wird (Wellenlänge: 465 nm; deshalb auch als „blue `fluorescent` protein“ bezeichnet). Liegt bei dieser Reaktion Aequorin gegenüber Calcium im Überschuß vor, so ist die Intensität des emittierten Lichtes der Calciumionenkonzentration (nichtlinear) proportional. Dies ermöglicht die Messung der Calciumionenkonzentration mittels Luminometer, Bildverstärkerröhre und CCD-Kamera (Shimomura, 1995; Ohmiya und Hirano, 1996). Knight et al. (1991) beschrieben zum ersten Mal die heterologe Expression von Apoaequorin in einer Pflanze (*Nicotiana*). Die Inkubation mit Coelenterazin rekonstituierte Aequorin *in vivo* und ermöglichte die Bestimmung der cytosolischen Calciumionenkonzentration. Diese sogenannte „rekombinante Aequorintechnik“ hat gegenüber den anderen Calciumindikatoren mehrere Vorteile: Meßprobleme durch Autofluoreszenz entfallen, da Aequorin lumineszent und nicht fluoreszent ist. Das Signal-Hintergrund-Verhältnis ist aufgrund geringer endogener Lumineszenz hoch. Durch Verwendung von Coelenterazinderivaten läßt sich die Lumineszenzintensität variieren. Diese bleibt von Chlorid- und anderen Anionen unbeeinflusst. Calciumionenkonzentrationsmessungen sind im Bereich von 10 nM bis 10 μ M möglich (Plieth, 2001).

1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Apoaequorin wurde bislang in folgenden Pflanzen exprimiert: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Knight et al., 1996; Polisensky und Braam, 1996), *Glycine max* (L.) Merr. (Müller et al., 2000), *Lycopersicon esculentum* L. (Moyen et al., 1998), *Nicotiana plumbaginifolia* Viviani (Knight et al., 1991), *Nicotiana tabacum* L. (Takahashi et al., 1997), *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Falciatore et al., 2000), *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp (Russell et al., 1996) und *Solanum tuberosum* L. (C. Plieth, Universität Kiel, persönliche Mitteilung). Dementsprechend sind Messungen der $[Ca^{2+}]_c$ mittels rekombinanter Aequorintechnik überwiegend in dikotyledonen und in keinen monokotyledonen Pflanzen durchgeführt worden, mit der Folge, daß die mögliche Beteiligung intrazellulären Calciums an physiologischen Antworten, die für monokotyledone Pflanzen spezifisch sind, bislang wenig untersucht geblieben sind.

Beispielsweise wurde die $[Ca^{2+}]_c$ in Weizenkoleoptilen bislang nur von Felle (1988) mit calciumsensitiven Mikroelektroden und von Gehring et al. (1990) mit dem nichtratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 (1.3) gemessen. Weizen und Weizenkoleoptilen sind in Hinblick auf Kälteakklimatisationsprozesse intensiv (Dörffling et al., 1997; Nagel-Volkman, 1997), kälteinduzierte Veränderungen ihrer $[Ca^{2+}]_c$ aber bislang, zumindest nach gegenwärtigem Kenntnisstand, nicht mittels rekombinanter Aequorintechnik untersucht worden. Darüber hinaus sind Koleoptilen ein Modellsystem zur Untersuchung des auxininduzierten Streckungswachstums (Boysen-Jensen, 1913; Went, 1928; Lüthen, 1995), bei dem unbekannt ist, ob die Auxinwirkung auf Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ beruht (Saunders, 1990).

Aus diesem Zusammenhang ergab sich die Zielsetzung dieser Arbeit: die Herstellung transgener, Apoaequorin exprimierender Weizenpflanzen zur Messung möglicher Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ unter dem Einfluß von Kälte und Phytohormonen.

Folgende Teilziele bedingten den experimentellen Rahmen der Arbeit:

- Herstellung transgener Sommer- und Winterweizenpflanzen mit stabiler, konstitutiver und gewebeunspezifischer Apoaequorinexpression im Cytosol,
- Herstellung transgener Winterweizenzell suspensionen mit entsprechender Apoaequorinexpression,
- Lokalisation der Luminesenzverteilung in den transgenen Pflanzen,
- Etablierung eines Systems zur bildlichen Darstellung von Calciumreaktionen in Echtzeit,
- Messung möglicher Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ durch Kälteeinwirkung in unterschiedlichen Pflanzenteilen,
- Messungen zum Einfluß einer Kälteakklimatisation auf mögliche kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$,
- $[Ca^{2+}]_c$ -Messung in Hinblick auf die mögliche Regulation von Calciumkanälen durch Aktinfilamente,
- Messung möglicher Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ durch ABA in Keimlingen und Auxin in Koleoptilsegmenten.

Die Resultate sollten insbesondere den Vergleich mit kälteinduzierten Calciumreaktionen in dikotyledonen Pflanzen und mit den Ergebnissen bisheriger, fluoreszenzmikroskopischer $[Ca^{2+}]_c$ -Messungen in Weizen ermöglichen.

2 Material

2.1 Organismen

2.1.1 Pflanzenmaterial

Folgende Weizengenotypen (*Triticum aestivum* L.) wurden verwendet:

Winterweizen: Florida,
Deutsche Sortenliste 1998, Bundessortenamt, Postfach 610440, Hannover, Deutschland. Bezugsquelle: Firma Hans Schweiger & Co, Feldkirchen 3, 85368 Moosburg.

Sommerweizen: Veery-5,
Zuchtlinie des CIMMYT Mexiko. Bezugsquelle: CIMMYT, PO Box 60326, TX77205 Houston, USA.

2.1.2 Bakterienstamm

Als Wirtstamm der Vektoren wurde der *E.coli*-Stamm DH5 α verwendet (Hanahan, 1983). Bezugsquelle: Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Deutschland.

2.2 Vektoren

Folgende Vektoren wurden für die Klonierung und Transformation verwendet:

p7AQ (A.J. Trewavas, University of Edinburgh, Großbritannien)

Enthält die 672 bp lange *Apoaequorin*-Komplementärdesoxyribonukleinsäure (cDNA, Prasher et al., 1987) unter der Kontrolle des 35S-Promotors im binären Vektor pART7 (Gleave, 1992).

pUbi.cas (D. Becker, Universität Hamburg, Deutschland)

Ein Derivat des binären Vektors pUC19 (Vieira und Messing, 1982) mit dem Mais *Ubiquitin*-Promotor *ubi1*, (Christensen et al., 1992) und dem Terminator des *Nopalinsynthasegens nos* von *Agrobacterium tumefaciens* (Dhaese et al., 1983).

pTA7001 (N.-H. Chua, The Rockefeller University, USA. Aoyama und Chua, 1997)
Das Plasmid basiert auf pBI101 und ermöglicht die induzierte Expression eines inserierten Gens durch Applikation von Glucocorticoiden, z.B. Dexamethason. Es enthält ein trans- und ein cis-Element. Das trans-Element enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus, den chimären Transkriptionsfaktor GVG und die Poly(A)-Additionssequenz der Erbsen-Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase (RUBISCO)-Untereinheit *rbcS-E9*. GVG besteht aus der Hormonbindedomäne des Maus-Glucocorticoidrezeptors, der DNA-Bindedomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors *GAL4* und der transaktivierenden Domäne des Herpesvirusproteins *VP16*. Das cis-Element enthält sechs Kopien der Hefe-*GAL4*-Upstream-Aktivatorsequenz (UAS), die TATA-Box des 35S-Promotors, Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *SpeI* und *XhoI*, und die Poly(A)-Additionssequenz der Erbsen-RUBISCO-Untereinheit *rbcS-3A*. Das Plasmid enthält Resistenzgene gegen die Antibiotika Kanamycin und Hygromycin.

pUbiAeq (im Rahmen dieser Arbeit konstruiert)

Das Plasmid basiert auf pUbi.cas, in welches die *Apoaequorin*-cDNA aus p7AQ inseriert wurde.

pTA.Aeq (im Rahmen dieser Arbeit konstruiert)

Das Plasmid basiert auf pTA7001, in welches die *Apoaequorin*-cDNA aus p7AQ inseriert wurde.

pCalNeo (Barcelo et al., 1994)

Das Plasmid enthält das Neomycinphosphotransferasegen *nptII* unter der Kontrolle des 35S-Promotors und verleiht Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin und dessen Derivaten.

p35SPAT (P. Eckes, Bayer CropSciences, Deutschland)

Das Plasmid enthält das *Phosphinothricinacetyltransferase*gen (*bar*-Gen) unter der Kontrolle des 35S-Promotors und verleiht Resistenz gegenüber Phosphinothricin (PPT), der wirksamen Komponente des Herbizids BASTA® (Aventis, Hoechst AG, Deutschland).

2.3 Antikörper

Polyklonale Maus-Antikörper gegen Apoaequorin wurden von A.J. Trewavas, Edinburgh, Großbritannien, zur Verfügung gestellt. Monoklonale Maus-Antikörper gegen Apoaequorin wurden von der Firma Chemicon International, Fischbacher Weg 3a, 65719 Hofheim, Deutschland, bezogen. Polyklonales Gesamtserum von Ratten, Mäusen und Meerschweinchen, die nach Standardprotokoll gegen rekombinantes Apoaequorin (Molecular Probes, Niederlande) immunisiert wurden, wurde von der Firma Pineda (Bitterfelder Straße 19, 12681 Berlin, Deutschland) bezogen.

2.4 Wasser

Wasser wurde mit Aufbereitungsanlagen der Firma Millipore (USA) gereinigt und, sofern erforderlich, durch Autoklavieren (120 °C, 2×10^5 Pa, 20min) oder Filtration (Rotilabo[®]-Spritzenfilter PVDF 0,22 µm, Carl Roth, Deutschland) sterilisiert.

3 Methoden

3.1 Erzeugung transgener Weizenpflanzen

3.1.1 Klonierung

Apoaequorin-cDNA wurde aus p7AQ restringiert und über die *Sall* und *SmaI*-Schnittstellen in pUbi.cas sowie über die *SpeI* und *XhoI*-Schnittstellen in pTA7001 ligiert. Die resultierten Konstrukte wurden als pUbiAeq und pTA.Aeq bezeichnet.

Die Restriktion und Ligation der Plasmide erfolgte unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen, thermosensitiver alkalischer Phosphatase sowie T4-DNA-Ligase von Gibco BRL Lifesciences, Deutschland, entsprechend den Herstellerangaben und wurde elektrophoretisch überprüft. Die Elektrophorese erfolgte in Agarosegelen (1 % low EEO-Agarose, Applichem, Deutschland) in Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (0,5 %, nach Sambrook et al., 1989) bei einer Spannung von 50 V. Es wurde der Längenmarker „Lambda DNA/*Eco*130I(*StyI*),16“ (MBI Fermentas, Deutschland) verwendet. Plasmidfragmente wurden mittels „GenElute™ Agarose Spin Columns“ (Sigma-Aldrich, Deutschland) aus dem Gel eluiert.

Für die Klonierung wurden kompetente *E. coli*-Zellen (Stamm DH5 α , Hanahan, 1983) verwendet. Die Transformation der Zellen erfolgte mittels Calciumchlorid- und Temperaturbehandlung, und die Extraktion der Plasmide aus den Zellen mittels Midi-Präparation mit anschließender Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und Isopropanol- und Ethanol-fällung (beides nach Sambrook et al., 1989; Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol von Carl Roth, Deutschland). pTA7001 sowie pTA.Aeq - low copy-Plasmide - wurden mittels Anionenaustauschsäule (Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben aus *E. coli* isoliert und gereinigt. Die Konzentration der isolierten Plasmide wurde photometrisch nach Sambrook et al. (1989) bestimmt.

3.1.2 Stabile Transformation von *Triticum aestivum* L.

Sommerweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Veery) und Winterweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida) wurde mit den Konstrukten pUbiAeq und pTA.Aeq mit jeweils einem der beiden Selektionsmarker pCa1Neo und p35SPAT kotransformiert. Die Transformation erfolgte biolistisch (Sanford und Klein, 1987), modifiziert nach Becker et al. (1994).

3.1.2.1 Pflanzenanzucht

Winterweizen wurde in dampfsterilisierter Erde (70 % Komposterde, 30 % Sand) angezogen, 14 Tage nach Aussaat für 8 Wochen vernalisiert und anschließend weiterkultiviert. Bei Sommerweizen entfiel die Vernalisation. Es herrschten die folgenden Kulturbedingungen:

	Anzucht und Weiterkultivierung	Vernalisation
Ort	Klimakammer	Klimakammer
Temperatur (Tag/Nacht)	18 °C / 14 °C	2 °C / 2 °C
relative Luftfeuchte	60 %	60 %
Beleuchtung	16 h bei etwa 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lampentyp: Sylvania Cool White F96T12CW1500, 215W	8 h bei etwa 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lampentyp: Violax Na V-T Super Osram, 400w

Die Pflanzen wurden regelmäßig mit „Wuxal Top N 12:4:6 + Spurenelemente“ (Aglukon, Deutschland) gedüngt.

3.1.2.2 Isolierung unreifer Weizenembryonen

Unreife Embryonen (etwa 14 Tage nach der Bestäubung) wurden aus den Ähren isoliert, oberflächensterilisiert und mit dem Skutellum nach oben auf Induktionsmedium (Zusammensetzung dieses und der folgenden Medien im Anhang) für 2 Tage bei 25 °C im Dunkeln kultiviert. Die Oberflächensterilisation erfolgte durch sequentielle Inkubation mit Ethanol (70%, 1 min) und Natriumhypochlorid (1 %) plus Mucasol (0,5 %, Brand, Deutschland) für 20 min und anschließendes fünfmaliges Waschen mit Wasser.

3.1.2.3 Biolistische Transformation

Vier Stunden vor der Transformation wurden die Embryonen auf Osmotikummedium (siehe Anhang) transferiert. Die Plasmid-DNA wurde an Goldpartikel (Partikelgröße 0,4-1,2 μm , Heraeus, Deutschland) präzipitiert. Dazu wurden 5 μg Plasmid-DNA, 2 mg Goldpartikel (0,1-1,2 μm Durchmesser, Biorad, Deutschland) in 50 μl Wasser, 50 μl Calciumchloridlösung (2,5 M) und 20 μl Spermidinlösung (0,1 M, basisch, Sigma-Aldrich, Deutschland) miteinander vermengt, die Suspension 15 min auf Eis gestellt, die Goldpartikel anschließend abzentrifugiert (5 s, 4000 g) und in 250 μl Ethanol resuspendiert. 3,5 μl dieser Suspension wurden verwendet, um die DNA mittels Partikelkanone (Modell „PDS 1000/He“, Biorad, Deutschland) in die Skutelli von 30 Embryonen einzubringen. Die Embryonen wurden 20 h nach erfolgtem Partikelbeschuss zurück auf Induktionsmedium überführt. Durch Weiterkultivieren der Embryonen auf Induktionsmedium (3 Wochen bei 25 °C im Dunkeln) wurde die Entwicklung von Calli mit somatischen Embryonen induziert.

3.1.2.4 Selektion und Regeneration

Der Kultur auf Induktionsmedium folgte eine 2 bis 3-wöchige Kulturphase auf Selektionsmedium (je nach verwendetem Selektionsmarker mit 150 mg/l Kanamycin, Applichem, Deutschland, 2 mg/l PPT, Aventis/Hoechst, Deutschland, oder 30 mg/l Hygromycin, Boehringer, Deutschland) bei 25 °C im Dunkeln, eine 2- bis 6-wöchige Kulturphase auf Regenerationsmedium bei 25 °C im Licht (Selektionsagens wie beim Selektionsmedium), und eine 2- bis 6-wöchige Kulturphase auf Transfermedium bei 25 °C im Licht (jeweils 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, von der Lampe „Sylvania Cool White F96T12CW1500 215W“; Medien siehe Anhang). Regenerierte Pflanzen wurden ausgetopft und nach 10 bis 14 Tagen durch Besprühen nach folgendem Schema selektiert. Kanamycinselektion: 2,5 % Kanamycin, 2 mal in 1-wöchigem Abstand. BASTA-Selektion: 150 mg/l PPT, am 4. Tag 200 mg/l PPT, am 11. Tag 250 mg/l PPT. Hygromycin-Selektion: Keine Selektion der Regenerate. Sämtliche Sprühlösungen enthielten Tween-20 (0,1 %). Die überlebenden, potentiell transgenen Regenerate wurden bis zur Ährenreife weiterkultiviert (3.1.2.1) und molekular analysiert (3.2).

3.1.3 Etablierung transgener Zellsuspensionen

Unreife Embryonen der mit pUbiAeq und pCa1Neo transgenen Winterweizenlinie „28“ (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, F1-Generation) wurden wie für die biolistische Transformation beschrieben (3.1.2.2) isoliert und auf Induktionsmedium *in vitro* kultiviert. Die erhaltenen Kalli wurde in flüssiges L3-Medium (Lazzeri et al., 1991; siehe Anhang) mit 2 mg l^{-1} 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D, Merck, Deutschland) überführt und kontinuierlich bei $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln geschüttelt. Die entstandene Zellsuspension wurde im gleichen Medium unter Selektionsdruck (125 mg l^{-1} Gentamycin, Applichem, Deutschland) weiterkultiviert, und das Medium wurde regelmäßig ausgetauscht.

3.2 Molekulare Analyse (potentiell) transgener Weizenpflanzen

3.2.1 Isolierung genomischer DNA und Southern Blot-Analyse

Die Isolierung pflanzlicher, genomischer DNA für die Southern Blot-Analyse (Southern 1975) erfolgte aus dem jüngsten Blatt mittels Phenol-Chloroform-Extraktion modifiziert nach Dellaporta et al. (1983). Die Extrakte wurden zusätzlich durch Ribonuklease A-Verdau (RNase A, Applichem, Deutschland) mit anschließender Isopropanol- und Ethanol-fällung gereinigt (Sambrook et al., 1989). $25 \text{ } \mu\text{g}$ isolierter DNA wurden restringiert (Restriktionsendonukleasen von MBI Fermentas, Deutschland, sowie von Promega, Großbritannien), in Agarosegelen (0,8 % Agarose MP, Applichem, Deutschland, in 0,5 % Tris-Borsäure-EDTA-Puffer nach Sambrook et al., 1989) bei einer Spannung von 50 V elektrophoretisch aufgetrennt, denaturiert und neutralisiert, und kapillar auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech, Germany) transferiert, die mit Dextransulfatpuffer plus Heringssperma-DNA (Sigma-Aldrich, Deutschland, Sauter, 1997) geblockt wurde. Die ssDNA wurde mit ^{32}P -markierter *Apoaequorin*- oder *Ubiquitin*-DNA hybridisiert, und die Membran mittels Phosphorimaging analysiert (BAS reader, model BAS-1000, Fujifilm, Japan. Software: PCBAS 2.09, Raytest, Deutschland).

Als Längenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese wurde der Größenstandard „Lambda DNA/*Eco*130I(*Styl*),16“ (MBI Fermentas, Deutschland) verwendet.

Die Synthese ³²P-markierter DNA erfolgte mittels randomisierter Primermarkierung (Prime It II Kit, Stratagene Europe) des *Sall*/*Sma*I-Fragmentes von p7AQ oder des *Sall*/*Bgl*I-Fragmentes von pUbi.cas mit α -[³²P]-dCTP (3000 und 6000 Ci mmol⁻¹, Amersham-Pharmacia Biotech, Deutschland). Uninkorporierte Nucleotide wurden über eine Sephacrylchromatographiesäule (Amersham Micro-S-300 HR Colum, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) entfernt.

Die DNA pUbiAeq-transformierter Pflanzen wurde mit *Eco*RI und *Xba*I (oder *Sac*I) zusammen und jeweils einzeln restringiert. Die Korestriktion ergibt ein aus *ubi1*-Promotor, *Apoaequorin*-cDNA und *nos*-Terminator bestehendes Fragment und ermöglicht die Kontrolle der vollständigen Integration. Die Einzelrestringtionen ermöglichen die Ermittlung der Anzahl der integrierten Kopien. Als Kontrolle wurde unrestringierte DNA verwendet. Die DNA pTA.Aeq-transformierter Pflanzen wurde einzeln sowie zusammen mit *Spe*I und *Xho*I restringiert.

3.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA und Northern Blot-Analyse

Die Isolierung pflanzlicher, genomischer RNA erfolgte aus dem jüngsten Blatt mit „TRizol-Reagenz“ (Gibco BRL Lifesciences, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt (1 % Agarose-Gel in 1-fach konzentriertem Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)-Puffer mit 6 % Formaldehyd, Sambrook et al., 1989), und die *Apoaequorin*-Botenribonukleinsäure (mRNA) wurde wie bei der Southern Blot-Analyse (3.2.1) auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer „radioaktiven“ DNA-Sonde detektiert. Die Gesamt-RNA wurde unmittelbar nach der Isolation aufgetrennt und geblottet. Verwendete Gefäße und Lösungen wurden, soweit möglich, mit Diethylpyrocarbonat (0,01 % g x V⁻¹, Applichem, Deutschland) behandelt. Als Längenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese wurde die „0.24-9.5 Kb RNA Ladder“ (Gibco BRL Lifesciences, Deutschland) verwendet.

3.2.3 Proteinbiochemische Nachweise

3.2.3.1 *in vitro*-Expressionsanalyse

Ein Nachweis der Expression von Apoaequorin in Regeneraten und deren Nachkommenschaft basierte auf der calciumvermittelten Lumineszenz von Aequorin und erfolgte mit einem *in vitro*-Lumineszenzassay modifiziert nach Knight et al. (1997).

0,1 g (Frischgewicht) des jüngsten Blattes einer Pflanze wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mittels Schwingmühle (Model „MM2“, Retsch, Deutschland) homogenisiert und in 400 µl Rekonstitutionspuffer (50 mM Trishydroxymethylaminomethan (Tris), 500 mM Natriumchlorid, 10 mM Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA), 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0,1 % $g \times V^{-1}$ Rinderserumalbumin, pH 7.4) resuspendiert. Die Proben wurden bei 16600 g für 5 min zentrifugiert, und der Überstand wurde mit 2,5 µM Coelenterazin (Nanolight, USA) für 4 h bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Rekonstituiertes Aequorin wurde durch Injektion von 100 µl Calciumchloridlösung (250 mM) „entladen“ (3.2.3.5) und das emittierte Licht währenddessen luminometrisch detektiert (Luminometer-Modell „Lumat LB 9501“, Berthold, Deutschland).

Die Apoaequorinexpression in Zellsuspensionen wurde mit einem abgewandelten *in vitro*-Lumineszenzassay getestet. Bei diesem wurden 400 µl Zellsuspension in L3-Medium (siehe Anhang) mit 5 µM Coelenterazin für 4 h bei 25 °C inkubiert, rekonstituiertes Aequorin durch Injektion von 400 µl Calciumchloridlösung (2 M in 20 % Ethanol) „entladen“ und das emittierte Licht wie beim zuvor beschriebenen *in vitro*-Lumineszenzassay detektiert.

Mit Hilfe der **Analyse der transienten Expression** wurde die Funktionalität der Konstrukte pUbiAeq und pTA.Aeq (2.2) in Weizen vor der ersten *in vitro*-Kulturphase (3.1.2.3) getestet. Dazu wurden die Embryonen wie beschrieben mit dem jeweiligen Konstrukt und zusätzlich mit den Transkriptionsfaktoren *C1* und *R* aus *Zea mays* (Lloyd et al., 1992) kotransformiert.

C1 und R induzieren die Anthocyanbiosynthese, wodurch sich transformierte Zellen violett verfärben und die visuelle Ermittlung der Anzahl an Transformationsereignissen ermöglichen. Ein bis zwei Tage nach der Transformation (nach Erreichen einer hinreichenden Anzahl violett gefärbter Zellen) wurden pTA.Aeq-transformierte Embryonen für 24 h auf Induktionsmedium (siehe Anhang) mit Dexamethason (100 μM ; Negativkontrolle: 0,1 % Ethanol) inkubiert (Aoyama und Chua, 1997). Mit pUbiAeq transformierte Embryonen wurden nicht auf diese Weise inkubiert. Anschließend wurde die Expression des Apoaequorins mit Hilfe des *in vitro*-Lumineszenzassays überprüft. Die Luminometercounts, die innerhalb eines 10 s-Meßintervalls integriert wurden (abzüglich des Luminometerhintergrundes), wurden zur eingesetzten Gesamtproteinmenge und zur eingesetzten Anzahl der Transformationsereignisse in Bezug gesetzt.

3.2.3.2 Dot Blot-Analyse

Mit Hilfe der Dot Blot-Analyse wurde die Spezifität der primären Antikörper (2.3) gegen Apoaequorin getestet. Wie bei der *in vitro*-Expressionsanalyse (3.2.3.1) wurden aus Wurzel- und Blattmaterial die wasserlöslichen Proteine isoliert und diese in Rekonstitutionspuffer - in diesem Fall ohne Rinderserumalbumin - gelöst. Der Gesamtproteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung des „Biorad Microassay“ (Biorad, Deutschland) bestimmt, und jeweils 5 μg Protein wurden auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (Hybond P, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben transferiert.

Die Membran wurde mit Milchpulverlösung (5 % $\text{g} \times \text{V}^{-1}$ fettarmes Milchpulver in „TBST“-Puffer nach Sambrook et al., 1989: 0.1 M Tris, 1.5 M Natriumchlorid, 0.5 % Tween-20, pH 8.0) geblockt, nachfolgend mit dem primären und sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:5000 ($\text{V} \times \text{V}^{-1}$ in TBST-Puffer) für jeweils 45 min bei 22 °C inkubiert und jeweils vorher und nachher mit TBST-Puffer gewaschen. Peroxidasemarkierte sekundäre Antikörper ermöglichten die Detektion von Signalen mittels Chemilumineszenzreaktion („Horseradish Peroxidase“-markierte Antikörper, „ECL Plus Western Blotting Detection System“ und „Hyper Film ECL“, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland).

3.2.3.3 Western Blot-Analyse

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse wurde die Expression des Apoaequorins molekular nachgewiesen. Das Gesamtprotein wurde wie für die Dot Blot-Analyse (3.2.3.2) extrahiert und quantifiziert, 24 µg in 8 µl Wasser aufgenommen und mit 2 µl 5-fach konzentriertem „Tris-Glycin-Natriumdodecylsulfat(SDS)“-Elektrophoresepuffer nach Sambrook et al. (1989) versetzt. Die Proben wurden nach der Methode von Laemmli (1970) in denaturierendem Polyacrylamidgel (diskontinuierlich: 4 % Sammelgel, 12 % Trenngel) elektrophoretisch aufgetrennt und mittels „Semidry“-Apparatur (Biotec Fischer, Deutschland) elektrisch auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (Hybond P, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) transferiert. Der Proteintransfer auf die Membran wurde mittels Ponceaufärbung (0,2 % in 3 % Trichloressigsäure) kontrolliert, und die Membran anschließend, wie für die Dot Blot-Analyse beschrieben (3.2.3.2), detektiert. Als Größenstandard wurde der „Full Range Rainbow 10.000 - 250.000“-Marker (Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) verwendet.

3.2.3.4 Immunolokalisation

Die Immunolokalisation wurde leicht modifiziert nach Quader et al. (1986) ausgeführt. Wurzelspitzen (5mm Länge) drei Tage alter, etiolierter Keimlinge wurden in Paraformaldehydlösung (1 %) in „MSB“-Puffer (100 mM Piperazin-1,4-bis(2-ethylsulfonsäure) (PIPES), 5 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, pH 6,8) mit 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) für 1 h bei Raumtemperatur fixiert, und verbleibendes Aldehyd nach gründlichem Waschen mit 1:2 mit Wasser verdünntem MSB-Puffer mit Natriumborhydrid reduziert. Die Zellwände wurden mit einem Enzymgemisch aus 1 % Zellulase (aus *Trichoderma viridae*, Boehringer, Deutschland), 1 % Pektinase (aus *Aspergillus niger*, 3200 units/mg, Serva, Deutschland) und 2 % Driselase (Sigma-Aldrich, Deutschland) in MSB-Puffer, pH 5,6, für 10 min angedaut.

Danach wurden die Segmente gequetscht, um kleinere Gewebefragmente und einzelne Zellen zu erhalten. Anschließend erfolgte für 1 h eine Lipidextraktion mit 5 % DMSO, 0,05 % Triton X-100 und 0,05 % Oktylphenoxypolyethoxyethanol (Nonidet oder Igepal, Sigma-Aldrich, Deutschland) in MSB-Puffer.

Die Proben wurden mit einem primären Antikörper gegen Aequorin (Verdünnung 1:200) über Nacht und mit einem sekundären, fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Antikörper (Verdünnung 1:80, Sigma-Aldrich, Deutschland) für 1 h inkubiert. Zwischen den Behandlungen wurden die Proben mit 1:2 mit Wasser verdünntem MSB-Puffer gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mit einem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop (TCS-4D, Leica-Microsystems Deutschland) unter Verwendung eines Argon-Krypton-Lasers (Anregung bei 488 nm, Emission bei 520-560 nm Wellenlänge).

3.2.3.5 Bestimmung der cytosolischen Apoaequorinkonzentration

Die Sprosse von drei Tage alten, etiolierten Keimlingen wurden wie bei der Dot Blot-Analyse (3.2.3.2) in Rekonstitutionspuffer homogenisiert und der Gesamtproteingehalt pro Frischgewicht nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung des „Biorad Microassay“ (Biorad, Deutschland) bestimmt. Der Apoaequoringehalt der Gesamtproteine wurde durch Rekonstitution einer definierten Menge Gesamtproteins mit einem Überschuß an Coelenterazin (Nanolight, USA) und anschließender Luminenzintensitätsmessung mittels Luminometer (Modell „Lumat LB 9501“, Berthold, Deutschland) bestimmt. Die ungefähre cytosolische Aequorinkonzentration ließ sich nach Kalibrierung desselben Luminometers (Luminometercounts gegen Aequorinkonzentration) unter Verwendung von rekombinantem Aequorin (Molecular Probes, Niederlande) errechnen.

3.3 Physiologische Experimente an transgenem Weizen

3.3.1 Bestimmung der $[Ca^{2+}]_c$ mittels heterologer Apoaequorin-expression

3.3.1.1 *in vivo*-Rekonstitution von Aequorin

Transgenes, Apoaequorin exprimierendes Pflanzenmaterial wurde in Coelenterazin oder cp-Coelenterazin inkubiert und dadurch *in vivo* Aequorin bzw. cp-Aequorin rekonstituiert. Die Inkubationsbedingungen richteten sich nach den Erfordernissen der Experimente und sind in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen angegeben.

3.3.1.2 Lumineszenzdetektion

Die Lumineszenz rekonstituierten Pflanzenmaterials wurde mit verschiedenen Luminometern und bildgebenden Verfahren detektiert, die im folgenden aufgeführt und in den Beschreibungen der einzelnen Experimente angegeben sind.

- **„Tubeluminometer“**

(Model „Lumat LB 9501“, Berthold, Deutschland).

Dieses Luminometer ermöglichte die Einbringung von Proben in Kunststoffröhren (75 mm Höhe, 12 mm Durchmesser, Referenznr. REF55.476, Sarstedt, Deutschland), deren untere 2,5 cm vor dem Photomultiplier platziert werden. Die Röhren konnten weder belüftet noch perfundiert werden, und es konnte ein fixes Flüssigkeitsvolumen von 100 µl injiziert werden. Das minimale Meßintervall betrug 0,1 s.

- **„Boxluminometer“**

(Photomultiplier-Model „9892A“, EMI, Großbritannien)

Dieses Luminometer ermöglichte die Messung von Proben in Petrischalen, in die während der Messung Lösungen beliebigen Volumens injiziert werden konnten. Das minimale Meßintervall betrug 0,1 s.

- **„Perfusionsluminometer“**

(Plieth et al., 1999; Photomultiplier-Model „9892A“, EMI, Großbritannien)

Dieses Luminometer ermöglichte die simultane Detektion von Licht und Temperatur unter aeroben Bedingungen. Diese wurden entweder durch Belüftung oder durch permanenten Austausch der Lösung (Perfusion) im Probengefäß aufrechterhalten. Als Probengefäße dienten wahlweise Photometerküvetten (12,5 X 12,5 X 45mm) oder 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Cellstar PP-Röhrchen Nr. 227.261, Greiner, Deutschland). Das minimale Meßintervall betrug 0,1 s.

- **Bildverstärkerröhregekoppelte CCD-Kamera**

(Campbell et al., 1996; Model „Photek 216“, Photek, Großbritannien)

Die Messungen wurden in einem lichtdichten Gehäuse in Petrischalen durchgeführt und erfolgten mittels eines Makroobjektives (50 mm, f=2.8), der Kombination dreier Mikrokanal-Bildverstärkerröhren mit einer CCD-Kamera, und der Software "IFS32, Version 4.06" (Photek, Großbritannien).

Diese ermöglichte das Auszählen einzelner Photonen in definierten Arealen abgespeicherter Bilder. Die Proben konnten auf einem Peltierelement plaziert und während der Messung auf bis zu -10 °C gekühlt werden.

- **Bildverstärkerröhre**

Die Messungen wurden in planen Glasküvetten in einem lichtdichten Raum durchgeführt und erfolgten mittels eines Makroobjektives (60 mm, $f=1.0$) und der Kombination einer Mikrokanal-Bildverstärkerröhre der ersten Generation mit einer analogen Videokamera (Panasonic, Deutschland). Videobilder wurden mit einer AD-Wandlerkarte digitalisiert und mit der Bildverarbeitungssoftware „Giotto, Version 1.12“ (Dr. Georg Dittie, Dittie Thermografie Bonn, Deutschland, www.videoastronomy.org) analysiert.

3.3.1.3 Quantifizierung der $[Ca^{2+}]_c$

Bei der Quantifizierung der $[Ca^{2+}]_c$ wurde die pro Zeitintervall gemessene Lumineszenz-intensität zur jeweils verbleibenden Lumineszenzkapazität in Bezug gebracht. Die Lumineszenzkapazität wurde durch Entladung der Probe am Ende des Experimentes ermittelt (durch Applikation von 1 M Calciumchlorid in 10 % Ethanol, beides Endkonzentrationen). Dies ermöglichte die Berechnung der $[Ca^{2+}]_c$ unabhängig von zwischen den Proben variierenden Aequoringehalten.

a) Gleichung nach Knight et al. (1997)

Bei Rekonstitution des Apoaequorins mit Coelenterazin (Nanolight, USA) wurde zur Berechnung der $[Ca^{2+}]_c$ die bei Knight et al. (1997) aufgeführte Gleichung verwendet:

$$p[Ca^{2+}]_c = 0,332588(-\log K)+5,5593; \text{ mit } K = \frac{L}{L + L_{max}},$$

wobei L die gemessenen Luminometercounts pro Sekunde und L_{max} die verbleibende Lumineszenzkapazität bezeichnet. Um L zu erhalten, wurde bei einem n Sekunden andauernden Meßintervall die Anzahl der Counts durch n dividiert. L_{max} ist gleich der Summe aller L nach dem jeweiligen Meßintervall und umfaßt damit sowohl die Counts der nachfolgenden Meßintervalle als auch die der Entladung.

K wird auch als „relative Lumineszenz“ bezeichnet, während die „absolute Lumineszenz“ den Quotienten aus L im Zähler und der Summe sämtlicher Counts im Nenner beschreibt, zu der auch die Counts *vor* dem jeweiligen Meßintervall gehören (Plieth 2001).

b) Gleichung nach Model B von Allen et al. (1977)

Bei Rekonstitution des Apoaequorins mit dem Coelenterazinderivat cp-Coelenterazin (Molecular Probes, Niederlande) wurde zur Berechnung der $[Ca^{2+}]_c$ die Gleichung des Modells B von Allen et al. (1977) verwendet. Bei Aequorin und cp-Aequorin folgt die Abhängigkeit der Lumineszenzintensität von der Calciumionenkonzentration einer sigmoiden Funktion (Shimomura et al., 1993), die mit dieser Gleichung beschrieben werden kann; sie ist dadurch bei Calciumionenkonzentrationen unterhalb von 100 nM genauer als die lineare Gleichung von Knight et al. (1997).

$$\frac{L}{L_{\max}} = \frac{1 + K_R [Ca^{2+}]}{1 + K_{TR} + K_R [Ca^{2+}]}$$

Daraus folgt:

$$\frac{[Ca^{2+}]}{\text{mol/l}} = \frac{\left[\sqrt[3]{(L/L_{\max})} + \sqrt[3]{(L/L_{\max})} \times K_{TR} - 1 \right] / \left[1 - \sqrt[3]{(L/L_{\max})} \right]}{K_R}$$

L und L_{\max} entsprechen der Gleichung von Knight et al. (1997). Model B postuliert, daß jede Calciumbindestelle des Aequorins sich in einem sogenannten T- und einem R-Zustand befinden kann. Nur im R-Zustand kann Calcium gebunden werden. K_{TR} ist die Gleichgewichtskonstante für das Verhältnis von Bindestellen im T-Zustand zu Bindestellen im R-Zustand ($K_{TR} = [T]/[R]$). K_R ist die Konstante für die Assoziation eines Calciumions mit einer Bindestelle im R-Zustand.

Die Konstanten K_{TR} und K_R wurden durch Anpassung des Modells B an die „Eichkurve“ (L/L_{max} gegen Calciumionenkonzentration) von Shimomura et al. (1993) mit Hilfe des Computerprogramms „Sigma Plot“ (Version 7.1, SPSS Science, USA) für cp-Aequorin berechnet. Sie betragen:

$$\begin{aligned} K_{TR} &= 57 \\ K_R &= 2,6 \times 10^7 \end{aligned}$$

Die lineare Regressionsanalyse der von Shimomura gemessenen L/L_{max} -Werte gegen diejenigen, die mittels Model B (mit den auf der Basis der bei Shimomura angegebenen Calciumionenkonzentrationswerten berechneten Konstanten) errechnet wurden, ergab einen Korrelationskoeffizienten von $R^2=0,999$. Die Gleichung lautet somit:

$$\frac{[Ca^{2+}]}{mol/l} = \frac{\left[\sqrt[3]{(L/L_{max})} + \sqrt[3]{(L/L_{max})} \times 57 - 1 \right] / \left[1 - \sqrt[3]{(L/L_{max})} \right]}{26000000}$$

Die Konstanten für „natives“ und hcp-Coelenterazin wurden ebenfalls berechnet, jedoch nicht zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_c$ verwendet. Sie betragen:

Derivat	K_{TR}	K_R	R^2
natives Coelenterazin	96	1×10^7	0,99
hcp-Coelenterazin	51,39	$2,25 \times 10^7$	0,96

3.3.2 Experimente zum Einfluß der Temperatur auf die $[Ca^{2+}]_c$

3.3.2.1 Pflanzenmaterial

Sämtliche physiologischen Experimente wurden mit Winterweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida) durchgeführt, der mit pUbiAeq transgen war und Apoaequorin exprimierte (Linie „28“, F1-Generation).

3.3.2.2 Messung kälte(schock)induzierter Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$

Für Experimente an Keimlingen wurden Karyopsen oberflächensterilisiert (durch 10 min Inkubation mit 1% Natriumhypochlorid mit 0,1% Tween-20 und anschließendem gründlichen Waschen mit Wasser), über Nacht in gut belüftetem Wasser gequollen, erneut oberflächensterilisiert und auf mit Wasser befeuchtetem Keimpapier für drei bis fünf Tage bei 25 °C im Dunkeln oder im Licht ausgekeimt. Die Kutikula wurde optional mit Siliziumcarbidgepulver (1200 mesh, K. Schriever, Deutschland) aufgeraut, und die Keimlinge wurden *in toto* in 2,5 bis 10 μ M Coelenterazinlösung (Nanolight, USA) für 4 h bei 25 °C im Dunkeln inkubiert, um funktionelles Aequorin zu rekonstituieren. Das Coelenterazin war in Puffer gelöst („Standardpuffer“: 1 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure (MES), 0,1 mM Kaliumchlorid, 0,1 mM Calciumchlorid und 0,1 mM Magnesiumchlorid, pH 6.2) und die Lösung belüftet. Bei Experimenten an Pflanzenteilen (Wurzeln, Koleoptilen, Blätter) wurden diese erst isoliert und danach rekonstituiert (siehe auch 3.3.3 und 3.3.4).

Für Experimente an Aleurongewebe wurden Karyopsen transversal halbiert und die embryofreie Hälfte weiterverwendet. Nach Entfernung der äußeren Perikarpschichten wurden diese, wie für die Keimlinge beschrieben (siehe oben), oberflächensterilisiert und gequollen, indem sie mit der angeschnittenen Fläche auf sterilem, mit Wasser angefeuchtetem Filterpapier, oder sterilen, mit Wasser durchsetzten Glaskügelchen für drei Tage bei 25 °C im Dunkeln inkubiert wurden. Danach wurde das stärkehaltige Endosperm entfernt und auf diese Weise das Aleurongewebe isoliert. Das isolierte Aleurongewebe wurde in 10 μ M Coelenterazin in belüftetem MES / 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer (1 mM MES, 1 mM HEPES, 0.1 mM Kaliumchlorid, 5 mM Calciumchlorid, pH 7.0) rekonstituiert.

Bei Messungen mit dem Tubeluminometer wurde die Lumineszenz eines einzelnen Keimlings detektiert und während der Messung Wasser unterschiedlicher Temperatur hinzupipettiert. Die Messung wurde dabei für 1-2 s unterbrochen. Im Perfusionsluminometer lagen 1 bis 3 Keimlinge plan auf einer vertikal ausgerichteten, hohlen Kupfer- oder Edelstahlplatte, deren Temperatur durch Perfusion mit Wasser reguliert und parallel mit der Lumineszenzintensität detektiert wurde (Plieth et al., 1999).

Für eine Kälteschockbehandlung wurde die Perfusion unterbrochen und + 2 °C-kaltes Wasser in die Meßkammer injiziert. Keimlinge oder deren Pflanzenteile wurden während der Messung kontinuierlich mit belüftetem Standardpuffer, isoliertes Aleurongewebe mit belüftetem MES/HEPES Puffer mit einem pH-Wert von 5.0 perfundiert. Für Aufnahmen mit der CCD-Kamera lagen die Keimlinge auf mit Wasser befeuchtetem Filterpapier in einer Kunststoffpetrischale, deren Temperatur durch ein Peltierelement reguliert wurde. Für Aufnahmen mit der Bildverstärkerröhre befanden sich die Keimlinge in einer Glasküvette, in die Wasser oder Standardpuffer unterschiedlicher Temperatur hinzupipettiert wurde. Am Ende eines Experimentes wurde das Pflanzenmaterial wie beschrieben „entladen“ und die $[Ca^{2+}]_c$ berechnet (3.3.1.3).

3.3.2.3 Versuche zum Einfluß einer Kälteakklimatisation auf kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$

Keimlinge wurden wie beschrieben (3.3.2.2) angezogen und weitere 6 bis 10 Tage bei 4 °C im Dunkeln kultiviert. Die $[Ca^{2+}]_c$ -Messungen erfolgten im Perfusionsluminometer wie bei den Versuchen zu kälteinduzierten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ in nichtakklimatisierten Keimlingen (3.3.2.2). Die Inkubation mit Coelenterazin erfolgte jedoch bei 4 °C, um eine Adaptation an höhere Temperaturen zu vermeiden.

3.3.2.4 Versuche zum Einfluß des Cytoskelettes auf kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$

Die Messungen erfolgten wie bei den übrigen Versuchen zu kälteinduzierten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ mit dem Perfusionsluminometer (3.3.2.2), jedoch ging der Messung eine Cytochalasin-D-Inkubation (20 µM, Sigma-Aldrich, Deutschland) voraus. Erfolgte die Inkubation vor der Messung, wurde das Pflanzenmaterial während der Messung perfundiert. Erfolgte die Inkubation im Verlauf der Messung durch Injektion, wurde nicht perfundiert, sondern belüftet.

Es wurden Keimlinge und isolierte Wurzeln verwendet. Entsprechende Lumineszenzintensitätsmessungen wurden zusätzlich an Zellsuspensionen mit dem Tubeluminometer durchgeführt, wobei 100 µl Cytochalasin-D-Lösung (100 µM in L3-Medium) zu 400 µl Zellsuspension injiziert wurden, ohne die Messung zu unterbrechen.

3.3.2.4.1 Sichtbarmachung von Aktinfilamenten in Weizenwurzeln

Um die depolymerisierende Wirkung des Cytochalasin-D gegenüber Aktinfilamenten zu kontrollieren, wurden Keimlinge für 4 h in Cytochalasin-D (20 µM) sowie für 4 h in DMSO (0,1 %, Negativkontrolle, beide Ansätze in Standardpuffer) inkubiert und anschließend die Aktinfilamente nach der Methode von Sonobe und Shibaoka (1989) sichtbar gemacht. Dazu wurden die Wurzeln basal abgeschnitten und zur Proteinvernetzung für 30 min in 100 µM Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester in Puffer (100 mM PIPES, 10 mM EGTA, 5 mM Magnesiumsulfat, 0,025 % Triton X-100, pH 6.8) inkubiert. Anschließend wurden die Wurzeln mit 1:2 mit Wasser verdünntem MSB-Puffer (3.2.3.4) gewaschen, die apikalen 5 mm der Wurzeln abgeschnitten und für 5 min in 8 nM Rhodamin-Phalloidin in 1:2 mit Wasser verdünntem MSB-Puffer inkubiert. Die Aktinverteilung in der Zelle wurde mit Hilfe eines Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopes (TCS-4D, Leica Microsystems Deutschland) unter Verwendung eines Argon-Krypton-Lasers untersucht (Anregungslicht 520-560 nM; Emission: > 620 nm Wellenlänge).

3.3.2.5 Messung hitzeinduzierter Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$

Die Messungen erfolgten wie bei den Versuchen zu den kälteinduzierten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ mit dem Perfusionsluminometer (3.3.2.2). Die Keimlinge wurden unterschiedlichen Temperaturregimen ausgesetzt: Erhitzung, Erhitzung und nachfolgende Kühlung, sowie Kühlung und nachfolgende Erhitzung.

In einem Kontrollexperiment wurde überprüft, ob die Temperatur die Lumineszenzintensität des Aequorins selbst beeinflusst. Dazu wurde rekombinantes Aequorin (Molecular Probes, Niederlande) in Puffern definierter Calciumionenkonzentration (Calcium Calibration Buffer Kit 2, Molecular Probes, Niederlande) gelöst, die Lumineszenz mit dem Perfusionsluminometer gemessen, und währenddessen abwechselnd erhitzt und gekühlt, danach „entladen“ und schließlich die $[Ca^{2+}]_c$ mit der Formel nach Knight et al. (1997; 3.3.1.3) berechnet. Der Puffer befand sich in einer Kammer aus zwei Objektträgern, die der hohlen Edelstahlplatte auflag, wodurch der Temperaturgradient zwischen Platte und Puffer derselbe war wie bei den Messungen hitzeinduzierter Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ zwischen Platte und Keimling.

3.3.3 Experimente zum Einfluß von Abscisinsäure auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizenkeimlingen

Die Experimente zum Einfluß von ABA auf die $[Ca^{2+}]_c$ erfolgten mit dem Perfusionsluminometer wie zuvor beschrieben (3.3.2.2). Die $[Ca^{2+}]_c$ drei Tage alter, etiolierter Weizenkeimlinge, 6 bis 12 Tage alter, ergrünter Weizenpflanzen und isolierter grüner Blätter wurde ermittelt, während und nachdem $100 \mu M \pm$ -ABA (ABA, Fluka, Deutschland) hinzugegeben wurden. Die Rekonstitution der ergrünter Pflanzen erfolgte unter reduziertem Außendruck, um die Permeation der Coelenterazinlösung in die Interzellularen des Blattgewebes zu gewährleisten.

3.3.4 Experimente zum Einfluß von Auxin auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizenkoleoptilen

Karyopsen wurden oberflächensterilisiert (durch 10-min Inkubation mit 1 % Natriumhypochlorid mit 0,1 % Tween-20 und anschließend, gründlichen Waschen mit Wasser), über Nacht in gut belüftetem Wasser gequollen, erneut oberflächensterilisiert, und auf mit Wasser befeuchtetem Keimpapier für drei Tage bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln ausgekeimt.

Die Koleoptilen wurden mit Siliziumcarbidpulver (1200 mesh, K. Schriever, Deutschland) aufgeraut oder unbehandelt gelassen, die apikalen 5 mm abgeschnitten und die oberen 10 mm der Restkoleoptile als Segment auf eine Nadel aufgefädelt. Vier bis acht solcher aufgefädelten Koleoptilsegmente wurden in einer Photometerküvette (12,5 x 12,5 x 45mm) mit 10 μM Coelenterazin oder 10 μM cp-Coelenterazin für 15 bis 30 min bei 25 °C im Dunkeln inkubiert und unmittelbar anschließend für die Lumineszenzintensitätsmessung verwendet. Während der (cp)-Coelenterazininkubation befanden sich die Segmente in belüftetem Puffer („Auxinpuffer“: 1 mM MES, 0,1 mM KCl, pH 6,2), der während der Messung mit dem Perfusionsluminometer (3.3.1.2) entweder belüftet oder perfundiert wurde.

Während der Lumineszenzintensitätsmessung wurde IAA (Sigma-Aldrich, Deutschland) in einer Endkonzentration von 10 μM hinzugegeben. Am Ende eines Experimentes wurde das Pflanzenmaterial wie beschrieben (3.3.1.3) „entladen“ und die $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mit der Formel nach Knight et al. (1997) für Aequorin und der Formel von Allen et al. (1977) für cp-Aequorin (3.3.1.3) berechnet.

3.3.4.1 Messung des auxininduzierten Streckungswachstums von Weizenkoleoptilen

In einem Kontrollexperiment wurde die Wirksamkeit des während der Lumineszenzintensitätsmessungen hinzugegebenen Auxins anhand von Messungen des auxininduzierten Streckungswachstums von Weizenkoleoptilen getestet. Die Isolierung und Behandlung (Aufrauhung, Rekonstitution) der Koleoptilsegmente erfolgte auf die gleiche Weise wie für die $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Messung bei Auxineinwirkung (3.3.4), mit dem Unterschied, daß vier 5 mm-Koleoptilsegmente aus der Region unmittelbar unterhalb der apikalen 5 mm auf eine Nadel aufgefädelt wurden, so daß sie eine „Koleoptilsäule“ bildeten. Das Wachstum dieser Säule wurde mit dem Winkelgeber eines mechanischen Auxanometers (Tode und Lüthen, 2001) registriert. Die Messungen erfolgten in belüftetem Auxinpuffer (3.3.4).

3.4 Computergestützte Berechnungen

Die Berechnung der $[Ca^{2+}]_c$ erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Excel“ (Version 2000, Microsoft, USA). Statistische Analysen wurden mit „Winstat“ (Version 1999.1, R.Fitch Software, Deutschland) und „Statistica“ (Version 6, StatSoft, USA) durchgeführt, Grafiken mit „Origin“ (Version 5, Microcal, USA) erstellt. Ein mit „Acrobat“ (Version 5, Adobe, USA) generiertes Dokument dieser Arbeit befindet sich auf der „Compact Disc“ im Anhang.

4 Ergebnisse

4.1 Erzeugung und Analyse transgener Weizenpflanzen

Die Restriktionsanalyse der Konstrukte pUbiAeq und pTA.Aeq (3.1.1) wies die vollständige Integration der Apoaequorin-cDNA in beiden Plasmiden nach.

Beide Plasmide - pUbiAeq und pTA.Aeq - ermöglichten die transiente Expression des Apoaequorins in Skutellumgewebe von Winterweizen (3.2.3.1). Nach pUbiAeq-Transformation wurden innerhalb eines 10 s-Meßintervalls 760 Luminometercounts pro 1 µg Gesamtprotein bzw. 95 Luminometercounts pro 1 Transformationsereignis gemessen. Nach pTA.Aeq-Transformation und Dexamethasoninkubation betrug der Meßwert 17 Counts pro 1 µg Gesamtprotein bzw. 3 Counts pro 1 Transformationsereignis. pTA.Aeq-transformierte, mit 0,1 % Ethanol inkubierte Skutelli (Negativkontrolle) produzierten 3 Counts pro 1 µg Gesamtprotein bzw. 0,7 Counts pro 1 Transformationsereignis. Untransformierte Embryonen waren nicht lumineszent (Countangaben abzüglich des Hintergrundes).

Von 2137 isolierten und mit pTA.Aeq transformierten Embryonen (3.1.2) wurden 45 Pflanzen regeneriert, die sich in der Southern Blot-Analyse (3.2.1) als nicht transgen erwiesen. Von 18000 isolierten und mit pUbiAeq transformierten Embryonen wurden 52 Pflanzen regeneriert, von denen 13 mit pUbiAeq transgen waren: 10 Winterweizenpflanzen, 4 mit Kanamycin- und 6 mit BASTA[®]-Resistenz, und 3 Sommerweizenpflanzen, 2 mit Kanamycin- und 1 mit BASTA[®]-Resistenz (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Transgene Weizenlinien (Nummern), aufgeschlüsselt nach Sorte und Resistenz

Sorte	Resistenz gegen	
	Kanamycin	BASTA [®]
Florida (Winterweizen)	2, 4, 24, 43	5, 6, 25, 28, 34, 39
Veery (Sommerweizen)	49, 51	45

Southern Blot- und Northern Blot-Analysen (3.2.2) bestätigten die Integration (Abb. 4.1) und Transkription (Abb. 4.2) der *Apoaequorin*-cDNA in den 13 lumineszierenden Regeneraten. In den übrigen selektionspositiven Regeneraten konnte keine *Apoaequorin*-DNA oder -RNA nachgewiesen werden.

Dot Blot- und Western Blot-Analysen sowie Immunlokalisationen zeigten eine Kreuzreaktivität der Antikörper. Die *in vitro*-Expressionsanalyse wies die Expression funktionellen Apoaequorins in sämtlichen Linien bis hin zur F4-Generation sowie in der Zellsuspension nach.

In vivo produzierte ein drei Tage alter, etiolierter Keimling, dessen Apoaequorin mit 5 μ M Coelenterazin zu Aequorin rekonstituiert wurde, typischerweise 3000 Luminometercounts per 3 s-Integrationsintervall (Hintergrund: 50 Counts / 3 s, gemessen im Perfusionsluminometer, 3.3.1.2) und 200 Millionen Counts insgesamt (Gesamtsumme der Counts nach „Entladung“, 3.3.1.3).

Wurzeln, Koleoptilen und Blätter der Weizenkeimlinge waren lumineszent, wie Messungen mittels bildverstärkerröhregekoppelter CCD-Kamera (3.3.1.2) zeigten (Abb. 4.3). Die Intensität des emittierten Lichtes ermöglichte die vergrößerte Darstellung einzelner Bereiche des Keimlings, beispielsweise von Koleoptil- und Wurzelspitzen (Abb. 4.3). Das emittierte Licht war mit bloßem Auge zu sehen.

Der Apoaequoringehalt des Sprosses eines drei Tage alten, etiolierten Keimlings betrug $0,3 \pm 0,05$ ng pro 1 μ g Gesamtprotein, bei einem Gesamtproteinanteil von $6 \pm 0,4$ μ g pro 1 mg Frischgewicht (n=3).

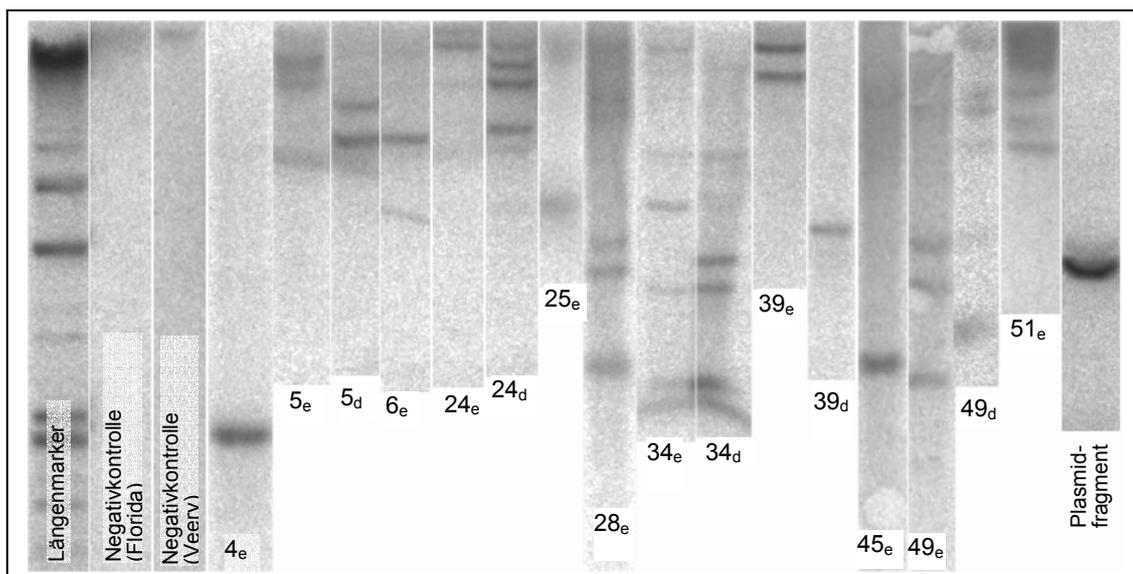


Abb. 4.1 Southern Blot-Analyse der Integration der *Apoaequorin*-cDNA in das Genom pUbiAeq-transformierter Weizenregenerate (3.2.1). Vorhandenen Banden weisen die Integration nach. Die Nummern kennzeichnen die Regenerate, „e“ eine Einzel- und „d“ eine Doppelrestriktion. Hybridisierung mittels 32 P-markierter *Apoaequorin*-ssDNA (*Sall*/*Sma*I-Fragment aus p7AQ; 2.2).

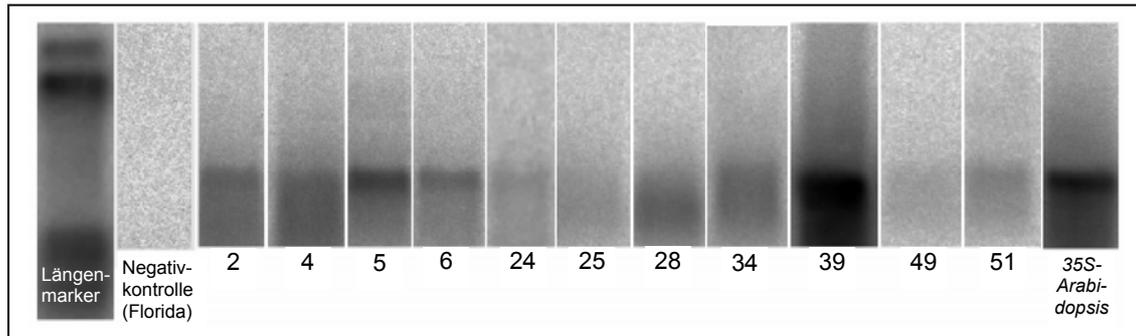


Abb. 4.2 Northern Blot-Analyse der Apoaequorin-mRNA in pUbiAeq-transformierten Weizenregeneraten (3.2.2). Die Nummern kennzeichnen die Regeneraten. Hybridisierung mittels ^{32}P -markierter Apoaequorin-ssDNA (*Sall/SmaI*-Fragment aus p7AQ; 2.2). Positivkontrolle: *Arabidopsis* mit Apoaequorinexpression unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Zusammenstellung verschiedener Blots.

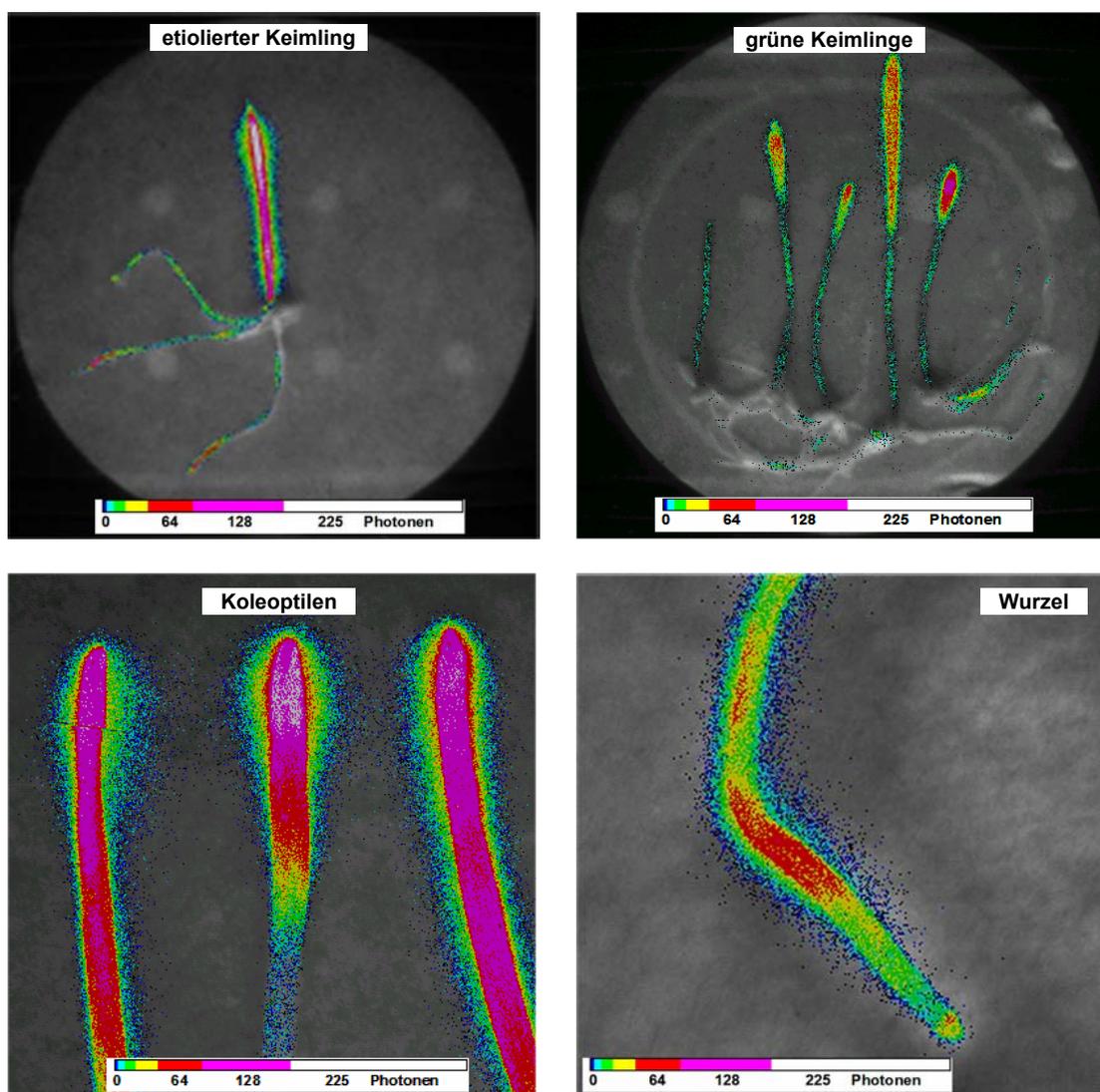


Abb. 4.3 Lumineszenzbilder Apoaequorin exprimierenden Winterweizens (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28), aufgenommen mittels bildverstärkerröhregekoppelter CCD-Kamera. Hellfeldbilder (grau) sind mit Integrationsbildern (Falschfarben) des durch Entladung emittierten Lichtes überlagert.

4.2 Der Einfluß der Temperatur auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizen

4.2.1 Die Wirkung einer schnellen Temperaturabsenkung (Kälteschock) auf die $[Ca^{2+}]_c$

Der Einfluß eines Kälteschocks auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Winterweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) wurde in zwei experimentellen Ansätzen untersucht (3.3.2.2).

Im ersten Ansatz wurde zu etiolierten Keimlingen, die bei +20 °C in leeren Kunststoffröhren inkubiert wurden, Wasser unterschiedlicher Temperatur pipettiert und währenddessen die Lumineszenzintensität gemessen. Diese Behandlung verursachte einen sofortigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ (Abb. 4.4): Innerhalb des 3 s-Integrationsintervalls des Luminometers stieg die $[Ca^{2+}]_c$ auf ein Maximum an, welches umso höher ausfiel, je niedriger die Temperatur des hinzugegebenen Wassers war.

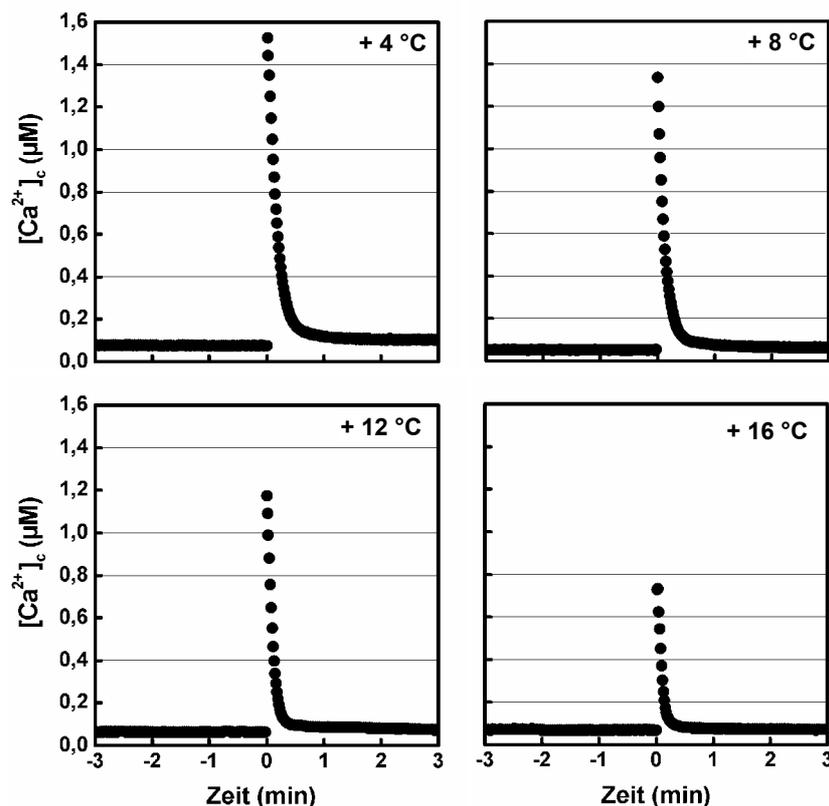


Abb. 4.4 $[Ca^{2+}]_c$ -Anstieg in etiolierten Winterweizen-keimlingen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) nach Applikation von Wasser mit einer Temperatur von +4, +8, +12 und +16 °C („Temperaturschock“) bei 0 min. Dargestellt sind das arithmetische Mittel und der Standardfehler von 10-20 Meßwerten; nicht sichtbare Fehlerbalken befinden sich innerhalb der Dimension des jeweiligen Datenpunktes. $[Ca^{2+}]_c$ -Messung mittels rekombinanter Aequorintechnik.

Die $[Ca^{2+}]_c$ stieg ebenfalls bei $+20\text{ }^\circ\text{C}$ und damit ohne Kälteeinwirkung an (Abb. 4.5). Dies könnte auf den mechanischen Stimulus durch die Wasserzugabe zurückzuführen sein, wie mittels Bildverstärkerröhre gezeigt werden konnte: Die mechanische Stimulation der Koleoptile eines Weizenkeimlings durch Biegen mit einer Impföse führte zu einem unmittelbaren Lumineszenzanstieg (Abb. 4.6, digitalisierter Videofilm „mechanostimulus.avi“ auf der „Compact Disc“ im Anhang).

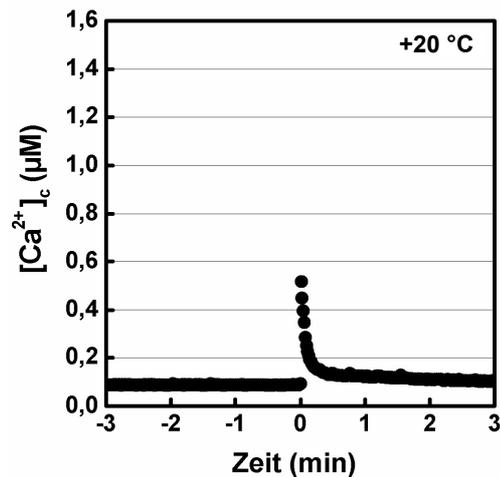


Abb. 4.5 $[Ca^{2+}]_c$ -Anstieg in etiolierten Winterweizenkeimlingen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28), hervorgerufen durch Applikation von Wasser ($+20\text{ }^\circ\text{C}$, Kontrolle) bei 0 min. Dargestellt sind das arithmetische Mittel und der Standardfehler von 10 Meßwerten; nicht sichtbare Fehlerbalken befinden sich innerhalb der Dimension des jeweiligen Datenpunktes. $[Ca^{2+}]_c$ -Messung mittels rekombinanter Aequorintechnik.

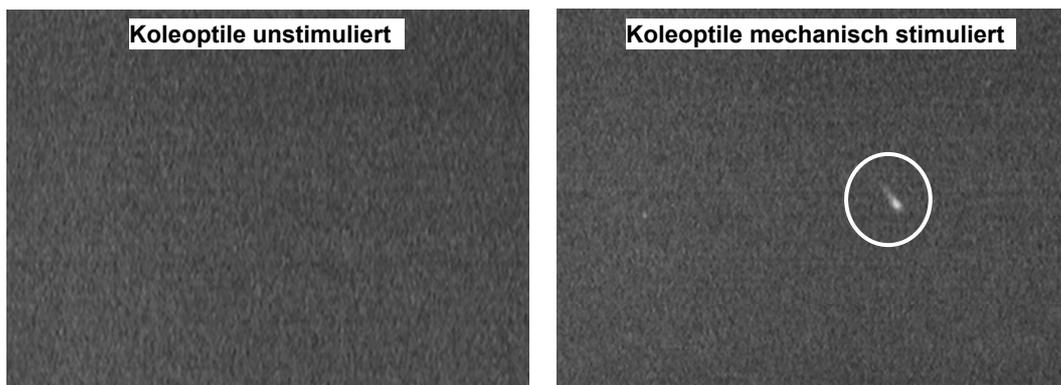


Abb. 4.6 Lumineszenzanstieg in Apoaequorin exprimierendem, etioliertem Winterweizenkeimling (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) durch mechanischen Stimulus. 0,02-Sekunden-Integrationsbilder des emittierten Lichtes des unstimulierten Keimlings (links) und während des Biegens von dessen Koleoptile (rechts). Der Ort des Lumineszenzanstiegs ist weiß eingekreist. Aufnahme mittels Bildverstärkerröhre.

Die $[Ca^{2+}]_c$ der Keimlinge vor der Applikation („Grundkonzentration“) lag in allen Fällen zwischen 50 nM und 100 nM und wurde durch die Applikation auf Werte von 1500 nM bei +4 °C, 1300 nM bei +8 °C, 1200 nM bei +12 °C, 700 nM bei +16 °C und 500 nM bei +20 °C erhöht (arithmetische Mittel, auf Hunderterpotenz gerundet, Abb. 4.7). Dies entspricht einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ um bis zu 2400 % (bei +8 °C). Die relative Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ ist bei +4 °C niedriger als bei +8 °C, da die Grundkonzentration der für die +4 °C-Applikation verwendeten Keimlinge höher als die der übrigen war. Die Regressionsanalyse im Bereich von 8 °C bis 20 °C zeigt eine hochsignifikante, lineare Korrelation zwischen der Temperatur des hinzugegebenen Wassers und der relativen Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ ($R^2=0,999$, Abb. 4.7).

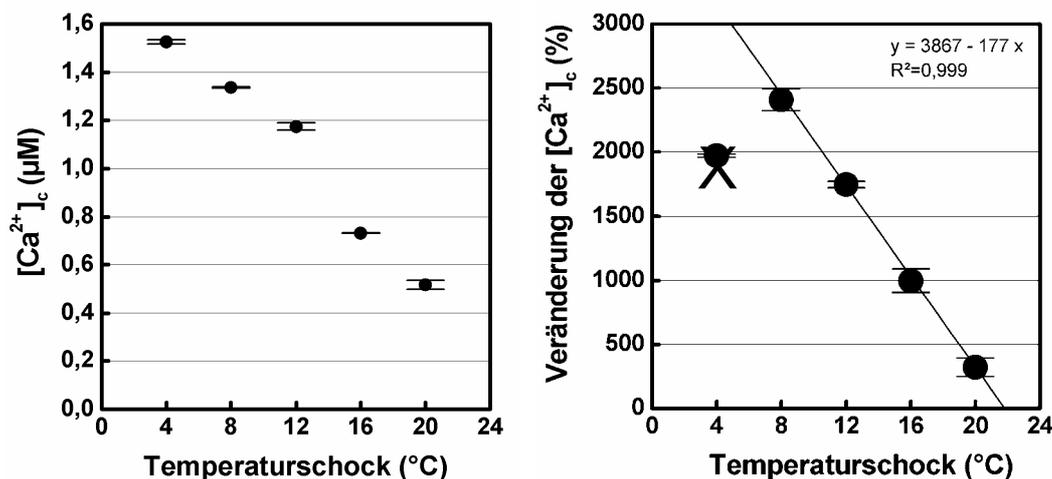


Abb. 4.7 $[Ca^{2+}]_c$ -Anstieg in etiolierten Winterweizenkeimlingen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) nach Applikation von temperiertem Wasser. Dargestellt sind das arithmetische Mittel und der Standardfehler der Maximalwerte der $[Ca^{2+}]_c$ (linke Grafik, $n=10-20$) und deren relativer Veränderung ($\frac{[Ca^{2+}]_{c,nach\ Applikation}}{[Ca^{2+}]_{c,vor\ Applikation}} \cdot 100 - 100$; rechte Grafik). Die relative Veränderung ist mit der Temperatur linear korreliert ($R^2=0,999$, mit „X“ markierter Wert blieb unberücksichtigt). $[Ca^{2+}]_c$ -Messung mittels rekombinanter Aequorintechnik.

Im zweiten experimentellen Ansatz wurde das Pflanzenmaterial mit belüftetem Puffer perfundiert, bevor es durch Zugabe von +2 °C-temperiertem Wasser einem Kälteschock ausgesetzt wurde (3.3.2.2). Wie im vorhergehend beschriebenen Versuch erfolgte als Reaktion auf den Kälteschock ein sofortiger Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ (Abb. 4.8). Im Gegensatz zu diesem wurde der maximale Wert jedoch erst nach dem ersten 3 s-Meßintervall des Luminometers erreicht und war - bei etiolierten Keimlingen - mit $650 \pm 17,4$ nM weniger als halb so hoch.

Die Maximalwerte bei den etiolierten Keimlingen und isolierten Koleoptilen sowie bei grünen Keimlingen und isolierten, grünen Primärblättern ebenso wie die der Zellsuspensionen unterschieden sich nicht voneinander. Isoliertes Aleurongewebe hingegen zeigte mit einem Maximalwert von nur $300 \pm 10,8$ nM einen deutlich geringeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ (Varianzanalyse mit LSD-Methode, $\alpha = 0,01$), die darüber hinaus anschließend langsamer sank. Drei min nach dem Kälteschock betrug die $[Ca^{2+}]_c$ des Aleurongewebes noch $163 \pm 23,2$ nM, während diese bei Keimlingen, Primärblättern und Koleoptilen nur $85 \pm 7,5$ nM betrug.

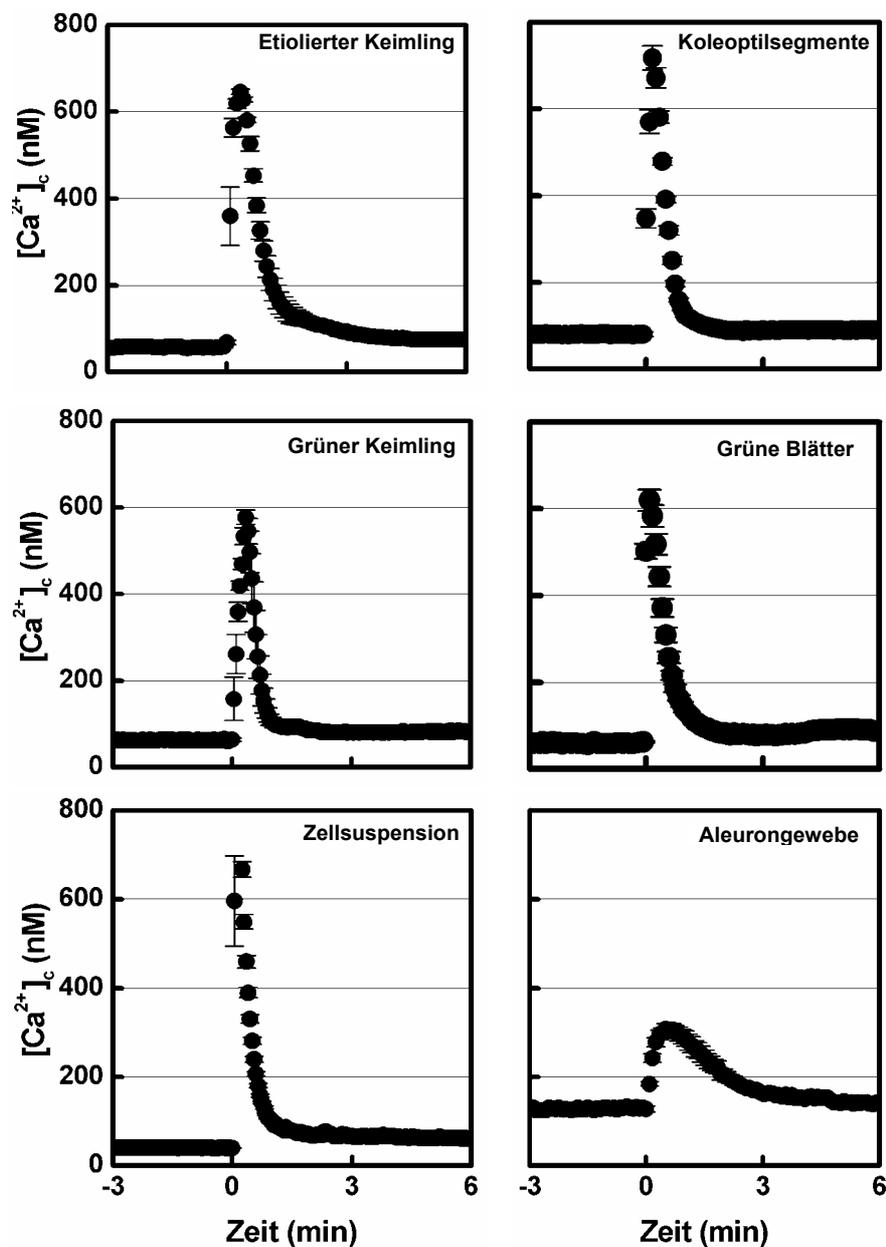


Abb. 4.8 Kälteschockinduzierter $[Ca^{2+}]_c$ -Anstieg in Winterweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28), hervorgerufen durch Applikation von +2 °C kaltem Wasser bei 0 min. Dargestellt sind das arithmetische Mittel und der Standardfehler von 5-10 Meßwerten; nicht sichtbare Fehlerbalken befinden sich innerhalb der Dimension des jeweiligen Datenpunktes. $[Ca^{2+}]_c$ -Messung mittels rekombinanter Aequorintechnik.

Der bei Eintreten eines Kälteschocks in Keimlingen unmittelbar erfolgende Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ (vergleiche Abb. 4.4 und Abb. 4.8) ließ sich ebenfalls mittels Bildverstärkerröhre beobachten (Abb. 4.9, Videodatei „kaelteschock.avi“ auf der „Compact Disc“ im Anhang). Wurde ein etiolierter Keimling mit $+2\text{ °C}$ kaltem Wasser überflutet, pflanzte sich die Lumineszenz entlang der Koleoptile mit steigendem Wasserpegel fort. Nach dem anfänglichen Kälteschock leuchtete die Koleoptile nach. Die Wurzeln reagierten entsprechend (nicht dargestellt).

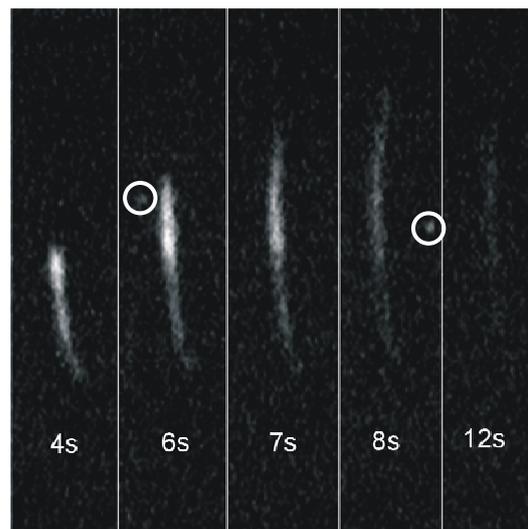


Abb. 4.9 Lumineszenz der Koleoptile eines Apoaequorin exprimierenden, etiolierten Winterweizenkeimlings (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) im Verlauf eines Kälteschocks. Der Keimling wurde durch Applikation von $+2\text{ °C}$ kaltem Wasser innerhalb von 8 s überflutet. Jedes Einzelbild zeigt die Lichtemission innerhalb eines 0,02-s-Integrationsintervalls zum angegebenen Zeitpunkt ab Beginn der Kälteschockbehandlung. Nur die Koleoptile ist abgebildet. Die Kreise kennzeichnen Meßartefakte (sog. „hot pixels“). Lumineszenzmessung mittels Bildverstärkerröhre.

4.2.2 Die Wirkung langsamer Temperaturabsenkung auf die $[Ca^{2+}]_c$

In einem weiteren experimentellen Ansatz (3.3.2.2) wurden etiolierte Keimlinge mit belüftetem Puffer perfundiert, kälteexponiert und die Lumineszenzintensität sowie die Temperatur parallel gemessen. Auf diese Weise konnten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ in Abhängigkeit von der Temperatur und der Temperaturrate ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$) erfaßt werden.

Das Kühlen eines Keimlings von +20 °C auf +8 °C innerhalb weniger Sekunden - ein Kälteschock - verursachte den aus den zuvor beschriebenen Versuchen (4.2.1) bekannten sofortigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$. Der maximale Wert der $[Ca^{2+}]_c$ wurde bereits vor Erreichen des Minimalwertes der Temperatur erreicht (Abb. 4.10a). Während des Andauerns dieser „Minimaltemperatur“ sank die $[Ca^{2+}]_c$ kontinuierlich und erreichte beim Ansteigen der Temperatur auf +20 °C den Wert, der vor dem Kälteschock bestand (die „Grundkonzentration“).

Dies impliziert, daß der kälteinduzierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ von der Veränderung der Temperatur über die Zeit, der Temperaturrate, abhängig sein könnte. Das in Abb. 4.10b dargestellte Ergebnis bestätigt dies: Bei langsamerem Kühlen (mit einer Temperaturrate von $-0,05 \text{ °C s}^{-1}$ anstatt $-0,29 \text{ °C s}^{-1}$) stieg die $[Ca^{2+}]_c$ langsamer auf ihren Maximalwert (innerhalb von 8 min anstatt von 1 min), der niedriger ausfiel (100 nM anstatt 300 nM). Sequentielles Kühlen (Abb. 4.10c), erst mit niedriger Temperaturrate ($-0,03 \text{ °C s}^{-1}$), dann mit höherer Temperaturrate ($-0,26 \text{ °C s}^{-1}$), führte entsprechend zu zwei Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_c$, von denen der Maximalwert der zweiten schneller (innerhalb von 1 min anstatt von 5 min) erreicht wurde und höher ausfiel (210 nM und 110 nM). Bei einer Temperaturrate von nur $-0,005 \text{ °C s}^{-1}$ konnte auf +8 °C gekühlt werden, ohne daß sich die $[Ca^{2+}]_c$ in ihrer Höhe veränderte (Abb. 4.10d). Von +8 °C wurde - ohne vorherige Temperaturerhöhung - die Temperatur in zwei Stufen auf +2 °C gesenkt: erst mit einer Temperaturrate von $-0,06 \text{ °C s}^{-1}$, dann von $-0,05 \text{ °C s}^{-1}$. Dies führte zu zwei zeitgleichen Anstiegen der $[Ca^{2+}]_c$.

Abb. 4.11 zeigt die polynomische Abhängigkeit ($r = -0,85$) zwischen den kälteinduzierten Maximalwerten der $[Ca^{2+}]_c$ und der jeweiligen Temperaturrate. Die Temperaturraten kamen experimentell durch Kühlung auf unterschiedliche Temperaturen zustande, wodurch die Maximalwerte der $[Ca^{2+}]_c$ sowohl von der Temperaturrate als auch von der absoluten Temperatur beeinflusst worden sein können. Die multiple Regressionsanalyse ($\alpha = 0,01$) ergab eine stärkere Abhängigkeit zwischen $[Ca^{2+}]_c$ und Temperaturrate ($r_{\text{partiell,Temp.rate}} = -0,86$) als zwischen $[Ca^{2+}]_c$ und Temperatur ($r_{\text{partiell,Temp.}} = -0,67$).

Die $[Ca^{2+}]_c$ in der Koleoptile und den Wurzeln desselben Keimlings änderte sich im Verlauf einer Kälteexposition nahezu simultan, wie Messungen mittels CCD-Kamera (3.3.1.2, 3.3.2.2) zeigten (Abb. 4.12). Die Calciumreaktion war dabei in der Koleptile und den Wurzeln gleichermaßen von der Temperaturrate abhängig:

Das zweistufige Kühlen (zu erkennen an der zweiten Erniedrigung der Temperaturrate) führte zu einem korrespondierenden, zweiten Ansteigen der $[Ca^{2+}]_c$, die nach dem Kühlen nochmals geringfügig anstieg.

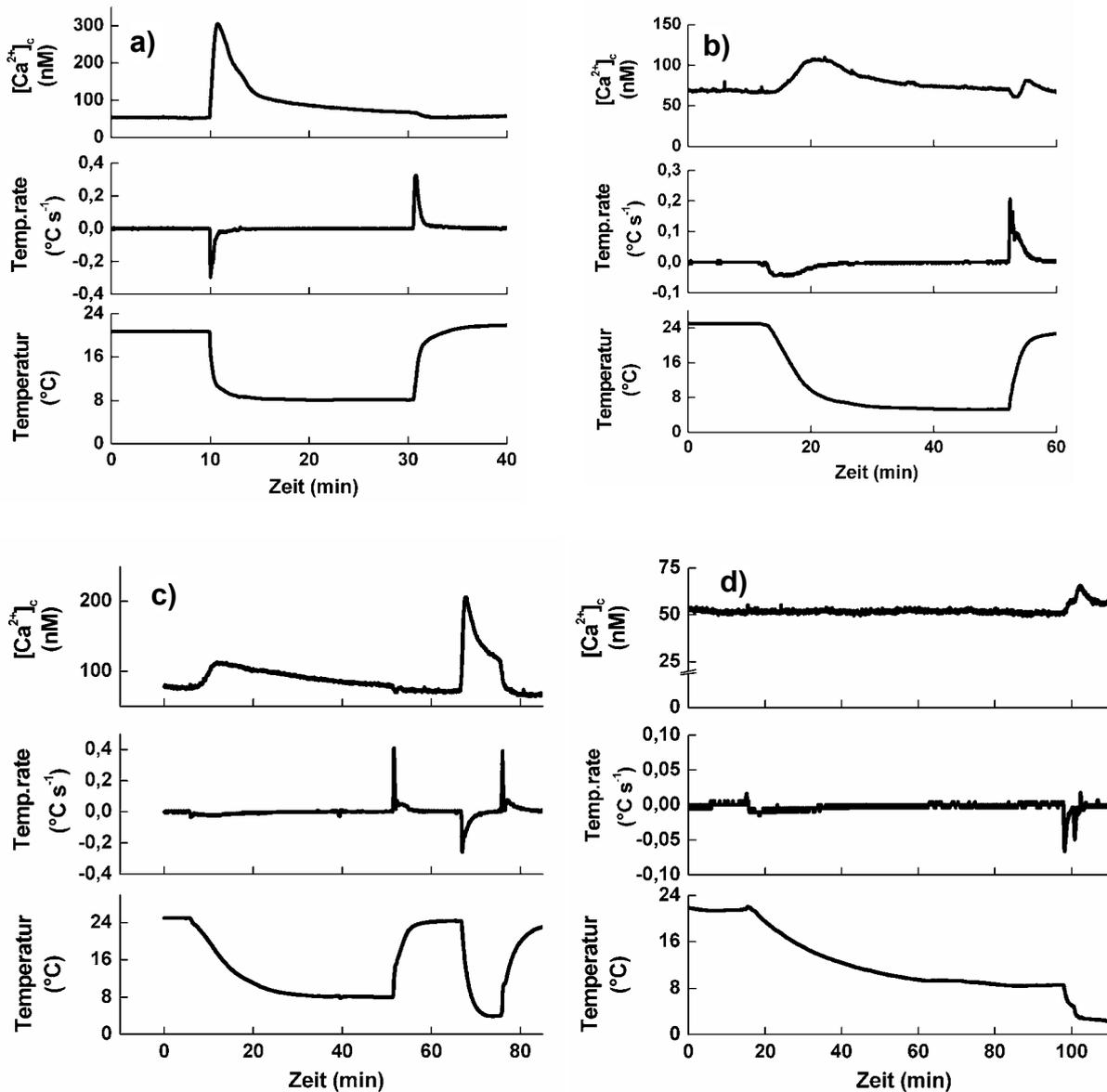


Abb. 4.10 $[Ca^{2+}]_c$ in etioliertem Winterweizenkeimling (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) in Abhängigkeit von Temperatur und Temperaturrate (Temp.rate). **a)** Die $[Ca^{2+}]_c$ steigt zu Beginn des $+8\text{ }^\circ\text{C}$ -Kälteschocks und sinkt im Verlauf der weiteren Kälteexposition. **b)** Vergleichsweise langsame Kühlung ($-0,05\text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ anstatt $-0,29\text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ wie bei a)) führt zu einem langsameren und geringeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$. **c)** Eine zweite Kühlung mit höherer Kühlrate führt zu einem weiteren, höheren Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$. **d)** Bei hoher Temperaturrate ($-0,005\text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$) können $+8\text{ }^\circ\text{C}$ erreicht werden, ohne daß die $[Ca^{2+}]_c$ ansteigt. Die sich anschließende, stufenweise Kühlung auf $+2\text{ }^\circ\text{C}$ mit niedrigerer Temperaturrate führt zu einem korrespondierenden Ansteigen der $[Ca^{2+}]_c$. Darstellung typischer Ergebnisse von 5 bis 10 $[Ca^{2+}]_c$ -Messungen mittels rekombinanter Aequorintechnik.

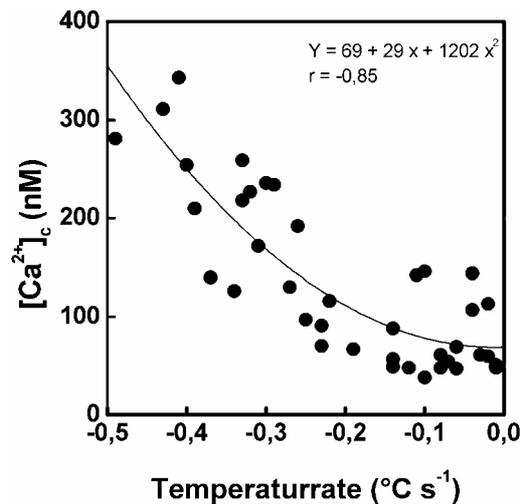


Abb. 4.11 Maximalwerte der kälteinduzierten $[Ca^{2+}]_c$ etiolierter Winterweizenkeimlinge (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) in Abhängigkeit von der Temperaturrate. Die Kühlung begann bei einer Temperatur von 21 °C bis 25 °C, und die Pflanzen waren vor der Messung keinen niedrigeren Temperaturen ausgesetzt. Dargestellt sind die Meßwerte voneinander unabhängiger Versuche sowie die Regressionskurve und der Korrelationskoeffizient für die angegebene polynomische Funktion.

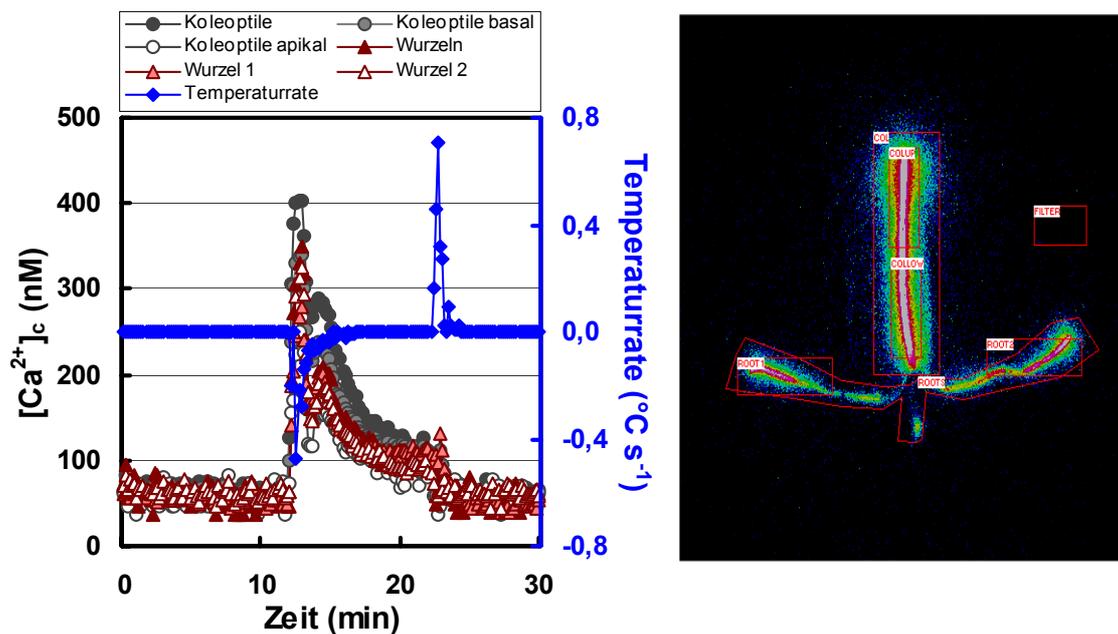


Abb. 4.12 $[Ca^{2+}]_c$ in etioliertem Winterweizenkeimling (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) in Abhängigkeit von der Temperaturrate. **Links:** $[Ca^{2+}]_c$ in verschiedenen Arealen der intakten Pflanze. **Rechts:** Falschfarbenbild des integrierten Lichtes derselben Pflanze (nach Entladung, 3.3.1.3). Die Einrahmungen markieren die für die Messung verwendeten Areale: Col=Koleoptile; ColUp= Koleoptile, apikal; ColLow=Koleoptile, basal; Roots=Wurzeln, Root1,2=Wurzel1,2. $[Ca^{2+}]_c$ -Messung mittels rekombinanter Aequorintechnik und bildverstärkerröhrengekoppelter CCD-Kamera.

Eine weitere Eigenschaft der kälteinduzierten Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ wird in Abb. 4.13 gezeigt. Die Temperatur wurde stufenweise reguliert, mit abnehmender Temperatur, aber annähernd konstanter Temperaturrate. Wie bereits in Abb. 4.10a gezeigt wurde, hing auch in diesem Experiment die Kinetik des $[Ca^{2+}]_c$ -Peaks von der Temperaturrate der jeweiligen Kühlstufe ab. Die Amplitude des $[Ca^{2+}]_c$ -Peaks stieg jedoch im Verlauf der Kühlung mit jeder weiteren Stufe an. Dies deutet auf eine Art von Sensibilisierung der Pflanze gegenüber Kälte hin.

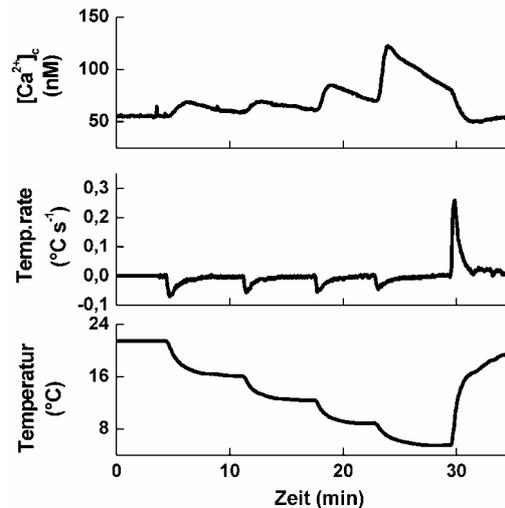


Abb. 4.13 Sensibilisierung: Das stufenweise Kühlen bei annähernd konstanter Temperaturrate ($dT dt^{-1}$) führt zu einem stufenweisen Ansteigen der $[Ca^{2+}]_c$ im etiolierten Winterweizenkeimling (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28). Typisches Ergebnis von 5 $[Ca^{2+}]_c$ -Messungen mittels rekombinanter Aequorintechnik.

Im Gegensatz dazu schienen wiederholte Kälteperioden, im Sinne von sich abwechselnden, repetitiven Kälte- und Wärmephasen (Abb. 4.14a), die Pflanze zu desensibilisieren: Die Amplitude des $[Ca^{2+}]_c$ -Peaks war mit jeder der nachfolgenden Kältephasen geringer. Zu beachten ist, daß die Wärmephasen nur halb so lange andauerten wie die 20-minütigen Kältephasen. Folgt den Kältephasen unmittelbar aufeinander (Abb. 4.14b), sank die Amplitude des $[Ca^{2+}]_c$ -Peaks während der ersten vier Kälteperioden, um dann jeweils konstant zu bleiben. Darüber hinaus ließ sich eine solche Desensibilisierung infolge von Kälteperioden durch eine Refraktärphase reduzieren (Abb. 4.14c): Wurde die desensibilisierte Pflanze 20 min lang einer Temperatur von 22 $^{\circ}C$ ausgesetzt, führte die nachfolgende, weitere Kühlung zu einem $[Ca^{2+}]_c$ -Peak, dessen Amplitude höher war als die des $[Ca^{2+}]_c$ -Peaks während der letzten Kühlung vor der Refraktärphase.

Abb. 4.14d zeigt, wie die durch Kälteperioden induzierte Desensibilisierung durch eine Kühlung mit sinkender Temperatur und sinkender Temperaturrate kompensiert werden konnte. Die Amplitude des $[Ca^{2+}]_c$ -Peaks nahm mit jeder weiteren Kühlung nicht etwa ab (wie bei den in den Abb. 4.14a-c dargestellten Versuchen), sondern sie stieg sogar an.

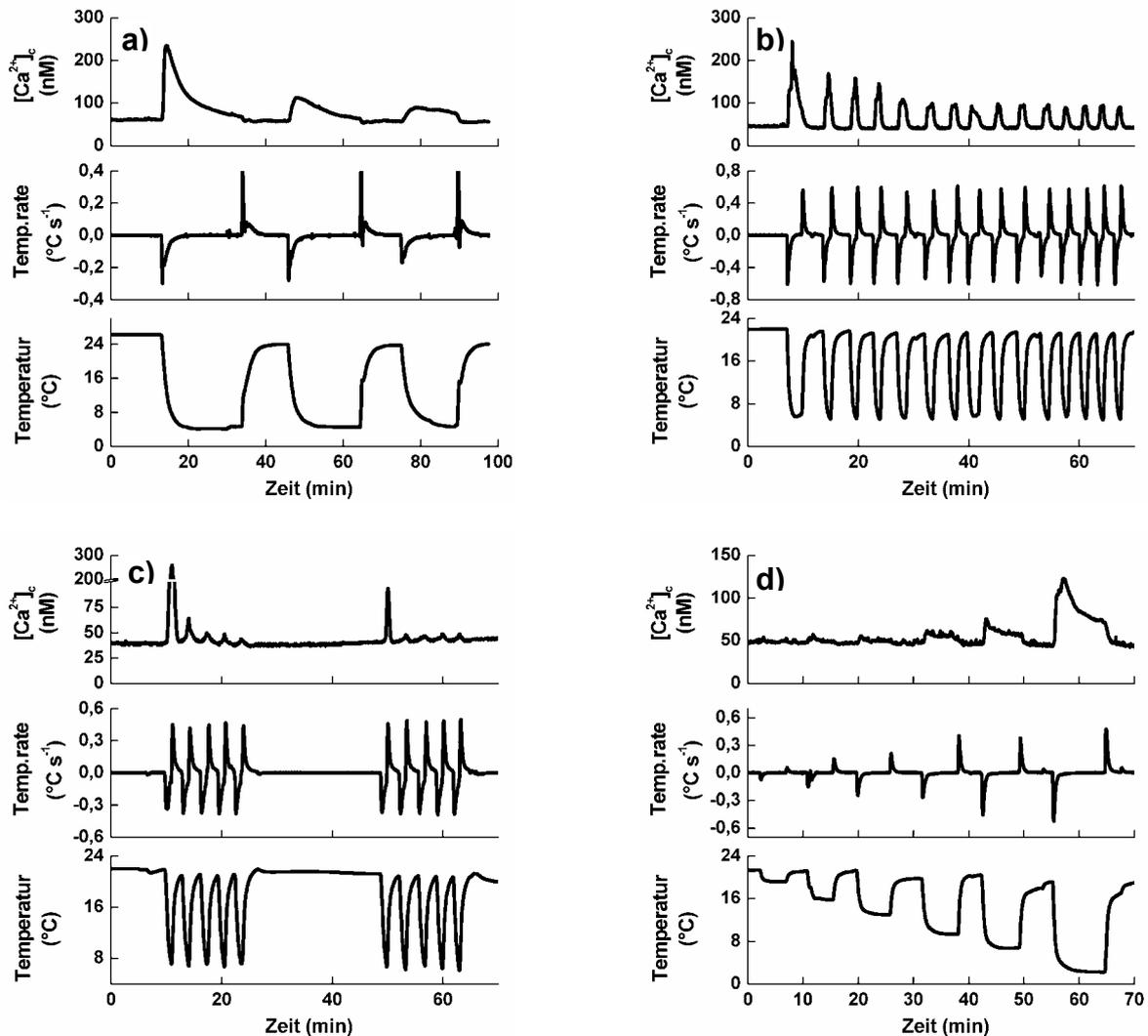


Abb. 4.14 Desensibilisierung: **a)** Bei aufeinanderfolgende Kälteperioden steigt die $[Ca^{2+}]_c$ bei jedem wiederholten Kühlen an, wobei sich die Amplitude des $[Ca^{2+}]_c$ -Peaks verringert. **b)** Nach einer solchen Verringerung der Amplitude bleibt diese konstant. **c)** Eine Refraktärphase verringert, und, **d)** Kühlen mit sinkender Temperatur und sinkender Temperaturrate ($dT dt^{-1}$) kompensiert die durch repetitives Kühlen hervorgerufene Desensibilisierung. Darstellung typischer Ergebnisse von jeweils 5 bis 10 $[Ca^{2+}]_c$ -Messungen mittels rekombinanter Aequorintechnik in etiolierten Winterweizenkeimlingen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28).

4.2.3 Der Einfluß einer Kälteakklimatisation auf kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$

Die kälteinduzierten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ von kälteakklimatisierten, etiolierten Weizenkeimlingen (3.3.2.3) unterschieden sich von denen nicht-akklimatisierter Keimlinge (3.3.2.2) in dreierlei Hinsicht. Zum einen bestand keine signifikante Korrelation zwischen $[Ca^{2+}]_c$ und Temperaturrate (Abb. 4.15). Zum anderen blieb die $[Ca^{2+}]_c$ bei Temperaturraten kleiner als $-0,5 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ unterhalb von 200 nM. Und zum dritten konnte, im Gegensatz zu nichtakklimatisierten Keimlingen, eine biphasische Calciumreaktion auf den Kältestimulus beobachtet werden (Abb. 4.16): Nach dem anfänglichen Ansteigen der $[Ca^{2+}]_c$, das vor Erreichen des Minimalwertes der Temperatur erfolgte und mit dem Verlauf der Temperaturrate korrespondierte (Abb. 4.10a), schloß sich ein zweiter $[Ca^{2+}]_c$ -Peak an. Dieser bildete sich unmittelbar nach Erreichen des „Temperaturminimums“ bei konstant niedriger Temperatur (Temperaturrate = $0 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$), und die $[Ca^{2+}]_c$ fiel höher oder niedriger als die des vorhergehenden, ersten $[Ca^{2+}]_c$ -Anstiegs aus.

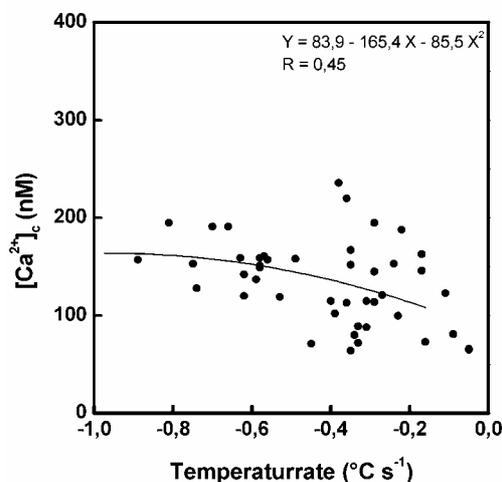


Abb. 4.15 Maximalwerte der kälteinduzierten $[Ca^{2+}]_c$ kälteakklimatisierter, etiolierter Winterweizenkeimlinge (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) in Abhängigkeit von der Temperaturrate. Die Kühlung begann bei einer Temperatur von $21 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Dargestellt sind die Meßwerte voneinander unabhängiger Versuche sowie die Regressionskurve und der Korrelationskoeffizient für die angegebene polynomische Funktion.

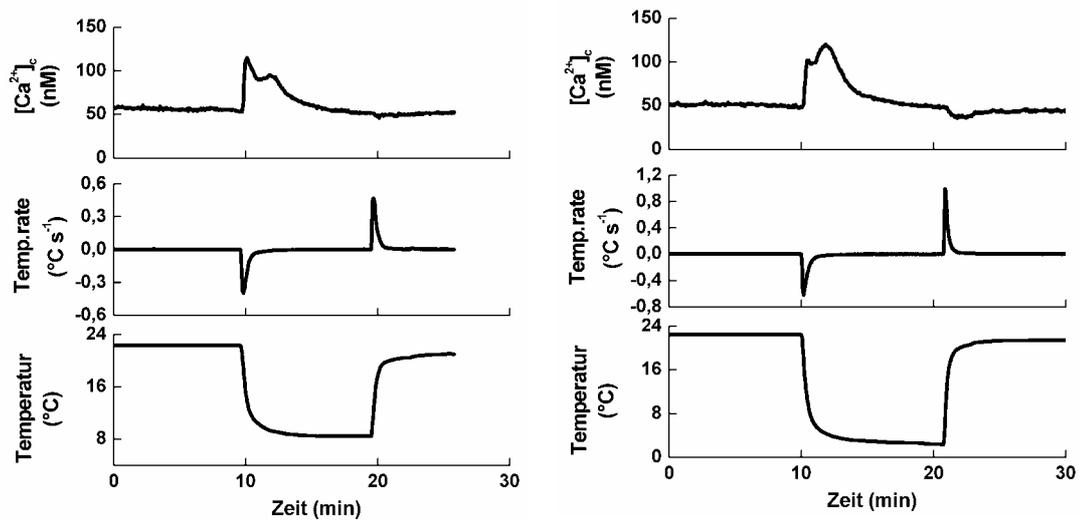


Abb. 4.16 Biphaseische Calciumreaktion kälteakklimatisierter, etiolierter Winterweizenkeimlinge (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) auf einen Kältestimulus. Nach einem ersten, durch das Kühlen ausgelösten Calciumpeak sinkt oder steigt die $[Ca^{2+}]_c$ unmittelbar anschließend bei konstant niedriger Temperatur. Repräsentative Ergebnisse. $[Ca^{2+}]_c$ -Messungen mittels rekombinanter Aequorintechnik.

4.2.4 Die Beteiligung des Cytoskelettes an kälteinduzierten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$

In einem experimentellen Ansatz zur Untersuchung der möglichen Beteiligung des Cytoskelettes an der kälteinduzierten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ (3.3.2.4) wurde Winterweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28, 3.3.2.1) mit dem Aktinfilamenthemmstoff Cytochalasin-D (Endkonzentrationen: 10 und 20 μ M) behandelt. Dies führte weder in etiolierten Keimlingen noch in isolierten Wurzeln zu einer Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ (Abb. 4.17). Der transiente, biphasische Anstieg des arithmetischen Mittels der $[Ca^{2+}]_c$ von Zellen in Suspension (Abb. 4.17) ist statistisch nicht signifikant (U-Test nach Mann-Whitney, $\alpha = 0,01$).

Die Inkubation desselben Pflanzenmaterials mit Cytochalasin-D (10 μ M, 4 h) führte zu keiner Veränderung der Calciumreaktion auf einen Kälteschock (U-Test nach Mann-Whitney, $\alpha = 0,01$). Etiolierte Keimlinge reagierten nach Cytochalasin-D-Inkubation auf einen Kälteschock mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ auf einen Maximalwert von $720 \pm 88,3$ nM, isolierte Wurzeln mit $1562 \pm 239,4$ nM (Bestimmung der $[Ca^{2+}]_c$ unter Verwendung von cp-Coelenterazin) und Zellsuspensionen mit $1238 \pm 89,7$ (Abb. 4.17). Die Applikation von Dimethylsulfoxid (DMSO, 0,1%, Negativkontrolle) hatte weder unmittelbar noch in Hinblick auf den nachfolgenden Kälteschock einen Einfluß auf die $[Ca^{2+}]_c$.

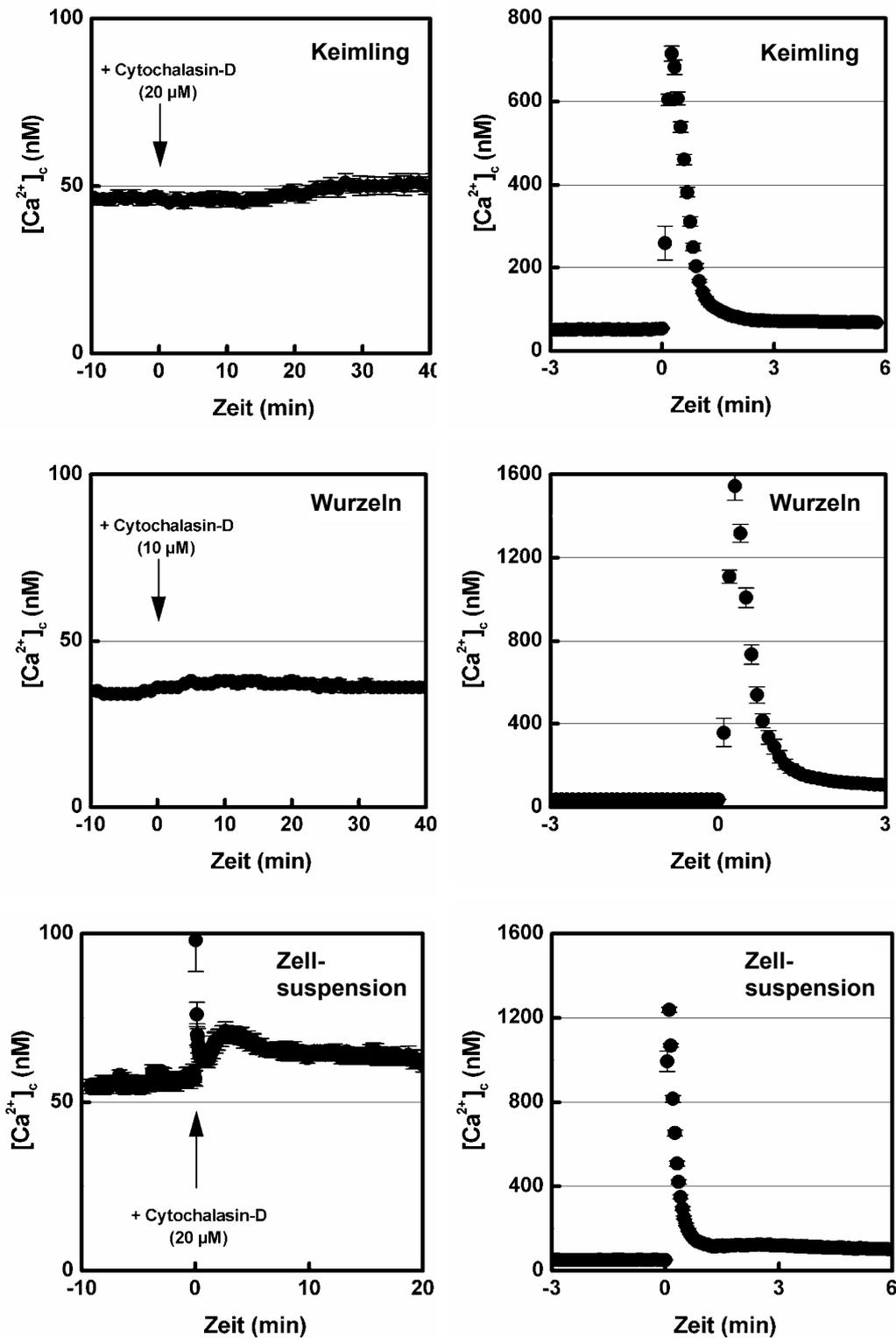


Abb. 4.17 $[Ca^{2+}]_c$ in Winterweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) unter dem Einfluß des Aktinfilamenthemmstoffes Cytochalasin-D. Links: Cytochalasin-D-Applikation (10 μ M und 20 μ M). Rechts: Kälteschock nach Cytochalasin-D-Inkubation (20 μ M, 4 h). Abgebildet sind das arithmetische Mittel und der Standardfehler von 5-10 Meßwerten. Nicht sichtbare Fehlerbalken befinden sich innerhalb der Dimension des jeweiligen Datenpunktes. Messung mittels rekombinanter Aequorintechnik unter Verwendung von Coelenterazin, bei den Wurzeln von cp-Coelenterazin.

Nach der Inkubation von Weizenwurzeln mit Cytochalasin-D ($10 \mu\text{M}$) konnten in den Zellen der Wurzelinitialzone nur noch Aktinfilamentfragmente beobachtet werden (Abb. 4.18).

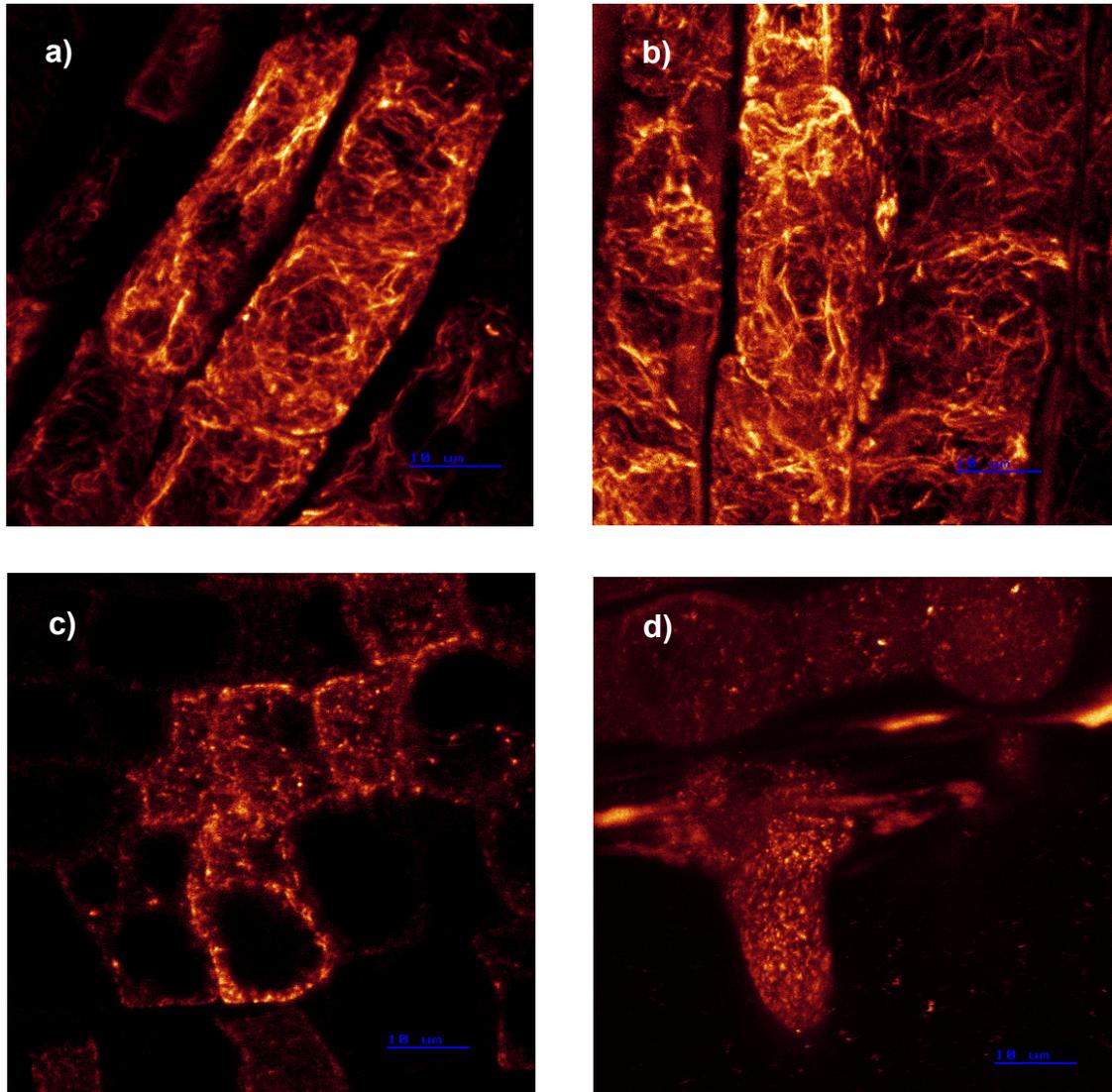


Abb. 4.18 Aktinverteilung in Winterweizenwurzeln (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28). a) Aktinfilamente in Zellen aus der Wurzelinitialzone (unbehandelt, ohne DMSO); b) Aktinfilamente in Zellen aus der Wurzelinitialzone nach 4 h Inkubation mit 0,1 % DMSO (Kontrolle); c) Aktinverteilung in Zellen aus der Wurzelinitialzone nach 4 h Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Cytochalasin-D; d) Rhizodermiszellen und Wurzelhaar nach 4 h Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Cytochalasin-D. Visualisierung mittels Rhodamin-Phalloidin-Färbung und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.

4.2.5 Hitzeinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$

Wurden etiolierte Winterweizenkeimlinge (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) abwechselnd Hitze und Kälte ausgesetzt (3.3.2.5), nahm deren Lumineszenzintensität sowohl während der Kälte- als auch während der Hitzeexposition zu. Die Berechnung der $[Ca^{2+}]_c$ ergab ähnliche Maximalwerte für den hitze- wie für den kälteinduzierten Anstieg (250 nM, Abb. 4.19). Das Erhitzen von Aequorin (Molecular Probes, Niederlande) in 100 nM Calciumionenpuffer (3.3.2.5) *in vitro* führte ebenfalls zu einem Ansteigen der Lumineszenzintensität (Abb. 4.20a) bzw. der errechneten Calciumionenkonzentration (Abb. 4.20b) auf einen Maximalwert von 250 nM. Die hitzeinduzierte Zunahme der Lumineszenzintensität in den Keimlingen korrespondierte damit mit der erhöhten Lichtfreisetzung des Aequorins. Die transiente Zunahme der Lumineszenzintensität in den Keimlingen unmittelbar nach dem Kühlen von +40 °C auf +22 °C hingegen repräsentierte einen tatsächlichen Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$.

Die Temperaturabhängigkeit des Aequorins - höhere Lumineszenzintensität bei höheren Temperaturen - bestand auch im Temperaturbereich von +2 °C bis +22 °C und war um Zehnerpotenzen geringer (Abb. 4.20). Kälteinduzierte Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_c$ sind somit keine *bona fide*-Interpretationen, sondern tatsächlich existent.

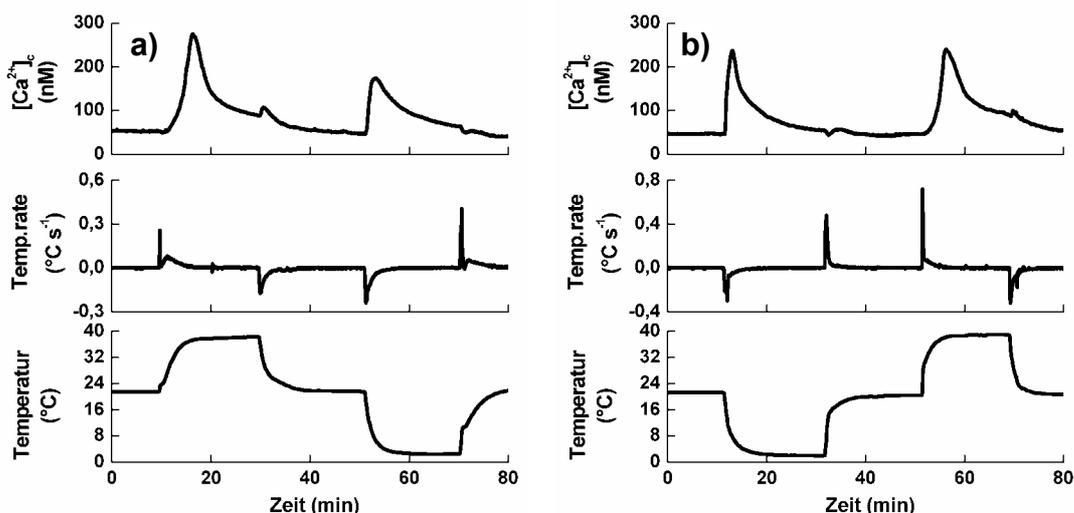


Abb. 4.19 Errechnete $[Ca^{2+}]_c$ in etiolierem Winterweizenkeimling (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) in Abhängigkeit von Temperatur und Temperaturrate. **a)** Sequentielles Erhitzen und Kühlen; **b)** sequentielles Kühlen und Erhitzen. Repräsentative Ergebnisse. Messungen mittels rekombinanter Aequorintechnik.

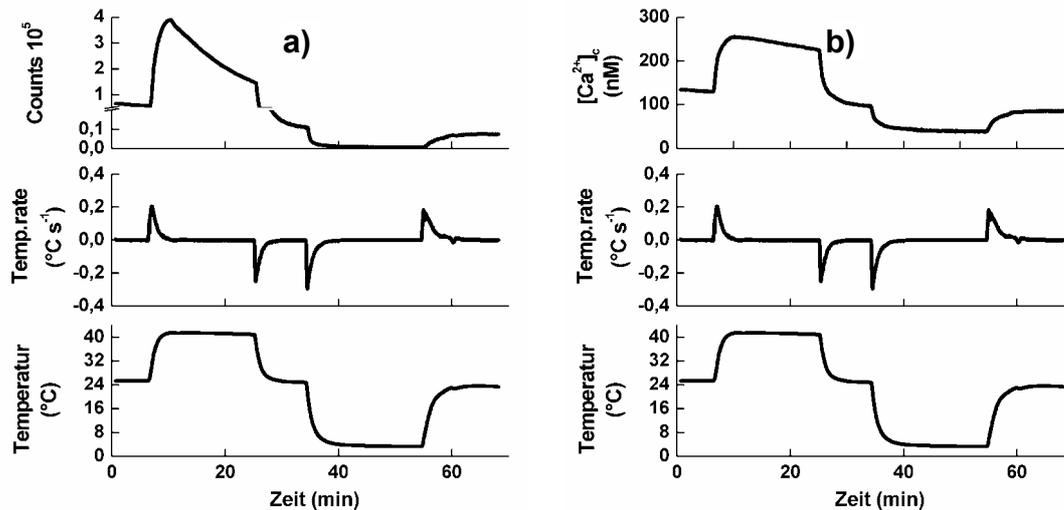


Abb. 4.20 a) Lumineszenzintensität von rekombinantem Aequorin; b) errechnete Calciumionenkonzentration von 100 nM Calciumionenpuffer (3.3.2.5) im Verlauf sequentiellen Erhitzens und Kühlens.

4.3 Der Einfluß von Phytohormonen auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizen

4.3.1 Abscisinsäure

Dem in 3.3.3 beschriebenen Versuchsaufbau entsprechend wurden etiolierte Keimlinge, ergrünte Keimlinge und isolierte, grüne Blätter mit 100 μ M ABA behandelt. Die ABA-Applikation führte zu keinen meßbaren Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ (Abb. 4.21). Zur Kontrolle wurde am Ende des jeweiligen Experimentes das Pflanzenmaterial einem Kälteschock ausgesetzt, der jedes Mal zu einem Ansteigen der $[Ca^{2+}]_c$ führte (nicht dargestellt)

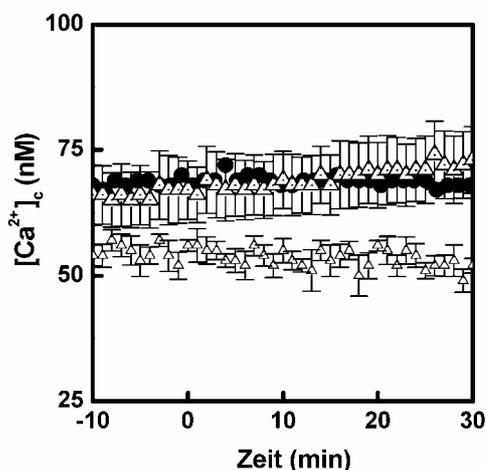


Abb. 4.21 $[Ca^{2+}]_c$ von Winterweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) unter dem Einfluß von 100 μ M ABA (Applikation bei 0 min). Kreise symbolisieren etiolierte Keimlinge, punktierte Dreiecke grüne Keimlinge und kleine Dreiecke isolierte, grüne Blätter. Abgebildet sind das arithmetische Mittel und der Standardfehler der Meßwerte (n = 10). Messung mittels rekombinanter Aequorintechnik.

4.3.2 Auxininduziertes Streckungswachstum

Die Applikation von 10 μM Indolelessigsäure (IAA) zu isolierten Weizenkoleoptilsegmenten (3.3.4) führte zu einer deutlichen Wachstumsreaktion, aber keiner meßbaren Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Nach der Isolierung der Koleoptilsegmente sank die Wachstumsrate zunächst auf $0 \mu\text{m cm}^{-1} \text{s}^{-1}$. Etwa 10 min nach IAA-Applikation stieg sie an, um dann zu sinken und wieder anzusteigen (Abb. 4.22). Die maximale Wachstumsrate betrug nach IAA-Zugabe $0,42 \pm 0,065 \mu\text{m cm}^{-1} \text{s}^{-1}$ und nach Applikation von Pufferlösung (Negativkontrolle) $0,003 \pm 0,0013 \mu\text{m cm}^{-1} \text{s}^{-1}$. Innerhalb von 90 min wuchs die Koleoptilsäule um $0,02 \pm 0,021 \text{ mm cm}^{-1}$ bei der Negativkontrolle und um $1,3 \text{ mm cm}^{-1}$ nach IAA-Zugabe.

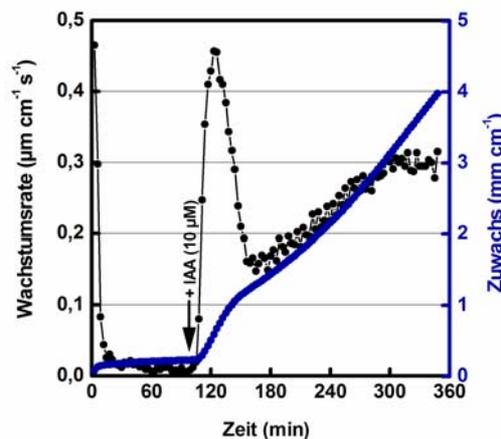


Abb. 4.22 Wachstum isolierter Koleoptilsegmente von Winterweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) nach Inkubation mit Colenterazin und Applikation von Indolelessigsäure (10 μM). Darstellung eines repräsentativen Meßergebnisses.

Der Mittelwert der $[\text{Ca}^{2+}]_c$ steigt nach IAA-Applikation kontinuierlich an (Abb. 4.23). Tatsächlich besteht zwischen der $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mit einem Wert von $33 \pm 5,9 \text{ nM}$ zum Zeitpunkt der IAA-Applikation und von $40 \pm 7,4 \text{ nM}$ 40 min nach der IAA-Applikation kein signifikanter Unterschied (U-Test nach Mann-Whitney, $\alpha = 0,01$). Darüber hinaus verläuft die Kurve der Negativkontrolle nahezu parallel. Die IAA-Applikation führte auch in Segmenten von Koleoptilen, deren Kutikulapermeabilität durch Siliziumcarbidbehandlung erhöht wurde (3.3.4.1), zu keiner Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Zur Kontrolle wurde am Ende des jeweiligen Experimentes das Pflanzenmaterial einem Kälteschock ausgesetzt, der jedes Mal zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ führte (nicht dargestellt).

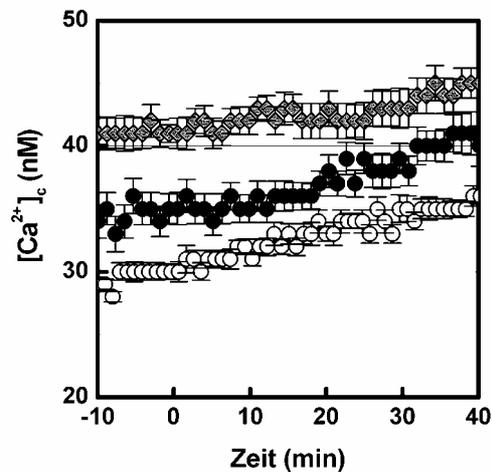


Abb. 4.23 $[Ca^{2+}]_c$ isolierter Koleoptilsegmente von Winterweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida, Linie 28) unter dem Einfluß von Indoleessigsäure (IAA, 10 μ M, Applikation bei 0 min). Ausgefüllte Kreise symbolisieren IAA-behandelte Koleoptilen, leere Kreise IAA-unbehandelte Koleoptilen (Kontrolle) und Rauten Koleoptilen, deren Kutikula vor der IAA-Applikation mit Siliziumcarbid aufgeraut wurden. Abgebildet sind das arithmetische Mittel und der Standardfehler der Meßwerte (N = 6-12). Messung mittels rekombinanter Aequorintechnik unter Verwendung von cp-Coelenterazin.

5 Diskussion

5.1 Erzeugung und Analyse transgener Weizenpflanzen

Die dargestellten Daten zeigen, daß Messungen der cytosolischen, freien Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_c$) mittels rekombinanten Apoaequorins in Sommer- und Winterweizen und damit - zumindest nach gegenwärtigem Kenntnisstand - zum ersten Mal in einer monokotyledonen Pflanze möglich sind.

Die regenerierten Weizenlinien (mit konstitutivem Promotor in pUbiAeq, 2.2) sind, wie bis zur F4-Generation nachgewiesen wurde, stabil transgen und ermöglichen aufgrund der gewebeunspezifischen Apoaequorinexpression $[Ca^{2+}]_c$ -Messungen in unterschiedlichen Pflanzenteilen, wie Wurzeln, Blättern und Koleoptilen (Abb. 4.3). Erhöhungen der Lumineszenzintensität *in vivo* konnten darüber hinaus mit einer zeitlichen Auflösung von 0,02 Sekunden als Echtzeitvideo bildlich dargestellt (Abb. 4.6 und Abb. 4.9) und mit bloßem Auge wahrgenommen werden.

Transformationseffizienz

Von 18000 beschossenen Embryonen konnten 54 selektionspositive und 13 Apoaequorin exprimierende Pflanzen regeneriert werden (4.1). Das ergibt eine vergleichsweise niedrige Transformationseffizienz von 0,3 Prozent; die für die biolistische Transformation von Weizen publizierten Werte liegen sonst bei etwa 1 Prozent (Becker et al., 1994; Altpeter et al., 1996; Takumi und Shimada, 1996; Iser et al., 1999).

Die Häufigkeitsverteilung der Basentriplets („codon bias“, Kurland, 1991) der verwendeten Apoaequorin-cDNA (Prasher et al., 1987) ist der des Weizengenoms (Wada et al., 1992) ähnlich, wodurch im Wirtsorganismus genügend aminoacylierte tRNAs für die Translation des Transkripts zur Verfügung gestanden haben sollten. Tatsächlich bestätigten die Ergebnisse die Expression des Apoaequorins (4.1).

Die selektionspositiven Regenerate (3.1.2.4) wurden in Hinblick auf die mögliche Apoaequorinexpression analysiert (3.2.3.1). Der Nachweis der Integration der *Apoaequorin*-cDNA in das Weizengenom erfolgte ausschließlich bei Regeneraten, die sich zuvor auf diese Weise als Apoaequorin exprimierend erwiesen hatten.

Dadurch können Silencingphänomene (Kooter et al., 1999) als Ursache für die niedrige Transformationseffizienz nicht ausgeschlossen werden.

Als weitere Ursache könnte eine Negativselektion während der *in vitro*-Kulturphase durch das Apoaequorinprotein selbst erwogen werden: Bei hoher Apoaequorinkonzentration würden so viele Calciumionen gebunden werden, daß dies für die Zelle letal wäre. Mit 13 Apoaequorin exprimierenden Pflanzen von 54 selektionspositiven Regeneraten beträgt die Kotransformationsrate von Apoaequorinen und Selektionsmarker 24 Prozent und ist damit vergleichsweise niedrig; diese beträgt bei der biolistischen Transformation von Weizen sonst typischerweise 75 Prozent (D. Becker, Universität Hamburg, persönliche Mitteilung). Eine solche niedrigere Kotransformationsrate wäre bei der beschriebenen Negativselektion zu erwarten.

In Anbetracht einer *in vivo* Calciumpufferkapazität von 5 mM bis 50 mM (Plieth et al, 1997; Plieth und Hansen, 1998) müßte der Apoaequorinanteil an den löslichen Gesamtproteinen ungefähr 6 bis 60 % betragen, um die $[Ca^{2+}]_c$ zu verringern (basierend auf einer standardisierten, $5 \times 5 \times 15 \mu\text{M}$ großen Zelle mit 10 % Cytosol, dem gemessenen Proteinanteil von $6 \mu\text{g}$ Gesamtprotein pro 1 mg Frischgewicht einer Dissoziationskonstante für Calcium-Aequorin von $1 \mu\text{M}$ und einer Calciumpufferkapazität von 5 mM). Die Expressionsstärke von Promotoren wird oft anhand der Aktivität des unter der Kontrolle des jeweiligen Promotors exprimierten Enzyms β -Glucuronidase verglichen (GUS-Assay; Holtorf et al., 1995), quantitative Angaben zu exprimierten Proteinmengen sind dagegen selten. Schenk et al. (2001) beschreiben für die Expression mittels Ubiquitinpromotor einen „Green Fluorescent Protein“-Anteil an den löslichen Gesamtproteinen von Zuckerrohrblättern von 0,34 % - eine Angabe, die wegen des in unterschiedlichen Wirtsorganismen unterschiedlichen Codongebrauchs („codon usage“, Kooter et al., 1999) jedoch nicht auf Weizen übertragen werden kann.

Die Negativselektion durch Calciumionenbindung während der *in vitro*-Kulturphase ist damit nicht auszuschließen, jedoch unwahrscheinlich, wenn die *in vivo* Calciumpufferkapazität einen Wert von 50 mM aufweist (Plieth et al, 1997; Plieth und Hansen, 1998).

Apoaequorinkonzentration im transgenen Weizen

In den transgenen Linien betrug der Apoaequorinanteil am Gesamtprotein nur 0,07 % (errechnet anhand des gemessenen Apoaequoringehaltes von 0,3 ng / 1 µg Gesamtprotein; 4.1), was einer Apoaequorinkonzentration von ungefähr 14 nM entspricht. Diese im Vergleich zur genannten Calciumpufferkapazität geringe Apoaequorinkonzentration erklärt, warum trotz Calciumionenbindung an die Aequorinmoleküle die $[Ca^{2+}]_c$ mittels rekombinanter Aequorintechnik akkurat bestimmt werden kann.

Die „absolute Lumineszenz“, das Verhältnis zwischen Luminometercounts per Integrationsintervall und sämtlichen verfügbaren Counts (3.3.1.3), unterschritt in unstimulierten Pflanzen mit einer $[Ca^{2+}]_c$ von 100 nM den Wert von 2×10^{-5} (bei einem 3 s-Integrationsintervall, Daten nicht gezeigt). Somit wären - bei gleichbleibender Ca^{2+} -Grundkonzentration - mehr als 500 Integrationsperioden erforderlich, um 1 % des verfügbaren Aequorins zu entladen. Dies bedeutet, daß die $[Ca^{2+}]_c$ -Messungen auch einige Stunden nach der Aequorinrekonstitution (3.3.1.1) durchgeführt werden können.

5.2 Der Einfluß der Temperatur auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizen

5.2.1 Die Wirkung schneller Temperaturabsenkung (Kälteschock) auf die $[Ca^{2+}]_c$

Kälteschockinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ in monokotyledonen Pflanzen wurden - zumindest nach gegenwärtigem Kenntnisstand - bislang nur in Reiskeimlingen mittels Calciumisotopen- (^{45}Ca ; DeNisi und Zocchi, 1996) und Fluoreszenzfarbstoffmessungen (Fluo-3, 1.3; Kitigawa und Yoshizaki, 1998) nachgewiesen. Der beobachtete Calciumioneneinstrom in die Zelle wurde in beiden genannten Studien in Form von relativen Werten angegeben. Mit Hilfe des Apoaequorin exprimierenden Weizens ist es nun möglich geworden, Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ zu quantifizieren.

Korrelation zwischen $[Ca^{2+}]_c$ und Umgebungstemperatur

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (4.2.1) zeigen deutlich, daß die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizenkeimlingen von der Umgebungstemperatur abhängt (Abb. 4.7, lineare Korrelation zwischen Temperatur des Kälteschocks und Maximalwert der $[Ca^{2+}]_c$).

Außerdem bestimmt die Art des Kälteschocks die Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ mit: Während die Applikation von +2 °C-kaltem Wasser zu etiolierten Winterweizenkeimlingen die $[Ca^{2+}]_c$ auf einen Wert von beinahe 1600 nM ansteigen ließ (Abb. 4.4), führte der Austausch des Umgebungspuffers perfundierter Keimlinge mit +2 °C-kaltem Wasser zu $[Ca^{2+}]_c$ -Werten um die 600 nM (Abb. 4.8). Der Unterschied zwischen den beiden beschriebenen Experimenten besteht in der Stärke des mechanischen Stimulus während der Kälteschockbehandlung, der im ersten Experiment (Abb. 4.4) höher war und - wie Kontrollexperimente zeigten (Abb. 4.5) - allein zu einem Ansteigen der $[Ca^{2+}]_c$ auf einen Wert von beinahe 600 nM führte. In Mesophyllprotoplasten von *Nicotiana* wurde ein mechanisch induzierter Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ auf 10 μ M nachgewiesen (Haley et al., 1995). Ding und Pickard (1993) beschreiben, daß, umgekehrt, auch die Temperatur die Aktivität mechanosensitiver Kanäle beeinflussen kann.

Der Vergleich der in dieser Arbeit für Weizenkeimlinge beschriebenen, kälteschockinduzierten $[Ca^{2+}]_c$ mit für *Arabidopsis* angegebenen Werten (Kiegle et al., 2000) zeigt eine Gemeinsamkeit und einen Unterschied in der Calciumreaktion: Die Maximalwerte der $[Ca^{2+}]_c$ (1600 nM) sind in den konstitutiv Apoaequorin exprimierenden Keimlingen beider Spezies gleich, die Calciumreaktion klingt in Weizen aber eher ab (Minimalwert der $[Ca^{2+}]_c$ in Weizen nach 3 min und in *Arabidopsis* nach 80 min). Die Ergebnisse dieser Experimente lassen sich jedoch nur bedingt miteinander vergleichen, wie die unterschiedlichen Maximalwerte der $[Ca^{2+}]_c$ in Weizenkeimlingen zeigen (siehe oben).

Gewebespezifische Calciumreaktion

Die Calciumreaktion auf einen Kälteschock war bei etiolierten Weizenkeimlingen und deren Koleoptilen und Wurzeln, bei grünen Weizenkeimlingen und deren Blättern sowie bei Zellen in Suspensionskultur gleich ($[Ca^{2+}]_c$ -Maximalwert: 600 nM, Abb. 4.8) In Aleurongewebe hingegen wurde nur eine $[Ca^{2+}]_c$ von 300 nM erreicht, und die $[Ca^{2+}]_c$ war 3 min nach dem Kälteschock mit 160 nM doppelt so hoch wie in den anderen Pflanzenmaterialien (4.2.1, Abb. 4.8). Wenn es sich auch beim Aleurongewebe - dem Namen entsprechend - um ein Gewebe und bei den anderen Pflanzenmaterialien entweder um Zellen, Organe oder Pflanzenteile handelt, so läßt der Unterschied in der $[Ca^{2+}]_c$ -Kinetik doch eine gewebespezifische Calciumreaktion auf den Kälteschock erkennen.

Einzelne Zellen müssen mit einem vergleichsweise höheren Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ reagiert haben, um die $[Ca^{2+}]_c$ insgesamt zu erhöhen.

Eine gewebespezifische Calciumreaktion konnte auch in Wurzeln von *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Kiegle et al., 2000).

5.2.2 Die Wirkung langsamer Temperaturabsenkung auf die $[Ca^{2+}]_c$

Bei dem in Abb. 4.10a dargestellten Temperaturverlauf handelt es sich insofern um einen Kälteschock, als die Temperatur um mehrere Grad Celsius pro Sekunde gesenkt wurde. Im Gegensatz zu den in den Abb. 4.4 und 4.8 dargestellten Messungen erfolgte dieser Kälteschock jedoch ohne zusätzlichen mechanischen Stimulus. Das Ergebnis ist eine differierende, charakteristische Kinetik der Calciumreaktion, bei der die $[Ca^{2+}]_c$ nach einem anfänglichen, transienten Anstieg während der gesamten Kühlperiode (20 min) erhöht blieb. Dies relativiert die in Hinblick auf das Sinken der $[Ca^{2+}]_c$ nach dem Kälteschock beschriebenen Unterschiede zwischen Weizen und *Arabidopsis* (7.2.1); diese könnten auf einer unterschiedlich langen Kälteexposition basieren.

Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]_c$ von Temperatur und Temperaturrate

Aus der Abb. 4.10 ist ersichtlich, daß nicht nur ein Kälteschock, sondern auch das langsame Kühlen ein Ansteigen der $[Ca^{2+}]_c$ verursachte. Kälteinduzierte Calciumantworten waren, wie die Abb. 4.11 und die multiple Regressionsanalyse (4.2.2) zeigen, hauptsächlich von der Änderung der Temperatur über die Zeit, in diesem Fall der Kühlrate, und weniger vom Betrag der Temperatur abhängig. In Weizenkeimlingen stieg die $[Ca^{2+}]_c$ durch Kühlen mit einer Temperaturrate von weniger als $-0,005 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ an (die Kühlrate mußte höher als $+0,005 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ sein). Dies bedeutet, daß die Temperatur um mehr als $18 \text{ }^\circ\text{C}$ pro Stunde sinken muß, um eine Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ zu bewirken – ein *in natura* seltenes Ereignis.

Abb. 4.13 und 4.14 zeigen, wie das Zusammenwirken von Temperatur und Temperaturrate zur Sensibilisierung und Desensibilisierung der Pflanzen gegenüber Kälte beiträgt. Dieses Phänomen der Sensibilisierung und Desensibilisierung wurde ebenfalls in *Arabidopsis* beobachtet (Plieth et al., 1999).

Es läßt sich damit erklären, daß die Aktivität einwärtsgerichteter Calciumkanäle von der Kühlrate abhängig und von der Temperatur unabhängig, und diejenige auswärtsgerichteter Calciumpumpen von der Kühlrate unabhängig und von der Temperatur abhängig ist (Plieth, 1999).

Die Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]_c$ von der Temperaturrate wurde von Minorsky (Minorsky, 1989) postuliert und von Plieth et al. (1999) für *Arabidopsis* beschrieben. Sie weist darauf hin, daß sich aus der Calciumabhängigkeit einer kälteschockinduzierten Genexpression, wie sie für die *cas*-Gene in *Medicago* (Monroy und Dhindsa, 1995) oder die *TCH*-Gene in *Arabidopsis* (Polisensky und Braam, 1996) beschrieben wurde, weder auf die Bedeutung von Calcium für die Kältesignaltransduktion noch auf die Notwendigkeit der Expression der entsprechenden Gene für die Kälteakklimatisation schließen läßt.

Homogenität der Kältesensitivität

Abb. 4.12 zeigt, daß die $[Ca^{2+}]_c$ in Wurzeln und Koleoptilen von Weizenkeimlingen durch Kälte gleich schnell ansteigt, was auf die gleiche Sensitivität von Weizenwurzeln und -koleoptilen gegenüber Kälte hinweist. Campbell et al. (1996) postulieren dagegen einen Sensitivitätsunterschied für die Wurzeln und Blätter von *Nicotiana*-Pflanzen.

5.2.3 Der Einfluß einer Kälteakklimatisation auf kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$

Arbeiten von Puhakainen et al. (1999) an Reis und von Jian et al. (1999) an Weizen weisen darauf hin, daß Kälte die Aktivität der Calcium-ATPase in kälteakklimatisierten Pflanzen weniger verringert als in nichtakklimatisierten. Basierend auf dem Modell von Plieth (1999; 5.2.2) könnten demzufolge die über Calciumkanäle eingeströmten Calciumionen nach erfolgter Kälteakklimatisation schneller zurück in den Apoplasten gepumpt werden, und eine kürzer andauernde Erhöhung der $[Ca^{2+}]_c$ wäre zu vermuten.

Dies war nach einem Kältestimulus jedoch nicht der Fall (Abb. 4.16 im Vergleich mit Abb. 4.10a). Die $[Ca^{2+}]_c$ akklimatisierter Weizenkeimlinge stieg - ohne eine weitere Senkung der Temperaturrate - nach dem ersten Maximum vielmehr ein zweites Mal an. Der zweite $[Ca^{2+}]_c$ -Peak fiel dabei entweder niedriger oder höher aus als der erste.

Eine derartige biphasische Reaktion wird auch für *Arabidopsis* beschrieben (Plieth et al., 1999; Knight und Knight, 2000). Knight und Knight (2000) folgern auf der Basis von Experimenten an *Arabidopsis*-Pflanzen mit einer Apoaequorin-expression im Bereich des Tonoplasten (Knight et al., 1996) unter Verwendung von Calciuminhibitoren, daß der zweite $[Ca^{2+}]_c$ -Peak eine vakuoläre Calciumionenfreisetzung repräsentieren und eine Kälteakklimatisation zu einer Erhöhung derselben führen würde. Für Weizen würde dies bedeuten, daß die kälteinduzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_c$ in nichtakklimatisierten Weizenkeimlingen ohne oder mit geringer Beteiligung einer Calciumionenfreisetzung aus der Vakuole, in kälteakklimatisierten Keimlingen hingegen mit einer solchen Beteiligung zustande käme - eine Erwägung spekulativer Natur. Gleichwohl unterstützen die biphasische Kinetik (Abb. 4.16) und die bei niedrigen Temperaturraten ($-0,8 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$) vergleichsweise niedrige $[Ca^{2+}]_c$ (200 nM, 4.2.3, Abb. 4.15) die Schlußfolgerung des Einflusses einer Kälteakklimatisation auf kälteinduzierte Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ in Winterweizen.

5.2.4 Der Einfluß des Cytoskelettes auf kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$

Die Applikation des Aktinfilamenthemmstoffes Cytochalasin-D veränderte die $[Ca^{2+}]_c$ weder in etiolierten Winterweizenkeimlingen und deren isolierten Wurzeln, noch in Weizenzellsuspensionen (Abb. 4.17). Die Inkubation von Weizenkeimlingen mit Cytochalasin-D hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die nachfolgende, kälteschockinduzierte Calciumreaktion (Abb. 4.17). Die Wirksamkeit des Cytochalasin-D wurde anhand der Fragmentierung von Aktinfilamenten in Zellen der Wurzelinitialzone kontrolliert und bestätigt (Abb. 4.18).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Aktivität von Calciumkanälen in Weizen von Aktinfilamenten unbeeinflusst reguliert wird. Kälteschockinduzierte Calciumreaktionen erfolgen danach ebenfalls unabhängig von Aktinfilamenten.

Die Ergebnisse widersprechen damit den in 1.2 dargestellten experimentellen Befunden von Mazars et al. (1997) und Örvar et al. (2000). Mazars et al. (1997) beschreiben eine Erhöhung der kälteinduzierten $[Ca^{2+}]_c$ nach Inkubation mit Cytochalasin-D in Protoplasten von *Nicotiana* und Örvar et al. (2000) eine entsprechende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_c$ in Protoplasten von *Medicago*. Dieser Widerspruch in den Ergebnissen könnte jedoch auch darauf zurückzuführen sein, daß zum einen mit Protoplasten und - in dieser Arbeit - zum anderen mit intakten Zellen und *in toto* gearbeitet wurde. Akashi et al. (1990) beschreiben, daß die kortikalen Mikrotubuli von Protoplasten von *Nicotiana* durch Kälte depolymerisiert werden, und daß diese Depolymerisation in Anwesenheit der Zellwandkomponenten Extensin oder Poly-L-Lysin sowie nach Beginn der Zellwandbildung unterbleibt. Die physiologische Funktion der Aktinfilamente und des übrigen Cytoskelettes in Hinblick auf die Interaktion mit Kälte und $[Ca^{2+}]_c$ bedarf somit noch eingehender Prüfung.

5.2.5 Hitzeinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$

Die in 4.2.5 dargestellten Ergebnisse weisen die Temperaturabhängigkeit der Lumineszenzintensität des Aequorins nach, durch welche hitzeexponierte Weizenkeimlinge ohne einen tatsächlichen Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ stärker lumineszierten (Abb. 4.19 und Abb. 4.20). Hitze veränderte die $[Ca^{2+}]_c$ somit nicht. Das Senken der Temperatur von +40 °C auf etwa +20 °C führte jedoch zu einem transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$. Dieser Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ korrespondierte mit einer negativen Temperaturrate und bestätigt damit die zuvor diskutierte (5.2.2) Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]_c$ von der Temperaturrate.

Gong et al. (1998) inkubierten Apoaequorin exprimierende *Nicotiana*-Keimlinge bei Hitze, maßen anschließend eine erhöhte $[Ca^{2+}]_c$ und interpretierten diese als hitzeinduziert. Wie die oben dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, könnte der $[Ca^{2+}]_c$ -Anstieg in *Nicotiana* jedoch ebenfalls durch die Temperaturabsenkung zustande gekommen sein.

Larkindale und Knight (2002) fanden in *Arabidopsis* einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ ebenfalls nicht zu Beginn oder während, sondern ausschließlich nach der Hitzeexposition.

Unabhängig davon weisen Untersuchungen, bei denen Calciumantagonisten verwendet wurden (Gong et al., 1998; Trofimova et al., 1999; Larkindale und Knight, 2002), auf die mögliche Beteiligung intrazellulären Calciums an der Entstehung von Hitzetoleranz hin.

5.3 Der Einfluß von Phytohormonen auf die $[Ca^{2+}]_c$ von Weizen

5.3.1 Abscisinsäure

Die $[Ca^{2+}]_c$ von etiolierten Weizenkeimlingen, ergrünten Weizenkeimlingen und isolierten, grünen Weizenblättern blieb nach ABA-Applikation (10 μ M) unverändert. ABA-induzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ wurden bislang überwiegend in Schließzellen beobachtet (1.2). Gehring et al. (1990) beschreiben eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_c$ durch ABA in Maiskoleoptilen, die mit dem nichtratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 (1.3) gemessen wurde.

Streßinduzierte und kälteinduzierte Erhöhungen des endogenen ABA-Gehaltes werden gewöhnlich in ganzen Blättern oder Blattsegmenten gemessen (Cowan et al., 1997). Eine Untersuchung von Daeter und Hartung (1995) dagegen weist ABA in verschiedenen Geweben von *Hordeum*-Blättern nach und beschreibt die ABA-Akkumulation in der Epidermis und im Mesophyll gestreißter Blätter. Wenn die kälte- und ABA-induzierte Steigerung der Frosttoleranz (Abromeit und Dörffling, 1994) calciumabhängig wäre, würde dies somit eine Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ in mehreren Zellen verschiedener Blattgewebe vermuten lassen, und die Möglichkeit der Detektion einer derartigen Veränderung mittels rekombinanter Aequorintechnik wäre gegeben. Die in dieser Arbeit beschriebene, ausbleibende Änderung der Lumineszenzintensität würde damit einer konstanten $[Ca^{2+}]_c$ nach ABA-Applikation entsprechen. Dies steht in Widerspruch zu Wu et al. (1997), die einen Kältesignaltransduktionsweg für *Arabidopsis* postulieren, bei dem ABA cyclische Adenosindiphosphat-Ribose (cADP-Ribose) und cADP-Ribose die $[Ca^{2+}]_c$ ansteigen läßt.

Selbst wenn ABA die $[Ca^{2+}]_c$ nicht erhöht, ist dennoch ein calciumabhängiger ABA-Signaltransduktionsweg im Rahmen der Kälteakklimatisation denkbar, wie Untersuchungen von Kim et al. (2003) nahelegen: Calcium reguliert die Aktivität einer Proteinkinase (CIPK3) in *Arabidopsis*, die wiederum die ABA-induzierte Genexpression reguliert. Alles in allem bedarf es somit noch weiterer Untersuchungen zur Beteiligung der $[Ca^{2+}]_c$ an der Transduktion von ABA-Signalen.

5.3.2 Auxininduziertes Streckungswachstum

Indolessigsäure (10 μ M) induziert Wachstum, aber keine Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ von Weizenkoleoptilsegmenten (4.3.2, Abb. 4.22 und Abb. 4.23).

Auxininduziertes Streckungswachstum von Weizenkoleoptilen könnte dennoch insofern calciumabhängig sein, als polarer Auxin- und Calciumtransport in der Koleoptile miteinander gekoppelt sein könnten (Gross und Sauter, 1987; Saunders, 1990).

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen hat Felle (1988) mit calciumselektiven Mikroelektroden in Maiskoleoptilzellen $[Ca^{2+}]_c$ -Oscillationen nach Applikation des synthetischen Auxins 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D, 1 μ M) gemessen (Periode der Oscillation: 30 min). Steffens und Lüthen (2000) beschreiben das Anschwellen von Protoplasten aus Maiskoleoptilen nach Auxinapplikation. Die in jener Studie verwendeten Protoplasten entstammten verschiedenen Geweben der Koleoptile, woraus geschlossen werden kann, daß der überwiegende Anteil verschiedener Zelltypen in der Koleoptile auf Auxin reagiert. Auf den transgenen Weizen und die hier dargestellten Ergebnisse übertragen würde dies bedeuten, daß insbesondere mit der rekombinanten Aequorintechnik, mit der die Calciumreaktion mehrerer Zellen gemessen wird, auxininduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ erfaßt werden können. Ayling und Clarkson (1996) konnten mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 (1.3) auxininduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ von Tomatenwurzelhaaren nur unter unphysiologischen Bedingungen feststellen.

Die Messung kälteinduzierter $[Ca^{2+}]_c$ -Änderungen wurde an etiolierten Weizenkeimlingen durchgeführt, deren Primärblatt von der Koleoptile eingehüllt war (3.3.2.1, 3.3.2.2 und 4.2.2). Experimente an Zucchinihypokotylen (Butler et al., 1998) mit Aktinfilamenthemmstoffen weisen auf die Beteiligung des Cytoskelettes am polaren Auxintransport hin. Vor dem Hintergrund der Diskussion um die Regulation von Calciumkanälen durch Aktinfilamente (1.2, 5.2.4) wäre damit eine Interaktion von Auxin und möglicher Calciumreaktion und von Kälte und Calciumreaktion denkbar. Diese Überlegung wird durch Ergebnisse von Yang und Poovaiah (2000) gestützt, die eine posttranskriptionale Regulation der Aktivität des ZmSAUR1-Proteins durch Calmodulin nachweisen konnten. ZmSAUR1 wird in Maiskoleoptilsegmenten auxininduziert exprimiert, und die Calmodulinregulation der Proteinaktivität ist calciumabhängig. Experimente mit Calciuminhibitoren weisen ebenfalls auf die mögliche Beteiligung von Calcium an der Auxinsignaltransduktion hin (Kalra und Bhatla, 1998; Yuasa et al., 1998; Cho und Hong, 1996). Der im Rahmen dieser Arbeit erbrachte Nachweis, daß Indolessigsäure zu keiner Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ in Weizenkoleoptilen führt (siehe oben), schließt eine solche „Kreuzreaktion“ von möglicher auxin- und kälteinduzierter Calciumreaktion jedoch aus.

5.4 Zusammenfassende Diskussion

Die Charakteristika der kälteinduzierten Calciumreaktion in Weizen (5.2) sind mit denen in *Arabidopsis* (Plieth et al., 1999) vergleichbar und weisen auf einen konservierten Mechanismus der Calciumhomöostase in dikotyledonen und monokotyledonen Pflanzen hin.

Die „unnatürlich“ hohe Kühlrate von 18 °C pro Stunde, die für kälteinduzierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ erforderlich ist, läßt die physiologische Irrelevanz derartiger Calciumreaktionen vermuten.

Aus der nach Einwirken des Aktinfilamenthemmstoffes Cytochalasin-D unverändert bleibenden $[Ca^{2+}]_c$ (5.2.4) kann keineswegs geschlossen werden, daß das Cytoskelett an der Regulation von Calciumkanälen nicht beteiligt wäre. Vielmehr bedarf es hierzu noch eingehenderer Untersuchungen mit Mikrotubulihemmstoffen.

Die ausbleibende Detektion einer Calciumreaktion nach ABA-Applikation (5.3.1) könnte auf die Verwendung der rekombinanten Aequorintechnik zur $[Ca^{2+}]_c$ -Messung zurückzuführen sein, mit welcher mögliche Calciumreaktionen einzelner Zellen nicht erfaßt werden können. Demgegenüber zeigt die nach Indolessigsäureapplikation einsetzende Wachstums-, aber unterbleibende Calciumreaktion (5.3.2) deutlich, daß das auxininduzierte Streckungswachstum von Weizenkoleoptilen keiner Veränderung der $[Ca^{2+}]_c$ bedarf.

Die gewebeunspezifische Expression des Apoaequorins in den transgenen Weizenpflanzen ermöglicht $[Ca^{2+}]_c$ -Messungen in verschiedenen Pflanzenteilen (5.1). Dadurch läßt sich die $[Ca^{2+}]_c$ in Hinblick auf viele verschiedene Umgebungsfaktoren und endogene Signale untersuchen und mit denen dikotyledoner Pflanzen vergleichen (1.4). Die Ähnlichkeit der kälteinduzierten Calciumreaktionen in Weizen und *Arabidopsis* empfehlen jedoch die Konzentration auf physiologische Reaktionen, die für monokotyledone Pflanzen spezifisch sind.

Die mögliche Beteiligung intrazellulären Calciums an der gibberellinsäureinduzierten α -Amylasesynthese in Aleurongewebe ist beispielsweise erst wenig untersucht worden. Untersuchungen unter Verwendung von Calciuminhibitoren und der Mikroinjektion von Calmodulin (Gilroy, 1996) sowie Messungen der $[Ca^{2+}]_c$ mit Fluoreszenzfarbstoffen (Bush und Jones, 1987; Bush, 1996) weisen auf eine solche Beteiligung hin. Mit Hilfe der rekombinanten Aequorintechnik könnte die Rolle intrazellulären Calciums an der gibberellinsäureinduzierten α -Amylasesynthese in Hinblick auf die mögliche Wechselwirkung mit ABA (Jacobsen et al., 1995) und der Phospholipase D (Ritchie et al., 2002) eingehender untersucht werden.

Die Möglichkeit cytosolischer Calciumionenmessungen in den Koleoptilen und Wurzeln des transgenen Weizens (Abb. 4.3) eröffnet Perspektiven in Hinblick auf Untersuchungen zur möglichen Regulation gravitropen Wachstums durch Calcium. Eine solche Funktion von Calcium wird intensiv diskutiert (Sinclair und Trewavas, 1997) und durch neue Calciumionenmessungen an *Arabidopsis* bekräftigt (Plieth, 2002).

6 Zusammenfassung

Die cytosolische Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_c$) von Pflanzen kann sich infolge einer großen Anzahl verschiedener abiotischer und biotischer Umgebungsfaktoren sowie endogener Signale ändern. Dies hat zu der nicht unumstrittenen „Calciumhypothese“ geführt, nach welcher derartige Calciumreaktionen für die Transduktion der Signale in physiologische Antworten notwendig seien.

Calciumionenkonzentrationen können u.a. mit der rekombinanten Aequorintechnik gemessen werden, bei welcher das aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* (Murbach & Shearer) stammende Protein Apoaequorin in einem Organismus heterolog exprimiert und durch Inkubation mit dem Luminophor Coelenterazin zu Aequorin rekonstituiert wird. Aequorin luminesziert bei Calciumbindung (Emissionswellenlänge: 465 nm) und ermöglicht damit die Messung der Calciumionenkonzentration. Die rekombinante Aequorintechnik wurde bislang überwiegend in dikotyledonen und nicht in monokotyledonen Pflanzen verwendet, mit der Folge, daß die mögliche Beteiligung intrazellulären Calciums an physiologischen Antworten, die für monokotyledone Pflanzen spezifisch sind, wenig untersucht geblieben sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden transgene, Apoaequorin exprimierende Sommer- und Winterweizenpflanzen (*Triticum aestivum* L. cv. Veery, cv. Florida) sowie Winterweizenzellensuspensionen (*Triticum aestivum* L. cv. Florida) hergestellt, deren Apoaequorinexpression cytosolisch, gewebeunspezifisch und konstitutiv ist. Von 18000 biolistisch transformierten Embryonen wurden 52 Pflanzen regeneriert, von denen 13 mit dem Apoaequorin stabil transgen waren.

Die Pflanzen der transgenen Linien ermöglichten quantitative Messungen der $[Ca^{2+}]_c$ mittels Luminometern sowie die bildliche Darstellung der $[Ca^{2+}]_c$ mittels bildverstärkerröhrengekoppelter CCD-Kamera in ganzen Keimlingen, Wurzeln und Koleoptilen und deren apikaler Bereiche sowie in isoliertem Aleurongewebe. Darüber hinaus wurde ein Imagingsystem etabliert, mit dem Erhöhungen der Lumineszenzintensität in den Pflanzen mit einer zeitlichen Auflösung von 0,02 Sekunden als Echtzeitvideo bildlich dargestellt werden konnten. Erhöhungen der Lumineszenzintensität waren mit bloßem Auge sichtbar.

Die cytosolische Apoaequorinkonzentration des transgenen Weizens betrug etwa $1,4 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$. Im Vergleich mit einer *in vivo*-Calciumpufferkapazität von bis zu $5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ erklärt dies, warum trotz Calciumionenbindung an die Aequorinmoleküle die $[\text{Ca}^{2+}]_c$ akkurat bestimmt werden kann.

Kälteinduzierte Calciumreaktion wurden an transgenen Winterweizenkeimlingen untersucht. Das Kühlen von Keimlingen von $+20 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $+8 \text{ }^\circ\text{C}$ innerhalb weniger Sekunden - ein Kälteschock - verursachte einen charakteristischen, transienten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_c$, bei welchem die $[\text{Ca}^{2+}]_c$ einen maximalen Wert bereits vor dem Minimalwert der Temperatur erreichte. Die Kinetik der Calciumreaktion auf schnelles und langsames Kühlen sowie die multiple Regressionsanalyse unter Verwendung der $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Maximalwerte zeigten, daß der kälteinduzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_c$ von der Veränderung der Temperatur über die Zeit, der Temperaturrate, und weniger von der Temperatur selbst abhängt. Die $[\text{Ca}^{2+}]_c$ stieg ab einer Kühlrate von $+0,005 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ an. Das bedeutet, daß die Temperatur um mehr als $18 \text{ }^\circ\text{C}$ pro Stunde sinken muß, um eine Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_c$ zu bewirken – ein *in natura* seltenes Ereignis.

Desweiteren konnte gezeigt werden, daß repetitive Kältephasen die Keimlinge gegenüber Kälte desensibilisieren und das stufenweise Kühlen diese sensibilisieren. Kälteinduzierte Calciumreaktionen waren gewebespezifisch.

Die Kälteakklimatisation der Keimlinge führte zu einer veränderten, biphasischen Calciumreaktion auf Kälte, bei der die $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ein zweites Mal anstieg. Mechanische Stimuli führten zu einer ähnlichen Calciumreaktion wie ein Kälteschock. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zu kälteinduzierten Calciumreaktionen in Weizen werden mit denen dikotyledoner Pflanzen verglichen und in Hinblick auf ihre physiologische Relevanz diskutiert.

Die Fragmentierung von Aktinfilamenten in Winterweizenwurzelzellen und Winterweizenzellen in Suspensionskultur durch Inkubation mit Cytochalasin-D führte weder zu einer Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_c$, noch zu einer veränderten Calciumreaktion auf einen Kälteschock.

Auxin ($1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) induzierte in isolierten Koleoptilsegmenten von Winterweizen ein Streckungswachstum, aber keine Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Abscisinsäure führte in Keimlingen und isolierten grünen Blättern ebenfalls zu keiner Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Die Bedeutung dieser ausbleibenden Calciumreaktionen für die mögliche Regulation der Aktivität von Calciumkanälen durch das Cytoskelett sowie in Hinblick auf die Signaltransduktion der beiden verwendeten Phytohormone wird diskutiert.

7 Literaturverzeichnis

- Abromeit M (1996) Untersuchungen zur Bedeutung von Abscisinsäure für die Frosttoleranz von Winterweizen (*Triticum aestivum* L.). Dissertation, Universität Hamburg, unveröffentlicht.
- Abromeit M, Dörffling K (1994). ABA and frost tolerance in winter wheat. Proceedings of the COST 814 Workshop „Crop Adaptation to Cool Climates“: 223-230.
- Akashi T, Kawasaki S, Shibaoka H (1990) Stabilization of cortical microtubules by the cell walls in cultured tobacco cells. *Planta* 182: 363-369.
- Allen DG, Blinks JR, Prendergast FG (1977) Aequorin luminescence: Relation of light emission to calcium concentration – a calcium-independent component. *Science* 195(4282): 996-998
- Allen GJ, Sanders D (1996) Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *The Plant Journal* 10(6): 1055-1069.
- Allen GJ, Amtmann A, Sanders D (1998) Calcium-dependent and calcium-independent K⁺ mobilisation channels in *Vicia faba* guard cell vacuoles. *Journal of Experimental Botany* 49: 305-318.
- Allen GJ, Kuchitsu K, Chu SP, Muraza Y, Schroeder JI (1999) *Arabidopsis* *abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *The Plant Cell* 11: 1785-1798.
- Allen GJ, Chu SP, Schumacher K, Shimazaki CT, Vafeados D, Kemper A, Hawke SD, Tallman G, Tsien RY, Harper JF, Chory J, Schroeder JI (2000). Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science*. 289(5488):2338-2342.
- Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffman T, Tang YY, Grill E, Schroeder JL (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*. 411(6841): 1053-1057.
- Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Stöger E, Vasil IK (1996) Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Reports* 16: 12-17.
- Anil VS, Rao KS (2001) Calcium-mediated signal transduction in plants: a perspective on the role of Ca²⁺ and cdpks during early plant development. *Journal of Plant Physiology* 158(10): 1237-1256.
- Aoyama T, Chua N-H (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal* 11(3): 605-612.
- Ayling SM, Clarkson DT (1996) The cytoplasmic streaming response of tomato root hairs to Auxin; the role of Calcium. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 699-708.
- Barcelo P, Hagel C, Becker D, Martin A, Lörz H (1994) Transgenic cereal (*Triticum aestivum*) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. *The Plant Journal* 5(4): 583-592.

- Becker D, Brettschneider R, Lörz H. (1994). Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant Journal* 5(2): 299-307.
- Blatt MR (1999). Reassessing roles for Ca^{2+} in guard cell signalling. *Journal of Experimental Botany* 50(sp.iss.): 989-999.
- Blum A, Sinmena B (1995). Isolation and characterization of variant wheat cultivars for ABA sensitivity. *Plant, Cell and Environment* 18: 77-83.
- Boysen-Jensen P (1913) Über die Leitung des phototropischen Reizes in der Avenakoleoptile. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 31: 449-566.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.
- Brunold C, Rüegeegger A, Brändle R (1996). *Stress bei Pflanzen*. Verlag Paul Haupt Berne, UTB-Verlag. ISBN 3-8252-8125-6.
- Bush DS (1996) Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells. *Planta* 199: 89-99.
- Bush DS, Jones RL (1988) Cytoplasmic calcium and alpha amylase secretion from barley aleuron protoplasts. *European Journal of Cell Biology* 46: 466-469.
- Butler JH, Hu S, Brady SR, Dixon MW, Muday GK. (1998) *In vivo* and *in vivo* evidence for actin association of the naphthylphthalamic acid-binding protein from zucchini hypocotyls. *Plant Journal* 13(3): 291-301.
- Cai G, Moscatelli A, Cresti M (1997) Cytoskeletal organization and pollen tube growth. *Trends in Plant Science* 2(3): 86-91.
- Campbell AK, Trewavas AJ, Knight MR (1996). Calcium imaging shows differential sensitivity to cooling and communication in luminous transgenic plants. *Cell Calcium* 19(3): 211-218.
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J (2002) Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiology* 129(2): 469-485.
- Cho H-T, Hong Y-N (1996) Effect of calcium channel blockers on the IAA-induced cell elongation of sunflower hypocotyl segments. *Journal of Plant Physiology* 149: 377-383.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promotor activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18(4): 675-689.
- Cowan AK, Richardson GR, Maurel JCG (1997) Stress-induced abscisic acid transients and stimulus-response-coupling. *Physiologia Plantarum* 100: 491-499.
- Daeter W, Hartung W (1995) Stress-dependent redistribution of abscisic acid (ABA) in *Hordeum vulgare* L. leaves: the role of epidermal ABA metabolism, tonoplastic transport and the cuticle. *Plant, Cell and Environment* 18: 1367-1376.

- Dallaire S, Houde M, Gagné Y, Hargurdeep SS, Boileau S, Chevrier N, Sarhan F (1994) ABA and low temperature induce freezing tolerance via distinct regulatory pathways in wheat. *Plant Cell Physiology* 35(1): 1-9.
- DeNisi P, Zocchi G (1996). The role of calcium in cold shock responses. *Plant Science* 121: 161-166.
- DeKonick P, Schulman H (1998) Sensitivity of CaM Kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 279: 227-230
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA mini-preparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reports* 1: 19-21.
- Dhease P, Greve H, Gielen J, Guernich J, vanMontagu M, Schell J (1983) Identification of sequences involved in polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *EMBO Journal* 2: 419-429.
- Ding JP, Pickard BG (1993) Modulation of mechanosensitive calcium-selective cation channels by temperature. *Plant Journal* 3(5): 713-720.
- Dörffling K, Abromeit M, Bradersen U, Dörffling H, Melz G (1997) Involvement of abscisic acid and proline in cold acclimation of winter wheat. In: Li PH, Chen TH (Hrsg.) *Plant cold hardiness*: 283-292. Plenum Press, New York. ISBN 0-306-45712-1.
- Dupont G, Goldbeter A (1998). CaM kinase II as frequency decoder of Ca²⁺ oscillations. *BioEssays* 20: 607-610.
- Evans NH, McAinsh MR, Hetherington, AM (2001). Calcium oscillations in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4(5): 415-420
- Falciatore A, d'Alcala MR, Croot P, Bowler C (2000) Perception of environmental signals by marine diatom. *Science* 288(5475): 2363-2366.
- Felle H (1988). Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta* 174: 495-499.
- Flores A, Dörffling K (1990) A comparative study of the effects of abscisic acid and new terpenoid abscisic acid analogues on plant physiological processes. *Journal of Plant Growth Regulation* 9: 133-139.
- Fox TC, Guerinot ML (1998) Molecular biology of cation transport in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 669-696.
- Franklin-Tong V, Hackett G, Hepler PK (1997) Ratio imaging of Ca²⁺ in the self-incompatibility response in pollen tubes of *Papaver rhoeas*. *Plant Journal* 12: 1375-1386.
- Franklin-Tong VE (1999) Signaling and the modulation of pollen tube growth. *The Plant Cell* 11: 727-738.
- Gau SL, Lur HS, Chu C (1993) Amelioration of chilling induced injury by abscisic acid in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Plant Physiology* 102-S-454.
- Gehring CA, Irving HR, Parish RW (1990) Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 87: 9645-9649.

- Genoud T, Métraux J-P (1999) Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. *Trends in Plant Science* 4(12): 503-507.
- Gilroy S, Bethke PC, Jones RL (1993) Calcium homeostasis in plants. *Journal of Cell Science* 106: 453-462.
- Gilroy, S. (1996). Signal transduction in barley aleuron protoplasts is calcium dependent and independent. - *The Plant Cell* 8: 2193-2209.
- Gleave AP (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology* 20(6): 1203-1207.
- Gong M, vanderLuit AH, Knight MR, Trewavas AJ (1998) Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiology* 116: 429-437.
- Gross J, Sauter M (1987). Are auxin and calcium movements in corn coleoptiles linked processes? *Plant Science* 49: 189-198.
- Guy CL (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance; role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 41: 187-223.
- Haley A, Russell AJ, Wood N, Allan AC, Knight M, Campbell AK, Trewavas AJ (1995) Effects of mechanical signaling on plant cell cytosolic calcium. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92: 4124-4128.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166(4): 557-580.
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF (2000) CDPKs – a kinase for every Ca^{2+} signal? *Trends in Plant Science* 5(4): 154-159.
- Harper JF (2001) Dissecting calcium oscillators in plant cells. *Trends in Plant Science* 6(9): 395-397.
- Haugland RP (1996) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6th edition. Molecular Probes, Leiden, Niederlande.
- Heino L, Sandmann G, Lang V, Nordin K, Palva ET (1990) Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics* 79: 801-806.
- Hetherington AM, Gray JE, Leckie CP, McAinsh MR, Ng C, Pical C, Priestley AJ, Staxén I, Webb AAR (1998) The control of specificity in guard cell signal transduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 353: 1489-1494.
- Holdaway-Clarke TL, Feijó JA, Hackett JA, Kunkel JG, Hepler PK (1997) Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell* 9: 1999-2010.
- Holtorf S, Apel K, Bohlmann H (1995) Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 29: 639-646.

- Hwang J-U, Lee Y (2001) Abscisic acid-induced actin reorganisation in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology* 125: 2120-2128.
- Iser M, Fettig S, Scheyhing F, Viertel K, Hess D (1999) Genotype-dependent stable transformation in German spring wheat varieties selected for high regeneration potential. *Journal of Plant Physiology* 154: 509-516.
- Jakobsen JV, Gubler F, Chandler PM (1995) Gibberellin action in germinated cereal grains. In: Davies PJ (Hrsg.) *Plant hormones; physiology, biochemistry and molecular biology*, 2nd edition. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Niederlande. ISBN 0-7923-2985-6.
- Jian L-C, Li J-H, Chen W-P, Li PH, Ahlstrand GG (1999) Cytochemical localization of calcium and Ca²⁺-ATPase activity in plant cells under chilling stress: a comparative study between the chilling-sensitive maize and the chilling-insensitive winter wheat. *Plant Cell Physiology* 40(10): 1061-1071.
- Kalra G, Bhatla SC (1998) Auxin - calcium interaction in adventitious root formation in the hypocotyl explants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 7: 107-110.
- Kiegle E, Moore CA, Haseloff J, Tester M.A., Knight MR (2000). Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *The Plant Journal* 23(2): 267-278.
- Kim KN, Cheong YH, Grant JJ, Pandey GK, Luan S (2003) CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(2): 411-423.
- Kitigawa Y, Yoshizaki K (1998) Water stress-induced chilling tolerance in rice; putative relationship between chilling tolerance and Ca²⁺ flux. *Plant Science* 137: 73-85.
- Knight H (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *International Review of Cytology* 195: 269-324.
- Knight H, Knight MR (2000). Imaging spatial and cellular characteristics of low temperature calcium signature after cold acclimation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 51(351): 1679-1686.
- Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* 6: 262-267.
- Knight, M. R, Campbell, A. K, Smith, S. M, Trewavas, A. J. (1991). Transgenic plant aequorin report the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352: 524-526.
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1996) Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell* 8:489-503.
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997). Recombinant aequorin methods for measurement of intracellular calcium in plants. *Plant Molecular Biology Manual* C4:1-22.

- Kooter JM, Matzke MA, Meyer P (1999). Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends in Plant Science* 4(9): 340-347.
- Kudla J, Xu Q, Harter K, Grisse W, Luan S (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 4718-4723.
- Kurland CG (1991) Codon bias and gene expression. *FEBS Letters* 285(2): 165-169.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of maize bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* 128: 682-695.
- Lazzeri PA, Brettschneider R, Lühns R, Lörz H (1991) Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics* 81:437-444.
- Leung J, Merlot S, Giraudat J. (1997). The *Arabidopsis* abscisic acid-insensitive *ABI2* and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9(5): 759-771.
- Lewis BD, Spalding EP (1998) Nonselective block by La^{3+} of *Arabidopsis* ion channels involved in signal transduction. *Journal of Membrane Biology* 162: 81-91.
- Liu Z, Xia M, Poovaiah BW (1998) Chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase in tobacco: differential regulation by calmodulin isoforms. *Plant Molecular Biology* 38(5): 889-897.
- Lloyd AM, Walbot V, Davis RW (1992) *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. *Science* 258(5089): 1773-1775.
- Lüthen H (1995) Research on auxin action: a never-ending story. Early progress in the 1930ies. *Mitteilungen des Instituts für Allgemeine Botanik Hamburg* 25: 53-63
- Malho R (1999) Coding information in plant cells: the multiple roles of Ca^{2+} as a second messenger. *Plant Biology* 1: 487-494.
- Malho R, Moutinho A; vanderLuit A, Trewavas AJ (1998). Spatial characteristics of calcium signalling: the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 353: 1463-1473
- Malho R, Camacho L, Moutinho A (2000) Signaling pathways in pollen tube growth and reorientation. *Annals of Botany* 85: 59-68.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego. ISBN 0-12-473543-6.
- Mazars C, Thion L, Thuleau P, Graziana A, Knight MR, Moreau M, Ranjeva R (1997) Organization of cytoskeleton controls the changes in cytosolic calcium of cold-shocked *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts. *Cell Calcium* 22(5): 413-420.

- McAinsh MR, Hetherington AM (1998) Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. *Trends in Plant Science* 3(1): 32-36.
- McAinsh MR, Webb AAR, Taylor JE, Hetherington AM (1995) Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. *The Plant Cell* 7: 1207-1219.
- Messerli M, Robinson KR (1997) Tip localized Ca^{2+} pulses are coincident with peak pulsatile growth rates in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Journal of Cell Science* 110: 1269-1278.
- Meyer K, Leube MP, Grill E (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452-1455.
- Miedema H, Bothwell JHF, Brownlee C, Davies JM (2001) Calcium uptake by plant cells - channels and pumps acting in concert. *Trends in Plant Science* 6(11): 514-519.
- Minorsky PV (1989) Temperature sensing by plants: a review and hypothesis. *Plant, Cell and Environment* 12: 119-135.
- Miyawaki A, Tsien RY (2000) Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods in Enzymology* 327: 472-500.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for calcium based on green fluorescent protein and calmodulin. *Nature* 388: 882-887.
- Miyawaki A, Greisbeck O, Heim R, Tsien RY (1999) Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 2135-2140.
- Møller SG, Chua N-H (1999) Interactions and intersections of plant signaling pathways. *Journal of Molecular Biology* 293: 219-234.
- Monroy AF, Sarhan F, Dhindsa RS (1993) Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation and gene expression. *Plant Physiology* 102: 1227-1235.
- Monroy AF, Dhindsa RS (1995) Low temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25° C. *The Plant Cell* 7: 321-331.
- Moyen C, Hammond-Kosack KE, Jones J, Knight MR, Johannes E (1998) Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca^{2+} mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell and Environment* 21: 1101-1111.
- Muir SR, Sanders D (1997) Inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive Ca^{2+} release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiology* 114: 1511-1521
- Müller J, Staehelin C, Xie Z-P, Neuhaus-Url G, Boller T (2000) NOD factors and chitoooligomers elicit an increase in cytosolic calcium in aequorin-expressing soybean cells. *Plant Physiology* 124: 733-740.
- Nagel-Volkmann J (1997) Untersuchungen zur Bedeutung von intrazellulärem Calcium und Abscisinsäure für die Entwicklung der Frosttoleranz von Winterweizen (*Triticum aestivum* L.). Diplomarbeit, Universität Hamburg, unveröffentlicht.

- Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 19: 137-141.
- Ohmiya Y, Hirano T (1996) Shining the light: the mechanism of the bioluminescence reaction of calcium-binding photoproteins. *Chemistry & Biology* 3: 337-347.
- Örvar, B.L, Sangwan, V, Omann, F, Dhindsa, R.S. (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant Journal* 23(6): 785-794.
- Piñeros M, Tester M (1997) Calcium channels in higher plant cells: selectivity, regulation and pharmacology. *Journal of Experimental Botany* 48: 551-577.
- Plieth C (1999) Temperature sensing by plants: calcium-permeable channels as primary sensors - a model. *Journal of Membrane Biology* 172: 121-127.
- Plieth C (2001). Plant calcium signaling and monitoring: pros and cons and recent experimental approaches. *Protoplasma* 218: 1-23.
- Plieth C, Hansen UP (1998) Cytoplasmic Ca^{2+} - H^{+} -exchange buffers in green algae: a reply. *Protoplasma* 203:210-213.
- Plieth C, Sattelmacher B, Hansen UP (1997) Cytoplasmic Ca^{2+} - H^{+} -exchange buffers in green algae. *Protoplasma* 198:108-124.
- Plieth C, Trewavas AJ (2002) Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. *Plant Physiology* 129(2): 786-96.
- Plieth C, Hansen UP, Knight H, Knight MR (1999) Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *The Plant Journal* 18(5):491-497.
- Polisensky DH, Braam J (1996) Cold-shock regulation of the *Arabidopsis TCH* genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiology* 111: 1271-1279.
- Prasher DC, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ (1987). Sequence comparisons of complementary DNAs encoding aequorin isotypes. *Biochemistry* 26: 1326-1332.
- Puhakainen T, Pihakaskimaunsbach K, Widell S, Sommarin M (1999) Cold acclimation enhances the activity of plasma membrane Ca^{2+} ATPase in winter rye leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 37(3): 231-239.
- Putney JW (1998) Calcium signalling: up, down, up, down... What's the point? *Science* 279: 191-192.
- Quader H, Deichgräber G, Schnepf E (1986) The cytoskeleton of *Cobaea* seed hairs: patterning during cell-wall differentiation. *Planta* 168: 1-10
- Reddy ASN (2001) Calcium: silver bullet in signalling. *Plant Science* 160: 381-404.
- Ritchie SM, Swanson SJ, Gilroy S (2002) From common signalling components to cell specific responses: insights from the cereal aleurone. *Physiologia Plantarum* 115: 342-351.

- Roos W (2000) Ion mapping in plant cells - methods and applications in signal transduction research. *Planta* 210: 347-370.
- Rudd JJ, Franklin-Tong VE (2001) Calcium signaling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 214-232.
- Russell AJ, Knight MR, Cove DJ, Knight CD, Trewavas AJ, Wang TL (1996) The moss *Physcomitrella patens* transformed with apoaequorin cDNA responds to cold shock, mechanical perturbation and pH with transient increases in cytoplasmic calcium. *Transgenic Research* 5: 167-170.
- Sambrook F, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with Calcium. *The Plant Cell* 11: 691-706.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroad of signaling. *Plant Cell* 14: S401-S417.
- Sanford JC, Klein TM (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5:27-37.
- Sangwan V, Foulds I, Singh J, Dhindsa RS (2001) Cold-activation of *Brassica napus* *BN115* promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca^{2+} influx. *The Plant Journal* 27(1): 1-12.
- Saunders MJ (1990) Calcium and plant hormone action. *Symposia of the Society of Experimental Biology* 44: 271-283.
- Sauter M (1997) Differential expression of a CAK (cdc2-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and *cdc2* genes during the cell cycle and in response to gibberellin. *Plant Journal* 11: 181-190.
- Schenk PM, Remans T, Sági L, Elliot AR, Dietzgen RG, Swennen R, Ebert PR, Grof CPL, Manners JM (2001) Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. *Plant Molecular Biology* 47: 399-412.
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugoouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 52: 527-658.
- Sheen J (1996) Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transduction in higher plants. *Science* 274: 1900-1902.
- Shimomura O, Musicki B, Kishi Y, Inouye S (1993) Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium. *Cell Calcium* 14: 373-378.
- Shimomura O (1995) Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 211(2): 357-363.
- Snedden WA, Fromm H (1998) Calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science* 3: 299-304.

- Sopory SK, Munshi M (1998) Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signaling in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17(3): 245-318.
- Southern AM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517.
- Steffens B, Lüthen H (2000) New methods to analyse auxin-induced growth II: The swelling reaction of protoplasts - a model system for the analysis of auxin signal transduction? *Plant Growth Regulation* 32: 115-122.
- Takahashi, K, Isobe, M, Knight, M. R, Trewavas, A. J, Muto, S. (1997). Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca^{2+} in tobacco suspension-culture cells. - *Plant Physiology* 113: 587-594.
- Takumi S., Shimada T (1996) Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissues: frequency is influenced by culture duration. *Journal of Plant Physiology* 149: 418-423.
- Thomas TL, Chung HJ, Nunberg AN (1997) ABA signaling in plant development and growth. - In: P. Aducci (1997) *Signal transduction in plants*. Birkhäuser Verlag, Basel. ISBN 3-7643-5307-4.
- Tode K, Lüthen H (2001) Fusicoccin- and IAA-induced elongation growth share the same pattern of K^+ dependence. *Journal of Experimental Botany* 52(355): 251-255.
- Trewavas A (1999) Le Calcium, C'est la Vie: Calcium Makes Waves. *Plant Physiology* 120: 1-6
- Trewavas AJ, Malho R (1998) Ca^{2+} signalling in plant cells: the big network! *Current Opinion in Plant Biology* 1: 428-433.
- Trofimova MS, Andreev IM, Kuznetsov VV (1999) Calcium is involved in regulation of the synthesis of HSPs in suspension-cultured sugar beet cells under hyperthermia. *Physiologia Plantarum* 105: 67-73.
- Tsien RY, Miyawaki A (2000) Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods in Enzymology* 327: 472-500
- Vieira J, Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19(3): 259-268.
- Wada K-N, Wada Y, Ishibashi F, Gojobori T, Ikemura T (1992) Codon usage tabulated from the GeneBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Research* 20: 2111-2118.
- Wang QY, Nick P (2001) The auxin response of actin is altered in the rice mutant Yin-Yang. *Protoplasma* 204(1-2): 22-33.
- Webb AAR, McAinsh MR, Taylor JE, Hetherington AM (1996) Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Advances in Botanical Research* 22: 45-96.
- Went FW (1928) Wuchsstoff und Wachstum. *Rec Trav Bot Neerl* 15: 1-116.
- White PJ (2000) Calcium channels in higher plants. *Biochemistry and Biophysics Acta* 1465(1-2): 171-189.

-
- Woods CM, Reid MS, Patterson BD (1984) Response to chilling stress in plant cells I. Changes in cyclosis and cytoplasmic structure. *Protoplasma* 121: 8-16.
- Wu Y, Kuzma J, Marechal E, Graeff R, Lee HC, Foster R, Chua NH (1997) Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278(5346): 2126-2130.
- Yang T, Poovaiah BW (2000) Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. *Journal of Biological Chemistry* 275(5): 3137-3143.
- Yokota E, Muto S, Shimmen T (2000) Calcium-calmodulin suppresses the filamentous actin-binding activity of a 135-kilodalton actin-bundling protein isolated from lily pollen tubes. *Plant Physiology* 123: 645-654.
- Yuasa K, Takahashi K, Katou K (1998) Calcium chelator and channel blockers suppress the IAA-induced membrane hyperpolarization without inhibiting the following growth promotion in hypocotyl sections of *Vigna unguiculata* under xylem perfusion. *Plant Cell Physiology* 39(9): 978-986.
- Zhang W-H, Rengel Z, Kuo J (1998) Determination of intracellular Ca^{2+} in cells of intact wheat roots: loading of acetoxymethyl ester of Fluo-3 under low temperature. *The Plant Journal* 15(1): 147-151.
- Zielinski RE (1998) Calmodulin and calmodulin binding proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 697-725.

8 Anhang

In vitro-Kulturmedien:

Induktionsmedium: MS_{min}-Medium + 2 mg/l 2,4-D

Osmotikmedium: Induktionsmedium + 0,7 M (239,5 g/l) Saccharose

Selektionsmedium: Induktionsmedium + optional:
150 g/l Kanamycin
2 mg/l PPT
30 mg/l Hygromycin

Regenerationsmedium: Selektionsmedium mit nur 0,1 mg/l 2,4-D

Transfermedium: 0,5-fach konzentriertes MS_{min}-Medium ohne Hormonzusatz und Selektionsagens

MS_{min}-Medium	
Makrosalze:	Endkonzentration
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ 2 H ₂ O	440 mg l ⁻¹
MgSO ₄ 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikrosalze:	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ H ₂ O	11,2
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	5,8
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,25 mg l ⁻¹
CaCl ₂ 6 H ₂ O	0,025
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,025
KJ	0,75
“Fe-Na-EDTA”:	
Na ₂ EDTA („Titriplex“)	37,3 mg l ⁻¹
FeSO ₄ 7 H ₂ O	27,8
Maltose	30 g l ⁻¹
pH	5,6 – 5,8
Gelrite	0,3 %

L3-Medium (nach Lazzeri et al., 1991)

Das Medium wurde unter Verwendung der unten aufgeführten 10- bis 1000-fach konzentrierten Stammlösungen („10x“ bis „1000x“) folgendermaßen zusammengestellt:

L3-Makrosalze (10x)	100 ml
L3-Mikrosalze (1000x)	1 ml
“FeNa-EDTA” (500x)	2 ml
Inositol (500x)	2 ml
Aminosäuren (40x)	25 ml
Vitamine (1000x)	1 ml
Maltose	50 g
H ₂ O auffüllen auf	1 l
pH	5,6 – 5,8
Gelrite	0,3 %

Stammlösungen:

L3-Makrosalze (10x)		Inositol (500x)	
NH ₄ NO ₃	2,0 g	myo-Inositol	50 mg ml ⁻¹
KNO ₃	17,5 g		
KH ₂ PO ₄	2,0 g	Aminosäuren (40x)	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	3,5 g	Glutamin	15 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	4,5 g	Prolin	3 g
H ₂ O	1000 ml	Asparagin	2 g
		H ₂ O	500 ml
L3-Mikrosalze (1000x)		Vitamine (1000x)	
MnSO ₄ · H ₂ O	1,5 g	Nicotinsäure	0,1 g
(oder: MnSO ₄ · 4 H ₂ O)	2,5 g)	Thyamin	1 g
H ₃ BO ₃	0,5 g	Pyridoxine	0,1 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,75 g	H ₂ O	100 ml
KI	0,075 g		
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,025 g		
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,0025 g		
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,0025 g		
H ₂ O	100 ml		
“Fe-Na-EDTA” (500x)			
Na ₂ EDTA	3,73g		
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,78g		
H ₂ O	200 ml		

9 Danksagung

Diese Arbeit wurde im Arbeitsbereich Pflanzenphysiologie des Instituts für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten der Universität Hamburg unter der Anleitung von Prof. Dr. K. Dörffling sowie mit Beteiligung folgender Kooperationspartner durchgeführt:

Dr. D. Becker, Arbeitsbereich Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen II,
PD Dr. H. Quader, Arbeitsbereich Zellbiologie,
Dr. H. Lüthen, Arbeitsbereich Pflanzenphysiologie des oben genannten Instituts,
Dr. C. Plieth, Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Kiel,
Dr. M.R. Knight, Department of Plant Sciences, University of Oxford,
Prof.Dr. A.J. Trewavas, Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh.

Die Arbeit wurde von der Universität Hamburg in Form eines Graduiertenstipendiums sowie von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Do104/25-1,2) finanziell gefördert.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung der Promotion unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. K. Dörffling danke ich für die Themenstellung, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und seine stetige Förderung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. M. Böttger danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Förderung der Arbeit nach der Pensionierung von Herrn Dörffling. Herrn PD Dr. H. Quader danke ich für die Begleitung der Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens, und Herrn Dr. Quader, Frau Y.S. Lisboa und Frau E. Woelken für die Hilfe am CLSM. Herrn Dr. D. Becker danke ich für die Einweisung in molekularbiologische Techniken und seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, und Herrn Prof. Dr. H. Lörz und Herrn Dr. Becker für die Bereitstellung von Laborkapazität. Danke Dirk! Ich bedanke mich auch bei Frau S. Amati und Frau A. Stival. Herrn Dr. H. Lüthen danke ich für das gemeinsame Etablieren des Real-Time-Imaging-systems, den Zugang zum Auxanometer und seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Alles im Fokus. Herrn Dr. C. Plieth danke ich für den Zugang zum Perfusionsluminometer, seine Unterstützung bei den Messungen und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft. Es war für mich immer eine produktive, lehrreiche und schöne Zeit in Kiel. Herrn Dr. M.R. Knight und seiner Arbeitsgruppe danke ich für den Zugang zur CCD-Kamera. Herrn Prof. Dr. A.J. Trewavas danke ich für seine Unterstützung der Arbeit, und Herrn Prof. Dr. Trewavas und Herrn Dr. M.K. Watahiki für den Zugang zum Boxluminometer und die Diskussionen. I will remember: „Just try it“, and „Never say never“. Herrn Prof. Dr. U. Wienand und seiner Arbeitsgruppe danke ich für den Zugang zum Tubeluminometer. Herrn Prof. Dr. E. Heinz und seiner Arbeitsgruppe danke ich für den Zugang zum Phosphorimager. Frau M. Jaworski danke ich für ihre technische Assistenz.

Auch möchte ich folgenden Personen danken: Frau Dr. S. Lüthje für Ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und ihre Ratschläge, Herrn Dr. O. Döring für seine Computerunterstützung, und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Dörffling und Herrn Prof. Dr. Böttger für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Schließlich möchte ich meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung danken.

Lebenslauf

Jürgen Nagel-Volkmann
Geburtsdatum/-ort: 5. Juli 1970 in Hamburg

Schulabschluß	1989	Abitur
Wehrpflicht	1989 - 1990	im Stabsdienst in Lütjenburg, Schleswig-Holstein
Studium	1990 - 1997	Biologie an der Universität Hamburg Fächer: Allgemeine Botanik, Angewandte Botanik, Genetik/ Molekularbiologie, Hydrobiologie, Bodenkunde. Diplomarbeit im Arbeitsbereich Pflanzenphysiologie des Instituts für Allgemeine Botanik unter Anleitung von Prof. Dr. K. Dörffling. Thema: „Untersuchungen zur Bedeutung von intrazellulärem Calcium und Abscisinsäure für die Entwicklung der Frosttoleranz von Winterweizen (<i>Triticum aestivum</i> L.)“
Promotion	1998 - 2003	an der Universität Hamburg, im Arbeitsbereich Pflanzenphysiologie des Instituts für Allgemeine Botanik bei Prof. Dr. K. Dörffling. Forschungsaufenthalte an den Universitäten Kiel, Oxford und Edinburgh. Finanzielle Förderung: Universität Hamburg (Graduiertenstipendium), Deutsche Forschungsgemeinschaft (Do104/25-1 und 2)