

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 Winterweizenzellsuspensionen (*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 bildverstärkerröhregekoppelter 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.