

Elektrophysiologische Untersuchungen zur frühen Erkennungsphase zwischen Pflanzen und Mikroorganismen

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

vorgelegt von

Elena Jeworutzki

aus Magdeburg

Würzburg 2009

Eingereicht am: 11.09.2009

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.

1. Gutachter: PD Dr. Dirk Becker

2. Gutachter: PD Dr. Susanne Berger

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 IMMUNITÄTSMCHANISMEN DER PFLANZE.....	2
1.1.1 <i>Basale Immunität – PAMP/MAMP-induzierte Immunität</i>	3
1.1.1.1 PAMP/MAMP`s.....	3
1.1.1.2 Pathogen Erkennungs Rezeptoren (PRRs) / LRR rezeptorartige Kinasen.....	5
1.1.2 <i>Effektor-vermittelte Immunität</i>	9
1.1.2.1 Avirulenz- und Resistenz Proteine	10
1.2 SIGNALTRANSDUKTION WÄHREND DER BASALEN IMMUNANTWORT	11
1.3 INFORMATIONÜBERTRAGUNG INNERHALB DER PFLANZE	15
1.3.1 <i>Salizylsäure als Vermittler in der SAR Signaltransduktion</i>	16
1.3.2 <i>Die zentrale Rolle von NPR1 in der SAR Signaltransduktion</i>	16
1.4 FRÜHE PATHOGENESE DER PFLANZENZELLE	17
1.5 ELIZITOR-INDUZIERTER IONENFLÜSSE IN DER PFLANZEN-PATHOGEN INTERAKTION	19
1.5.1 <i>Externe Alkalisierung durch Elizitoren</i>	19
1.5.2 <i>Kalzium als Botenstoff in der Pflanzen-Pathogen-Interaktion</i>	20
Reaktive Sauerstoffspezies und Kalzium	22
Der SV Kanal TPC1	23
Zyklische Nucleotid-gesteuerte Ionenkanäle - CNGCs	24
1.5.3 <i>Anionenkanäle / -transporter in der Pflanzen-Pathogen Interaktion</i>	25
1.5.4 <i>Die Rolle der Kaliumkanäle in der Pflanzenzellpathogenese</i>	28
1.6 ZIELSETZUNG	31
2. MATERIAL UND METHODEN.....	32
2.1 ANZUCHT VON PFLANZEN- UND BAKTERIENMATERIAL	32
2.1.1 <i>Anzucht der für Mesophyllexperimente verwendeten Pflanzen</i>	32
2.1.2 <i>Samensterilisation und Aussaat für Wurzelhaareexperimente an Arabidopsis</i> <i>Keimlingen</i>	32
2.1.3 <i>Tabak-Zellkultur</i>	33

Einleitung

2.1.4 Bakterienkulturen.....	33
2.1.4.1 Agrobacterium tumefaciens.....	33
2.1.4.2 Azospirillum brasilense.....	33
2.1.4.3 Pseudomonas syringae pv. tomato DC 3000	34
2.1.4.4 Herstellung von Bakterienlysaten	34
2.2 SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN	35
2.2.1 verwendete Substanzen	35
2.2.2 Stammlösungen.....	37
2.2.3 Peptide.....	37
2.2.5 Medien.....	38
2.2.5.1 Pflanzenmedien.....	38
Linsmaier & Skoog Medium (LS medium) - für Nicotiana tabaccum cv. xanthi	
Zellkulturanzucht	38
Sussman Original Medium für Hydrokultur von Arabidopsis thaliana	38
2.2.5.2 Bakterielle Medien	39
MMAB - Minimalmedium für Azospirillum brasilense	39
YEB Medium für die Anzucht von Agrobacterium tumefaciens	39
King's Broth Medium zur Anzucht von Pseudomonaden	40
2.3 MEMBRANPOTENTIALMESSUNGEN	41
2.3.1 Einstichmessplatz für Experimente an Mesophyllzellen.....	41
2.3.2 Herstellung der Elektroden.....	43
2.3.3 Präparation der Mesophyllzellen	43
2.3.4 Wurzelhaareinstichmessungen	44
2.3.5 Theorie zu den Membranpotentialmessungen	44
2.3.5.1 Das Membranpotential	44
2.3.5.2 Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung.....	45
2.3.5.3 Membranpotentialänderungen	46
2.3.5.4 Das Umkehrpotential	47
2.4 BIOLUMINESZENZMESSUNGEN.....	47
2.4.1 Meßprinzip und Meßaufbau der Photomultiplier	49
2.4.2 Photomultiplierexperimente an Arabidopsis Mesophyllgewebe	51
2.4.3 Protoplastenlumineszenzexperimente	51
2.4.3.1 Herstellung der Protoplasten	51
2.4.3.2 Kalzium-induzierte Protoplastenlumineszenz.....	52

Einleitung

2.4.5 Berechnung der zytosolischen Kalziumkonzentration.....	53
2.5 SIMULTANE EINSTICH- UND BIOLUMINESZENZMESSUNGEN	55
2.5.1 Kombiniertes Einstich- und Lumineszenzkamera-Messplatz.....	55
2.5.2 Durchführung von simultanen Lumineszenz- und Potentialmessungen mit <i>Arabidopsis Mesophyllzellen</i>	56
2.6 PH-ELEKTRODEN-VERSUCHE	57
2.7 DIE MIFE™ TECHNIK	58
2.7.1 Präparation der <i>Arabidopsis Mesophyllzellen</i>	58
2.7.2 Elektroden / Pipetten.....	58
2.7.3 Lösungen für MIFE™ Messungen.....	60
2.7.3.1 Ionenselektive Cocktails	60
2.7.3.2 Backfilling Puffer.....	60
2.7.3.3 Messlösungen.....	61
2.7.4 Kalibrierung	61
2.7.5 Messung von Ionenströmen mit ionenselektiven Elektroden	62
2.7.6 Datenanalyse.....	63
2.7.8 Theorie zur Berechnung von Ionenströmen mit der MIFE™ Technik	64
2.8 ANIENEN EXUDAT ANALYSE.....	66
3. ERGEBNISSE	67
3.1 DIE ELEKTRISCHE ANTWORT DER PFLANZEN AUF MIKROORGANISMEN	67
3.1.1 Elektrische Antworten bei der Interaktion mit intakten Bakterien	68
3.1.2 Bakterienlysate lösen artübergreifend elektrische Antworten in Pflanzengewebe aus	69
3.2 DIE BAKTERIELLEN ELIZITOREN FLG22 UND ELF18 LÖSEN ELEKTRISCHE SIGNALE IN ARABIDOPSIS THALIANA AUS.....	71
3.2.1 Die bakteriellen Peptide flg22 und elf18 induzieren in <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Mesophyllzellen</i> transiente Membrandepolarisationen	72
3.2.2 Gewebsspezifität der Flagellin induzierten elektrischen Signale und spezifische Erkennung von Flagellinen verschiedener Bakterien	73
3.2.3 Die Detektion von PAMPs durch Rezeptorkinasen in der Plasmamembran ist hochspezifisch und führt zu einer Immunisierung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
3.2.3.1 Hochaffine Bindung von flg22 an den Rezeptor FLS2 induziert Ionenflüsse	79

Einleitung

3.2.3.2 Rezeptorabhängige Aktivierung der Immunantwort durch flg22 und elf18.....	79
3.3 WELCHER IONENTRANSPORT FÜHRT ZU DEN FLG22-INDUZIERTEN ELEKTRISCHEN SIGNALLEN?	84
3.3.1 <i>Flagellin induziert zahlreiche Ionenflüsse</i>	85
3.3.2 <i>Die Elizitor-induzierte externe Alkalisierung</i>	89
3.3.3 <i>Kalzium als Signalmolekül in der basalen Immunität</i>	92
3.3.4 <i>Anionen dominieren die flg22-induzierte Membrandepolarisation</i>	102
3.3.5 <i>Der flg22-induzierte Ausstrom von Kalium</i>	113
3.4. DIE FLG22-INDUZIERTER DEPOLARISATION SETZT PHOSPHORYLIERUNGEN UNTER ANDEREM DES REZEPTORKOMPLEXES FLS2/BAK1 VORAUS.....	116
3.5 FLG22 UND DIE SA VERMITTELTE RESISTENZ	117
3.6 ANALYSE VON <i>ARABIDOPSIS</i> MUTANTEN, DIE IN DEN SIGNALWEGEN DER PATHOGENABWEHR UND RESISTENZMECHANISMEN INVOLVIERT SIND ODER SEIN KÖNNTEN	118
4. DISKUSSION	124
4.1 <i>PAMPs/MAMPs vermitteln Membranpotentialänderungen</i>	124
4.2 <i>Die Bindung von flg22 und FLS2</i>	126
4.3 <i>Multiple PAMP/MAMP Rezeptoren – derselbe Signalweg?</i>	128
4.4 <i>flg22 bindet FLS2 mit einer hohen Affinität und aktiviert Ionenströme konzentrationsabhängig</i>	132
4.5 <i>Das flg22-induzierte Kalziumsignal ist an die Membrandepolarisation gekoppelt</i> .	133
4.6 <i>Flg22 induziert multiple Ionenflüsse in Arabidopsis Mesophyllzellen</i>	136
4.7 <i>Der Ausstrom von Nitrat und anderen Anionen führt zu Änderungen im Membranpotential</i>	137
4.8 <i>Neben Lanthan konnte kein effektiver Blocker der flg22-induzierten Ionenflüsse gefunden werden</i>	140
4.9 <i>Kinaseaktivität ist essentiell für die Elizitor-induzierte Ionenkanalaktivierung</i>	141
4.10 <i>Gibt es eine Verbindung zwischen der Systemischen Resistenz und der basalen Immunität?</i>	141
4.11 <i>Die Membrandepolarisation ist eine der ersten Reaktionen der basalen Immunität in Pflanzen</i>	142
4.12 <i>Ionentransport in der basalen Immunität – ein Modell</i>	147
5. ZUSAMMENFASSUNG	149

Einleitung

6. SUMMARY	153
7. REFERENZEN	156
8. ANHANG	175
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	175
CURRICULUM VITAE ET STUDIORUM.....	178
DANKSAGUNG.....	184
ERKLÄRUNG.....	185

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Zick-Zack Modell zur Präsentation der Stärke der Abwehrantwort des pflanzlichen Immunsystems.	3
Abb. 1.2: Ein Bakterium wird von der Pflanze anhand von Zellbestandteilen, die für die Vitalität und Überlebensfähigkeit des Bakteriums wichtig sind erkannt.	4
Abb. 1.3: Modell der Struktur und Lokalisation der fünf Hauptklassen von Resistenzproteinen in Pflanzen.	6
Abb. 1.4: Die zwei PAMPs flg22 und elf18 werden durch LRR-Rezeptorartige Kinasen (FLS2 und EFR) wahrgenommen, was zu einer basalen Immunität in <i>Arabidopsis thaliana</i> führt. ..	13
Abb. 2.1 Mikroelektrodeneinstichmessplatz in der Dunkelkammer einer Lumineszenzkamera.	41
Abb. 2.2. Reaktionsschema der Ca^{2+} -induzierten Aequorin-Lumineszenz	48
Abb. 2.3: A schematische Skizze eines Photomultipliers; B Photomultiplier	50
Abb. 2.4.: Luminoskan Ascent [®] Photomultiplier mit computergesteuerten Dispensersystem.	50
Abb. 2.5: VisiLuxe Imager	55
Abb. 2.6: typisches Mesophyllpräparat	57
Abb. 2.7: Befüllen der Mikroelektrode.	60
Tab. 2.1: Berechnung der freien Kalziumkonzentration.	61
Abb. 2.8: flg22-induzierte Protonenkonzentrationsänderungen.....	63
Abb. 3.1: <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 induziert in <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllzellen eine anhaltende Depolarisation.	68
Abb. 3.2: zytosolisches Kalziumsignal in <i>Arabidopsis</i> (C24 Aequorin) Blattstücken induziert durch bakterielle Lysate.	70
Abb. 3.3: Peptidsequenzen von flg22 und elf18.	71
Abb. 3.4: flg22-induzierte Depolarisation der Plasmamembran von <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen.	73
Abb. 3.6: Homologe Sequenzen der flg22 Peptide verschiedener Bakterien.....	75
Abb. 3.7: Eine C-terminale Deletion von 2 Aminosäuren am flg22 Peptid (flg22 Δ 2) induziert keine Depolarisation der Plasmamembran von <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen aber konkurriert mit dem aktiven Peptid.	76

Einleitung

Abb. 3.8: Änderungen der Membranspannung durch Flagelline verschiedener Bakterienarten in <i>Arabidopsis</i> Wurzelhaar- und Mesophyllzellen.	78
Abb. 3.9: Konzentrationsabhängigkeit der flg22-induzierten Depolarisation in <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen.	81
Abb. 3.10: Rezeptorabhängige Aktivierung der Depolarisation durch flg22 und elf18 in <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen.....	83
Abb. 3.11: Suboptimale Elizitorkonzentrationen können sich gegenseitig in der Depolarisationsantwort ergänzen.....	84
Abb. 3.12: flg22-induzierte externe Alkalisierung in Tabak Zellkulturzellen.	86
Abb. 3.13: flg22 induziert eine externe Alkalisierung durch einen Protoneneinstrom und eine Erhöhung der externen Chlorid- und Kaliumkonzentration durch einen Chlorid- und Kaliumausstrom in <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen (MIFE TM).	87
Abb. 3.14: Kombinationsmessungen mit 2 Ionen-selektiven Elektroden zeigten, dass der Chloridausstrom zeitgleich mit dem Protoneneinstrom stattfindet, jedoch zeitlich versetzt zum Kaliumausstrom.....	89
Abb. 3.15: Diphenyl Iodonium Chlorid (DPI), eine alkalische Badlösung oder das Pilzgift Fusicoccin haben keinen Effekt auf die flg22-induzierte Depolarisation von <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen.	92
Abb. 3.16: Die flg22-induzierte zytosolische Kalziumsignatur in <i>Arabidopsis</i> C24 Aequorin Blattscheiben ist hochsensitiv.....	93
Abb. 3.17: Simultane Messungen von Membranpotentialänderungen und Aequorinlumineszenz durch verschiedene Elizitoren und Kälte in <i>Arabidopsis</i> C24 Aequorin Mesophyllzellen.	95
Abb. 3.18: Das flg22-induzierte zytosolische Kalziumsignal geht mit der Depolarisation in <i>Arabidopsis</i> C24 Aequorin Mesophyllzellen einher.....	96
Abb. 3.19: Inhibierung der flg22 ^{P.syr.} induzierten zytosolischen Kalziumerhöhung durch Lanthan.....	97
Abb. 3.20: Lanthan blockt die flg22-induzierte zytosolische Kalziumerhöhung und die Depolarisation konzentrationsabhängig.....	99
Abb. 3.21: Bereits mit elf18 elizitierte Mesophyllzellen bleiben sensitiv für flg22 und zeigen ein reduziertes Kalziumsignal bei bereits depolarisierter Membran.....	101

Einleitung

Abb. 3.22: Erhöhte externe Anionenkonzentrationen modulieren die flg22-induzierte Depolarisation der Plasmamembran in <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen.	102
Abb. 3.23: flg22 induziert einen Nitratausstrom aus <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen.....	104
Abb. 3.24: schnelle transiente Depolarisation durch flg22 bei erhöhten externen Anionenkonzentrationen (Spannungsspur mit gefülltem Kreissymbol).....	105
Abb. 3.25: Die Repolarisationsphase von <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen nach der flg22-induzierten Depolarisation verkürzt sich signifikant in Anwesenheit von hohen externen Anionenkonzentrationen.	106
Abb. 3.26: Mikromolare Konzentrationen an externen Nitrat scheinen keine Signalwirkung auf die flg22-vermittelte Depolarisation zu haben.....	107
Abb. 3.27: In nitratfreien Mesophyllzellen kann eine vollständige Depolarisation durch flg22 auch durch andere Anionen gewährleistet werden.	108
Abb. 3.28: NPPB, ein Anionenkanalblocker, blockte nicht die flg22-induzierte Depolarisation und auch nicht das Kalziumsignal.	111
Abb. 3.29: Der Anionenkanalblocker Niflumsäure blockte die flg22-induzierte Membrandepolarisation und das zytosolische Kalziumsignal in <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen nicht.....	113
Abb. 3.30: Screening von <i>Arabidopsis</i> Kaliumkanal Knockout Mutanten auf die flg22 und elf18 induzierte Depolarisation in Mesophyllzellen.	115
Abb. 3.31: K-252a, ein unspezifischer Kinaseinhibitor blockt die flg22 vermittelte Depolarisation vollständig.....	117
Abb. 3.32: <i>Arabidopsis</i> Mesophyllzellen reagierten nach eine Vorbehandlung mit Salizylsäure mit einer reduzierten Depolarisationsamplitude nach Gabe von flg22. Sprühinokulation mit dem flg22 Peptid beeinflusste die 24 h später folgende flg22-induzierte Membrandepolarisation jedoch nicht.	118
Abb. 3.33: Analyse von <i>Arabidopsis</i> knockout Mutanten, die an der Pathogenabwehr beteiligt sein könnten.....	123
Abb. 4.1: Membrandepolarisation von <i>Nicotiana tabaccum</i> var. Samsun NN Mesophyllzellen induziert durch 10 nM flg22 oder Cryptogein.....	132
Abb. 4.2: Modell der flg22-induzierten frühen Abwehrantworten in <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllzellen.	148

1. Einleitung

Der Ursprung und die Evolution der Landpflanzen erfolgten in einer Umgebung, in der Bakterien bereits in verschiedensten Habitaten etabliert waren. Die Teilung eines gemeinsamen Lebensraumes führte daraufhin zwangsläufig zu einer Koevolution, in deren Verlauf auch Mikroorganismen die Oberfläche von Pflanzen zu besiedeln begannen. Man nennt solche auf Pflanzen lebenden Organismen Epiphyten. Neben Bakterien, welche die oberirdischen Organe (Phyllosphäre) besiedeln, gibt es zahlreiche wurzellosoziierte (Rhizosphäre) Bakterien (z.B. *Azospirillum spec.*) Es gibt mutualistische Interaktionen von Pflanzen und zahlreichen Bakterien, die für beide Partner Vorteile mit sich bringen. Die Pflanze bietet dem Mikroorganismus z.B. komplexe Nährstoffe an und erhält im Gegenzug dafür wichtige Hilfeleistungen bei der Mineralstoffaufnahme, bei der Vermeidung von Frostschäden und der biologischen Kontrolle des ökologischen Gleichgewichts. Auf diese Weise konnten zahlreiche Lebensräume für Pflanzen aber auch für Bakterien neu erschlossen werden. Neben diesen mutualistischen Epiphyten gibt es aber auch Mikroorganismen, die sich im Laufe der Evolution zu Parasiten entwickelten. Ein Beispiel dafür ist das gramnegative Bakterium *Pseudomonas syringae*. Dieses Bakterium verbringt einen Teil seines Lebens auf der Blattoberfläche und dringt dann unter günstigen Bedingungen wie Wärme und Feuchtigkeit, in das Pflanzengewebe ein und ruft die sogenannte Blattfleckenkrankheit hervor (Melotto et al., 2006). Im Gegensatz zu den epiphytischen Bakterien penetrieren infektiöse Bakterien in die Pflanze und leben und vermehren sich dort als Symbiont oder Parasit. Nur wenige Bakterien jedoch sind in der Lage das „Sicherheitssystem“ der Pflanze zu überwinden und sich im Inneren der Pflanze zu etablieren. Bakterienarten aus insgesamt fünf verschiedenen taxonomischen Gruppen (*Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* und coryneforme Bakterien) sind fähig gesundes Pflanzengewebe zu „infizieren“.

Mitglieder der Gattung *Agrobacterium* z.B. induzieren Tumore, indem sie einen Teil ihres Genoms in Form des sogenannten T_i (tumour inducing)-Plasmids in das Genom der Pflanzen integrieren. In der Gruppe der Rhizobien wiederum, gibt es Arten, die in die Pflanze eindringen und Wurzelknöllchen bilden, in denen

molekularer Stickstoff fixiert werden kann. In vielen Fällen ist der Vorteil für die Pflanze offensichtlich und doch gibt es immer wieder Berichte, in denen symbiotische Bakterien auch fähig sind das Pflanzenwachstum zu hemmen. Dennoch ist ein Krankheitsbefall eher ein seltener Vorfall, da Pflanzen Immunitätsmechanismen besitzen. Um sich vor biotischem und auch abiotischem Stress zu schützen, hat die Pflanze mechanische (Zellwand), chemische (Sekundärstoffe, Reaktive Sauerstoffspezies), enzymatische und auch genetische Verteidigungslinien, die in einem komplexen Netzwerk miteinander interagieren, entwickelt. Die Erkennung der verschiedenen Stressstimuli/Pathogene ist für die Pflanze besonders wichtig, damit sie zwischen „Freund“ und „Feind“ unterscheiden kann.

1.1 Immunitätsmechanismen der Pflanze

Das Abwehrsystem der Pflanze hat sich im Laufe der Evolution ständig, an die sich verändernden Bedingungen und Invasionsstrategien der Mikroorganismen, angepasst und erweitert. Zwei verschiedene Strategien werden heute beschrieben, welche die Pflanze für ein mehrstufiges Abwehrsystem nutzt (Jones und Dangl, 2006). In der ersten Phase bemerkt und reagiert die Pflanze auf Bestandteile von pathogenen und auch nicht pathogenen Bakterien (Abb. 1.1). Diese Moleküle werden PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) oder auch MAMP's (microbial-associated molecular pattern) genannt. PAMP/MAMP's werden von PR Rezeptoren (pathogen recognition receptors) in der Plasmamembran wahrgenommen (Gomez-Gomez und Boller, 2002; Ausubel, 2005), was in einem hochsensitiven und spezifischen Bioassay, durch eine externe Alkalisierung von Zellkulturmedium nachgewiesen wurde (Boller, 1995). Für Mikroben, die dennoch die Fähigkeit besitzen, dieses basale Immunsystem durch bestimmte Effektormoleküle zu umgehen, hat die Pflanze in einer zweiten Stufe die sogenannte Effektor-vermittelte Resistenz entwickelt. Die meisten bekannten bakteriellen Effektoren werden in der pflanzlichen Zelle von PRRs, den polymorphen NB-LRR Proteinprodukten von Resistenzgenen, erkannt. Aber auch gegen diese Abwehr entwickeln Pathogene im Laufe der Evolution Strategien, um sie zu umgehen. Darauf reagiert die Pflanze wiederum mit einer Selektion von neuen NB-LRR Allelen (Abb. 1.1). Dieses Zick-

Zack Modell wurde von Jonathan DG Jones und Jeffrey Dangl (2006) beschrieben (Jones und Dangl, 2006).

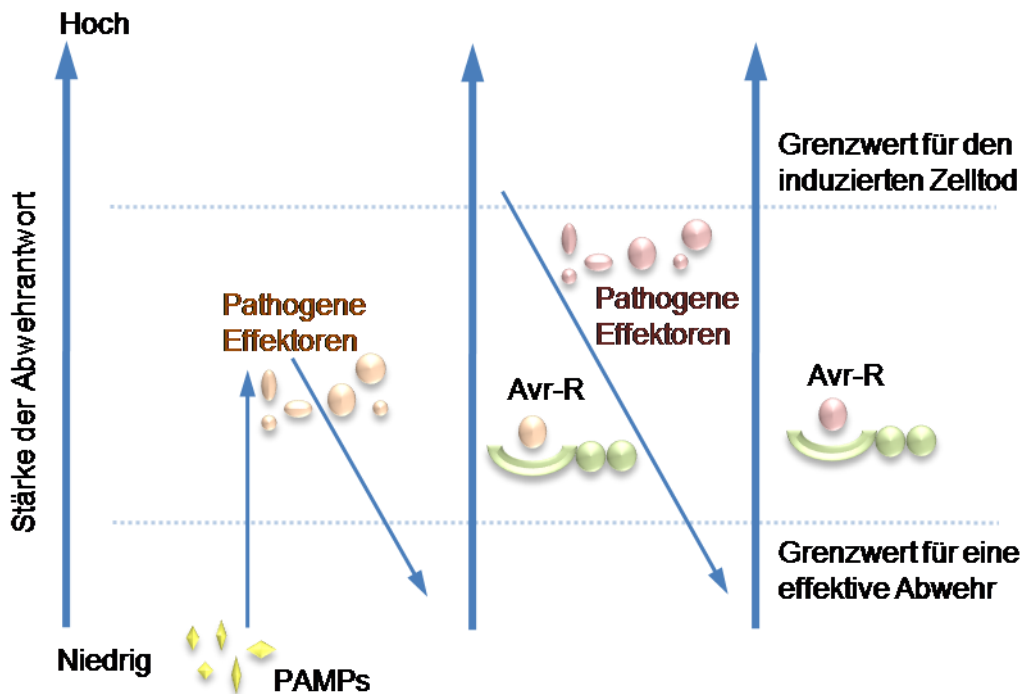


Abb. 1.1: Zick-Zack Modell zur Präsentation der Stärke der Abwehrantwort des pflanzlichen Immunsystems. PAMPs können Abwehrantworten aktivieren, die nicht in den Zelltod führen. Diese PAMP-induzierte Immunität kann von bakteriellen Effektoren abgeblockt werden. Durch Entwicklung von Resistenzgenen, die zu einer Erkennung dieser bakteriellen Manipulation befähigt sind, wird eine noch stärkere Abwehrantwort induziert, die in den Zelltod (HR) und zu Läsionen im Gewebe führen. Diese Effektor-induzierte Immunität kann wiederum durch weitere bakterielle Effektoren umgangen werden, was zu Krankheitssymptomen führt. Weitere Resistenzproteine vermitteln eine Erkennung dieser Effektoren, oder der Effektor induzierten Störungen in der Pflanze und eine starke Immunantwort, die in den Zelltod leitet, wird aktiviert (Abb. modifiziert nach Jones und Dangl, 2006)

1.1.1 Basale Immunität – PAMP/MAMP-induzierte Immunität

1.1.1.1 PAMP/MAMP's

PAMP/MAMP's sind Moleküle, die für das bakterielle Wachstum, die Vermehrung und das Überleben unabdingbar sind. Gewöhnlich weisen Teile dieser Moleküle eine konservierte Struktur auf. Diese wird oft von pflanzlichen PRR's wahrgenommen und lösen nach der Erkennung eine basale Immunität der Pflanze aus. Typische Beispiele für PAMP/MAMP's sind Chitin, Ergosterol oder auch andere Zellwand- oder

Einleitung

Membrankomponenten von Pilzen. Zu diesen PAMP/MAMP's gehören auch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Glykolipide der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und Flagellin, der Hauptbestandteil des bakteriellen Motilitätsorganes, dem Flagellum (Abb. 1.2). Die von der Pflanze erkannten und eine Immunantwort stimulierenden PAMP/MAMP's werden Elizitoren genannt. Der am besten untersuchte Elizitor ist das bakterielle Flagellin, welches Abwehrantworten in vielen Pflanzen und auch im Menschen hervorruft (Gómez-Gómez und Boller, 2002). Flagellin ist der Hauptbestandteil der bakteriellen Flagelle oder Geißel. Die Motilität der Flagelle ist wichtig für die Pathogenität dieser Bakterien (Zipfel und Felix, 2005). In *Arabidopsis thaliana* reicht u.a. ein 22 Aminosäuren langes, hochkonserviertes Peptid aus dem N-Terminus des bakteriellen Flagellins von *Pseudomonas syringae*, (flg22), um zahlreiche Abwehrantworten der pflanzlichen Zelle zu aktivieren (Felix et al., 1999). Jedoch wird das Flagellin von anderen pathogenen flagellentragenden Bakterien nicht von der Pflanze erkannt (Zipfel et al., 2004).

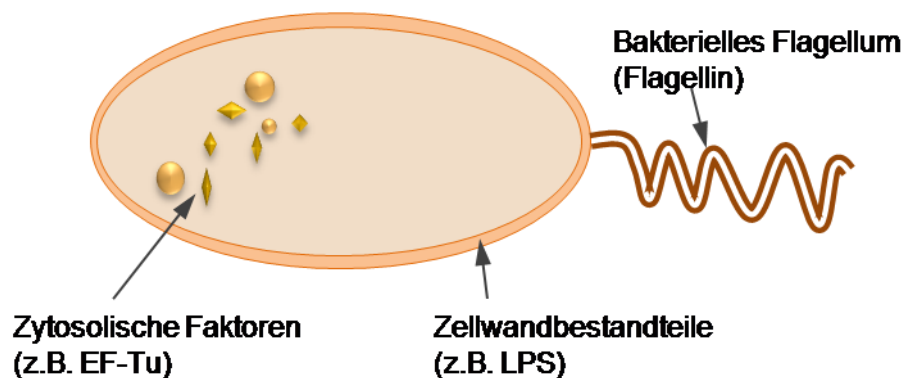


Abb. 1.2: Ein Bakterium wird von der Pflanze anhand von Zellbestandteilen, die für die Vitalität und Überlebensfähigkeit des Bakteriums wichtig sind erkannt.

Zu den frühen PAMP/MAMP vermittelten Abwehrantworten gehören Phosphorylierungen, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, NO und Ethylen und die Aktivierung von Ionenkanälen und/oder Transportern (Felix et al., 1999; Zipfel und Felix, 2005). Innerhalb einer Stunde kommt es durch flg22 zu einer transkriptionellen Induktion von mehr als 1100 Genen in *Arabidopsis thaliana* (Zipfel et al., 2004). Zu den späteren Antworten gehören Ablagerungen von Kallose im

Einleitung

Phloem und die Synthese von antimikrobiellen Stoffen, den sogenannten Phytoalexinen (Felix et al., 1999; Zipfel und Felix, 2005).

Nicht alle Pflanzenfamilien können auf dieselben Bestandteile von Mikroorganismen reagieren und eine Immunität entwickeln. Der bakterielle Elongationsfaktor EF-Tu kann zum Beispiel nur von Brassicaceen wahrgenommen werden (Kunze et al., 2004). EF-Tu ist das häufigste und ein hoch konserviertes Protein in Bakterien. Neben dem Transport der Aminoacyl-tRNAs zu den Ribosomen hat es möglicherweise noch viele weitere Funktionen in Bakterien. EF-Tu und auch bakterielle Kälteschockproteine (CSP) kommen reichlich in allen Bakterien vor. Das CSP konnte von allen untersuchten Pflanzen nur in der Familie der Solanaceen wahrgenommen werden (Felix und Boller, 2003). Wie für das bakterielle Flagellin gezeigt wurde, besitzen EF-Tu und CSP hochkonservierte Sequenzen (das N-acetylierte Peptid elf18 für EF-Tu und das hochkonservierte, RNA-bindende, 15 Aminosäure lange RNP-1 Motif für CSP). Diese Epitope der Elizitoren können ebenfalls zu einer Abwehrreaktion in der Pflanze führen (Felix und Boller, 2003; Kunze et al., 2004). Im Vergleich dazu sind Lipopolysaccharide (LPS) als Elizitoren bei der pflanzlichen Abwehr noch nicht so genau untersucht worden. Der hochkonservierte Lipid A Teil scheint jedoch für die Induktion der Abwehrantworten verantwortlich zu sein (Zeidler et al., 2004; Chinchilla et al., 2006). Das LPS aus dem symbiontischen *Sinorhizobium meliloti* z.B. verhindert bei zeitgleicher Applikation des pilzlichen Elizitors Invertase eine Induktion von Abwehrantworten in der Wirtspflanze *Medicago truncatula* (Tellström et al., 2007).

Der pilzliche Elizitor Cryptogein ist ein 10 kD Protein und wird von dem Oomyzeten *Phytophthora cryptogea* ausgeschieden. Es scheint ein extrazelluläres Protein zum Transport von Sterolen zu sein (Mikes et al., 1997). Die Studien an diesem pilzlichen Elizitor wurden an Tabakzellkulturzellen durchgeführt und zeigten große Ähnlichkeit mit Abwehrreaktionen der Pflanze, die durch bakterielle Elizitoren hervorgerufen wurden. Cryptogein leitet jedoch im Gegensatz zu dem bakteriellen Elizitor, flg22, den Zelltod ein, und wird aus diesem Grund als ein nekrotisierender Elizitor klassifiziert.

1.1.1.2 Pathogen Erkennungs Rezeptoren (PRRs) / LRR rezeptorartige Kinasen

PRR's sind Proteine, die man sowohl in der Plasmamembran als auch im Zellinneren findet (Dardick und Ronald, 2006). Um ein Eindringen von pathogenen Bakterien

Einleitung

oder Pilzen in die Pflanze und später in die Zelle zu verhindern, sollte die Pflanze schon auf der Zelloberfläche Pathogene detektieren. Während bei Tieren Pathogene hauptsächlich durch Mitglieder der Toll-like Rezeptor Familie (TLR's) der PRR's wahrgenommen werden, besitzen Pflanzen keine TLR's. Pflanzen vermitteln die Wahrnehmung von Pathogenen durch Serin/Threoninkinasen oder Rezeptor-ähnliche Proteine (RLP's), die ähnlich wie die RLK's strukturiert sind, doch denen die Kinasedomäne fehlt (Abb. 1.3, Dardick und Ronald, 2006).

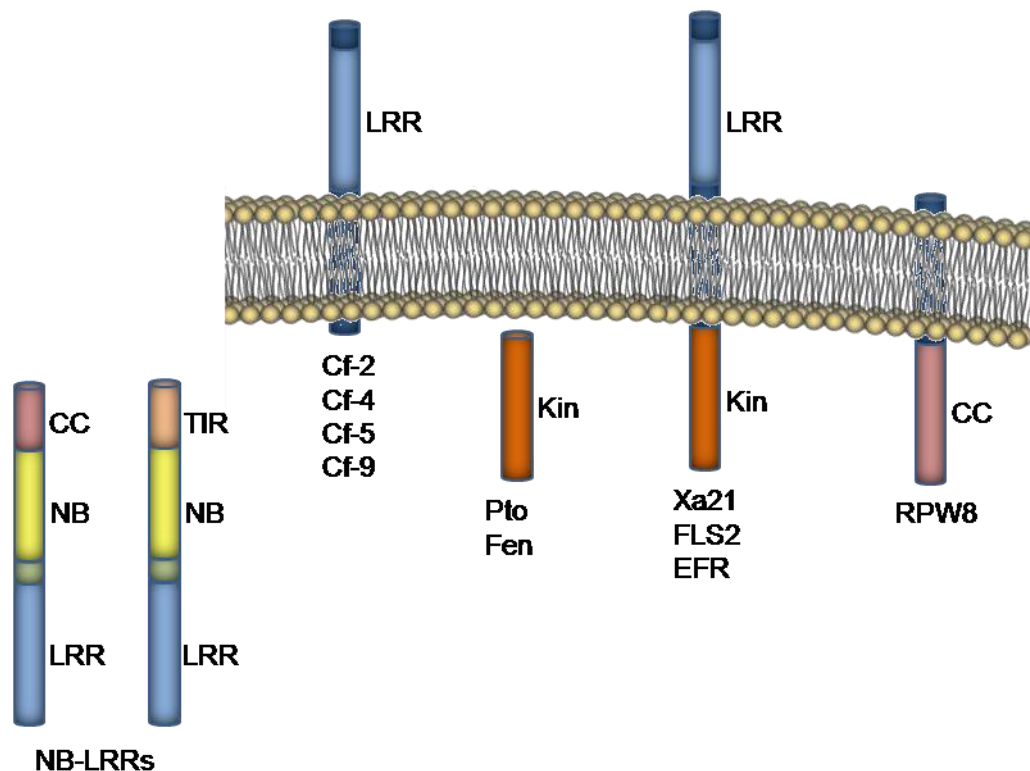


Abb. 1.3: Modell der Struktur und Lokalisation der fünf Hauptklassen von Resistenzproteinen in Pflanzen. Die Gruppe von Xa21, FLS2 und EFR, sowie die Gruppe der Cf-x Proteine tragen eine extrazelluläre LRR Domäne und eine Transmembrandomäne. Das Pto Gen kodiert für eine zytosomatische Serin/Threoninkinase, könnte aber über die N-terminale Myristylierungsstelle mit der Membran assoziiert sein. Ein noch sehr neues Genprodukt RPW8 trägt einen putativen Signalanker am N-Terminus. Die NB-LRRs gehören zu der größten Klasse, sind hauptsächlich in Zytosol lokalisiert und besitzen verschiedene N-terminale Domänen. Abbildung modifiziert nach (Dangl und Jones, 2001)

Pflanzliche rezeptorartige Kinasen, RLK's (receptor-like kinases), sind transmembrane Proteine, mit einer extrazellulären N-terminalen Erkennungsdomäne und einer zytosolischen C-terminalen Kinasedomäne, die den tierischen Tyrosinkinasen ähnelt (Shiu und Bleecker, 2001). Die zahlreichen pflanzlichen

Einleitung

Rezeptorkinasen gehören zu der monophyletischen IRAK (Interleukin-1 receptor-associated kinase) Familie, zu der auch die humanen IRAK's und die Pelle Kinase aus *Drosophila* gehören (Mushegian und Medzhitov, 2001; Shiu und Bleecker, 2001; Shiu et al., 2004). Bei der Untersuchung von Signaltransduktionswegen, die zu einer Einleitung von Abwehrantworten und zu einer basalen Immunität führen, konnte eine Beteiligung von Kinasen, die zur IRAK Familie gehören nachgewiesen werden (Jones et al., 1994; Song et al., 1995; Wang et al., 1998; Gomez-Gomez und Boller, 2002). Nach Erkennung eines Elizitors an der Zelloberfläche vermittelt dann die Kinaseaktivität das Signal ins Innere der Zelle. Die Elizitor-abhängige Regulation der Kinasedomäne ist durch verschiedene posttranslationale Mechanismen gesteuert. Dazu gehören Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen regulatorischer Domänen in und außerhalb der Kinasedomäne, die durch das Erzeugen von Substratbindestellen oder auch durch Unterbrechung von hemmenden Protein-Protein Interaktionen die Kinaseaktivität beeinflussen (Johnson et al., 1996). Unter allen bekannten Aktivierungsmechanismen ist die Autophosphorylierung einer regulatorischen Region, der sogenannten Aktivierungsschleife, die am weitesten verbreitete unter den meisten Kinasen (Adams, 2003). Interessanterweise tragen die bisher bekannten Rezeptorkinasen aus Pflanzen nicht das typische hochkonservierte RD (Arginin-Aspartat) Motiv in der Aktivierungsschleife, wie es für tierische abwehrspezifische Kinasen beschrieben wurde (Dardick und Ronald, 2006). So besitzt auch der am Besten charakterisierte MAMP/PAMP Rezeptor für das bakterielle Flagellin FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2) in *Arabidopsis* kein RD Motiv (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Dardick und Ronald, 2006).

Die direkte Interaktion zwischen dem Rezeptor FLS2 und dem Peptid flg22 aus dem bakteriellen Flagellin, konnte durch eine Komplexbildung nachgewiesen werden (Chinchilla et al., 2006). In weiteren Experimenten konnte diese Arbeitsgruppe allein durch die heterologe Expression des *Arabidopsis* FLS2 Rezeptors das für *A. thaliana* charakteristische Flagellin FLS2 System in Tomatenzellen transferieren (Chinchilla et al., 2006). In *Arabidopsis* trägt die Flagellin Wahrnehmung durch FLS2 zu einer signifikanten Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 bei, wenn die Bakterien auf das Blatt gesprüht werden (Zipfel et al., 2004). Werden die Bakterien jedoch direkt durch Druckinfiltration in das Blattinnere hereingebracht, können sie sich dort ungehindert ausbreiten. Dies führte zu der Folgerung, dass die FLS2 vermittelte Krankheitsresistenz möglicherweise zu einem sehr frühen Zeitpunkt

Einleitung

geschieht (Zipfel et al., 2004). Überraschenderweise fanden Melotto et al. (2006), dass flg22 und auch andere Elizitoren wie bakterielle Lipopolysaccharide (Zeidler et al., 2004) einen Stomaschluss induzieren. Sie konnten auch zeigen, dass durch den Stomaschluss ein Eintritt von Bakterien in das Blattinnere aktiv verhindert wurde (Melotto et al., 2006). In fls2 Mutanten konnte nach flg22 Behandlung kein Stomaschluss mehr induziert werden (Melotto et al., 2006), was mit einem Verlust der Resistenz von *Arabidopsis* gegenüber *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 einherging (Zipfel et al., 2004). *Arabidopsis* fls2 Mutanten zeigten jedoch immer noch eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen, wenn sie mit rohen bakteriellen Extrakten behandelt wurden, was auf die Existenz anderer funktioneller PAMP/MAMP Wahrnehmungssysteme hinweist (Zipfel et al., 2004).

In *Arabidopsis* wurden 610 RLK's und 56 RLP's identifiziert (Shiu und Bleecker, 2001; Fritz-Laylin et al., 2005). Viele dieser Gene werden durch PAMP/MAMP Behandlung der Pflanze transkriptionell induziert. Das könnte auf eine potentielle Rolle in der Immunabwehr deuten (Zipfel et al., 2006)(Zipfel et al., 2004). Der zweite PAMP/MAMP Rezeptor in *Arabidopsis* wurde 2006 von Zipfel et al. identifiziert. Der EF-Tu Rezeptor (EFR) gehört ebenso wie FLS2 zu der *Arabidopsis* RLK Unterfamilie XII. *Arabidopsis* Mutanten, die keinen funktionellen EFR exprimierten, waren insensitiv für das Peptid elf18, doch zeigten sie noch typische Immunantworten auf flg22. *Nicotiana benthamiana* besitzt kein Perzeptionssystem für EF-Tu. Durch heterologe Expression des EF Rezeptors wurden sie jedoch sensitiv für elf18 und die Bindung von radioaktiv markierten elf Peptiden und verschiedene Biotests zum Nachweis für Elizitor Aktivität, wie die Produktion von Ethylen und ROS konnten nachgewiesen werden. Ein weiterer Rezeptor, der eine hohe Homologie zu dem FLS2 Rezeptor besitzt, ist die Xa21 rezeptorartige Kinase aus Reis (Abb. 1.3, Song et al., 1995). Doch handelt es sich bei dem Liganden für diesen Rezeptor um ein spezifisches sekretiertes Molekül von *Xanthomonas oryzae* und nicht um ein weit verbreiteten Elizitor (Burdman et al., 2004; da Silva et al., 2004). Das Xa21 Resistenzgen besitzt zwar die Struktur eines MAMP/PAMP Rezeptors, vermittelt aber Immunantworten, die den NBS-LRR Pathogen Resistenz Proteinen der Effektor-vermittelten Immunität ähnlicher sind (Ausubel, 2005).

Bis vor kurzem wusste man nicht welche weiteren Komponenten neben Ligand und Rezeptor an der Aktivierung der Signalkette und an sehr frühen Schritten der Pathogenabwehr beteiligt sind. Chinchilla et al. zeigten 2007, dass BAK1 (BR11-

associated receptor kinase1), eine LRR-RLK (Leucline rich repet receptor like kinase), die bekanntlich den Brassinosteroid Rezeptor BRI1 reguliert (Li et al., 2002; Nam und Li, 2002) auch im FLS2 und EFR Signalweg beteiligt ist. In *bak1-4 Arabidopsis* Mutanten kann ein normales Binden von flg22 nachgewiesen werden. Die frühen und auch späten Abwehrreaktionen, die zur Resistenz führen sind jedoch beeinträchtigt. Für die EF-Tu induzierten Abwehrreaktionen gilt dies nur für die frühen Reaktionen. Die Forschergruppe schlägt eine Komplexbildung von FLS2 mit BAK1 vor. BAK1 ist eine Kinase, die ein RD Motiv trägt, welches für einen vereinfachten Phosphotransfer steht (siehe oben und Adams, 2003). BAK1 scheint also ein positiver Regulator in FLS2/EFR zu sein und möglicherweise auch in anderen PRR Signalwegen, die zur basalen Immunität führen (Chinchilla et al., 2007).

Die Anwesenheit von 23 putativen N-Glykosylierungsstellen weist auf eine mögliche Glykosylierung des PAMP Rezeptors FLS2 hin (Gómez-Gómez und Boller, 2000). Auch in anderen PRRs wie EFR, dem Rezeptor für den bakteriellen Elongationsfaktor kommen zahlreiche N-Glykosylierungsstellen (N-X-S/T) in der LRR Domäne vor (Zipfel et al., 2006). Inwiefern Glykosylierungen des Rezeptors eine Rolle in seiner Funktionalität spielen, muss noch geklärt werden.

1.1.2 Effektor-vermittelte Immunität

In vielen Studien der letzten Jahre kristallisierte sich immer mehr heraus, dass es eine Verbindung zwischen der basalen und der Effektor-vermittelten Immunität gibt. Die Effektor-vermittelte Immunität nennt man auch „Gen für Gen Resistenz“ oder Rassen-Kultivar spezifische Wirtsresistenz (Ausubel, 2005; Chisholm et al., 2006). Der Unterschied zu der basalen Immunität besteht in der spezifischen Interaktion des Pathogens und des Wirtes. In der Effektor-vermittelten Immunität, entlässt der pathogene Organismus Effektorproteine über Typ III Sekretionssysteme des Pathogens in die Wirtszelle. Diese Effektoren manipulieren oder hemmen direkt oder indirekt bestimmte zelluläre Funktionen der Pflanze, wie zum Beispiel die MAMP/PAMP-induzierte Immunität (Hauck et al., 2003; Alfano und Collmer, 2004; Kim et al., 2005b; Chisholm et al., 2006; He et al., 2006). Den bakteriellen Effektorproteinen wirken die pflanzlichen Resistenz (R) Proteine entgegen, die die

Effektor induzierten Störungen der Wirtszellfunktionen überwachen (Guard-Hypothese: Van Der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001) und zu verstärkten Immunabwehrantworten der Pflanze führen (Asai et al., 2002; Tao et al., 2003; Navarro et al., 2004).

1.1.2.1 Avirulenz- und Resistenz Proteine

Es konnten zahlreiche Resistenzproteine identifiziert werden von denen die Mehrheit eine Nukleotid Bindestelle und eine LRR (leucin rich repeats) Domäne besitzen und offensichtlich im Zytosol lokalisiert sind (Abb. 1.3, Dangl und Jones, 2001; Martin et al., 2003). Diese NBS-LRR's ähneln den tierischen NOD (nucleotide oligomerization domain) Proteinen, die dort an der Wahrnehmung von MAMP/PAMP's beteiligt sind (Inohara und Nunez, 2003). Die Resistenzproteinvermittelte Erkennung von pathogenen Typ III Effektormolekülen aktiviert in der Pflanze Abwehrantworten, die oft den Zelltod der Wirtszelle, den sogenannten HR (hypersensitive response), einleitet (Heath, 2000). *Pseudomonas syringae* benutzt ein Typ III Sekretionssystem, über das es bis zu 40 verschiedene Typ III Effektor Proteine in die Wirtszelle sekretieren kann (Fouts et al., 2002; Guttman et al., 2002; Petnicki-Ocwieja et al., 2002). Wenn das passende Resistenzgen (R)-Produkt zu dem Effektor fehlt, kann keine Resistenz induziert werden und das Bakterium wird virulent und die Pflanze anfällig. Man nennt diese Interaktion kompatibel. Eine Strategie der Pathogene ist es die Abwehrantworten zu umgehen oder abzuschalten (Jakobek et al., 1993; Keshavarzi et al., 2004). In einer inkompatiblen Interaktion zwischen Pflanze und Bakterium können der/die Effektor(en) von der Pflanze erkannt werden. Man nennt die Effektoren auch Avirulenz Proteine. Avirulenz Proteine/Effektoren haben verschiedene enzymatische Funktionen, wie z.B. Cystein Proteasen (Shao et al., 2002; Lopez-Solanilla et al., 2004; Coaker et al., 2005; Kim et al., 2005a), Ubiquitin-artige Proteasen (Hotson et al., 2003; Roden et al., 2004), E3 Ubiquitin Ligasen (Abramovitch et al., 2006; Janjusevic et al., 2006) und Phosphatasen (Bretz et al., 2003; Espinosa et al., 2003). Lokalisationsstudien und Wirts-vermittelte posttranslationale Modifikationen haben einige Hinweise auf mögliche Effektorfunktionen gegeben (Nimchuk et al., 2000; Shan et al., 2000; Robert-Seilaniantz et al., 2006), doch für die meisten Effektoren sind noch keine Funktionen bekannt, da sie keine Sequenzähnlichkeiten mit bekannten Proteinen besitzen.

Um das MAMP/PAMP-induzierte Abwehrsystem der Pflanze zu manipulieren, wird durch das Pathogen auf zentrale Regulatoren des Immunsystems Einfluss genommen (Kim et al., 2005b). Zwei bakterielle Typ III Effektoren AvrB und AvrRpm1 interagieren mit und induzieren eine Phosphorylierung von RIN4 in *Arabidopsis* (Mackey et al., 2002). Ein dritter Effektor AvrRpt2, eine Protease, induziert die posttranskriptionelle Degradation von RIN4, wodurch das dazugehörige R Protein RPS2 aktiviert wird (Axtell et al., 2003; Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey et al., 2003). Eine Antwort der Pflanze darauf ist ein PAMP-induzierter Stomaschluss. Aber auch gegen diese Abwehrstrategie der Pflanze besitzt *Pseudomonas syringae* ein Phytotoxin, Coronatin, welches den Stomaschluss wieder aufheben kann und so verschafft sich das Pathogen Zutritt in das Pflanzeninnere (Melotto et al., 2006).

1.2 Signaltransduktion während der basalen Immunantwort

Pflanzen, Insekten und Tiere haben bemerkenswerte Ähnlichkeiten in der Art und Weise, wie sie pathogene Muster (PAMP/MAMPs) wahrnehmen. So haben Asai et al. die Gentranskription der frühen basalen Abwehr in Pflanze und Mensch nach Flagellin Gabe verglichen (Asai et al., 2002). Die Gruppe konnte eine komplette MAP (Mitogen aktivierte Protein) Kinase Kaskade (MEKK1, MKK4/MKK5 und MPK3/MPK6) und Transkriptionsfaktoren, wie WRKY22/ WRKY 29, identifizieren, die der Erkennung von Flagellin durch den FLS2 Rezeptor nachgeschaltet sind (Abb. 1.4, Asai et al., 2002). Zur Identifizierung wurden MAPK Kandidaten transient exprimiert und Varianten von verschiedenen MAPK Mutanten genutzt. Der MAPK Signaltransduktionsweg wird auch von anderen MAMP/PAMPs genutzt (He et al., 2006). Die Aktivierung dieser MAPK Signalkaskade, leitet eine Resistenz gegen pathogene Bakterien und Pilze ein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass individuelle Pathogene über diverse Rezeptoren in der Plasmamembran Signalwege anschalten, die in der gleichen konservierten MAPK Kaskade zusammenlaufen (Asai et al., 2002). Für MPK6 wurde gezeigt, dass die basale und auch spezifische Resistenz gegen Pathogene durch „Gene silencing“ von MPK6 vermindert wird (Menke et al., 2004). In verschiedenen Arbeiten wurde berichtet, dass MEKK1 nicht für die flg22 oder ROS induzierte Aktivierung von MPK3/6, sondern eher an der Aktivierung von MPK4 beteiligt ist (Ichimura et al., 2006; Nakagami et al., 2006;

Einleitung

Suarez-Rodriguez et al., 2007). Desweiteren ist die flg22-induzierte Aktivierung von MPK3/4/6 abhängig von MKK1, während MPK3/6 auch durch MKK4 reguliert ist (Meszaros et al., 2006). Diese Studien weisen auf eine Beteiligung von mehr als einer MAPK Kaskade in der MAMP/PAMP Signaltransduktion hin (Abb. 1.4). Dabei scheint der MPK3/6 Signalweg für die MAMP/PAMP Antworten eine positive und MPK4 eine negative regulatorische Funktion zu übernehmen (Bittel und Robatzek, 2007).

Durch flg22 werden schließlich Transkriptionsfaktoren reguliert, die möglicherweise das oder ein Ziel der MAPK Kaskade darstellen. Die WRKY Transkriptionsfaktoren WRKY22, 25, 29, 33, und 53 werden in großem Maße durch Stimulierung mit flg22 hochreguliert (Zipfel et al., 2004). Wie oben beschrieben scheint es mindestens zwei MAPK Signalwege zu geben. Die Transkriptionsfaktoren WRKY22 und 29 wurden als ein Zielobjekt des MPK3/6, und WRKY25, 33 als Substrate für den MPK4 Signalweg identifiziert (Asai et al., 2002; Andreasson et al., 2005; Qiu et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass MPK4 in einem nukleären Komplex mit WRKY33 durch Aktivierung mit *Pseudomonas* oder flg22 ein Substrat MKS1 phosphoryliert, welches zu einer Synthese von antimikrobiellen Stoffen führt (Qiu et al., 2008).

Folglich gilt auch für die WRKY Transkriptionsfaktoren, dass sie die MAMP/PAMP-induzierte Transkription negativ und auch positiv regulieren. Erst kürzlich wurde der WRKY41 als ein wichtiger Schlüsselregulator zwischen dem Salizylsäure- und dem Jasmonsäureweg beschrieben (Higashi et al., 2008). WRKY 41 wird durch flg22, inkompatible- oder T3SS- (Typ 3 Sekretionssystem) defiziente Bakterien transkriptionell induziert.

Einleitung

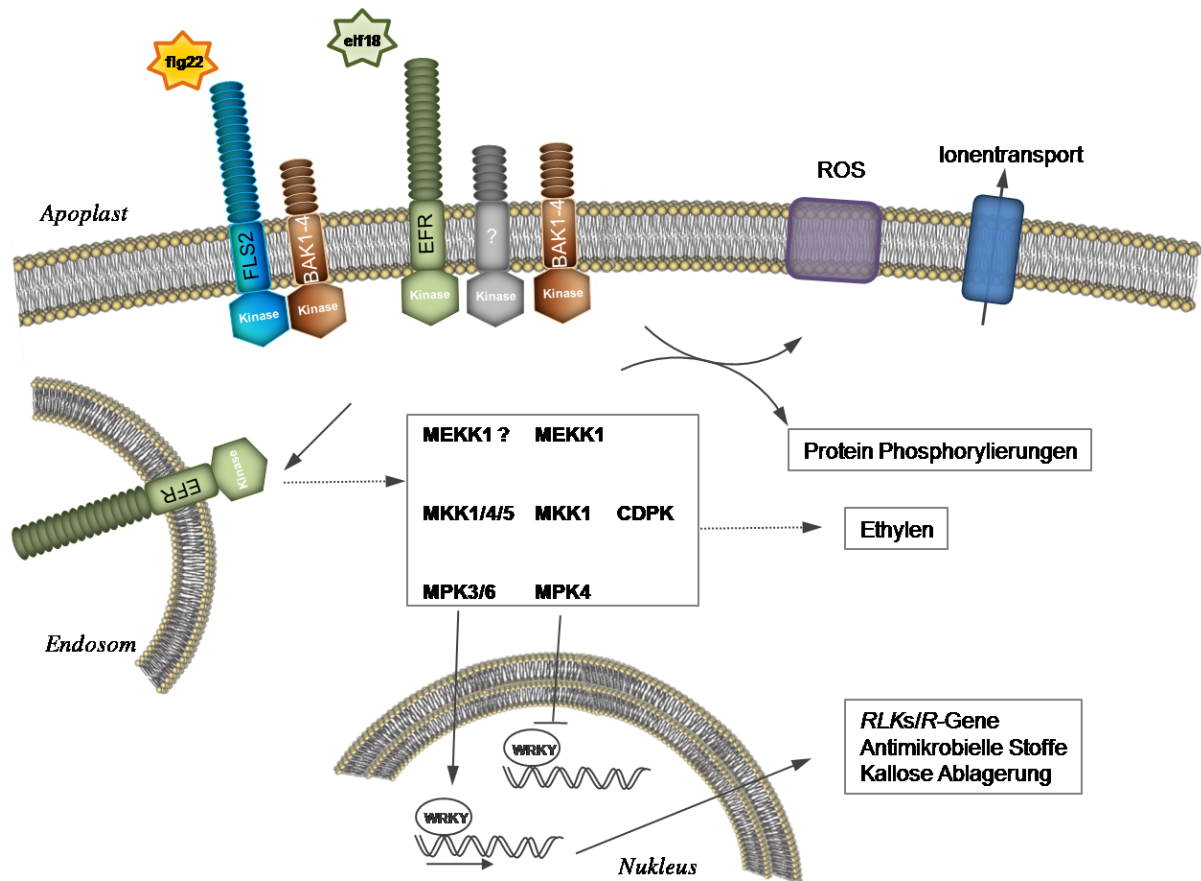


Abb. 1.4: Die zwei PAMPs flg22 und elf18 werden durch LRR-Rezeptorartige Kinasen (FLS2 und EFR) wahrgenommen, was zu einer basalen Immunität in *Arabidopsis thaliana* führt. Die Rezeptoren können umlokalisiert werden und in Endosomen akkumulieren. Durch die Aktivierung der Resistenzrezeptoren, werden mindestens zwei verschiedene MAP Kinase Kaskaden aktiviert, die WRKY Transkriptionsfaktoren im Nucleus positiv und negativ regulieren können. Die transkriptionelle Antwort beinhaltet die Hochregulierung von LRR-RLKs, R-Genen, die Produktion von antimikrobiellen Stoffen und die Ablagerung von Kallose. Desweiteren werden durch PAMP/MAMPs verschiedene Proteine phosphoryliert und die Ethylensynthese und die ROS Produktion stimuliert. Die gepunkteten Pfeile symbolisieren mögliche Signalwege.

Während der kompatiblen Interaktion von *Arabidopsis* und *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*), in der es zu Krankheitssymptomen kommt, konnte keine Induktion von WRKY41 detektiert werden. WRKY41 überexprimierende *Arabidopsis* Pflanzen zeigen eine konstitutive Expression des *PR5* Genes, welches mit den Salizylsäure induzierten Abwehrantworten assoziiert wird und eine Hemmung der Methyl-Jasmonat induzierten *PDF1.2* Genexpression, was auf eine Funktion in der Regulation der systemischen Immunität hinweist (Higashi et al., 2008). Für die WRKY11/17 und WRKY18/40/60 Transkriptionsfaktoren hingegen konnte gezeigt

Einleitung

werden, dass sie bei bakteriellen und pilzlichen Interaktionen mit Pflanzen eine negativ regulatorische Funktion in der basalen Immunität besitzen (Journot-Catalino et al., 2006; Xu et al., 2006; Shen et al., 2007). Für Homologe dieser WRKY Faktoren in Gerste konnte nachgewiesen werden, dass sie direkt mit dem R-Gen Produkt (MLA10) im Nukleus assoziieren, wenn der Resistenzrezeptor MLA 10 mit dem Avirulenzeffektor A10 des intrazellulären echten Mehltau Pilzes (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) interagiert. Durch die Erkennung des pilzlichen A10 Avirulenz Effektors im Nukleus, assoziieren der MLA10 Rezeptor und der WRKY Transkriptionsfaktor. Der hemmende Effekt des WRKY Faktors auf die basale Abwehr hebt sich durch Bindung von MLA auf (Shen et al., 2007). Eine ähnlich negativ regulatorische Interaktion, wie die Aufhebung von hemmenden Eigenschaften der WRKY Transkriptionsfaktoren durch Resistenzproteine, wurde auch für RIN4, welches für die RMP1 vermittelte spezifische Resistenz benötigt wird, beschrieben (Kim et al., 2005b).

Zu der Elizitor-induzierten Abwehrreaktion von verschiedenen Zellkulturzellen gehört die Produktion von Ethylen innerhalb der ersten Minuten und Stunden (Felix und Boller, 2003; Kunze et al., 2004). In der Ethylensignalkette konnte auch eine Beteiligung von MAPKinasen nachgewiesen werden (Chang, 2003). Nach Aktivierung der MAPKs durch Ethylen, führen diese über noch unbekannte Mechanismen zu einer Stabilisierung der Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL1, welche ohne Ethylen durch einen SCF Komplex degradiert würden, was auf eine Rolle im Ubiquitierungssignalweg hinweist (Guo und Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Ludwig et al., 2005). Ludwig et al. (2005) konnte eine Verbindung zwischen abiotischen und biotischen Stressantworten in *Nicotiana tabacum* nachweisen. Einer verkürzten Version der Kalzium-abhängigen Proteinkinase 2 (CDPK2), welche zu der Klasse der primären Kalziumsensoren gehört, fehlt die autoinhibitorische Kalziumbindedomäne. Diese Pflanzen zeigten nach einem abiotischen Stressstimulus die typische Reaktion auf biotischen Stress, wie die Synthese von ROS, die Induktion von Abwehr-spezifischen Genen und den Zelltod. Durch die Aktivierung von CDPK2 durch abiotische Stimuli wurden, abhängig von der Synthese und Perzeption von Ethylen, abwehrspezifische Gene aktiviert, wobei der Signalweg bestimmter MAPKinasen, aktiviert durch biotische Stimuli, umgangen werden konnte. (Ludwig et al., 2005).

Ein weiteres Protein welches in die Regulation der basalen Immunantwort involviert zu sein scheint kodiert für das glycinreiche RNA-Bindeprotein GRP-7 in *Arabidopsis thaliana*, welches im zirkadianen Rhythmus am Abend einen maximalen Transkriptionswert erreicht (Heintzen et al., 1997). In Keimungs- und Wurzelwachstumsversuchen reagierten *grp7* knockout Pflanzen auf ABA-Behandlung mit dem HR. Außerdem konnte eine signifikante Anreicherung von Transkripten, die ABA und Stress induziert sind (*RD29* und *RAB18*) festgestellt werden (Cao et al., 2006). In Versuchen mit dem PAMP flg22 zeigten *Atgrp-7* im Gegensatz zu Wildtyppflanzen eine deutlich reduzierte Ablagerung von Kallose (Fu et al., 2007).

1.3 Informationsübertragung innerhalb der Pflanze

Nach der Wahrnehmung eines Pathogens schaltet die Pflanzenzelle oft den Weg des HR (hypersensitive response) ein, der schnell zu einem lokalen Zelltod führt. Dieses Absterben des infizierten Gewebes schützt die Pflanze vor einer Ausbreitung des Pathogens. Zusätzlich zur HR nutzt die Pflanze Signalmoleküle, die zu einer systemischen Resistenz gegen weitere Infektionen noch nicht befallener Pflanzenorgane oder sogar benachbarter Pflanzen führen. Diese Immunität oder Resistenz nennt man SAR (systemic acquired resistance). In vielen Pflanzen wurde eine SAR nachgewiesen. Diese Resistenz ist langanhaltend und wirkt gegen eine ganze Reihe von Pathogenen, wie Bakterien, Pilze, Oomyzeten und Viren (Ryals et al., 1996; Sticher et al., 1997; Durrant und Dong, 2004). Mit der systemischen Resistenz SAR gehen die Aktivierung von einer großen Anzahl von Pathogenese bezogenen (PR: pathogenesis related) Genen in lokalen aber auch nicht infizierten (systemischen) Geweben einher (Ward et al., 1991; Maleck et al., 2000). Es ist noch nicht bekannt welches Molekül das systemische Signal vermittelt, das zur Resistenz führt, doch man nimmt an, dass die Genprodukte der *PR* Gene durch ihre gemeinsame Aktivität die SAR einleiten (Ryals et al., 1996).

1.3.1 Salizylsäure als Vermittler in der SAR Signaltransduktion

Seit langem wird das Phytohormon Salizylsäure (SA) als Signalmolekül in der systemischen Resistenz diskutiert (Beckers und Spoel, 2006). In lokalen und systemischen Geweben wurden nach viraler Infektion von Tabakpflanzen erhöhte endogene SA Werte gemessen, welche mit der Induktion von *PR* Genen korrelierten (Malamy et al., 1990). Ähnlich reagierten Gurkenpflanzen mit einer Erhöhung der SA Konzentration im Phloemsaft nach einer Infektion mit Viren oder Pilzen (Métraux et al., 1990). Auch der bakterielle Elizitor flg22 oder *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 mit einer gestörten TTSS (type three secretion system) Funktion induzieren nach 6 Stunden in *Arabidopsis thaliana* erhöhte Konzentrationen an SA (Tsuda et al., 2008). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von SA an der systemischen Resistenz gaben Experimente, in denen extern SA oder SA Analoga (2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) und benzothiadiazole S-methylester (BTH) appliziert wurden. In diesen Versuchen wurden die gleichen *PR* Gene wie bei einer natürlichen Infektion induziert (Métraux et al., 1991; Ward et al., 1991; Görlach et al., 1996; Lawton et al., 1996). Transgene Pflanzen, die das bakterielle *nahG* Transgen tragen, welches eine SA Hydroxylase kodiert, können kein SA akkumulieren, da das SA in das inaktive Katechol umgesetzt wird. Diese Pflanzen zeigen bei Infektion durch Pathogene keine Expression von *PR* Genen und verlieren ihre SA vermittelte Resistenz (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; Lawton et al., 1995).

1.3.2 Die zentrale Rolle von NPR1 in der SAR Signaltransduktion

In verschiedenen Screenings wurden mithilfe von *Arabidopsis* Mutanten, die in der SA abhängigen Signaltransduktion beeinflusst waren, die regulatorischen Gene *NPR1/NIM1/SAI1* (*n*on-expresser of *P*R. *G*enes/*n*on-inducible *i*mmunity/*s*alicylic *a*cid *i*nsensitive 1) identifiziert (Delaney et al., 1995; Glazebrook, 1999). Pflanzen mit einer Mutation in *NPR1* (*npr1*) reichern nach einer Infektion hohe Konzentrationen an SA an, aber es kommt zu keiner Aktivierung von *PR* Genen und die Pflanzen werden anfällig gegenüber vielen Pathogenen. Die *NPR1* Promotorregion enthält mehrere W-Box Motive, die als Bindestellen für pflanzenspezifische WRKY Transkriptionsfaktoren dienen. Mutationen in diesen W-Box Motiven hemmen die

Expression von *NPR1*, wodurch die SA induzierte *PR* Genexpression und letztendlich auch die Krankheitsresistenz in der Pflanze verloren geht (Yu et al., 2001; Beckers und Spoel, 2006).

Ein als Priming bekannter Prozess, in dem Pflanzen, die mit SAR induzierenden Stoffen konfrontiert wurden, mit einer potentierten Induktion von abwehrspezifischen Genen reagieren, geht in *npr1* Pflanzen verloren (Conrath et al., 2002; Kohler et al., 2002). Daraus kann man folgern, dass das konstitutiv expremierte *NPR1* ein wichtiger positiver Regulator der SA-abhängigen SAR ist und dass dieses Protein an dem SA vermittelten « Priming », welches zu einer gesteigerten Expression von abwehrspezifischen Genen führt, beteiligt ist. Durch das « Primen » oder auch « Rüsten » der Pflanze, kann diese nach einer darauf folgenden Infektion auf mehrere Stressstimuli, wie Pathogene, Insekten oder abiotischen Stress schneller und stärker reagieren. Unter anderem zeigten Katz et al., (2002), dass mit SA oder synthetischen SA Analoga vorbehandelte Petersilienzellkulturzellen auf den Elizitor Pep13 im externen Milieu mit einer Erhöhung der Kaliumkonzentration und einer verstärkten Alkalisierung im Vergleich zur nicht vorbehandelten Kontrolle reagierten (Katz et al., 2002). Auch die Synthese und Sekretion von Phytoalexinen (Katz et al., 1998) und die Aktivierung von verschiedenen Abwehr-spezifischen Genen (Thulke und Conrath, 1998) ist in « gerüsteten » Petersilien Zellsuspensionszellen nach Elizitorgabe potentiert.

1.4 Frühe Pathogenese der Pflanzenzelle

Der Kontakt zwischen Pflanzenzellen und inkompatiblen Bakterien führt in eine ganze Kaskade an degenerativen Änderungen, welche zum Zelltod führen können. Ein Kontakt mit PAMP/MAMPs allein, führt in den meisten Fällen zu keiner HR (Hypersensitive Reaktion). Tao et al., 2003 beschreibt die quantitative Natur der Interaktion von *Pseudomonas syringae* mit *Arabidopsis thaliana* in einem Modell (Nimchuk et al., 2003). Dabei laufen alle Änderungen in der Zelle unabhängig von der Stärke des Reizes und der Tatsache, dass sie zur HR führen oder nicht, ähnlich ab. Man kann diese Vorgänge in 3 Kategorien teilen: Änderungen an Membranen, im Zellmetabolismus und in der Zellfeinstruktur (Sigee, 1993).

Einleitung

In der Induktionsphase der inkompatiblen Interaktion von Bakterium und Pflanze sind eine Generierung von Sauerstoffradikalen, eine Peroxidierung von Membranlipiden beteiligt (Sigeo, 1993). Gefolgt werden diese Abwehrmaßnahmen von einer Sequenz von Ionenflüssen über der Membran. Diese führen innerhalb von 2 Stunden zu einer Depolarisation des Membranpotentials, zu einem Elektrolyt- und Wasserverlust und schließlich zur Zellplasmolyse (Pike et al., 2005).

In der kompatiblen Situation, das heißt wenn das Bakterium das Sicherheitssystem der Pflanze umgehen kann, findet keine Lipidperoxidierung statt. Es kommt jedoch auch zu einer Depolarisierung des Membranpotentials, zu einer apoplastischen Alkalisierung und zu einem verzögerten Ausstrom von Ionen und Metaboliten (Ersek et al., 1986). Nur in der kompatiblen Situation wird der Transport von Zuckern und Aminosäuren umgekehrt und aus der Zelle heraus gerichtet und es kommt zu Krankheitssymptomen und Nekrosen (Sigeo, 1993).

Die Membrandepolarisation und der Elektrolytverlust im inkompatiblen Fall, wurde erstmals von Cook & Stall (1968) und Goodman (1968) beschrieben und mit einer Erhöhung der Membranpermeabilität begründet. Der Elektrolytverlust beinhaltet in der Anfangsphase einen hohen Ausstrom von Kalium und es wurde vorgeschlagen, dass dies wiederum einen spezifischen passiven K^+/H^+ Austauschmechanismus aktiviert (Atkinson et al., 1990).

Zusätzlich zu dem bakteriell induzierten K^+/H^+ Austausch als Antwort auf *Pseudomonas syringae* pv *syringae* in Tabak Suspensionszellen konnte im gleichen Zeitrahmen, also nach 2-3 Stunden ein Kalziueinstrom gemessen werden, der durch EGTA und Kalziumkanalblockern, wie La^{3+} , Co^{2+} und Cd^{2+} , aber nicht durch Verapamil und Nifedipine geblockt wurde (Atkinson et al., 1990).

Pike et al. (1998) untersuchten das Membranpotential an Tabakblättern mit dem Elizitor Harpin des pathogenen Bakteriums *Erwinia amylovora* (Ea321) und verglichen dies mit einer Infektion mit dem Wildtypen Ea321 und auch mit Ea321 Bakterien, die in der Harpin Produktion defekt waren. Unabhängig von der Fähigkeit Harpin zu produzieren, führte eine Infektion mit Bakterien zu einer anhaltenden Depolarisation, hohem Elektrolytverlust und Nekrosen. Harpin allein dagegen zeigte nur eine schwächere Depolarisation. Nach einiger Zeit konnte eine Repolarisation des Membranpotentials beobachtet werden (Pike et al., 1998).

Für den pilzlichen Elizitor Cryptogein konnte sogar nachgewiesen werden, dass der induzierte Nitratausstrom in Tabakzellen eine essentielle Komponente in der

Cryptogein induzierten Signalkette zur Initiierung von Abwehrantworten und dem Hypersensitiven Zelltod ist (Wendehenne et al., 2002).

In der Induktions- und der darauf folgenden Latenzphase kommt es zur Induktion von spezifischen Enzymen, wie der lipolytischen Acylhydrolase, der Lipoxygenase, Peroxidase oder auch der Superoxid Dismutase. Die Induktion von Kinasen und Transkriptionsfaktoren ist in Teil 1.2 besprochen worden. Zu den feinstrukturellen Änderungen zählen lokale Zellwandverdickungen, Abbau der Chloroplasten, Abbau des Tonoplasten und eine Zelldisorganisation, später dann zusätzlich ein Kollaps des Protoplasten und Gewebeaustrocknung und –schrumpfung.

1.5 Elizitor-induzierte Ionenflüsse in der Pflanzen-Pathogen Interaktion

Die Rezeptor-vermittelten Reaktionen der Pflanze auf fremde Organismen setzen schon nach wenigen Minuten ein. Zu den ersten messbaren Antworten auf einen Pathogenbefall gehören die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies und Ethylen sowie eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration und ein Abfall in der Plasmamembranspannung.

1.5.1 Externe Alkalisierung durch Elizitoren

In zahlreichen Studien wird von einer extrazellulären Alkalisierung als Antwort auf Pathogene oder mikrobielle Elizitoren berichtet (Blein et al., 1991; Felix et al., 1993; Felle et al., 1996). Der Grund der Alkalisierung des Apoplasten ist noch nicht bekannt. Es wird eine Regulierung der Protonenpumpe (Felle et al., 1996; Felle et al., 1998) oder eine mögliche Alkalisierung durch die NADPH Oxidase diskutiert (Pugin et al., 1997). Vermutet wird auch, dass die Alkalisierung mit einem Ausstrom von Anionen in Verbindung stehen könnte (Felle et al., 1998; Felle et al., 2000).

Bei der Behandlung von Tabakzellen mit Elizitorextrakten kommt es neben einer extrazellulären Alkalisierung, einem Ausstrom von Kalium, Kalziumaufnahme und einer Membrandepolarisation auch zu einer zytosolischen Ansäuerung (Mathieu et al., 1994; Pugin et al., 1997). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch mit einer künstlichen Ansäuerung des Zytosols eine Stimulation von Enzymen

wie PAL (Phenylammoniumlyase) und OMT (O-diphenol methyltransferase) stattfindet, die eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen spielen (Mathieu et al., 1994). Auch für Pilz Oligochitin Elizitoren wurde eine zytosolische Ansäuerung in Wurzelhaaren von alfalfa (*Medicago sativa*) gezeigt (Felle et al., 2000). Dagegen alkalisiert bei den strukturell sehr nah verwandten Nod Faktoren das Zytosol, was möglicherweise auf eine wichtige Rolle des pH Wertes in der Aktivierung von Abwehr-spezifischen Genen hinweist (He et al., 1998; Felle et al., 2000).

1.5.2 Kalzium als Botenstoff in der Pflanzen-Pathogen-Interaktion

Die Anpassung an veränderliche Umweltbedingungen und Entwicklungsprozesse der Zellen muss durch ein Signalnetzwerk aus Rezeptoren, Nichtprotein-Botenstoffen, Enzymen und Transkriptionsfaktoren koordiniert werden. Nichtprotein-Botenstoffe, wie zyklische Nukleotide, Sauerstoffspezies, Lipide und Kalzium kommen im Gegensatz zu Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Enzymen in geringerer Vielfalt vor (Sanders et al., 2002). Abiotische oder biotische Stimuli, wie Abszisisäure (McAinsh et al 1992), Kälte (Carpaneto et al., 2007), oxidativer Stress (Price et al., 1994) oder der Pilzelizitor Cryptogein (Lecourieux et al., 2005) zeigten eine individuelle Kalzium Signatur in betroffenen Zellen (Sanders et al., 2002; White und Broadley, 2003; Lecourieux et al., 2006). Die Interpretation eines einzelnen Botenstoffs, wie Kalzium in so verschiedenen Stresssituationen, kann mit einer unterschiedlichen Dynamik oder der örtlichen Auflösung des Signals, dem Ursprung der Kalziumquelle, dazugehörigen Bindeelementen und der Regulation von Kalzium-permeablen Ionenkanälen erklärt werden (Sanders et al., 2002).

In einem der ersten Berichte über Elizitor-sensitive Kationenkanäle wird die Aktivierung eines Kalzium-permeablen Kanals in Tomatenprotoplasten beschrieben, der durch Pilzelizitoren und eine Hyperpolarisation der Membran aktiviert wurde (Gelli und Blumwald, 1997). Die Aktivität dieses Kanals wurde durch eine Phosphorylierung und von einem heterotrimerischen G-Protein moduliert (Gelli und Blumwald, 1997). In Petersilien (*Petroselinum crispum*) Protoplasten konnte durch einen Zellwandelizitor aus *Phytophthora*, Pep-13, aktivierter Kalzium-permeabler Kanal beschrieben werden, der jedoch bei depolarisierter Membran aktiviert wurde. Der Kanal besitzt eine sehr hohe Leitfähigkeit und konnte durch Lanthan geblockt

Einleitung

werden. Dieser Ionenkanal wurde LEAC (large conductance elicitor activated ion channel) genannt und ist reversibel aktiviert durch Pep-13 (Zimmermann et al., 1997).

In *Arabidopsis* Schließzellen konnten durch Hefe und Pilzelizitoren induzierte Kalziumeinströme gemessen werden, die teils vor die NADPH Oxidase und die folgende ROS Produktion (Blume et al., 2000), oder auch danach (Kawano und Muto, 2000) geschaltet waren. Auch wenn die Elizitor-induzierten Ionenkanäle mit einer hohen Kalziumleitfähigkeit beschrieben wurden (Gelli und Blumwald, 1997) fehlen bis heute Selektivitätsstudien. Auch sind bis heute keine ausschließlich Kalzium-selektiven Ionenkanäle in Pflanzen bekannt (Demidchik und Maathuis, 2007).

Weitere Studien zum Thema Kalziumsignale in der Pflanze und Pathogen Interaktion wurden mithilfe von direkten zytosolischen Kalziummessungen erlangt. Bis zur Entwicklung von optischen Methoden zum Aufnehmen von in vivo $[Ca^{2+}]_{cyt}$ Fluktuationen (zum Beispiel Plieth, 2001) war das Wissen über intrazelluläre Kalziumsignalwege sehr limitiert. Die meisten Studien basieren auf dem biolumineszierenden Protein Aequorin, welches durch Kalzium aktiviert wird (Knight et al., 1991; Mithöfer und Mazars, 2002). Aequorin Messungen reflektieren Messungen an ganzen Geweben und machen keine Einzelzellmessungen möglich.

Das bakterielle flg22 aus *Pseudomonas syringae* induziert ein zytosolisches Kalziumsignal in *Arabidopsis* (Lecourieux et al., 2005), führt aber nicht zu Zelltod und Nekrosen (Zipfel et al., 2004). Die flg22 vermittelte zytosolische Kalziumerhöhung in *Arabidopsis* scheint einphasisch zu verlaufen. Auch das Nekrosen bildende und Zelltod induzierende Cryptogein führt zu einer einphasischen zytosolischen Kalziumerhöhung in Tabak (Lecourieux et al., 2002). Kadota et al., (2004) zeigte jedoch einen zweiphasischen Kalziumpeak durch Cryptogein in Tabak BY-2 Zellen. Für Oligogalakturonide wurde ein zweiphasischer Peak in Tabakzellen gezeigt (Lecourieux et al., 2002). In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass das H_2O_2 aus der Kalzium-abhängigen Aktivierung der NADPH Oxidase möglicherweise auch wiederum an einer weiteren Aktivierung von Kalzium-permeablen Ionenkanälen in der Plasmamembran beteiligt ist. Durch Lokalisierung des Aequorinproteins in den Zellkernen von Tabakzellkulturzellen, konnten nukleäre Kalziumkonzentrationserhöhungen durch Lumineszenzmessungen detektiert werden. Lecourieux zeigte für Proteinelizitoren (flg22, Harpin und Cryptogein) ein

ausgeprägtes und über Stunden anhaltendes nukleäres Kalziumsignal im Gegensatz zu dem relativ kleinen Effekt von oligosaccharidischen Elizitoren. Das nukleäre Kalziumsignal war abhängig von der freien zytosolischen Kalziumkonzentration, Inositol-3-Phosphat und reaktiven Sauerstoffmolekülen (Lecourieux et al., 2005).

Reaktive Sauerstoffspezies und Kalzium

Arabidopsis besitzt wenigstens 6 Homologe zu dem humanen *gp91^{phox}*. Diese NADPH Oxidase Analoga *AtrbohA-F* (*A. thaliana* Respiratory Burst Oxidase Homologues) sind vermutlich für die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies in der Pflanzenimmunabwehr zuständig. Ein putatives EF-Hand Ca^{2+} - Bindemotiv in der n-terminalen Region des Proteins weist auf eine direkte Regulierung der NADPH Oxidase Aktivität durch Kalzium hin (Torres et al., 1998). *AtrbohD* und *AtrbohF* werden für eine volle ROS Produktion in der inkompatiblen Interaktion von *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*avrRPM1*) und *Arabidopsis thaliana* benötigt. Es konnte nach Infektion mit diesen Bakterien auch ein reduzierter Zelltod und ein reduzierter Elektrolytverlust in den *atrboh* Mutanten festgestellt werden. Paradoxerweise hatte *atrbohF* den stärksten Effekt auf den Zelltod, auch wenn in *atrbohD* Mutanten zu einem grösseren Anteil die ROS Produktion unterdrückt wurde (Torres et al., 2002). Sagi et al zeigten 2004, dass in *rboh* Mutanten das Redox Milieu gestört ist und dies in Tomatenpflanzen einen Einfluss auf die Wund-induzierte Expression von dem Proteinase Inhibitor II hat, welcher für die Wundantwort erforderlich ist. Desweiteren scheinen die Redoxintermediate eine zusätzliche Funktion im Wachstum und der Entwicklung der Tomatenpflanze zu haben. *Rboh* scheint also an der Signalvermittlung bei Stress und Entwicklungsprozessen beteiligt zu sein (Sagi et al., 2004). Durch Gabe von exogenen reaktiven Sauerstoffspezies kann die *Atrboh* Aktivität imitiert werden. Überraschenderweise hemmt der folgende Oxidative Burst in der Region der NADPH Oxiadaseaktivität den Zelltod umliegender Zellregionen. Da dieser Zelltod SA abhängig ist, wurde gefolgert, dass *Atrboh* generierte reaktive Sauerstoffspezies als Antagonisten in der SA abhängigen Einleitung des Zelltodes fungieren. Dies ist eine mögliche Erklärung wie im SA Signalweg, Zellen, die sich von der Infektionsstelle entfernter befinden von dem Zelltod verschont werden (Torres et al., 2005). Die root hair-defective *rhd2-1* Mutante besitzt eine unfunktionelle NADPH Oxidase *AtRBOH C*. In dieser Mutante sind

Einleitung

lokalisierte Oszillationen von reaktiven Sauerstoffspezies und dem extrazellulären pH-Wert gestört und führen zu einem Platzen der Wurzellhaare. Wahrscheinlich modulieren der pH-Wert und die ROS Zellwandeigenschaften, die das Wurzelwachstum unterstützen (Monshausen et al., 2007).

H₂O₂ kann einen Kalziumeinstrom in Tabakzellen hervorrufen (Price et al., 1994; Kawano und Muto, 2000; Negi et al., 2008). Beides, Kalzium und ROS werden zur Induktion des Zelltods benötigt (Levine et al., 1996).

In *Arabidopsis* Schließzellen aktiviert ABA Hyperpolarisations-aktivierte Kalziumkanäle in der Plasmamembran, die zu einem Kalziumeinstrom und einer zytosolischen Kalziumerhöhung führen (Hamilton et al., 2000; Pei et al., 2000). Auch konnte gezeigt werden, dass ABA ROS abhängig von der NAD(P)H Konzentration erhöht und dass ROS wiederum einen Hyperpolarisations-aktivierten Kalziumeinstrom induzieren (Pei et al., 2000). Interessanterweise, scheinen Hefeelizitoren und Chitosane, beide neben anderen Abwehrreaktionen, auch den von Pei et al (2000) beschriebenen Kalziumeinstrom in *Arabidopsis* Schließzellen zu aktivieren, dessen Aktivierung ebenso zytosolisches NADPH benötigt (Klüsener et al., 2002).

In der rezessiven ABA unempfindlichen Mutante *gca2* sind das ABA- und H₂O₂-abhängige Öffnen der Stomata und die Aktivierung von Kalziumkanälen durch H₂O₂ unterbrochen. Für den ABA-induzierten Stomaschluss scheint die ABA-induzierte Aktivierung von H₂O₂ und die H₂O₂-induzierte Aktivierung von Kalziumkanälen wichtig zu sein (Pei et al., 2000). Zwischen der ABA Perzeption und der ROS Produktion ist die Kinase OST1 geschaltet. In *ost1 Arabidopsis* Pflanzen war auch der flg22-induzierte Stomaschluss geblockt, was darauf hindeuten könnte, dass dieser biotische Stresstimulus an einem sehr frühen Punkt der Schließzellregulation eingreift (Melotto et al., 2006).

Der SV Kanal TPC1

Kalzium wird hauptsächlich in der zentralen Vakuole ausgewachsener Pflanzenzellen gespeichert (Pottosin und Schönknecht, 2007). TPC1, auch als der SV (slow vacuolar) Kanal bekannt, ist ein unselektiver Kationenkanal aus *Arabidopsis thaliana* und ein interessanter Kandidat für den Kalziumausstrom von der Vakuole in das Zytosol, (Peiter et al., 2005). Ranf et al (2008) zeigten in *Arabidopsis* Pflanzen, die

Einleitung

keinen TPC1 Kanal exprimierten (*tpc1*), dass die Kalziumsignale verschiedener abiotischer und biotischer Stressesstimuli nicht sichtbar beeinflusst waren. Auf der anderen Seite konnte kürzlich für die *fou2* (*fatty acid oxygenation upregulated2*) *Arabidopsis* Mutante, die eine „missense“ Mutation im putativen Spannungssensor von TPC1 trägt, eine erhöhte Resistenz gegen den Pilz *Botrytis cinerea* ein stark erhöhter Jasmonatgehalt nachgewiesen werden (Bonaventure et al., 2007). Die Resultate von Bonaventure et al. und die Tatsache, dass der SV Kanal unter physiologischen Bedingungen nicht geöffnet ist, weisen darauf hin, dass es andere zytosolische Faktoren geben muss, die den Kanal so modulieren, dass die Spannungsabhängigkeit in den physiologischen Bereich verschoben wird. Tatsächlich wird TPC1 durch eine ganze Reihe physiologischer Parameter, wie die Membranspannung, Kalium, Kalzium, Magnesium, Protonen, reduzierende- und oxidierende Agenzien, Schwermetalle, zytosolische Anionen, 14-3-3 Proteine und Antibiotika moduliert (Scholz-Starke et al., 2005; Pottosin und Schönknecht, 2007 und beinhaltende Referenzen). Andererseits konnte für den TPC1 Kanal aus Reis (OsTPC1) nach transienter Expression in Zwiebelepidermiszellen gezeigt werden, dass dieser in der Plasmamembran lokalisiert ist (Kurusu et al., 2005). Dieselbe Forschergruppe stellte in Experimenten fest, dass OsTPC1 an der Elizitor-induzierten Abwehrantwort in Reiszellen beteiligt ist. Es wurde berichtet, dass er die Sensitivität zum Elizitor beeinflusst und dass dieser Kanal sogar eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kaskade und dem HR spielt (Kurusu et al., 2005). In BY-2 Tabakzellkulturen wurde gezeigt, dass der Kalzium-permeable TPC1 Kanal in der Cryptogein-induzierten zytosolischen Kalziumerhöhung beteiligt ist (Kadota et al., 2004a).

Zyklische Nucleotid-gesteuerte Ionenkanäle - CNGCs

In der Effektor-vermittelten Resistenz spielt der HR eine zentrale Rolle. *Arabidopsis* Pflanzen, die im *DND1* Locus eine Mutation tragen, zeigen keinen HR mehr. Die charakteristischen Antworten auf *Pseudomonas syringae*, wie die Induktion von PR Genen und eine starke Hemmung des Pathogenwachstums bleibt jedoch erhalten. Zusätzlich weisen *dnd1* Pflanzen eine weit erhöhte Resistenz gegen zahlreiche virulente pilzliche, bakterielle und virale Pathogene auf. SA induzierte Stoffe und Transskripte von PR's sind in der *dnd1* Mutante konstitutiv erhöht. Die permanente

Einleitung

Aktivität der SAR ohne sichtbaren Zelltod zeigt, dass auch in der Abwesenheit der HR eine starke Hemmung des Pathogenwachstums erreicht werden kann (Yu et al., 1998). Ein Jahr später fand dieselbe Forschergruppe, dass *DND1* für einen unselektiven Kationkanal kodiert (Clough et al., 2000). Das CNGC2 (cyclic nucleotide-gated ion channel2) Protein leitet Ca^{2+} , K^+ und andere Kationen (Leng et al., 1999). Durch Einfügen eines nahG Transgens im Hintergrund der *dnd1* Mutante wird der SA-Gehalt reduziert. SA wurde für die erhöhte Resistenz verantwortlich gemacht, jedoch wurden der typische Zwergwuchs und der Verlust der HR auch in nahG transformierten Pflanzen, nicht aufgehoben. Die Störung eines zyklischen Nukleotid gesteuerten Kationkanals kann also eine Breitspektrumresistenz und die Blockierung der HR hervorrufen (Clough et al., 2000). Ali et al. (2007) konnten zeigen, dass CNGC2/DND1 Ca^{2+} in die Zelle leitet. Zellen von *cngc2* weisen keine Kalziumströme auf und leiten nicht den HR ein. Durch Applikation von NO konnte dieser Phänotyp komplementiert werden, weswegen die Arbeitsgruppe folgerte, dass NO als Signalmolekül downstream vom Kalziumsignal eingreift. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der bakterielle Elizitor Lipopolysaccharid (LPS) die CNGC2 vermittelten Kalziumströme induzieren kann (Ali et al., 2007).

1.5.3 Anionenkanäle / -transporter in der Pflanzen-Pathogen Interaktion

Anionenkanäle kommen in allen beschriebenen Pflanzenmembranen vor, wie Plasmamembran, Tonoplast, Endoplasmatisches Retikulum, Chloroplasten und Mitochondrien. Die Kanalaktivitäten und Regulationsmechanismen sind im Gegensatz zu den dazugehörigen Genen sehr gut untersucht. Erst kürzlich konnte zum Beispiel für das pflanzliche Tonoplastenprotein AtCLCa, eine direkte Transportfunktion von Nitrat und eine Funktion in der Nitratspeicherung in der Vakuole nachgewiesen werden (de Angeli et al., 2006). Zu den zahlreichen Funktionen von Anionenkanälen gehören Pflanzenernährung, Osmoregulation der Zelle, die Kompartimentalisierung von Metaboliten, Metalltoleranz und Signalfunktionen (z.B. in Schließzellbewegungen oder auch in Pflanzen- und Pathogeninteraktionen; (Barbier-Brygoo et al., 2000; de Angeli et al., 2007).

Einleitung

Roberts (2006) unterteilt die Pflanzenanionenkanäle prinzipiell in 3 Klassen, abhängig von ihrer Spannungsabhängigkeit, Mechanosensitivität und Lichtaktivierung auf.

Die am intensivsten studierten Anionenkanäle gehören zu den Depolarisations-aktivierten Anionenausstromkanälen. Man nennt sie, abhängig von ihrer Aktivierungskinetik R-Typ (rapid-activating) oder auch S-Typ (slow-activating) Anionenkanäle (Roberts, 2006). Öffnen Anionenkanäle, würden die Anionenkonzentrationen in der pflanzlichen Zelle und der elektrische Gradient zu einem passiven Ausstrom von Anionen führen (Barbier-Brygoo et al., 2000). Der R-Typ Anionenkanal ist stark permeabel für Nitrat, aber auch im kleineren Maße für Chlorid und Malat. Bei verschiedenen Pflanzenarten wurden bei Anionenströmen unterschiedliche Regulationen durch den pH-Wert (Barbara Schulz-Lessdorf, 1996), intrazelluläres ATP (Colcombet et al., 2001) und anderen pharmakologischen Inhibitoren festgestellt (Marten et al., 1992; Hedrich und Marten, 1993; Thomine et al., 1997). S-Typ Anionenkanäle besitzen ebenfalls eine hohe Permeabilität für Nitrat, weniger für Chlorid und sind impermeabel für Sulfat. Sie weisen die gleiche Lokalisation wie R-Typ Kanäle auf (Schroeder, 1995). Ob es sich hier um ein und denselben Kanal mit verschiedenen Funktionsmodi handelt oder um zwei verschiedene Kanäle, ist noch nicht klar (Roberts, 2006 und beinhaltende Referenzen). Die Sensitivität von S-Typ Anionenkanälen für Proteinkinase Inhibitoren weist auf eine Aktivierung durch Phosphorylierung hin. CDPKs (Calcium deependent Protein Kinase) wie z.B. CPK3 und CPK6 werden für die Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle durch ABA und Kalzium in *Arabidopsis* Schließzellen benötigt (Mori et al., 2006). In der Doppelmutante *cpk3cpk6* war z.B. das Kalzium-abhängige Schließen der Stoma reduziert. Diese Verbindung zwischen Kalziumsignalwegen und Anionenkanälen könnte auch für die frühen Signale in der Pflanzen Pathogen Interaktion interessant sein. Für die Elizitoren flg22 und das bakterielle Lipopolysaccharid LPS konnte ein ABA-abhängiger Stomaschluss gezeigt werden (Melotto et al., 2006). Einige Studien berichten über eine schnelle Elizitor-induzierte Plasmamembrandepolarisation und teilweise auch einer Aktivierung von Anionenkanälen (Ward et al., 1995; Pugin et al., 1997). Aber die Beziehung zwischen dem Kalziumeinstrom und Anionenaustrom ist bisher noch unklar. In einigen Fällen wird der Elizitor-induzierte Kalziumeinstrom durch Anionenkanalblocker inhibiert. Dies würde bedeuten, dass der Anionenaustrom dem Kalziumsignal vorrausgeht und

Einleitung

durch diesen reguliert wird (Ward et al., 1995). Möglicherweise könnten Anionenkanäle die Membrandepolarisation initiieren oder verstärken und dadurch Spannungs-abhängige Kalzium-permeable Kanäle aktivieren. Auch in *Vicia faba* Schließzellen konnte gezeigt werden, dass die ABA-induzierte Aktivierung von Anionenkanälen kein vorrausgehendes Kalziumsignal benötigt (Levchenko et al., 2005). Im Gegensatz dazu scheint in anderen Systemen ein Kalziumstrom vor der Aktivierung von Plasmamembrananionenkanälen zu stehen (Ward et al., 1995; Wendehenne et al., 2002). In Cryptogein behandelten Tabakzellkulturzellen resultierte die zytosolische Kalziumerhöhung nicht von der Plasmamembrandepolarisation, sondern schien ihr und damit auch einem Ausstrom von Anionen vorrauszugehen. Dies wiederum könnte zu einer Aktivierung von weiteren Spannungs-abhängigen Kalziumkanälen führen (Pugin et al., 1997; Wendehenne et al., 2002). In der HR-induzierenden Reaktion von Tabakzellen auf den pilzlichen Elizitor Cryptogein kommt es innerhalb einer Stunde zu einem schnellen und ausgeprägten Ausstrom von Nitrat, während dessen die Zelle etwa 60 % des zytosolischen Nitrats verliert (Wendehenne et al., 2002). Niflumsäure und NPPB stellten sich als die potentesten Anionenkanalblocker heraus, die nicht nur den Anionenausstrom, sondern auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die MAPkinase Aktivierung und die transkriptionelle Aktivierung von Abwehr-spezifischen Genen entgegenwirkten (Wendehenne et al., 2002). Die Verbindung zwischen dem HR und dem Anionenausstrom ist noch ungeklärt, doch aufgrund von Daten mehrerer verschiedener Systeme schlagen Garcia-Brugger et al. (2006) vor, dass der Anionenausstrom, wahrscheinlich in Kombination mit einem schnellen Kalziumsignal eine Membrandepolarisation verstärken, die wiederum Depolarisations-aktivierte Kalziumkanäle und Kaliumausstromkanäle aktivieren und zu einem massiven Kaliumverlust und konsequenterweise auch zu Wasserverlust führen (Garcia-Brugger et al., 2006). All diese Prozesse können die Zellschrumpfung, die ein typisches Ereignis im HR darstellt, erklären.

Die in Teil 1.4 beschriebene Membrandepolarisation durch den Elizitor Harpin von *Erwinia amylovora* (Pike et al., 1998) kann nicht durch einen Anionenefflux erklärt werden. In Einzelelektroden Spannungsklemmexperimenten an *Arabidopsis* Zellkulturzellen stellten El-Maarouf et al. (2001) eine Reduktion der Anionenströme fest. Ebenso unterstützen Daten von Reboutier et al., (2005), dass Plasmamembrananionenkanäle andererseits auch negative Regulatoren des HR

sein können. Es wurde gezeigt, dass der Harpin-induzierte Zelltod auch durch pharmakologische Agentien, die in *Arabidopsis thaliana* Chloridkanäle modulieren, imitiert werden kann (Reboutier et al., 2005). Auch durch die Kombination der Patch-Clamp Technik mit Anionenkanalblockern konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von R-Typ Anionenkanälen den Zelltod in der Immunantwort verzögert (de Angeli et al., 2007). Die Rolle der Anionenkanäle in der Pflanzen- Pathogen Interaktion ist also noch nicht geklärt und die bisher bekannten Studien weisen darauf hin, dass diese als positive oder auch negative Regulatoren in der Induktion des Zelltodes agieren können. Desweiteren bleibt offen, welche Rolle sie in der Induktion der basalen Immunität durch nicht-nekrotisierende Elizitoren wie flg22 oder elf18 spielen.

Erst kürzlich wurde ein neues Protein, SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL ASSOCIATED 1) gefunden, welches zu einer *Arabidopsis* Protein Familie gehört, die wahrscheinlich für die Regulierung der organischen und anorganischen Anionenhomöostase benötigt wird (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). *SLAH1* und *SLAH3* (*SLAC1 HOMOLOGUES*), konnten unter der Kontrolle des *SLAC1* Promotors den *slac1* Phänotyp komplementieren. Diese Proteine sind aber normalerweise nicht in Schließzellen lokalisiert, sondern in den Leitgeweben und *SLAH3* möglicherweise auch im Mesophyll (Negi et al., 2008). Für diese Homologen sind die Funktionen noch nicht bekannt und öffnen ein interessantes Feld auch für eine mögliche Beteiligung an dem Elizitor-induzierten Ausstrom von Anionen in zahlreichen verschiedenen Pflanzenzellen.

1.5.4 Die Rolle der Kaliumkanäle in der Pflanzenzellpathogenese

Kalium ist das häufigste Kation im Zytosol von pflanzlichen Zellen und macht etwa 10% des Trockengewichtes der gesamten Pflanze aus (Lebaudy et al., 2007). Die gute Verträglichkeit von hohen Kaliumkonzentrationen mit der Struktur und Funktionalität von Proteinen macht dieses Kation zum optimalen Kandidat für die elektrische Neutralisierung von anionischen Gruppen, zur Kontrolle des Membranpotentials und der Osmoregulation. Über den Kaliumein- oder Kaliumausstrom kontrolliert die Pflanzenzelle ihr Wasserpotential und damit ihren Turgor. Eine unter zahlreichen weiteren wichtigen Funktionen ist die Motorfunktion

Einleitung

von sich ausdehnenden oder schrumpfenden Zellen. Bei speziellen Bewegungen, wie dem Öffnen und Schließen der Stoma, aber auch in Immunabwehrantworten kommt es zu einem Ionenverlust und folgend zu einem Ausstrom von Wasser. Im Extremfall ist der Ionenverlust so hoch, dass die Zelle kollabiert und der Zelltod eingeleitet wird.

Bis heute sind aus *Arabidopsis thaliana* mindestens 35 Gene bekannt, die für Kalium Transportsysteme kodieren (Mäser et al., 2001). 3 Familien kodieren mit 15 Genen für Transporter, die den Transportprozess von K^+ über den elektrochemischen Protonengradienten energetisieren. Weitere 3 Familien kodieren mit 20 Genen für Kaliumkanäle, die einen passiven Ein- oder Ausstrom vermitteln. Die pflanzlichen Kaliumkanäle gehören zu den am besten untersuchten Ionenkanälen in Pflanzen. Anhand des Selektivitätsfiltermotives GYGD/E in der Porendomäne konnten hochselektive Kaliumkanäle gefunden werden. In zahlreichen wissenschaftlichen Übersichtsartikeln sind die Lokalisation, Regulation und die systematische Einteilung detailliert dargestellt (z.B.: Very und Sentenac, 2002; Gambale und Uozumi, 2006; Lebaudy et al., 2007). In verschiedenen Geweben in *Arabidopsis* und anderen Pflanzenarten wurden als Antwort auf Pathogene und PAMPs/MAMPs bakteriellen oder pilzlichen Ursprungs Kaliumtransportprozesse beschrieben. Blatt et al. (1999) konnten an Epidermisstreifen von Cf-9 transgenem Tabak, Schließzell Kaliumströme, die durch den Avr 9 Effektor, des Pilzes *Cladosporium fulvum* induziert worden sind, charakterisieren. Diese irreversibel aktivierten Kaliumkanäle waren spezifisch für die Cf-9 – Avr 9 - Interaktion und wurden in Wildtyp tabakpflanzen nicht gefunden. Innerhalb von 3-5 Minuten wurden nach Avr 9 Applikation die Kaliumeinwärtsgleichrichter fast komplett geblockt und die Auswärtsgleichrichter 2,5 bis 3 fach stimuliert (Blatt et al., 1999). Auch in *Arabidopsis* könnte es ähnliche Mechanismen in Schließzellen geben. Angesichts der Tatsache, dass PAMP/MAMP Rezeptoren, wie der bakterielle FLS2 Rezeptor für flg22 in Schließzellen und in allen anderen Geweben hoch expremiert sind, könnten auch in *Arabidopsis* Kaliumkanäle bei der Pathogenabwehr angesteuert werden (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Melotto et al., 2006). Melotto et al., (2006) zeigten z.B., dass Elizitoren wie flg22 und LPS ein ABA-abhängiges Schließen der Stoma verursachen, welche *Pseudomonas syringae* pv *tomato* und auch *Echerichia coli* abhängig vom bakteriellen Coronatin wiederöffnen können, um erfolgreich in das pflanzliche Gewebe einzudringen. In einer sehr neuen Arbeit konnte die Beteiligung von Kaliumkanälen an der PAMP-

Einleitung

induzierten Immunität in *Arabidopsis* Schließzellen nachgewiesen werden (Zhang et al., 2008). Diese flg22-induzierte Modulation von Kaliumkanälen wurde durch ein heterotrimerisches G-Protein GPA1 reguliert (Zhang et al., 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse kann ein Netzwerk von Signalketten, die biotische wie abiotische Stressstimuli in der Schließzellregulation verbinden, vermutet werden. Ebenso spielen MAPKinasen in der Vermittlung von Signalen in abiotischen, wie biotischen Stresssituationen eine Rolle (Ludwig et al., 2005; Mishra et al., 2006).

Auch in anderen Zelltypen als Schließzellen konnten Elizitor induzierte Kaliumströme nachgewiesen werden. In *Arabidopsis* Wurzelzellen fanden Ivashikina et al., 2001, dass GORK (guard cell outward rectifying K⁺ channel), AKT1 (Arabidopsis K⁺ transporter₁) und AtKC1 (Arabidopsis thaliana K⁺ conductance) die Repolarisation des Plasmamembranpotentials nach einer Pilz-Elizitor Behandlung vermitteln.

Auch ein Glykopeptidelizitor eines Pathogens der Erbse induziert neben einer schnellen Alkalisierung, einen Ausstrom von Natrium und Kaliumionen in das extrazelluläre Medium (Amano et al., 1997).

Immunität induzierende Abwehrreaktionen, wie Läsionen scheinen einen Kaliumausstrom zu beinhalten und finden in fast allen Geweben der Pflanze statt. Angesichts des Expressionsprofils der bis jetzt bekannten Kaliumselektiven Ionenkanäle (z.B.: Lebaudy et al., 2007) kann wohl keiner allein für den Elizitor-induzierten Kaliumausstrom verantwortlich sein.

Weitere Möglichkeiten für Leitfähigkeiten, die einen Kaliumausstrom vermitteln können, wären unter anderen nicht selektive Kationenkanäle oder auch Multidrug Efflux Proteine. In *Zea mais* wurde durch eine mRNA Expressionsanalyse ein Gen gefunden, welches durch Pathogenabwehr induziert wird und mit der bakteriellen Multidrug Efflux Protein Familie aus *E.coli* nah verwandt ist. Es wurde vorgeschlagen, dass der Prototyp dieser neuen Klasse von Pflanzenabwehrproteinen, Zm-Mfs1, eine Rolle im Export von antimikrobiellen Komponenten von der Pflanze oder auch der Mikrobe spielen. Weitere Funktionen könnte dieses Transportsystem in der Vermittlung des Kaliumausstroms oder der Wiederaufnahme von Kalium haben (Simmons et al., 2003).

1.6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die elektrophysiologische Untersuchung der Rolle von Ionenströmen über der Plasmamembran von *Arabidopsis* Wurzel- und Blattzellen in der frühen Interaktion zwischen Pflanze und Mikroorganismus.

Hierbei sollte die Einstichttechnik mit Mikroelektroden in Wurzelhaaren und Mesophyllzellen angewendet werden. Es sollte untersucht werden, inwiefern sich die elektrischen Antworten von wurzelassoziierten, Tumor-induzierenden oder pathogenen Bakterien unterscheiden.

Aus bakteriellen Extrakten wurde das bakterielle Flagellin isoliert oder auch chemisch hergestellt. Die Flagelline der verschiedenen Bakterien zeigten an der Membran unterschiedliche Antworten. Die Änderungen der Membranspannung durch das Flagellin von pathogenen Pseudomonaden sollten charakterisiert werden. Die Frage, welche Ionenströme zur Depolarisation beitragen, sollte beantwortet werden. Hierzu wurden zu der Einstichttechnik mit Mikroelektroden, auch transgene *Arabidopsis* Pflanzen, die das kalziumsensitive Aequorinprotein exprimieren, zur Charakterisierung eines möglichen Kalziumsignals verwendet. Eine Kombination von Einstichttechnik und Kalziumimaging mit einer Lumineszenzkamera sollte tiefere Einblicke in den Zusammenhang zwischen Kalziumsignal und Membrandepolarisation geben. Um die Ionenspezies zu identifizieren, die an den PAMP/MAMP induzierten Membranspannungsänderungen beteiligt sind sollten mehrere Methoden angewendet werden. Neben Blocker- und Ionenkonzentrationsstudien in der Messlösung, sollte auch die nicht invasive MIFETM Technik mit ionenselektiven Elektroden (H^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{++}) angewendet werden.

Weitere elektrophysiologische Untersuchungen sollten mittels Patch-Clamp Technik an *Arabidopsis* Mesophyll und Wurzelprotoplasten und mittels Einstichmessungen mit doppelläufigen Mikroelektroden in Zellkulturzellen, die auf PAMP/MAMPs mit einer Alkalisierung reagieren, zur Aufschlüsselung möglicher Stromantworten durchgeführt werden. Desweiteren sollten zahlreiche *Arabidopsis* Mutanten auf ihre elektrische Antwort auf PAMP/MAMPs hin untersucht werden, die in Ionen transportmechanismen oder in weiteren Signalwegen der Pflanzen-Mikroben Interaktion involviert sind.

2. Material und Methoden

2.1 Anzucht von Pflanzen- und Bakterienmaterial

2.1.1 Anzucht der für Mesophyllexperimente verwendeten Pflanzen

Die *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden auf Erde (Einheitserde Typ GS90, Gebrüder Patzer, Simtal-Jossa, Germany) im Gewächshaus bei einem Tag/ Nacht Rhythmus von 9 h/15 h angezogen. Zur besseren Einstellung kontrollierter Wachstumsbedingungen wuchsen die Pflanzen während der Sommerzeit in einer Klimakammer bei einem Tag/Nacht Rhythmus von 9 h (T=22 °C)/ 15 h (T=16 °C). Die Photonenflussdichte betrug in den Kammern $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die Rosettenblätter von 6 bis 10 Wochen alten nicht-blühenden *Arabidopsis* Pflanzen verwendet.

2.1.2 Samensterilisation und Aussaat für Wurzelhaarexperimente an Arabidopsis Keimlingen

Wildtyp-Samen von verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen (Col-0, Ws-0) wurden oberflächensterilisiert. Dazu rotierten die Samen 20 min in Ethanol mit einem Rotationsmischer. Nach Entfernung des Ethanols rotierten die Samen in 5% NaClO und 2% Triton X 100 präzise weitere 5 min weiter. Anschließend wurden die Samen unter der Sterilbank 5 Mal mit sterilem Wasser gewaschen und zum Trocknen ausgestrichen. Nach einigen Stunden wurden die sterilisierten Samen auf 0,8% (w/v) Gellan Gum (Sigma-Aldrich, USA) in 50% MS Medium (Prod.Nr.M0255.0050, Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) gelöst. Die Samensuspension überführten wir in Petrischalen (\varnothing 4 cm) (2-3 Samen/Schale), die mit wasserdichtem, luftdurchlässigen Parafilm verschlossen wurden. 6 bis 8 Tage zogen wir die Keimlinge in einer Klimakammer mit einem Tag/ Nacht Zyklus von 16 h (T=22 °C)/ 8 h (T=16 °C) und einer Photonenflussdicht von $140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.1.3 Tabak-Zellkultur

Nicotiana tabaccum cv. *Xanthi* Zellkulturzellen wurden in Erlmeyerkolben (300 ml) auf Rotationsschüttlern (New Brunswick Scientific, NJ, USA) bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 100 rpm in 100 ml LS Medium pH 5,8 (Linsmaier, 1965) unter kontinuierlicher Beleuchtung mit Leuchtstoffröhren und konstanter Temperatur (24 C) angezogen. Die Kulturen wechselten jede Woche in frisches Medium. Hierbei wurden 20 ml der Vorwochenkultur in 80 ml des frisch sterilisierten LS Mediums pipettiert. Als Qualitätsmerkmal der Zellkultur diente die Färbung, wobei die Kulturen eine gelblich-hellgrüne und keine graue Färbung besitzen sollten. Für die Experimente verwendeten wir 3 Tage alte Schüttelkulturen.

2.1.4 Bakterienkulturen

2.1.4.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobakterien C58 WT die keine Antibiotika-Resistenz besaßen und bei -80°C lagerten, wurden zum Animpfen von 3 ml YEB Medium in 15 ml Falkons verwendet. Durch Schütteln über Nacht bei 27-28°C erfolgte die Bakterienvermehrung in der Suspension.

2.1.4.2 *Azospirillum brasilense*

Die *Azospirillen-Experimente* führten wir mit dem Kanamycin-resistenten Stamm *Azospirillum brasilense* sp7p519ngfp durch. Die mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP transformierten *Azospirillen* zeigten gutes Wachstum und konnten mittels der GFP-Fluoreszenz (630 nm) identifiziert werden. 3 ml der *Azospirillen*kulturen schüttelten in 15 ml Falconröhrchen bei 27°C maximal 2-4 Tage lang, bevor sie wieder in frisches Kulturmedium umgesetzt wurden. Zur Anzucht verwendeten wir ein Minimalmedium, welches hauptsächlich für *Azospirillum* und *Herbaspirillum* (MMAB-Medium) selektiv ist. Für Versuche verwendeten wir 1 bis 2 Tage alte Kulturen.

2.1.4.3 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000

Zur Herstellung einer Vorkultur schüttelten *Pseudomonas syringae* Kulturen in 3 ml Ansätzen (Kings Broth Medium) in 15 ml Falkonröhrchen bei 28°C in Gegenwart des Antibiotikums Rifampicin (50 µg/ml) über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in 50 ml Kings Broth Medium in einen Erlenmeyerkolben umgesetzt und für 2-3 Stunden bis zu einer optischen Dichte von maximal 0,2 geschüttelt.

2.1.4.4 Herstellung von Bakterienlysaten

Die Bakteriensuspension zentrifugierte 10 min bei 4°C und 2500 rpm (Beckman Coulter GS-15R). Nach Dekantieren des Überstandes überführten wir die Bakterien in ein neues Medium (jeweilige Messlösung). Dieser Waschschrift wurde 5 Mal durchgeführt.

Medien, wie YEB oder King's Broth Medium, die standardmäßig für die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Pseudomonaden* verwendet werden, enthalten Bestandteile von Hefezellen, die als Elizitoren schon in winzigen Mengen eine eigene Abwehrantwort hervorrufen können. In elektrophysiologischen Untersuchungen wurden noch in hohen Verdünnungen Membranpotentialänderungen durch diese Medien hervorgerufen. Bei Membranpotentialmessungen der zu testenden Bakterienkultur kann aus diesem Grunde schwerlich zwischen Potentialänderungen durch das Medium oder dem Bakterium unterschieden werden (eigene Ergebnisse). Aus diesem Grund eignen sich Medien, die bereits Elizitoren enthalten nicht für elektrophysiologische Messungen. Für unsere Versuche haben wir die Bakterienkulturen alle auf MMAB Medium angezogen, um Verunreinigungen von Komponenten anderer Organismen zu vermeiden.

Nach dem Waschen lysierten wir die Bakterien nun mit einem Ultraschallgerät (Branson Sonic Power, USA) mit Hilfe eines elektronischen Zeitgebers (Multifix) für 6 Mal 15 s lang. Dabei überlebten jedoch auch einige Bakterien, sodass für die Messungen sowohl Zelltrümmer, wie auch intakte Bakterien verwendet wurden. Für die Messungen wurden die bakteriellen Lysate auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0,5 eingestellt (Eine Ausnahme bildete *A.tumefaciens*, der auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt wurde).

2.2 Substanzen und Lösungen

Die Herstellung aller verwendeten Lösungen erfolgte ebenso wie die Durchführung der Experimente bei Raumtemperatur (20 – 25 °C). Unter osmometrischer Kontrolle (Vapor Pressure Osmometer 5500, Schlag GmbH, Bergisch Gladbach) wurde die Osmolarität der Lösungen wie in der jeweiligen Methode angegeben, eingestellt. Die pH-Werte der jeweiligen Lösungen wurden mit einem pH-Meter (Knick Digital-pH-Meter 646) überprüft und eingestellt.

2.2.1 verwendete Substanzen

2-N-Morpholino-ethan-sulfonsäure (MES, Sigma, Germany)
Ammoniumchlorid (NH₄Cl, Sigma A0171, Germany)
Ammoniumdihydrogenphosphat (NH₄H₂PO₄, Merck, Germany)
Ammoniumnitrat (AppliChem, Germany)
Auxin
Kaliumnitrat (KNO₃, Merck, Germany)
Bacto-Peptone
Biotin- D(+) (Sigma B4501, Germany)
Bis-Tris-Propane (BTP, Fluka, Germany)
Borsäure (H₃BO₃, Roth, Germany)
Bovum Serum Albumin (BSA, Sigma A3902, Germany)
Calcium D-gluconate = Gluconic acid (D) Hemicalcium salt (Sigma, Germany)
Calcium Ionophore I – Cocktail A (21048, Fluka, Germany)
Cäsiumchlorid (CsCl, Fluka)
Chloride Ionophore I – Cocktail A (24902, Fluka, Germany)
Coelenterazin (Synchem, Felsberg/Altenburg, Germany)
Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Germany)
D-Sorbitol (Merck, Germany)
Eisen-EDTA (Sigma, Germany)
Eisen(III)-Sulfat-Heptahydrat (FeSO₄, 7H₂O, Merck, Germany)
Glycerol (Merck, Germany)
Hefeextrakt (Merck, Germany)
Hydrogen Ionophore II – Cocktail A (95297, Fluka, Germany)

Material und Methoden

K-252a (Alexis®Biochemicals)
Kaliumchlorid (KCl, Sigma, Germany)
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4 , Sigma, Germany)
Kaliumhydroxid (KOH, Merck, Germany)
Kaliumjodid neutral (KI, Merck, Germany)
Kalziumchlorid (CaCl_2 , Sigma, Germany)
Kalziumnitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Merck, Germany)
Kobalt (II)-chlorid Hexahydrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany)
Kupferchlorid ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma, Germany)
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Sigma, Germany)
Lanthanum Chloride (LaCl_3 , Sigma, Germany)
Magnesiumchlorid (MgCl_2 , Sigma, Germany)
Magnesiumsulfat Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, AppliChem, Germany)
Mangan Chlorid Tetrahydrat $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma, Germany)
Mangansulfat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany)
Mannose, D(+) (Roth, Germany)
Myo-Inositol (Sigma, Germany)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4 , Merck, Germany)
Natriumhydroxid (NaOH, Merck, Germany)
Na-Malat (Sigma, Germany)
Natriummolybdat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma M1003, Germany)
Natriumnitrat (NaNO_3 , Merck, Germany)
Nickel Chloride hexahydrate ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma, Germany)
Niflumsäure (NA, Sigma N0630, Germany)
Nitrodiphenylaminobenzoessäure (NPPB, Sigma, Germany)
N-methyl glucamine (NMG, Sigma, Germany)
Okadaic acid sodium salt (RBI, MA, USA)
Polyvinylpyrrolidone (PVP, Sigma, Germany)
Potassium Ionophore I – Cocktail A (60031, Fluka, Germany)
Saccharose (Sigma, Germany)
Salizylsäure (SA, Merck, Germany)
Salpetersäure (Merck, Germany)
Salzsäure 37% (Merck, Germany)
Thiamine HCl (Sigma T4625, Germany)

Material und Methoden

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, Sigma, Germany)

Tryptone (AppliChem, Germany)

Zinksulfat-Heptahydrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany)

2.2.2 Stammlösungen

Stammlösungen der Anionenkanalblocker Niflumsäure und Nitrodiphenylaminobenzoessäure (NPPB) wurden an jedem Versuchstag frisch hergestellt. Die Blocker wurden dabei in 4% DMSO als 20 mM Stammlösungen angesetzt.

K-252a wurde als 10 mM Stammlösung in DMSO vor dem Experiment angesetzt.

Coelenterazin- Stammlösung: Es wurden Lösungen mit einer Konzentration von 500 μM in MeOH hergestellt und als Aliquots im Dunkeln bei -80°C bis zum experimentellen Einsatz gelagert.

2.2.3 Peptide

Die Struktur und Herstellung der Flagellinpeptide flg22^{Pst}, flg22^{Atum}, flg22- Δ 2 und des EF-Tu Peptid elf18 wurden detailliert in folgenden Publikationen beschrieben: (Felix et al., 1999; Kunze et al., 2004; Zipfel et al., 2004). Die Peptide wurden als 10 mM Aliquots in Wasser und 1 mg/ml BSA angesetzt und bei -80°C bis zum experimentellen Einsatz gelagert.

2.2.5 Medien

2.2.5.1 Pflanzenmedien

Linsmaier & Skoog Medium (LS medium) - für Nicotiana tabaccum cv. xanthi Zellkulturanzucht

Makroelemente

20.61 mM NH_4NO_3

18.79 mM KNO_3

1.50 mM $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$

1.25 mM KH_2PO_4

2.99 mM $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$

Mikroelemente

0.1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}, 2\text{H}_2\text{O}$

0.1 mM $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$

0.1 mM H_3BO_3

0.1 mM $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$

29.91 μM $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$

5.0 μM KI

1.03 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

0.10 μM $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$

0.11 μM $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$

Vitamine

100.0 mg l^{-1} Myo-Inositol

0.40 mg l^{-1} Thiamine HCl

Hormone

0.22 mg l^{-1} Auxin

0.18 mg l^{-1} Cytokinin

Saccharose 30 g L^{-1}

Sussman Original Medium für Hydrokultur von Arabidopsis thaliana

Makroelemente

2,5 mM NaNO_3

2,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

2 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

2 mM $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$

Mikroelemente

0,1 mM FeNaEDTA

25 μM CaCl_2

25 μM H_3BO_3

2 μM ZnSO_4

0,5 μM CuSO_4

0,2 μM Na_2MoO_4

0,01 μM CoCl_2

2.2.5.2 Bakterielle Medien

*MMAB - Minimalmedium für **Azospirillum brasilense***

3 g/l KH_2PO_4
1 g/l NaH_2PO_4
1 g/l NH_4Cl
0,3 g/l $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$
0,15 g/l KCl
0,01 g/l $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$
0,0025 g/l $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$
5 g/l Na-Malat
0,005 g/l Biotin gelöst in KOH
0,2 ml Mikroelementlösung SL-6 (nach DSMZ)

Mikroelementlösung SL-6 (nach DSMZ):

0,1 g $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$
0,03 g $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$
0,3 g H_3BO_3
0,2 g $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$
0,01 g $\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$
0,02 g $\text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$
0,03 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

In 1 l demineralisiertem Wasser gelöst

*YEB Medium für die Anzucht von **Agrobacterium tumefaciens***

5 g Trypton
5 g Hefe
5 g Saccharose
12,324 g $\text{MgSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$
In 1000 ml destilliertem Wasser lösen

Material und Methoden

King's Broth Medium zur Anzucht von Pseudomonaden

10 g Bacto Peptone (DIFCO)

5 ml Glycerol (=1% (v/v))

8 mM KH_2PO_4

6 mM $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$

In 500 ml destilliertem Wasser lösen und mit KOH auf einen pH Wert von 7,2 eingestellt.

2.3 Membranpotentialmessungen

2.3.1 Einstichmessplatz für Experimente an Mesophyllzellen

Der mechanooptische Teil der Messapparatur umfasste die Badkammer mit dem Perfusionssystem und den hydraulisch-betriebenen Mikromanipulatoren (MO-103, Narashige, Tokyo, Japan). Diese Einheit befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch in einer Dunkelkammer, die mit einer CCD Kamera (VisiLuxx Imager, Visitron Systems, Germany, siehe Abb. 2.5) für Lumineszenzmessungen ausgerüstet war.

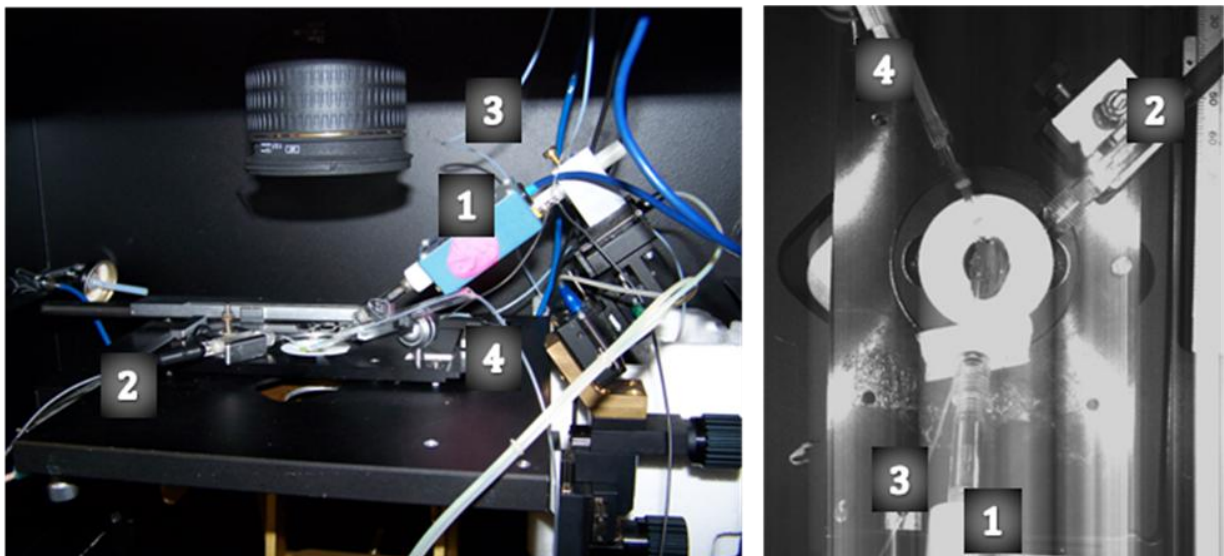


Abb. 2.1 Mikroelektrodeneinstichmessplatz in der Dunkelkammer einer Lumineszenzkamera. Teflonmessschälchen mit Mesophyllpräparat und in das Mesophyllgewebe eingestochener Potentialelektrode (1) und Referenzelektrode (2). Das Präparat wurde mit 2 seitigem Klebeband auf den Glasboden des Messschälchens fixiert. Die Perfusionslösung wurde mit einem Teflonschlauch (3) in die Kammer eingeleitet und mit einer Glaskapillare (4) abgesaugt.

Die Dunkelkammer diente gleichzeitig als eine Art Faradaykäfig. Die leitenden Bestandteile der Messeinheit wurden unter Vermeidung von Erdungsschleifen geerdet. Zur Beleuchtung der Messungen dienten kleine LED Lampen. Eine runde Teflonschale mit einem zentralen Glasboden (siehe Abb. 2.1), eingelassen in einen Messtisch, diente als Messkammer. In die Messschale führte ein Teflonschlauch, der für die Lösungszufuhr sorgte. Zur Applikationskontrolle der verschiedenen Lösungen

Material und Methoden

nutzte man ein elektrisches Schaltsystem, welches sich außerhalb der Dunkelkammer befand, um Störungen in den Messaufzeichnungen zu vermeiden. Zur Abfuhr der Badlösung wurde eine kanülenförmige Glaskapillare mit einem Teflonschlauch und einer Peristaltikpumpe verbunden. Das gleichzeitige Ziehen von Luft und Lösung gewährleistete einen konstanten Flüssigkeitsspiegel in der Messkammer, auch wenn die Lösungszufuhr variiert wurde. Das Kammervolumen von etwa 1 ml wurde mit einer Perfusionsrate von ca. 2 ml/min während der Messung kontinuierlich ausgetauscht.

Die elektronischen Elemente mit Ausnahme des Vorverstärkers waren außerhalb des Faradaykäfigs (Dunkelkammer) lokalisiert. Die Referenzelektrode tauchte nahe der Messelektrode in die Lösung und war am Verstärker geerdet. Der Messelektrodenhalter (siehe Abb. 2.1) war direkt an den Vorverstärker (HS-2A x 0.01, Axon Instruments, Union City, Ca., USA) gekoppelt, und dieser mit dem Verstärker (Axoclamp-2B, Axon Instruments Co) verbunden. Die präzise Positionierung der Mikroelektrodenpipette ermöglichte man durch einen hydraulischen xyz-Mikromanipulator (MO-103, Narashige, Tokyo, Japan). Zum Einstich in Mesophyllzellen wurde kein Mikroskop verwendet. Die Elektrode wurde blind in die Lösung eingetaucht und dann vorsichtig mithilfe des hydraulischen Mikromanipulators unter akustischer Kontrolle des Verstärkers langsam an das Gewebe herangeführt. Ein erfolgreicher Einstich zeichnete sich unter den gewählten Versuchsbedingungen (Badlösung: 0,1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM Mes/BTP pH6) durch einen Sprung von etwa -20 mV im Bad nach -180 mV im Zytosol einer Mesophyllzelle aus. Wird die Elektrode weiter in das Gewebe hineinbewegt, tritt die Elektrodenspitze in die Vakuole, was durch einen weiteren Potentialsprung von 20 mV nach etwa -160 mV sichtbar wird. In Langzeitexperimenten konnte es vorkommen, dass eine Zelle nicht die gewünschte Stabilität aufwies. Durch weiteres Eindringen der Elektrode in tiefere Gewebsschichten konnte mit einer anderen Mesophyllzelle die Messung ohne Probleme fortgeführt werden, da alle Zellen des Mesophyllgewebes ein elektrisches Kontinuum darstellen, da sie über Plasmodesmen miteinander verbunden sind.

Der Eingangswiderstand des Vorverstärkers betrug etwa $\sim 10^{13}$ Ω . In jedem Experiment zeichnete ein Schreiber das Membranpotential der Mesophyllzellen auf und mit einem ME Redlab interface (Meilhaus Electronic, Puchheim, Germany)

wurden die Daten digitalisiert und mit einem Computer erfasst. Die Daten wurden mit IGORPro (Wave Metrics Inc., Lake Oswego, OR, USA) ausgewertet und dargestellt.

2.3.2 Herstellung der Elektroden

Die Mikroelektroden zum Einstich in das Mesophyllgewebe oder in Wurzelhaare von *Arabidopsis thaliana* wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit einem Innenfilament (\varnothing außen 1.0 mm, \varnothing innen 0.58 mm, Hilgenberg, Malsfeld, Germany) in einem Zweischnitt-Protokoll mithilfe eines horizontalen Laserziehgerätes (P2000, Sutter Instruments Co, Novato, CA, USA) gezogen. Die Einstich-Elektroden wurden mit 300 mM KCl befüllt und waren über eine Ag/AgCl Halbzelle (chlorierter Silberdraht) mit dem Vorverstärker (HS-2A x 0.01, Axon Instruments, Union City, Ca., USA) verbunden. Die Einstichelektroden wiesen einen Spitzenwiderstand von 50-100 M Ω auf.

Als Referenzelektrode wurde die Spitze einer Kapillare mit einem Agarpfropfen verschlossen (300 mM KCl und 2% Agarose), mit 300 mM KCl luftblasenfrei befüllt und über eine Ag/AgCl Halbzelle mit der Erde des Verstärkers (Axoclamp-2B, Axon Instruments Co) verbunden.

2.3.3 Präparation der Mesophyllzellen

Einige Rosettenblätter wurden von einer 8 bis 10 Wochen alten *Arabidopsis* Pflanze mit einer Rasierklinge abgetrennt und die Mittelrippe heraus geschnitten. Mit einer feinen Uhrmacherpinzette zog man nun die Epidermis von der Blattunterseite ab. Anschließend musste man die Mesophyllstückchen in einer Messkammer auf den Glasboden mittels einem doppelseitigem Klebeband mit der adaxialen Blattunterseite nach oben fixieren. In etwas Standardmesslösung (0.1 mM KCl, 1 mM CaCl₂ und 1 mM MES/BTP pH 6.0) in der Messkammer, konnten sich die Blattstücke für mindestens 4 Stunden oder über Nacht von der Präparation erholen, bevor sie elektrophysiologischen Untersuchungen dienen.

2.3.4 Wurzelhaareinstichmessungen

Die, wie in Teil 2.1.2 beschrieben angezogenen, 6-8 Tage alten Keimlinge wurden mit je einem Tröpfchen Low Melting Point Agarose an der Wurzelspitze und an der Wurzelbasis befestigt. Darauf wurden die Keimlinge mit Standardmesslösung (0.1 mM KCl, 1 mM CaCl₂ und 1 mM MES/BTP pH 6.0) geflutet und sollten sich für mindestens 3 Stunden vor dem Einstichexperiment erholen.

Für die Wurzelhaarmessungen wurden die gleichen Elektroden wie für die Mesophyllmessungen verwendet. Allerdings wurde die Messelektrode in ein Wurzelhaar unter lichtmikroskopischer Kontrolle (Axioskop 2FS, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) unter Verwendung eines Immersionsobjektivs (Achromplan 40x/0,80W, Carl zeiss) eingeführt. Mit einem Mikromanipulator (Typ 5171, Eppendorf, Hamburg, Germany), kombiniert mit einem Piezoübersetzer (P-280.30, Physik Instrumente, Waldbronn, Germany), konnte die Mikroelektrode in das Wurzelhaar eingeführt werden. Die Elektrode war mit dem Mikroelektrodenverstärker (VF-102, Bio-Logic, Claix, France), der mit einem Vorverstärker mit einem Eingangswiderstand von $10^{11}\Omega$, verbunden war, gekoppelt. Die Filterung der Daten erfolgte bei einer Frequenz von 300 Hz mit einem 8-Pol Besselfilter (type 902, Frequency Devices, Haverhill Ma, USA). Das Membranpotential wurde unter der Kontrolle der Pulse Software (Heka, Lambrecht, Germany) aufgezeichnet und mit einem ITC-16-Interface (Instrutech, Corp., Elmont, NY, USA) digitalisiert. Mit den Software-Programmen Excel und IGORPro (Wave Metrics Inc., Lake Oswego, OR, USA) konnten die gespeicherten Daten ausgewertet und dargestellt werden.

2.3.5 Theorie zu den Membranpotentialmessungen

2.3.5.1 Das Membranpotential

Das Membranpotential in der Pflanzenzelle im Ruhezustand wird hauptsächlich von der Aktivität der P-Typ H⁺-ATPase und dem Kaliumgradienten über der Plasmamembran bestimmt. Neben dem Aufbau eines Membranpotentials beeinflusst die H⁺-ATPase auch den apoplastischen pH-Wert. Die Differenz zwischen dem Potential auf der zytosolischen Membranseite und dem Potential des extrazellulären Raums bestimmt die Membranspannung. Konventionell beträgt das extrazelluläre

Potential Null und da das Zellinnere negativer geladen ist, besitzt die Zelle ein negatives Membranpotential. Das Ruhepotential bezeichnet das Membranpotential im nicht erregten Zustand der Zelle. In Mesophyllzellen kann das Ruhemembranpotential negative Werte von mehr als -200 mV erreichen. In einer typischen Pflanzenzelle finden wir im Zytosol gewöhnlich eine Kaliumkonzentration von etwa 100 mM (Hedrich und Kudla, 2006). Als Gegenionen dienen Chlorid, Nitrat und unter anderen auch Malat, die in Konzentrationen von wenigen Millimolar bis etwa 50 mM in der Zelle vorkommen (Roberts, 2006 und beinhaltende Referenzen). Im Gegensatz dazu kommt Kalzium nur in Konzentrationen von 100 bis 200 nM (Bush, 1993) und Protonen im nano- bis mikromolaren Bereich vor.

2.3.5.2 Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung

Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (kurz: GHK-Gleichung) nach David E. Goldman, Alan Lloyd Hodgkin und Bernard Katz (Goldman, 1943) erlaubt die Berechnung des Membranpotentials unter Berücksichtigung mehrerer permeierender Ionen.

Unter Gleichgewichtsbedingungen ist die elektrochemische Triebkraft null. Die zufällige Ionenbewegung (Brownsche Molekularbewegung) führt zu einem Ausgleich der Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Zellmembran. Liegt ein Konzentrationsgradient eines Ions über der Membran vor, wird dieser durch eine elektrische Potentialdifferenz ausgeglichen und im Gleichgewichtszustand ergibt die Summe aller Ionenströme gleich null. Damit hängt die Gleichgewichtspotentialdifferenz (Ruhemembranpotential) über einer Zellmembran von den Ionenströmen aller permeablen Ionen ab.

Ionenstromamplituden hängen von der Membranspannung und der Ionenkonzentration ab und sind daher nur annäherungsweise zu berechnen. In der GHK-Gleichung wird das Membranpotential als Funktion der Ionenkonzentration und eines Koeffizienten, der sogenannten Permeabilität P angenähert. Die Permeabilität leitet sich vom Fickschen Diffusionsgesetz ab und ist der Quotient aus der Diffusionskonstanten und der Membrandicke.

$$U_M = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{p_{Na} \cdot [Na^+]_a + p_K \cdot [K^+]_a + p_{Cl} \cdot [Cl^-]_i}{p_{Na} \cdot [Na^+]_i + p_K \cdot [K^+]_i + p_{Cl} \cdot [Cl^-]_a} \quad (1)$$

R = allgemeine Gaskonstante

T = absolute Temperatur in Kelvin

F = Faradaysche Konstante

P = Permeabilität (siehe Text)

K = Kalium, Na = Natrium, Cl = Chlorid

z = Anzahl Ladungsträger (hier: z=1)

2.3.5.3 Membranpotentialänderungen

Kommt es zu einer Erregung der Membran, ändert sich das Membranpotential vorübergehend (Aktionspotential). In Pflanzen können diese Aktionspotentiale oder Membranpotentialänderungen viel langsamer als in tierischen Zellen ablaufen und Sekunden, Minuten oder gar Stunden anhalten (Volkov, 2006; Felle und Zimmermann, 2007). Der Transport von Ionen durch die Membran geschieht über transmembrane Proteine, wie Ionenkanäle oder Ionentransporter. Dieser Transport kann das Membranpotential beeinflussen.

Im Falle des Öffnens von Ionenkanälen, kommt es in Pflanzen unter physiologischen Bedingungen dem Konzentrationsgradienten folgend zu einem passiven Ausstrom von Anionen und Kaliumionen, oder zu einem Einstrom von Kalziumionen oder Protonen. Das Öffnen von Ionenkanälen ist jedoch auch von zahlreichen Faktoren, wie der Selektivität, der Spannungsabhängigkeit, der Permeabilität, der Regulierung durch zusätzliche zytosolische Faktoren und weiteren Eigenschaften des Kanals selber abhängig.

Die Änderung des Membranpotentials wird durch die Änderung der Permeabilität der Membran für bestimmte Ionen (in der Regel Kalium, Kalzium oder Anionen) oder durch ATPasen hervorgerufen.

Kommt es zu einer Depolarisation wird das Membranpotential weniger negativ, da Kationen auf die Seite mit dem negativen, oder Anionen auf die Seite mit dem positiven Potential strömen. Im Falle einer Hyperpolarisation wird das Membranpotential noch negativer, da sich entweder Kationen zum positiven Potential oder Anionen zum negativen Potential bewegen. Als Repolarisation wird die Rückkehr des Membranpotentials zum Ruhepotential nach einer Depolarisation bezeichnet.

2.3.5.4 Das Umkehrpotential

Als Umkehrpotential eines Ions bezeichnet man das theoretisch ermittelte Gleichgewichtspotential dieses Ions. Das heißt, durch den entsprechenden Kanal findet kein Nettostromfluss von Ionen (mehr) statt. Anhand der Nernst Gleichung kann man das Umkehrpotential (U_{rev}) des Ions bei bekannten Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran berechnen (2).

Bei einem Kalium selektiven Kanal zum Beispiel und einer absoluten Temperatur von 298, 15 K vereinfacht sich die GHK-Gleichung zur Nernst-Gleichung:

$$U_{rev} = 59,1mV \cdot \lg \frac{P_K \cdot [K^+]_a}{P_K \cdot [K^+]_i} \quad (2)$$

Aus der Gleichung ist zu entnehmen, daß sich das Umkehrpotential bei einer zehnfachen Konzentrationsänderung im externen Medium um 59,1 mV verschiebt.

Ebenso ist dies auch auf andere Ionen anwendbar. Zum Beispiel erhält man bei pH-Messungen ebenso eine Spannungsverschiebung von 59 mV, wenn sich die Protonen Konzentration um eine pH-Einheit verändert. Das Umkehrpotential der verschiedenen Ionen ist demnach abhängig von der Konzentration des permeierenden Ions auf beiden Seiten der Membran und seiner Wertigkeit.

Eine Abweichung des Membranpotentials von diesem „Gleichgewichtspotential“ des Ions verursacht eine treibende, elektromotorische Kraft, welche das Ion entweder in oder aus der Zelle treibt. (Bei jedem Überschreiten des Umkehrpotentials ändert sich die Stromrichtung über der Membran).

2.4 Biolumineszenzmessungen

Erste Messungen, mit ionensensitiven Farbstoffen zur Bestimmung von intrazellulären Ionenkonzentrationen, wurden mit dem Protein Aequorin aus der pazifischen Qualle *Aequorea forskalea* durchgeführt (Shimomura *et al.*, 1962). Aequorin zeigt Biolumineszenz, eine spezielle Form der Chemilumineszenz, d.h. die Lichtemission wird nicht durch Absorption von Licht stimuliert (wie bei der Fluoreszenz) sondern durch eine chemische Reaktion, in diesem Fall durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen. Wird derartiges Licht von Organismen mit arteigenen,

Material und Methoden

spezifischen Luminogenen enzymkatalysiert erzeugt, spricht man von Biolumineszenz. Derartig erzeugtes Licht ist monochromatisch, denn es wird bei einem diskreten Elektronenübergang abgestrahlt, kann aber durch sekundäre Leuchtfarbstoffe (z.B. durch fluoreszierende Proteine wie z.B. GFP bei Leuchtquallen der Gattung *Aequorea*) in längerwellige Spektralbereiche verschoben werden. Der Aequorin-Komplex besteht aus dem Apoaequorin-Protein mit einer Masse von 21 kDa, dem Luminophor Coelenterazin und molekularem Sauerstoff (Abb. 2.2). Aequorin besitzt drei Ca^{2+} -Bindestellen und luminesziert, sobald Ca^{2+} an mindestens zwei dieser Stellen bindet.

Bei der Ca^{2+} -Bindung wird CO_2 frei und Coelenterazin wird zu Coelenteramide oxidiert, wobei blaues Licht (466 nm) emittiert wird (Abb. 2.2). Aequorin kann in Gegenwart von Sauerstoff aus Apoaequorin und Coelenterazin regeneriert werden.

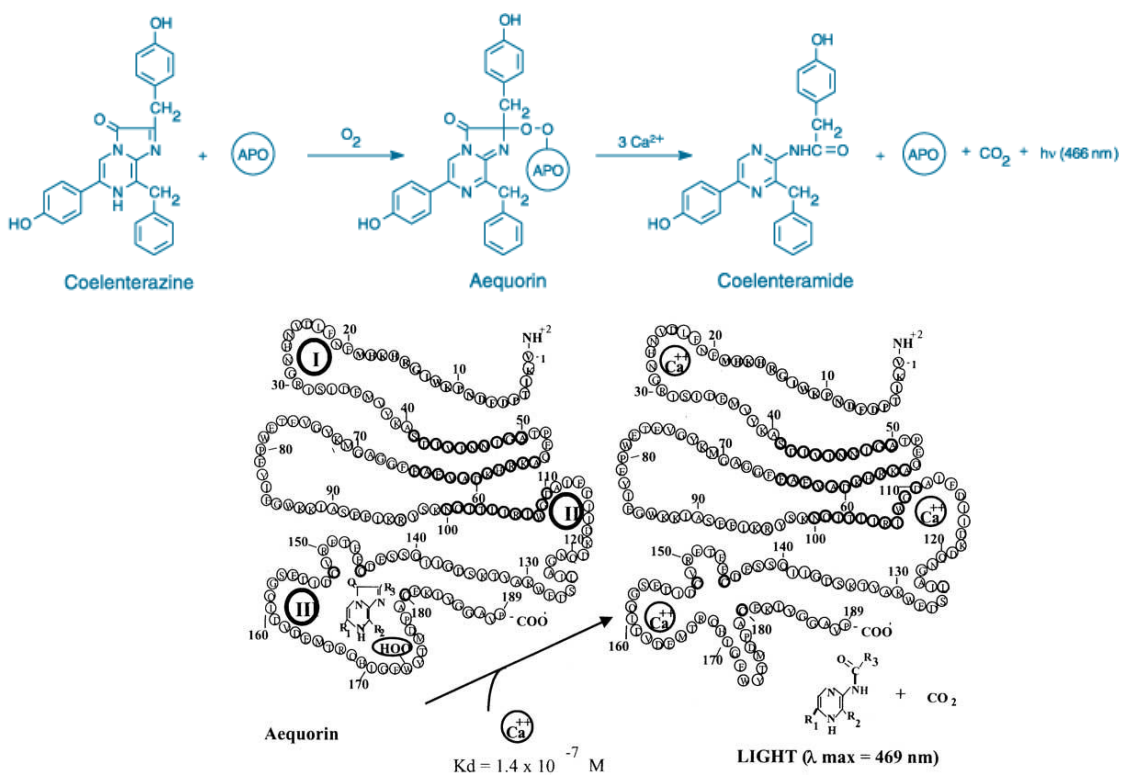


Abb. 2.2. Reaktionsschema der Ca^{2+} -induzierten Aequorin-Lumineszenz

Die Lumineszenz steigt monoton mit der Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration an, und zwar in einem Bereich zwischen ca. 10^{-7} und 10^{-4} M Ca^{2+} . Bei höherer Ca^{2+} -Konzentration wird $[\text{Ca}^{2+}]$ oft überschätzt, wenn es nicht homogen in der Zelle verteilt vorliegt. Bei geringen Ca^{2+} -Konzentrationen, die im Cytoplasma vorliegen, ist die

Messung nah an der Auflösungsgrenze des nativen Aequorin (3×10^{-8} M). Darüber hinaus vermindert die Anwesenheit von Mg^{2+} die Ca^{2+} -Sensitivität von Aequorin. Im Bereich von pH 6,6 bis 7,4 haben pH-Schwankungen dagegen keinen Einfluss auf die Lumineszenz. Innerhalb der Zelle kann Aequorin nicht in Organellen diffundieren, so dass spezifische Messungen der zytoplasmatischen Konzentration möglich sind.

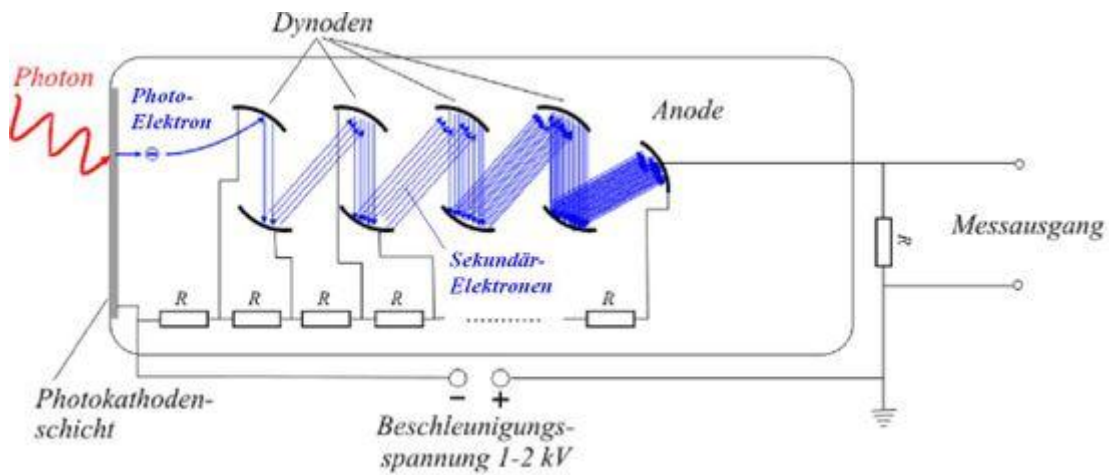
2.4.1 Meßprinzip und Meßaufbau der Photomultiplier

Ein Photomultiplier ist eine spezielle Elektronenröhre, die schwache Lichtsignale bis in zu einzelnen Photonen in ein elektrisches Signal umwandeln und dieses Signal hoch verstärken kann. Der Photomultiplier besteht aus einer Photokathode und einem nachgeschalteten Sekundärelektronen-Vervielfacher (Abb. 2.3 A und B).

Die Photonen treffen auf die Photokathode und geben Elektronen so viel Energie, dass diese in der Lage sind die Kathodenoberfläche zu verlassen. Durch eine positive Beschleunigungsspannung zur ersten und weiteren Dynoden werden durch die hohe kinetische Energie der Elektronen viele Elektronen aus den Dynodenoberflächen herausgeschlagen und nach der letzten Verstärkerstufe über die Anode abgeführt. Dieser durch Photonen ausgelöste Strom erzeugt über einen Messwiderstand eine Spannung die aufgezeichnet und in digitale Datenpunkte umgerechnet wird.

Für die Kalziumlumineszenz Experimente am Mesophyllgewebe, wurde der Luminoskan Ascent Photomultiplier (Luminoskan Ascent[®], Labsystems, Thermo Fisher scientific) (Abb. 2.4) verwendet. 96-well-Platten (Nunc N-167008) und ein computergesteuertes Injektionssystem mit zwei Dispensern (Abb. 2.4 rechts) ermöglichen Versuche in großer Anzahl und ergaben eine gute Reproduzierbarkeit.

A



B

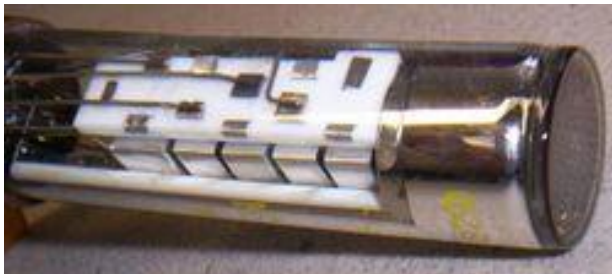


Abb. 2.3: A schematische Skizze eines Photomultipliers; B Photomultiplier, rechts das Eintrittsfenster mit Photokathode, in der Mitte die an Isolatoren befestigten Dynoden.

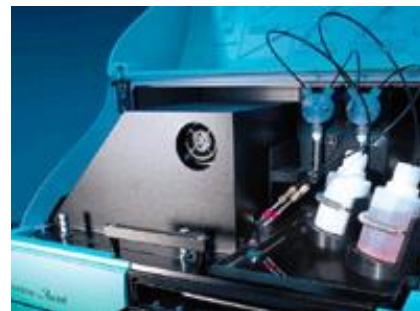


Abb. 2.4.: Luminoskan Ascent[®] Photomultiplier mit computergesteuertem Dispensersystem.

Für Lumineszenzexperimente an den sehr berührungsempfindlichen Protoplasten wurde ein Photomultiplier mit manuellem Injektionssystem verwendet.

2.4.2 Photomultiplierexperimente an Arabidopsis Mesophyllgewebe

Am Vorabend des Messtags oder mindestens 3-4 h vor dem Experiment wurde die Epidermis transgener *Arabidopsis thaliana* C24 Aequorin Rosettenblättern abgezogen und die Blattstückchen sofort in die Messlösung überführt (0,1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MES / BTP pH 6). 4 Stunden vor Versuchsbeginn erfolgte die Überführung der Blattstückchen in eine kalziumärmere Lösung (0,1 mM KCl, 0,1 mM CaCl₂, 1 mM MES / BTP pH 6) mit 2,5 µM Coelenterazin und möglichst in völliger Dunkelheit. Nach 4 Stunden mussten die jeweiligen Kammern der 96-well-Platte mit der Messlösung (0,1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MES / BTP pH 6) vorgelegt und jeweils mit einem Blattstückchen bestückt werden.

Über das Computerprogramm von Ascent wurden die Messkammern mit Name definiert und die Dispenser durchgespült, mit der zu testenden Substanz beladen und die Positionen und Injektionsgeschwindigkeiten der Dispenser festgelegt. Bevor das Experiment startete, musste das Blattstückchen eine niedrige und stabile Basislinie der Lumineszenz über 10% der Versuchszeit zeigen. Zum Abschluss eines jeden Experimentes wurde ein „Discharge“ mit 10% Ethanol und 1 M CaCl₂ durchgeführt, um über die maximale Lumineszenz die relative Lumineszenz berechnen zu können. Dies ermöglicht den Vergleich verschiedener experimentell erworbener Daten. Die Meßdaten werden in einem Excelformat festgehalten und können direkt im Meßprogramm preliminär ausgewertet werden. Zur weiteren Auswertung und Darstellung der Daten verwendete ich die Programme Excel und IgorPro Wavemetrics und zur Berechnung der Kalziumkonzentration den CLOCS Aequorin Calcium Calculator (siehe Teil 2.4.5).

2.4.3 Protoplastenlumineszenzexperimente

2.4.3.1 Herstellung der Protoplasten

Von 6 bis 10 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* C24 Aequorin Pflanzen wurden 20 Rosettenblätter mit einer Rasierklinge abgeschnitten, die Mittelrippe entfernt und die Epidermis mit einer Feinpinzette abgezogen. Die Blätter wurden in feine Streifen geschnitten und in 2 ml Enzymlösung (0,8% Cellulase R10; 0,05% Pectolyase; 0,5%

BSA; 0,5% PVP; 1 mM CaCl₂; 10 mM MES/Tris (pH 5,6); 400 mosmol/l eingestellt mit D-Sorbitol) für 1 bis 2 h bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Verdau wurde das Pflanzenmaterial durch ein 50 µm Netz gesiebt und 1 Mal mit einer Waschlösung (0.1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 4 mM MES/Tris (pH 5,6), 400 mosmol/l eingestellt mit Mannitol) und weitere 2 Mal mit der gleichen Waschlösung mit reduzierter Kalziumkonzentration (0,1 mM CaCl₂) gewaschen. Zwischen den Waschschritten zentrifugierten die Protoplasten in einem 15 ml Röhrchen (Sarstedt) bei 700 rpm (oder 100 g) ohne Beschleunigung und Bremse bei 4°C (Beckman Coulter GS 15R, Beckman Coulter GMBH).

Wahlweise wurden auch Experimente mit Protoplasten, die Übernacht in der Waschlösung (0.1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 4 mM MES/Tris (pH 5,6), 400 mosmol/l eingestellt mit Mannitol) bei 4°C gehalten wurden, durchgeführt. Hier sollte überprüft werden, ob die Protoplasten nach einer längeren Erholungsphase wieder auf mikrobielle Faktoren reagieren können.

2.4.3.2 Kalzium-induzierte Protoplastenlumineszenz

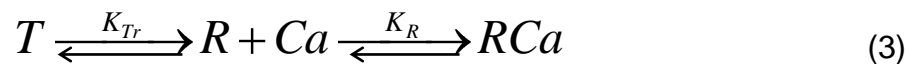
Zur Rekonstitution der C24 Aequorin Protoplasten inkubierten die Protoplasten bei 16°C in 2,5 µM Coelenteracine und einer kalziumreduzierten Rekonstitutionslösung (0.1 mM KCl; 0,1 mM CaCl₂; 4 mM MES/Tris pH 5,6) mindestens 4 Stunden lang. Nach der Rekonstitution wurde die Protoplastenlösung für die Messungen auf 1 mM CaCl₂ erhöht.

Die Durchführung der Lumineszenzmessungen erfolgte in einer Dunkelkammer. Nachdem Aufzeichnen einer ruhigen Basislinie in der Protoplastenlumineszenz, konnten die zu testenden bakteriellen Peptide (u.a. Flagelline) unter minimaler Injektionsgeschwindigkeit mit einer Kanüle zu den Protoplasten dazupipettiert werden. Dabei ist darauf zu achten, daß es das gleiche Volumen, wie die vorgelegten Protoplasten haben sollte (hier 100 µl), um ein gutes Durchmischen des Stimulus zu gewährleisten. Als eine Positivkontrolle diente die Injektion von eiskalter Meßlösung, die sich von der Kontrolle, in der zimmerwarme Meßlösung injiziert wurde, unterscheidet (Carpaneto et al., 2007). Um die Messungen vergleichen und relativieren zu können, wurde ein „Discharge“ durchgeführt. Zur Ermittlung der maximal möglichen Kalziumlumineszenz fand eine Behandlung der Protoplasten mit 1 M CaCl₂ und 10% Ethanol statt. Die Protoplastenlumineszenzmessungen wurden

mit einer zeitlichen Auflösung von einer Sekunde aufgenommen. Die Berechnung der relativen Lumineszenzwerte erfolgte durch Multiplikation der Mittelwerte aller Punkte mit der Anzahl der Messpunkte. Jeder einzelne Messpunkt wurde nun durch diesen Wert dividiert.

2.4.5 Berechnung der zytosolischen Kalziumkonzentration

Aequorin besitzt drei Bindestellen für Kalzium. Das Modell zum Reaktionsschema ist in der folgenden Gleichung dargestellt:



Jede dieser Bindestellen kann in zwei Zuständen vorkommen, T und R , die sich im Gleichgewicht befinden. Licht wird nur emittiert, wenn n Bindestellen im R -Zustand vorliegen. Da Kalzium mit sehr hoher Affinität an den R -Zustand bindet, werden sich die meisten Bindestellen bei hoher Kalzium-Konzentration im R -Zustand befinden. Für jede Bindestelle gilt die obige Gleichung, wobei K_R die Gleichgewichtskonstante der Ca^{2+} -abhängigen Reaktion darstellt und $K_{TR} = [T]/[R]$. Unter der Annahme, dass n Bindestellen eines Moleküls gleichzeitig im R -Zustand sein müssen, um Lumineszenz zu induzieren, und dass die fraktionelle Lichtintensität (L/L_{max}) dem Anteil der Moleküle in diesem Zustand entspricht, resultiert daraus die Gleichung:

$$L/L_{max} = ([R]+[RCa]) * ([R]+[T]+[RCa])^{-1})^n = ((1+K_R * [Ca]) * (1+K_{TR}+K_R * [Ca])^{-1})^n \quad (4)$$

mit $L = \text{Licht/s}$; $L_{max} = \text{Gesamtlicht}$, das in der Probe während der Messdauer erzeugt werden kann; $[R] = \text{Anteil der Bindestellen im R-Zustand}$; $[T] = \text{Anteil der Bindestellen im T-Zustand}$; $[Ca] = Ca^{2+}\text{-Konzentration}$; $K_R = \text{Gleichgewichtskonstante für die } Ca^{2+}\text{-Bindung}$; $K_{TR} = [T]/[R]$; $n = \text{Bindestellen, die sich für die Lumineszenz im R-Zustand befinden müssen}$.

Die Biolumineszenz von Aequorin kann einfach nur als fraktionelle Lumineszenz (L/L_{max}) dargestellt werden, wobei L das zu einem Zeitpunkt detektierte Licht angibt (L/s). Dadurch ist ein Vergleich von Messungen verschiedener Proben möglich, die

Material und Methoden

unterschiedliche Mengen an rekonstituiertem Aequorin enthalten. L_{max} entspricht der gesamten Lumineszenz, die zu diesem Zeitpunkt aus der Probe generiert werden kann. Durch den „Discharge“ wird mit einer 1 M $CaCl_2$ Lösung in 10% Ethanol die gesamte Menge an Kalzium im Zytosol freigesetzt und detektiert.

Zur Berechnung der zytosolischen Kalziumkonzentration wurde der CLOCS Aequorin Calcium Calculator angewandt (www.clocs.com). Die Werte wurden für 22°C für normales Aequorin berechnet und basieren auf Kalibrationskurven (Allen, 1977; Brini, 1995). Der folgende Algorithmus wurde verwendet:

$$ratio = \left(\frac{L_i}{L_{max}} \right)^{\frac{1}{nb}} \quad (5)$$

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{ratio + (ratio * K_{TR}) - 1}{K_R - (ratio * K_{TR})} \quad (6)$$

Für die Gleichungen gilt:

n (Nummer der Experimente)

L_i (Lichtintensität), gemessen zum Zeitpunkt i

L_{tot} (alle Messwerte), $[L_1 + L_2... + L_n]$

L_{max} (übrigen Messwerte), $L_{tot} - [L_1 + L_2... + L_i]$

K_R (Ca^{2+} Assoziationskonstante)

K_{TR} (Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen), $[T]/[R]$

nb (Anzahl der Bindestellen)

Für das verwendete Aequorin wurden zur Berechnung der Kalziumkonzentration die Konstanten K_R (22°C) = 7.23; nb = 2.99; K_{TR} = 120 in die Gleichung eingesetzt.

Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit Excel und IGORPro (Wave Metrics Inc., Lake Oswego, OR, USA).

2.5 Simultane Einstich- und Biolumineszenzmessungen

2.5.1 Kombiniertes Einstich- und Lumineszenzkamera-Messplatz

Um eine Verbindung zwischen Membranpotentialänderungen und zytosolischen Kalziumänderungen zu untersuchen, kombinierten wir eine hochsensitive Charge Coupled Device (CCD) Kamera (Visiluxx Imager, Visitron, Puchheim, Germany) zur Detektion von Kalzium induzierter Lumineszenz mit einem Einstichmessplatz. Die Installation des Einstichmessplatzes erfolgte in der Dunkelkammer der Kamera (siehe Abb. 2.5). Sternförmig wurde jedes leitende Teil geerdet und ein Perfusionssystem lichtdicht montiert. Für Kälteschockmessungen wurde der Perfusionsschlauch aus Nylon kurz vor der Messkammer zur Kühlung der Lösung um ein eisgekühltes Stahlelement in einem Eisbehälter geschlungen. Der Aufbau des Messplatzes ist bereits in Teil 2.3.1 beschrieben. Zur Aufzeichnung von Lumineszenzlicht mußte die Kamera mit flüssigem Stickstoff auf -80°C heruntergekühlt werden

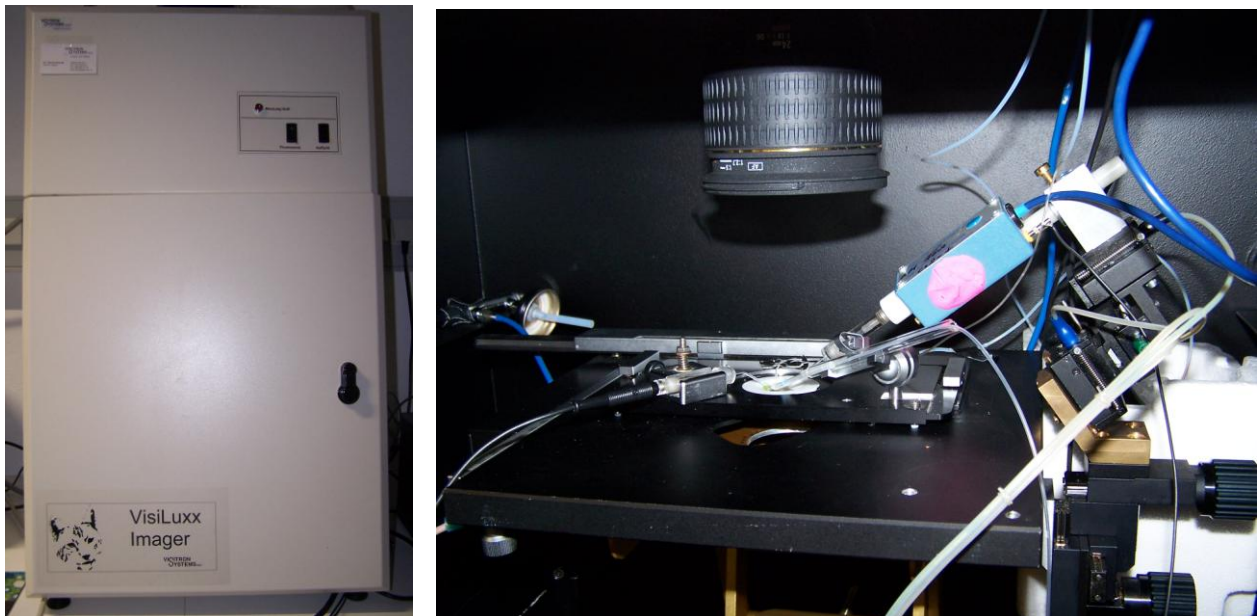


Abb. 2.5: VisiLuxx Imager mit Dunkelkammer für Lumineszenzaufnahmen der gesamten Pflanze. Kombiniertes Einstich- und Lumineszenzmessplatz in der Dunkelkammer (rechtes Foto).

Die CCD-Detektion basiert auf dem inneren lichtelektrischen Effekt eines Siliziumscheibchens, auf dessen Bildelementen (Pixel) bei Belichtung Elektronen frei

werden. Die lichtgeschützte Dunkelkammer des VisiLuxx Imagers (Abb. 2.5) erlaubt die Aufnahme von Objekten bis etwa 15 x 20 cm. Bis zu 2048 x 2048 Pixel und Belichtungszeiten vom Millisekunden- bis Stundenrahmen ermöglichen auch das Messen von sehr geringen Signalen. Trotz der hohen Quanteneffizienz und der geringen Auslesestörtrate des Chips, die sehr zu der hohen Auflösung und Empfindlichkeit beitragen, kommt es bei Langzeitaufnahmen doch zu einer Anhäufung von fehlbelichteten Pixeln. Aus diesem Grunde und um eine möglichst hohe zeitliche Auflösung zu erhalten, wurde die kleinst mögliche Belichtungszeit gewählt. Für Messungen mit dem bakteriellen Elizitor Flagellin an *Arabidopsis* Mesophyllzellen betrug die Belichtungszeit (wenn nicht anders angegeben) 30 s und für Kälteschockmessungen 500 ms.

2.5.2 Durchführung von simultanen Lumineszenz- und Potentialmessungen mit *Arabidopsis* Mesophyllzellen

Die Epidermis transgener *Arabidopsis thaliana* Rosettenblätter, die das Aequorinprotein konstitutiv exprimieren, wurde abgezogen und die Blattstückchen auf das Glas eines Patchschälchen mithilfe eines doppelseitigen Klebebandes mit der Oberseite nach unten geklebt. Sofort wurde 1 ml Rekonstitutionslösung (0,1 mM KCl, 0,1 mM CaCl₂, 1 mM MES / BTP pH 6) dazugegeben und das Schälchen in eine Dunkelkammer abgestellt. Dann erfolgte die Aktivierung des Apoaequorinproteins durch Zugabe von 2,5 µM der prosthetischen Gruppe „Coelenterazin“ (Synchem, Felsberg/Altenburg, Germany), welches sehr lichtsensitiv ist. Um eine genug intensive Lumineszenz zu erhalten mußten die Blätter mindestens 4 Stunden rekonstituiert werden.

Vor den Messungen wurde ein Durchlichtbild des Präparats aufgenommen, um die richtige Tiefenschärfe einzustellen (Abb. 2.6). Nach Einstellen der grösstmöglichen Blende, wurde eine Aufnahme der etwa 5 min anhaltenden Chlorophyllfluoreszenz durchgeführt, um die Fitness der Mesophyllzellen und auch die Funktion der Kamera zu testen. War die Autofluoreszenz erloschen, konnte mit dem Experiment begonnen werden.

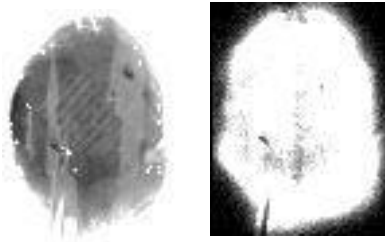


Abb. 2.6: typisches Mesophyllpräparat mit abgezogener Epidermis (links). Die rechte Abbildung zeigt die Chlorophyll bedingte Autofluoreszenz, die direkt nach Belichtung auftritt.

Mit Hilfe des Metamorph Programmes wurden die Lumineszenzdaten aufgezeichnet und später auch bearbeitet und als relative Lumineszenz Intensitäten in Zahlen dargestellt, um die einzelnen Messungen vergleichen zu können. Bei den simultanen Potentialmessungen mußte darauf geachtet werden, daß das Experiment erst gestartet wurde, wenn ein sehr stabiler Elektrodeneinstich vorlag, da die Kammer danach nicht mehr geöffnet werden kann. Die von der Lumineszenz und den Potentialmessungen gewonnenen Daten wurden mit Excel und IgorPro (Wave Metrics Inc., Lake Oswego, OR, USA) weiterverarbeitet und dargestellt.

2.6 pH-Elektroden-Versuche

Tabakzellkulturen wurden, wie in Teil 2.1.3 beschrieben, aufgezogen. Für Messungen des externen pH Wertes verwendeten wir 3 Tage alte Kulturen. Die Messung fand auf einem Schüttler (GFL 3017; Burgwedel, Germany) bei 100 rpm statt, auf dem die pH Elektrode (Mettler Toledo, Lab[®]Micro pH) und ein kleiner 10 ml Erlmeyerkolben fixiert waren. Nachdem 5 ml in den Kolben gefüllt worden sind, wurde die pH Elektrode in das Zellkulturmedium gehalten. Durch das Umfüllen kam es gewöhnlich zu einer Alkalisierung des Mediums um etwa eine pH Einheit, welches durch gleichmäßiges Schütteln bei 100 rpm sich nach etwa einer Stunde wieder auf Ausgangswerte ansäuerte. Bei einem ausgehenden pH Wert um etwa 4,5 konnten gute Messungen mit Elizitoren, die zu einer Alkalisierung des Mediums führten, durchgeführt werden. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit einem Schreiber.

2.7 Die MIFE™ Technik

Zur Identifizierung von Ionenströmen in Mesophyllzellen wurden ionenselektive Elektroden verwendet. Mit der MIFE™ Technik (**m**icroelectrode **i**onflux **e**stimation; MIFE™ technique; University of Tasmania, Hobart, Australia), in der eine oder auch mehrere Elektroden gleichzeitig die Ionenkonzentrationen an zwei verschieden entfernten Punkten im 5 s Rhythmus von der Zelle messen, ist es möglich, neben Ionenkonzentrationsänderungen auch Ionenströme zu berechnen. Es wurden Protonen-, Chlorid-, Kalium- und Kalziumelektroden verwendet.

2.7.1 Präparation der Arabidopsis Mesophyllzellen

Die Blätter von 6 bis 8 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* (siehe Teil 2.1.1) wurden mit einer Rasierklinge abgetrennt. Nach dem Heraustrennen der Mittelrippe wurde die Epidermis vorsichtig mit einer feinen Pinzette an der Blattunterseite abgezogen. Etwa 3 x 3 mm große Blattstückchen mussten nun sofort in eine kleine Petrischale in die Messlösung (0,1 mM KCl, 1 mM Ca-Glukonat und 0,5 mM Mes/BTP, pH 6) überführt werden. Die Messkammer bestand aus einem Teflonring, der an der Unterseite mit einem runden Deckglas geschlossen war, so daß eine Kammer entstand. Ein Blattstückchen aus der Petrischale wurde mit Fett an eine etwa 1 cm lange Glaskapillare, und die Glaskapillare in die Kammer geklebt, so daß die Mesophyllzellen (an der Seite mit der abgezogenen Epidermis) durch das Durchlichtmikroskop zu sehen sind. Die Proben mußten sich vor den Messungen wenigstens 3 Stunden von dem mechanischen Stress der Präparation erholen.

2.7.2 Elektroden / Pipetten

Aus Borosilikatglas Kapillaren ohne Filament (GC-150- 15; Harvard Apparatus Ltd., Edenbridge, Kent, UK) wurden Mikroelektroden gezogen und für 6 h bei 220°C gebacken. Die Silanisierung erfolgte durch Zugabe von Tributylchlorosilane (Fluka, Taufkirchen, Germany) in den Ofen und weiteres Backen für 15 min.

Nach dem Silanisieren müssen die Kapillaren einen Spitzendurchmesser von etwa 2 µm besitzen, damit der ionenselektive Cocktail in der Spitze hängen bleibt. Der

Material und Methoden

Durchmesser darf auch nicht zu klein sein, da die Reaktionszeit der Elektrode sonst beeinträchtigt werden würde.

Die silanisierten Elektroden konnten ab dem folgenden Tag verwendet werden. Mit einer ausgezogenen Pipette, befüllt mit dem Backfilling Puffer wurde die Elektrode zuerst unter Vermeidung von Luftblasen von hinten befüllt und die Flüssigkeitssäule mit einer Spritze und Gummischlauch in die Spitze gedrückt. Die befüllte Elektrode wurde an einem Halter unter einem Binokular befestigt. Auf der gegenüberliegenden Seite befand sich eine abgebrochene Kapillare, die mit dem gewünschten ionenselektiven Cocktail befüllt war. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurde nun die Elektrode an das Cocktail herangefahren und für einen Moment eingetaucht. Zwischen dem Backfilling Puffer und dem Cocktail darf keine Luftblase sitzen (Abb. 2.8).

Für die verschiedenen Cocktails führen längere oder kürzere Säulen in der Elektrodenspitze zu präziseren Messungen. Für das protonen-selektive Cocktail reicht eine kleine Menge in der Spitze und bei den chlorid-, kalium und kalziumselektiven Cocktails führt etwa die doppelte Menge (Säule etwa 10 μm) zu stabileren Messungen.

Wie bei allen anderen Elektroden wurde ein chlorierter Silberdraht als Verbindung zwischen Headstage und Backfilling Puffer verwendet. Die Referenzelektrode wurde mit 1 M KCl befüllt und mit einem Agarosepfropfen versehen (1 M KCl; 2% Agarose (Sigma)).

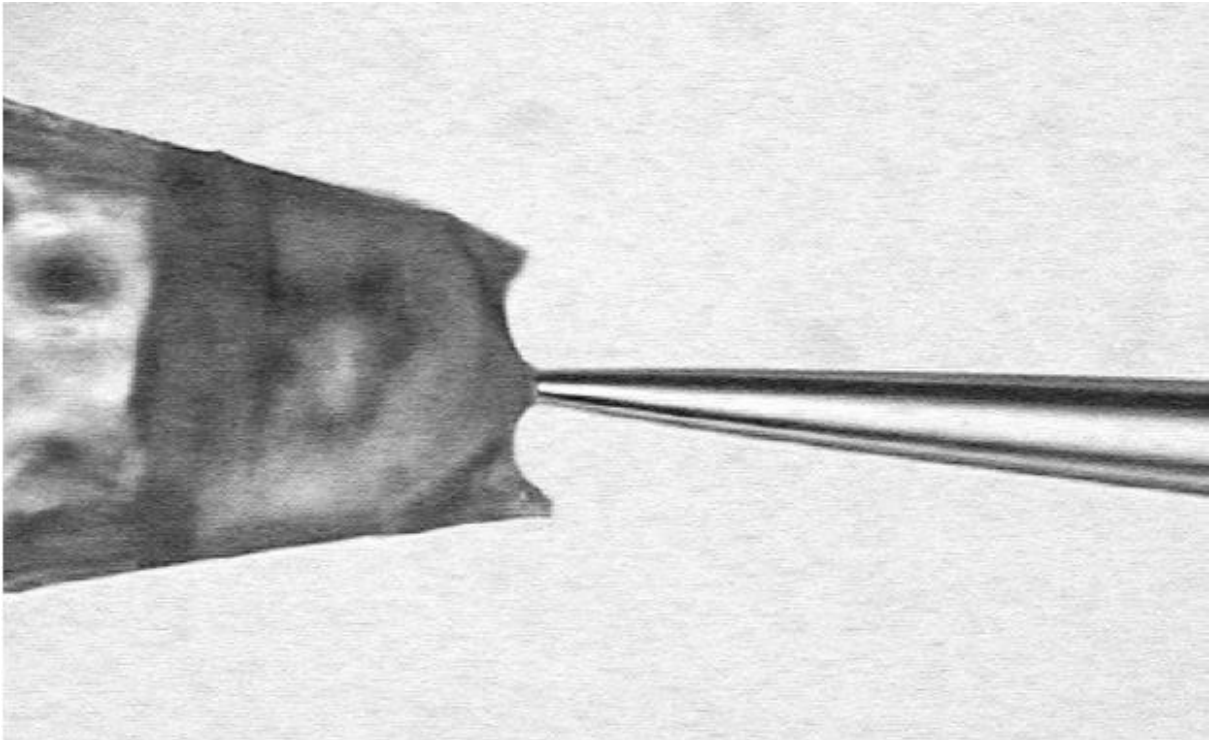


Abb. 2.7: Befüllen der Mikroelektrode. Mit dem ionenselektiven Cocktail aus einer Reservoirkapillare (links) wird durch kurzes Eintauchen die Spitze der Mikroelektrode von vorne befüllt.

2.7.3 Lösungen für MIFE™ Messungen

2.7.3.1 Ionenselektive Cocktails

Verwendet wurden folgende Cocktails (für externe Ionenkonzentrationsmessungen) :

Hydrogen Ionophore II – Cocktail A (95297, Fluka)

Chloride Ionophore I – Cocktail A (24902, Fluka)

Potassium Ionophore I – Cocktail A (60031, Fluka)

Calcium Ionophore I – Cocktail A (21048, Fluka)

2.7.3.2 Backfilling Puffer

Protonenselektive Elektrode: 40 mM KH_2PO_4 , 15 mM NaCl

Chloridselektive Elektrode: 500 mM NaCl

Kaliumselektive Elektrode: 200 mM KCl

Kalziumselektive Elektrode: 500 mM CaCl_2

2.7.3.3 Messlösungen

Alle Messungen (bis auf die Kalziummessungen) wurden in 0,1 mM KCl, 1 mM Ca-Glukonat und 0,5 mM Mes/BTP, pH 6 durchgeführt. Die Messungen mit kalzium-selektiven Elektroden wurden in 0,1 mM KCl, 0,05 mM Ca-Glukonat und 0,5 mM Mes/BTP, pH 6,5 durchgeführt.

2.7.4 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurden jeweils drei Kalibrierungspuffer verwendet:

Die protonen-selektive Elektrode wurde in Lösungen kalibriert, die 0,1 mM KCl, 1 mM CaCl₂ enthielten und der pH Wert wurde mit Mes/BTP auf jeweils pH 7,8, pH 6,4, pH 5,1 eingestellt.

Die chlorid- und kalium-selektive Elektrode wurden beide mit 1 mM Kalziumglukonat, 0,5 mM Mes/BTP pH 6 und verschiedenen Konzentrationen von KCl (100 µM, 1 mM und 10 mM) kalibriert.

Für die Kalziummessungen wurde mit dem Programm WEBMAXC standard die freie Kalziumkonzentration berechnet, die für die Kalibrierungspuffer nötig waren, die außer Kalziumglukonat noch 0,1 mM KCl und 0,5 mM Mes/BTP enthielten. Es wurde mit 100 nM, 1 µM und 10 µM Kalziumglukonat kalibriert.

Die Kalziumkonzentration stellte ich dann mit 10 mM EGTA bei pH 6,5 (eingestellt mit HEPES/Mes) wie folgt ein:

Tab. 2.1: Berechnung der freien Kalziumkonzentration. Durch das Programm WEBMAXC standard wurde für 18°C oder 20°C und einer Ionenstärke von 1 µM, sowie einem pH Wert von 6,5 die freie Kalziumkonzentration in der Lösung berechnet.

Ca ⁺⁺ _{free} 18°C	100 nM	1 µM	10 µM	100 µM
Ca ⁺⁺ _{free} 20°C	93 nM	962 nM	9,5 µM	978 µM
total	0,474 mM	3,32 mM	8,38 mM	9,91 mM

Die Messungen in den Kalibrierungslösungen mußten ein Plateau erreicht haben und dann wurde mit dem Programm CHART (Unitas Consulting, Hobart, Australia) ein

Mittelwert über eine definierte Dauer berechnet. Die Steigung der drei Kalibrierungswerte betrug etwa 59 mV/pH, 52 mV/pK und 70 mV/pCl, sowie 28 mV/pCa. Die Wiederholung der Kalibrierung erfolgte nach der Messung. Sie musste ähnliche Werte aufweisen, andernfalls wurde die Messung verworfen.

2.7.5 Messung von Ionenströmen mit ionenselektiven Elektroden

Nach der Kalibrierung und nachdem die Messkammer in den Halter am inversen Mikroskop befestigt wurde, wurde die Referenzelektrode in die Messlösung getaucht. Die Elektroden wurden auf die Multimanipulatoren (piezo translators, P-280.30, Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany) gesetzt und mit dem Verstärker verbunden. Nun konnte man den Manipulator (oder bei Messungen mit mehreren Elektroden die Manipulatoren) so bewegen, daß die Elektrodenspitzen etwa 10 µM nah an eine Mesophyllzelle herankommen. Im Falle einer Messung mit zwei verschiedenen ionenselektiven Elektroden, plazierte ich diese so nah wie möglich voneinander ohne dass sie sich jedoch berühren, da sonst der Cocktail (LIX = liquid ion exchanger) ausgetauscht oder verunreinigt werden kann.

In den Ionenstrom Messungen fahren die Elektroden alternierend nach vorne und wieder zurück. Die erste Position ist 10 µm, die zweite 60 µm von der Zelle entfernt. Die Frequenz der Bewegung beträgt 0,1 Hz. Die Bewegungen wurden von einem computergesteuerten Steppermotor (M061-CE08, Superior Electric, Bristol, CT) getrieben. In Shabala et al. (1997) wird dies sehr detailliert beschrieben.

Zu Beginn des Experimentes mussten sich die Ionenkonzentrationen nahe der zu messenden Zelle erst wieder einstellen. Dies dauerte gewöhnlich einige Minuten. Wenn die Ionenflüsse im Gleichgewicht waren, konnte die zu testende Substanz mit einer Eppendorf Pipette in einem möglichst kleinem Volumen (max 10 µl) nahe dem Gewebe dazugegeben werden. Durch das minimale Volumen der applizierten Lösung kam es zu keiner großen Störung des Ionengradienten an der Membran. Nach Zugabe des Stimulus wurden die Ionenkonzentrationen 20 min weitergemessen.

2.7.6 Datenanalyse

Die Meßwerte errechneten sich aus Mittelwerten über 3 s (20 Meßpunkte pro s) für die jeweiligen beiden Positionen. Wurde die Position erreicht, brauchte die Elektrode etwa 2 s um einen konstanten Wert im Gleichgewicht zu halten. Die aufgezeichneten Werte besitzen folglich im Gleichgewichtszustand eine Frequenz von 15 Hz.

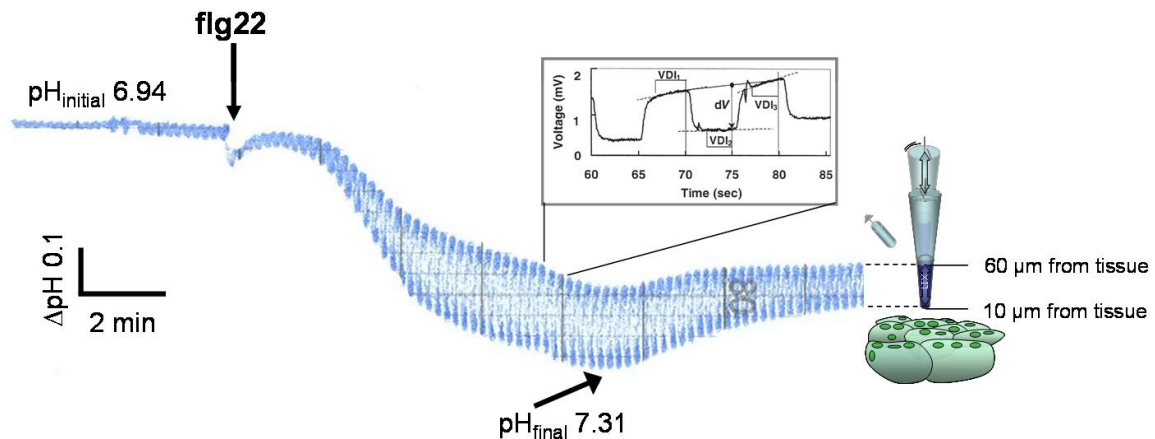


Abb. 2.8: flg22-induzierte Protonenkonzentrationsänderungen. Ein typisches Segment von Protonenströmen von *Arabidopsis* Mesophyllzellen als Antwort auf das bakterielle Peptid flg22, wie es mit einem Schreiber festgehalten wird. Nach einer initialen Phase vergrößern sich die Konzentrationsdifferenzen in den zwei Positionen. Aus dem ΔV können die Protonenströme berechnet werden.

Die Bestimmung der Ionenkonzentrationen erfolgte mithilfe der Meßwerte in mV (VDI) anhand der Kalibrierung. Mit einer auf dem PC installierten Interface Card wurden die Daten digitalisiert. Ein anderer Ausgang von dieser Karte diente der Kontrolle der Steppermotoren, die die Mikromanipulatoren der Elektroden ansteuerten. Der Meßbereich bestand aus wenigen mV (siehe Inset Abb. 2.8), die auf einer Basis von etwa 300 mV Offset rangierten. Dadurch musste das Offset immer wieder korrigiert werden und der Messbereich neu eingestellt werden. Diese Informationen und auch Kommentare zu den Messungen wurden auf einer log Datei festgehalten, die später in dem Auswertungsprogramm mit verarbeitet wurden. Die Software CHART (Unitas Consulting, Hobart, Australia), diente an erster Stelle der Datenaufzeichnung. Die Darstellung der Messungen erfolgte jedoch auch online auf einem Monitor. Die Datenumwandlung in ASCII Text Dateien fand mit dem CHART Programm statt und diese wurden dann anhand der Kalibrierungsdaten zur Berechnung der durchschnittlichen Nettoströme im 5 s Intervall verwendet. In einem

Programm zur Berechnung der Ionenströme wurden Informationen über die Badlösung, die Nettoströme und die zylindrische Diffusionsgeometrie der Mesophyllzellen (Newman et al., 1987; Kochian, 1992) mit einberechnet (detaillierte Beschreibung siehe (Shabala et al., 1997)). Die Ionenkonzentrationen berechnen sich aus dem Mittelwert beider Positionen. Folglich entsprechen die in den Ergebnissen angegebenen Konzentrationen, Werten, die etwa 30 μm von der Zelle entfernt entsprechen.

2.7.8 Theorie zur Berechnung von Ionenströmen mit der MIFETM Technik

Ionen tendieren ihrem elektrochemischen Gradienten folgend, von hohen Konzentrationen zu niedrigeren zu diffundieren. Die netto Ionenbewegung der Diffusion kann anhand des Gradienten und der Mobilität und Konzentration des Ions in der Lösung berechnet werden.

Angenommen der ionenselektive Cocktail, auch LIX (liquid ion exchanger) einer Mikroelektrode lässt nur eine Ionensorte passieren und befindet sich in einem Abstand x (m) von dem Gewebe. Für dieses Ion nennt man das elektrochemische Potential in der Lösung μ (Joule mol^{-1}) im Abstand x .

Wenn die freie Ionenkonzentration c genannt wird und das elektrische Potential V_b an diesem Punkt in der Lösung, dann kann man μ mit der folgenden Gleichung beschreiben:

$$\mu = \mu_o + RT \ln \gamma c + zFV_b \quad (7)$$

wobei μ_o der Referenzwert des elektrochemischen Potentials, z die Ladungszahl, γ den Aktivitätskoeffizienten des Ions in der Lösung, F die Faraday Konstante (96500 C mol^{-1}), R die Gaskonstante ($8,3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) und T die Temperatur (K) darstellt. In der zweiten Position dx ist das elektrochemische Potential $\mu + d\mu$, wobei $d\mu$ verschiedene Werte für c und V_b , doch das gleiche elektrochemische Potential der Referenz μ_o besitzt.

Nach der elektrochemischen Theorie von zum Beispiel Danty (1962) oder Nobel (1974) wird der netto Ionenstrom J ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) mit der Ionenkonzentration c (mol

Material und Methoden

m^{-3}), der Mobilität des Ions u ($(\text{m s}^{-1}) / (\text{N mol}^{-1})$) und der Kraft, die auf ein Mol Ionen trifft, was durch den elektrochemischen Potentialgradienten ($d\mu / dx$) beschrieben wird, wie folgt ausgedrückt:

$$J = cu(d\mu / dx) \quad (8)$$

Ein positives J bedeutet einen Ionenstrom in das Gewebe, weg von Position x . Wenn das elektrochemische Potential mit der Konzentration c und der Spannung V_b beschrieben wird, wird diese Gleichung auch als Nernst-Planck Gleichung bezeichnet.

Da das Ion frei durch den LIX passieren kann entspricht das μ und $d\mu$ auch dem μ und $d\mu$ und somit auch V_b und dV im Inneren der Elektrode. Dadurch gilt im idealen Fall:

$$d\mu = zFdV \quad (9)$$

Da aber das LIX häufig kein ideales Nernst Verhalten zeigt, wird ein Korrekturfaktor g , der gewöhnlich etwas über 1 liegt in die Gleichung eingefügt.

$$d\mu = zFgdV \quad (10)$$

Die Gleichung für den Ionenstrom kann demnach korrigiert so beschrieben werden:

$$J = cuFg(dV / dx) \quad (11)$$

Die Ionenkonzentration c wird aus dem Mittelwert der Spannung V während die Elektrode sich zwischen den Positionen bewegt und aus der Kalibrierungskurve berechnet. Hier geht man davon aus, daß die Spannungen während der Kalibrierung und während der Messung auch bei gleichen Konzentrationen des Ions nur sehr geringe Unterschiede durch zum Beispiel den Abstand zur Referenzelektrode oder das elektrische Feld aufweisen (Ryan, 1992). Für eine genauere Beschreibung von Ionenstrom Messungen mit ionenselektiven Elektroden siehe (Newman, 2001; Volkov, 2006)

2.8 Anionen Exudat Analyse

Für die Anionen Exudat Analysen wurden 6 Wochen alte auf MS-Medium (Duchefa) gezogene *Arabidopsis* Pflanzen vom Ökotyp Col-0 verwendet. Die ausgestanzten Blattstückchen mussten über 3 Stunden im Probenpuffer (2 mM Kalziumglukonat, 100 µM Kaliumglukonat, 1 mM Mes/BTP pH 6) equilibrieren. Dann wurde 200 mg Blattmaterial vorsichtig mit dem Probenpuffer gewaschen und darauf mit dem beschriebenen Stimulus (10 nM flg22 von *Pseudomonas syringae*) behandelt. Die Kontrolle wurde nur mit dem Probenpuffer behandelt. Zur Analyse des Anionengehaltes wurde je Probe 20 mg frisches Pflanzengewebe in wässriger Lösung 3 min bei 95°C aufgekocht und mithilfe einer HPLC gekoppelt an einen Anionen Chromatograph (IC 1000, Biotronic, Maintal, Germany) wurden die Anionenkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert.

3. Ergebnisse

Die frühe Interaktion der Pflanze mit Pathogenen, erfolgt über die sogenannten PAMPs und setzt eine Erkennung dieser durch spezifische Rezeptoren der Pflanze voraus. Die resultierende Initiierung von Abwehrreaktionen, zu denen auch die Aktivierung von Ionenkanälen gehört, kann in Folge zu einer Immunisierung der Pflanze führen.

3.1 Die elektrische Antwort der Pflanzen auf Mikroorganismen

In zahlreichen Studien wurde eine Änderung des Membranpotentials von pflanzlichen Zellen als Antwort auf einen Kontakt mit Pilzen oder Bakterien festgestellt. Insbesondere Elizitoren aus Zellwänden von Pilzen, wie auch Moleküle von Bakterien, die eine wichtige Rolle in der Erkennung und Initiierung der Knöllchenbildung spielen, die noch Faktoren wurden bisher untersucht (Felle et al., 1998; Felle et al., 2000). Pilzliche Elizitoren rufen in *Arabidopsis thaliana* Wurzelhaaren transiente Änderungen des Membranpotentials und der externen Kaliumkonzentration hervor (Ivashikina et al., 2001). Desweiteren gibt es spezifische Pilzarten, die die Pflanzenzellmembran nicht nur vorübergehend sondern irreversibel schädigen und dabei zu Elektrolytverlust und Zelltod führen (Klüsener und Weiler, 1999; Lee et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte nun mit Hilfe von biophysikalischen Methoden die Änderung des Membranpotentials pflanzlicher Zellen als Antwort auf bakterielle Elizitoren näher beleuchtet werden. Dabei sollten auch die beteiligten Ionenflüsse im Detail aufgeschlüsselt und elektrophysiologisch untersucht werden. Die Arbeit soll zu der Beantwortung der Frage beitragen, wie die Pflanze die Membranspannung und deren Modulation als „Signalübertragungssystem“ nutzt, um eine Immunität gegen schädigende Eindringlinge zu erlangen.

3.1.1 Elektrische Antworten bei der Interaktion mit intakten Bakterien

Bereits 1986 zeigte Pavlovkin *et al.* und auch Keppler und Novacky *et al.*, dass *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* durch Infiltration in Baumwollkotyledonen (*Gossypium hirsutum*) zu einer schnellen Membrandepolarisation führen.

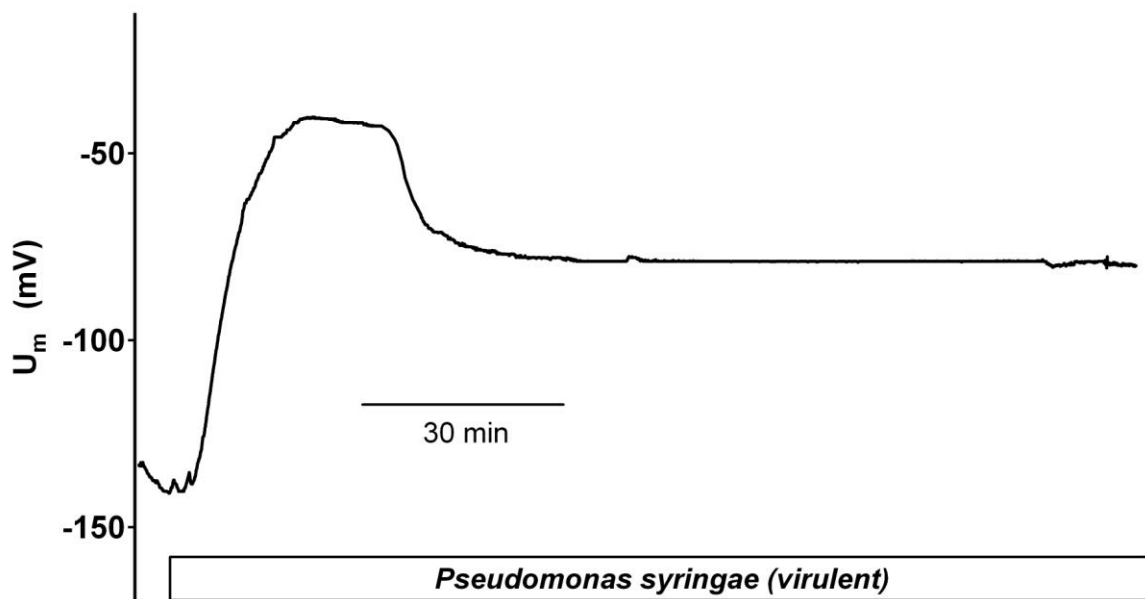


Abb. 3.1: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 induziert in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen eine anhaltende Depolarisation. Kommen virulente Pseudomonaden (Start und Dauer der Applikation dargestellt durch den Balken) in Kontakt mit *Arabidopsis* Mesophyllzellen, kommt es ausgehend von einem Potential von -140 mV innerhalb weniger Minuten zu einer Depolarisation, die sich auf ein Potential von etwa -70 mV einpegelt.

Führt man dieses Experiment mit *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen und dem virulenten *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 durch, kommt es zu einer kompatiblen Interaktion zwischen Pathogen und Wirt und man erhält eine ähnliche Antwort wie sie bei *Gossypium hirsutum* beobachtet wurde (Abb. 3.1). Zur Aufzeichnung des Membranpotentials wurden Mikroelektroden in die Mesophyllzellen eingestochen. Das Ruhepotential der Blätter stellte sich in einer Badlösung mit 100 μ M KCl, 1 mM CaCl_2 und 1 mM MES/BTP pH6, zwischen -140 bis -220 mV ein. Daraufhin wurde das Mesophyllgewebe mit intakten Pseudomonaden ($\text{OD}_{600} = 0,5$) umspült und die Potentialänderungen aufgezeichnet (Abb. 3.1). Schon nach weniger

Ergebnisse

als 5 Minuten begann eine schnelle Depolarisation, die ihr Maximum nach 15 Minuten erreichte und daraufhin bei etwa -75 mV einen Gleichgewichtszustand („Steady State“) erreichte. Dieser Steady State der Depolarisation war stabil und auch nach mehreren Stunden konnte keine weitere Änderung des Membranpotentials beobachtet werden (Abb. 3.1).

Unabhängig von der Kompatibilität des Pathogens mit der Pflanze kam es zu einer Depolarisation des Membranpotentials, doch nur bei einem kompatiblen Pathogen antwortet die Pflanze mit intensivem Zucker-, Aminosäure-, Metabolitenverlust und zeigt Krankheitssymptome (Sigeo, 1993). Im inkompatiblen Fall kann die Pflanze das Pathogen erkennen und durch eine Reihe von Abwehrreaktionen bekämpfen. Eine dieser Abwehrreaktionen ist die Einleitung des Zelltodes, der sich durch einen Elektrolyt- aber nicht durch einen Metabolitverlust auszeichnet und wodurch die Pflanze gegen den Eindringling resistent wird. Dies wird durch Läsionen an Blättern und anderen Pflanzenorganen sichtbar. In beiden Interaktionen, der Kompatiblen und der Inkompatiblen ist ein charakteristisches Kalziummuster zu beobachten.

Auch nicht intakte Bakterien und deren Bestandteile können zu Immunität führen (Zipfel et al., 2004). Um zu testen, welche Bestandteile der Bakterien von der Pflanze erkannt werden, wurden Bakterienlysate hergestellt und die Reaktion der Pflanze auf die Bakterienbestandteile untersucht (Felix et al., 1999).

3.1.2 Bakterienlysate lösen artübergreifend elektrische Antworten in Pflanzengewebe aus

Ein gut etablierter Test für die Erkennung/Aktivität von pflanzlichen Elizitoren ist die apoplastische Alkalisierung. In Zellkulturzellen von Tabak, Tomate und auch Arabidopsis (siehe Abb. 3.12) konnten externe Alkalisierungen von über einer pH Einheit als Antwort auf Bestandteile von Bakterien und Pilzen gemessen werden (Felix et al., 1999; Kadota et al., 2004b; Zipfel et al., 2004). Zeitgleich, also etwa 1 bis 2 Minuten nach Applikation des Elizitors konnte ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration gemessen werden. Dieses Muster war für verschiedene Elizitoren ähnlich (Pugin et al., 1997; Kadota et al., 2004b; Lecourieux et al., 2005). Zur Aufzeichnung von zytosolischen Ca^{2+} -Änderungen wurden Arabidopsispflanzen herangezogen, die das Kalzium-sensitive Protein Aequorin exprimierten (Grant et al., 2000). In Abb. 3.2 wurden, mit 2,5 μM Coelenterazine rekonstituierte Blattstückchen

Ergebnisse

mit verschiedenen Bakterienextrakten behandelt und die Kalzium induzierte Lumineszenz mit einem Photomultiplier detektiert. Zur Herstellung der Bakterienextrakte wurden die Bakterien durch Ultraschall zertrümmert, mehrfach gewaschen und auf eine OD von 0,5 bei 600 nm (Ausnahme: *A.tumefaciens* OD₆₀₀ =1) eingestellt, um die Messbedingungen (100 µM KCl, 0,1 mM CaCl₂ und 1 mM MES/BTP pH6) für alle Messungen konstant halten zu können.

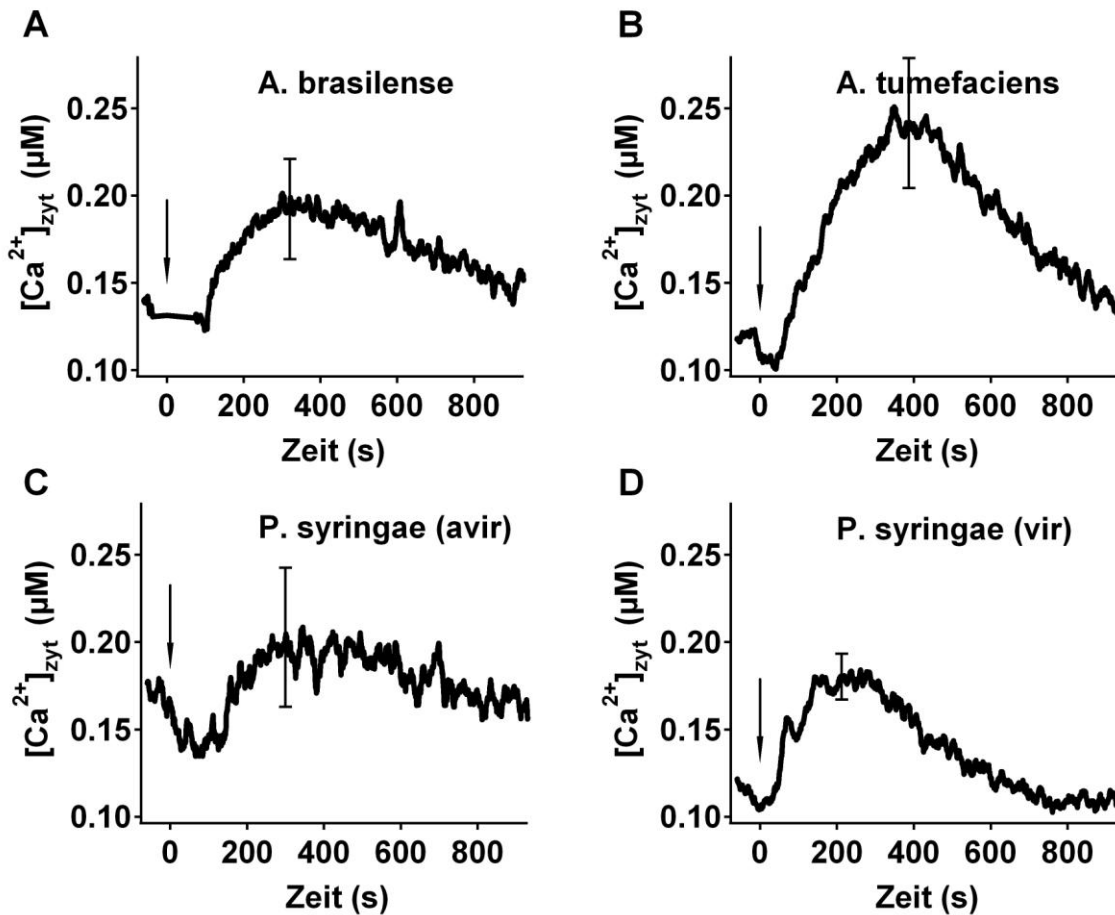


Abb. 3.2: zytosolisches Kalziumsignal in *Arabidopsis* (C24 Aequorin) Blattstücken induziert durch bakterielle Lysate. Lysate von symbiontischen Bakterien wie *Azospirillum brasilense* (A), dem Wurzelhalsgallen-induzierenden Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* (B), sowie von den pathogenen Bakterien *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (avir) (C) und der virulenten Form *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (vir) (D) (je $n = 6 \pm SF$) wurden getestet.

In allen getesteten Bakterienlysaten (Abb. 3.2 A-D), begann nach etwa 2 Minuten ein langsamer etwa über 15 min anhaltender transientser Kalziumanstieg im Zytosol der Zellen. Anhand der Berechnungen der Gleichungen (3) bis (6) in Teil 2.4.5 konnte ein Anstieg der Kalziumkonzentration von etwa 100 nM auf etwa 200 nM gemessen

Ergebnisse

werden. Alle untersuchten Bakterienlysate, das heißt von virulenten (D) und avirulenten (C) Pseudomonaden, sowie von dem tumorinduzierenden *Agrobacterium tumefaciens* (B) und dem symbiontischen *Azospirillum brasilense* (A) induzierten in *Arabidopsis* Mesophyllzellen einen zytosolischen Kalziumanstieg mit ähnlicher Kinetik. Die Art der Interaktion zwischen Pflanze und Bakterium, scheint bei allen getesteten Bakterienstämmen unerheblich für die Induktion eines zytosolischen Kalziumsignals zu sein. Im Ergebnisteil 5.1 wird ausführlicher auf den Pathogen-induzierten Kalziumanstieg im Zytosol eingegangen.

Felix et al. haben aus den bakteriellen Lysaten aktive Komponenten isolieren und charakterisieren können (Felix et al., 1999). In dieser Arbeit konnte das von *Pseudomonas syringae* pv *tomato* stammende Flagellinprotein als aktive Komponente identifiziert werden. Spätere Arbeiten zeigten, dass auch der Elongationsfaktor EF-Tu von *Escherichia coli* als Elizitor dient. Für beide PAMPs konnten die jeweiligen Rezeptoren in *Arabidopsis* kloniert werden (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Zipfel et al., 2006).

3.2 Die bakteriellen Elizitoren flg22 und elf18 lösen elektrische Signale in *Arabidopsis thaliana* aus

Das 22 Aminosäuren umfassende Peptid, flg22, stellt den kleinsten aktiven (Immunität induzierenden) Bestandteil des bakteriellen Flagellins von *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 dar, der von *Arabidopsis thaliana* als PAMP erkannt werden kann (Felix et al., 1999; Bauer et al., 2001; Sun et al., 2006 und Abb. 3.3). Analoges gilt für elf18, einem aus dem Elongationsfaktor EF-Tu abgeleitetem Peptid aus *Escherichia coli* (Kunze et al., 2004 und Abb. 3.3).

flg22 : QRLS TGSR INSA KDDA AGLQ IA
elf18 : ac~SKEK FERT KPHV NVGT IG

Abb. 3.3: Peptidsequenzen von flg22 und elf18. Die 22 Aminosäuren flg22 des bakteriellen Flagellins von *Pseudomonas syringae* stellen den kleinsten aktiven Teil dar der eine Immunität in *Arabidopsis* und anderen Pflanzen induzieren können. Elf18 besteht aus 18 Aminosäuren und besitzt eine N-terminale Azetylierung.

Ergebnisse

Eine extrazelluläre Alkalisierung von Pflanzenzellkulturen als Antwort auf die beiden Peptide, flg22 und elf18, (Felix et al., 1999; Kunze et al., 2004) weist auf eine Leitfähigkeitsänderung der Plasmamembran im Signalweg der Pathogenerkennung hin. Um zu prüfen ob auch diese „minimalen“ Elizitoren hinreichend für eine elektrische Antwort an der pflanzlichen Plasmamembran sind, wurde die Einstichttechnik mittels Mikroelektroden an intakten *Arabidopsis* Geweben angewandt.

3.2.1 Die bakteriellen Peptide flg22 und elf18 induzieren in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen transiente Membrandepolarisationen

Nach Einstich in Mesophyllzellen intakter *Arabidopsis* Rosettenblätter konnten Membranpotentiale von -150 bis -220 mV gemessen werden. Es wurde mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/min perfundiert. Die Applikation von 10 nM flg22-induzierte nach einer Verzögerungsphase von 1-3 min einen starken Abfall der Membranspannung auf etwa -100 bis -50 mV (Abb. 3.4). Diese Depolarisation war transient und die Membran repolarisierte innerhalb von 70 ± 9 Minuten ($n = 9 \pm SF$) unabhängig von der Anwesenheit von flg22 auf das Ausgangspotential zurück. Wurde das flg22 ausgewaschen, konnte nach vollständiger Repolarisation eine zweite und auch dritte (hier nicht gezeigt) allerdings schwächere Depolarisation gemessen werden (Abb. 3.4). Ein analoges Verhalten des Membranpotentials konnte für das Peptid elf18 festgestellt werden (Abb. 3.10 A). Die durch intakte Bakterien induzierte Membrandepolarisation (siehe Abb. 3.1), unterscheidet sich also von der Elizitor-aktivierten Membranpotentialänderung durch das Fehlen der Repolarisation.

Ergebnisse

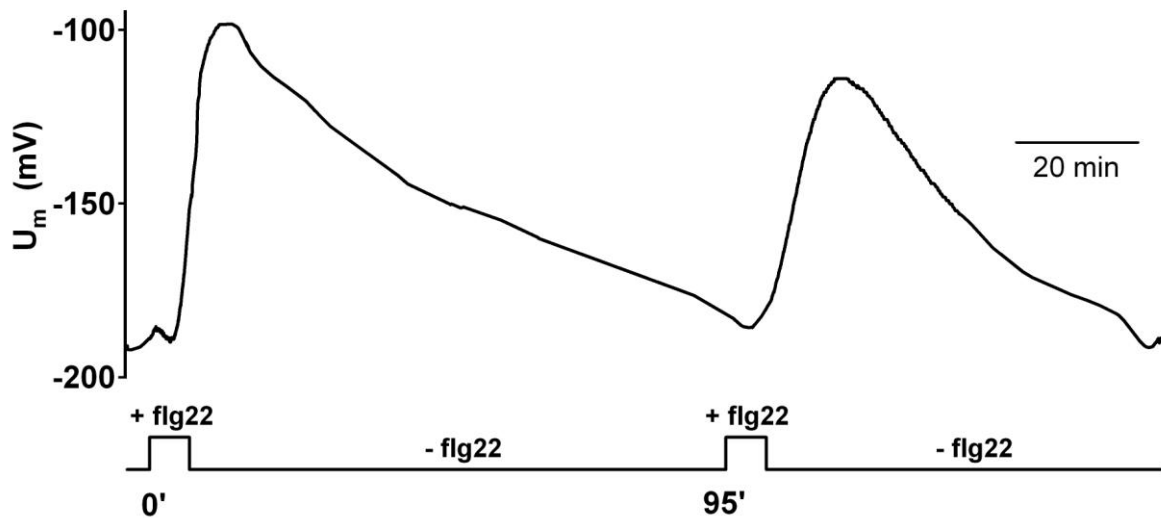


Abb. 3.4: flg22-induzierte Depolarisation der Plasmamembran von Arabidopsis Mesophyllzellen. Das 22 Aminosäuren lange Peptid flg22 (10 nM) von *Pseudomonas syringae* führt mit einer Verzögerung von etwa 2 min zu einer transienten Depolarisation zu -75 ± 3 mV ($n = 20 \pm$ SF). Nach Auswaschen des Elizitors und der vollständigen Repolarisation nach 70 ± 9 min ($n = 9 \pm$ SF) wurden die Zellen wieder sensitiv für flg22.

3.2.2 Gewebsspezifität der Flagellin induzierten elektrischen Signale und spezifische Erkennung von Flagellinen verschiedener Bakterien

Mit Hilfe von flg22-Bindungstudien konnte der Rezeptor für das bakterielle Flagellin gefunden werden (Gómez-Gómez und Boller, 2000). Der als FLS2 (Flagellin-sensitive 2) benannte Rezeptor ist eine Rezeptorkinase mit Homologie zu bekannten Komponenten des Immunsystems in Menschen und Insekten.

Die ubiquitäre Expression des FLS2 Rezeptors in *Arabidopsis* (Gómez-Gómez und Boller, 2000) weist auf mögliche Funktionen zum Beispiel in der Pathogenabwehr in der gesamten Pflanze hin.

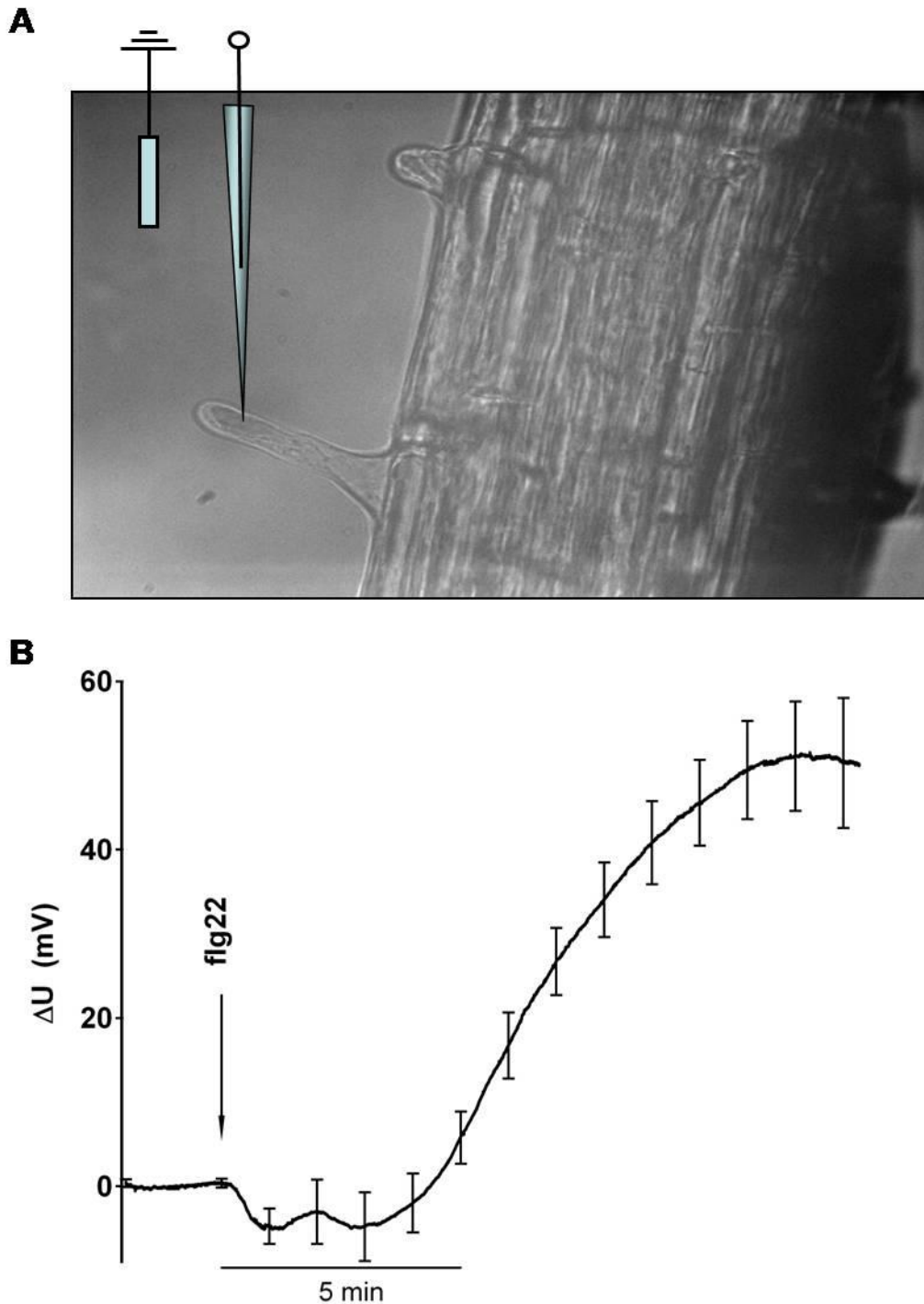


Abb. 3.5: flg22-induzierte Depolarisation der Plasmamembran von Arabidopsis Wurzelhaarzellen. (A) 7 bis 10 Tage alte Keimlinge wurden im Bereich der jüngsten Wurzelhaare eingestochen. **(B)** Applikation von 10 nM flg22 von *Pseudomonas syringae* führt bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von etwa 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ ausgehend von einem Membranpotential von durchschnittlich -147 mV nach einer Verzögerungsphase von 3 min zu einer Depolarisation um etwa 50 mV. Dargestellt ist der Mittelwert der Spannungsdifferenz und der Standardfehler von 12 Wurzelhaaren verschiedener Keimlinge.

Ergebnisse

Da Wurzeln eine sehr große Oberfläche besitzen und für viele Phytopathogene über das Erdreich zugänglich sind, errichtet die Pflanze hier ihre erste Abwehrbarriere. Anhand von Einstichmessungen mit Mikroelektroden in die Wurzelhaare von 8 Tage alten, steril angezogenen *Arabidopsis* Keimlingen, wurde eine ähnliche Membrandepolarisation wie in Mesophyllzellen als Antwort auf 10 nM flg22 von *Pseudomonas syringae* gemessen (Abb. 3.5; $n = 12 \pm \text{SF}$).

Zur Quantifizierung der Depolarisationsereignisse, wurde das Ruhepotential auf null normiert und die Spannungsänderungen gegen die Zeit aufgetragen. So konnten die Elizitor-induzierten Depolarisationen gemittelt und die Standardfehler berechnet werden. Das Ruhepotential der Wurzelhaare betrug $-147 \pm 6\text{mV}$ ($n=20 \pm \text{SF}$) (in 0,1 mM KCl, 1 mM CaCl_2 und 1 mM MES/BTP pH6). Im Vergleich zu den Messungen in *Arabidopsis* Mesophyllzellen, induziert flg22 in Wurzelhaaren eine etwas schwächere Depolarisation um $53 \pm 6 \text{ mV}$ ($n=12 \pm \text{SF}$) mV innerhalb von 10 min (Abb. 3.5 B).

Vergleicht man von verschiedenen Bakterienarten die Aminosäuresequenzen ihrer Flagelline im Bereich des aktiven Teils, so erkennt man eine stark konservierte Primärstruktur. Diese konservierten Erkennungssequenzen verschiedener flagellentragender Bakterien lösen jedoch bei *Arabidopsis* verschiedene Antworten aus (Abb. 3.6).

flg22	<i>P. syringae</i>	:	QRLS	TGSR	INSA	KDDA	AGLQ	IA
flg22 Δ 2		:	QRLS	TGSR	INSA	KDDA	AGLQ	
flg22	<i>P. avenae</i>	:	QRLS	SGLR	INSA	KDDA	AGLA	IS
flg22	<i>A. tumefaciens</i>	:	DRIS	SGLK	VGSA	SDNA	AYWS	IA
flg22	<i>A. brasilense</i>	:	SRVS	SGLR	VKSA	SDNA	AYWS	IA

Abb. 3.6: Homologe Sequenzen der flg22 Peptide verschiedener Bakterien. Im Vergleich sind die 22 Aminosäure von flg22 von *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas avenae*, *Agrobacterium tumefaciens* und *Azospirillum brasilense* aufgelistet. Die homologen Aminosäuren sind farblich hervorgehoben. Eine Deletion von 2 Aminosäuren im C-Terminus flg22 Δ 2 ergibt ein inaktives Epitop von flg22 in *Arabidopsis*

Durch eine Verkürzung des flg22 Peptids um 2 Aminosäuren am C-terminalen Ende, erhält man einen Antagonisten (flg22 Δ 2) von flg22 (Bauer et al., 2001). Dieses

Ergebnisse

Peptid löst auch im Überschuss bei Konzentrationen von 100 nM keine Depolarisation in *Arabidopsis* Mesophyllzellen aus (Abb. 3.7). Fügt man jedoch das aktive flg22 hinzu, reagieren die Zellen mit einer verzögerten und zur etwa Hälfte reduzierten Depolarisation, was auf eine kompetitive Interaktion der beiden Peptide an der Bindestelle des Rezeptors hinweist (Abb. 3.7).

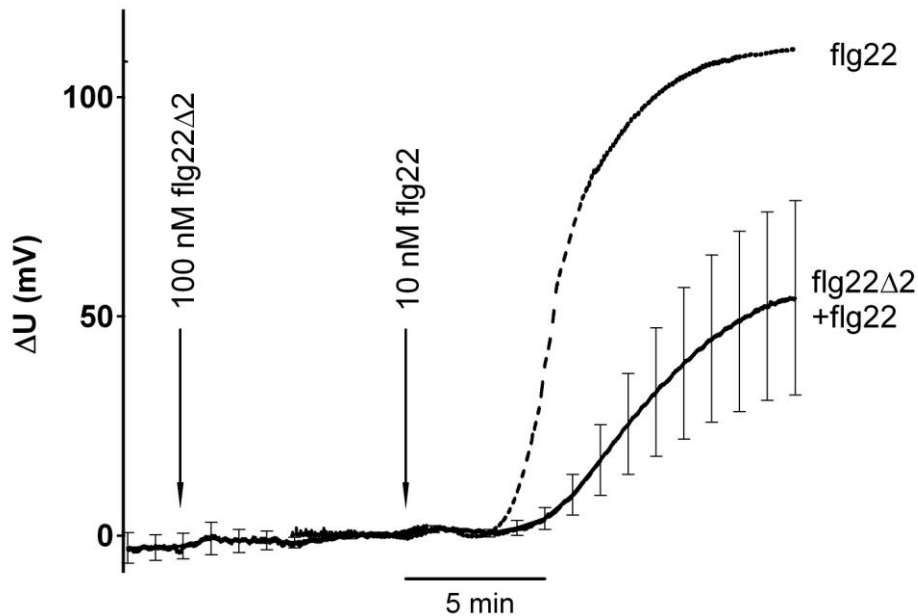


Abb. 3.7: Eine C-terminale Deletion von 2 Aminosäuren am flg22 Peptid (flg22 Δ 2) induziert keine Depolarisation der Plasmamembran von *Arabidopsis* Mesophyllzellen aber konkurriert mit dem aktiven Peptid. Appliziert man das deletierte Peptid im Überschuss (100 nM) und fügt kurz darauf das aktive flg22 (10 nM) hinzu, dann erhält man im Gegensatz zur Kontrolle (gestrichelte Spannungsspur) eine zur Hälfte geringere und verzögerte Depolarisation. Dargestellt ist die mittlere Spannungsdifferenz 6 unabhängiger Messungen und der Standardfehler.

In Übereinstimmung mit der hohen Homologie der Peptidsequenzen der Flagelline von *Pseudomonas avenae* und *Pseudomonas syringae* (Abb. 3.6) konnte durch beide Peptide eine Membrandepolarisation detektiert werden (Abbildung 3.8 A und B). Demgegenüber zeigten das flg22 von *Agrobacterium tumefaciens* und ein Flagellinextrakt von *Azospirillum brasilense* (einem wachstumsfördernden Bodenbakterium) keine Membranspannungsänderungen in *Arabidopsis* Wurzelhaaren oder Mesophyllzellen (Abb. 3.8 A und 3.8 B). Trotz der großen Ähnlichkeit des flg22 von *Agrobacterium tumefaciens* scheint es entscheidende Unterschiede zu flg22 (*Pseudomonas syringae*) zu geben (Abb. 3.6). Bei einer

Ergebnisse

zusätzlichen Applikation des aktiven Peptids von *Pseudomonas syringae* fand keine Abschwächung der Depolarisation statt, wie es im Falle mit dem verkürzten Peptid flg22 Δ 2 (Abb. 3.7) war (Abb. 3.8 B). Das flg22 von *Agrobacterium tumefaciens* hemmt also die flg22-induzierte Depolarisation nicht durch Konkurrenz.

Auch Schließzellen stellen einen putativen Eintrittsort für Pathogene dar. Da dieser Zelltyp elektrisch isoliert vom umgebenden Gewebe ist, wären neben Membranpotentialmessungen sogar Ableitungen von Ionenströmen über die Plasmamembran mit der Einstichttechnik möglich. Ebenso könnten Protoplasten oder Zellkulturzellen helfen die Natur der Ionenströme über die Plasmamembran aufzuklären und zu charakterisieren. Leider brachten die bisherigen Messungen an diesen Zelltypen jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Aber weitere Experimente sind auch hinsichtlich der Arbeit von Melotto et al. 2006, die einen Flagellin induzierten Stomaschluss beschreiben, von grossem Interesse (Melotto et al., 2006).

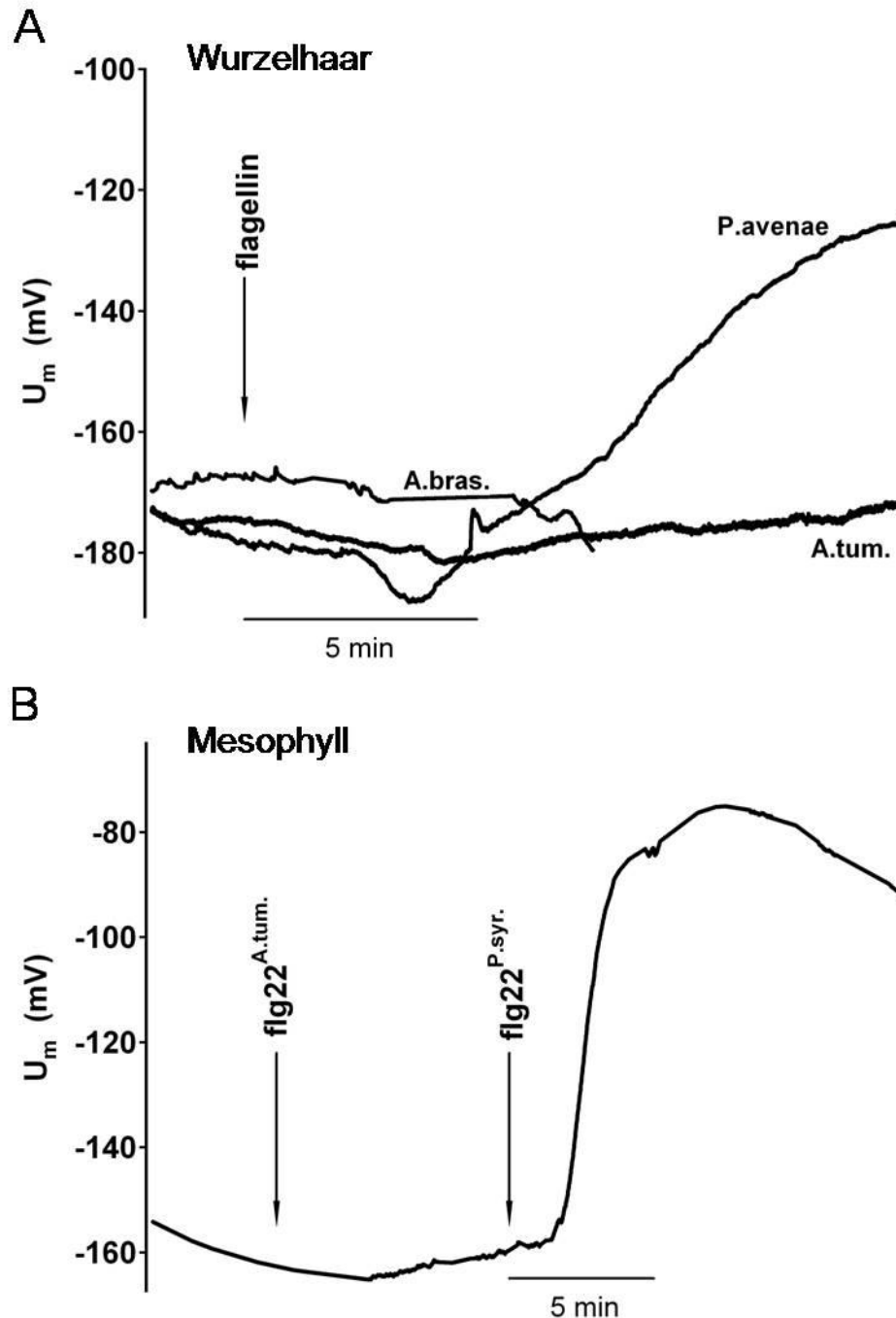


Abb. 3.8: Änderungen der Membranspannung durch Flagelline verschiedener Bakterienarten in Arabidopsis Wurzelhaar- und Mesophyllzellen. (A) Wurzelhaare von *Arabidopsis* Keimlingen reagierten nur auf flg22 des pathogenen *Pseudomonas avenae* oder *syringae* Bakteriums mit einer Depolarisation. Im Gegensatz dazu führt das Flagellin von *Azospirillum brasilense* und *Agrobacterium tumefaciens* zu keiner Potentialänderung. **(B)** Ebenso verhält es sich in 4 Wochen alten Mesophyllzellen, in denen 10 nM flg22 von *Agrobacterium tumefaciens* keine Depolarisation induziert. Die folgende Depolarisation durch 10 nM flg22 (*Pseudomonas syringae*) wird in Stärke und Form nicht beeinträchtigt (gezeigt ist je eine repräsentative Messung).

3.2.3 Die Detektion von PAMPs durch Rezeptorkinasen in der Plasmamembran ist hochspezifisch und führt zu einer Immunisierung in *Arabidopsis thaliana*

3.2.3.1 Hochaffine Bindung von flg22 an den Rezeptor FLS2 induziert Ionenflüsse

Eine Dosis-Effekt Studie zeigte, dass das applizierte flg22 mit steigender Konzentration eine schnellere und größere Depolarisation induziert (Abb. 3.9 A). Zur Darstellung der Daten wurde das Ruhepotential der Zellen (in 0,1 mM KCl, 1 mM CaCl₂ und 1 mM MES/BTP gepuffert bei pH6) gleich Null gesetzt und der Mittelwert, wie der Standardfehler berechnet. Signifikante Depolarisationen konnten bei Konzentrationen ab 50 pM flg22 erhalten werden. Sättigung war ab einer Konzentration von 10 nM flg22 zu beobachten (Abbildung 3.9 B). Für die Dosis-Effekt Kurve wurden die maximalen Spannungsdifferenzen gegen die logarithmische flg22 Konzentration aufgetragen und mit einer Michaelis Menten Kinetik beschrieben. Eine halbmaximale Aktivierungskonzentration (EC₅₀) von 0.17 ± 0.02 nM konnte so berechnet werden. Dieser Wert steht in sehr guter Übereinstimmung mit dem EC₅₀ Wert der externen Alkalisierung in Tomatenzellkulturzellen durch den hitzedenaturierten Rohextrakt des Flagellins von *Pseudomonas aeruginosa* (Felix et al., 1999). Das Peptid flg22 selbst weist im pH-Assay von Tomatenzellkulturzellen jedoch eine fast zehnmal höhere Effektivität auf. Da die externe Alkalisierung die gleiche Kinetik wie die Depolarisation aufweist, könnte man annehmen, dass die Bewegung von Protonen über der Membran für die Depolarisation verantwortlich sein könnte. Aufgrund dieser verschiedenen Konzentrationsabhängigkeiten ist es aber eher unwahrscheinlich, dass Protonen für die Depolarisation verantwortlich sind. Es weist eher auf eine Beteiligung von Protonen an der Depolarisation hin.

3.2.3.2 Rezeptorabhängige Aktivierung der Immunantwort durch flg22 und elf18

Die Rezeptoren für bakterielles Flagellin, FLS2, und den Elongationsfaktor, EF-Tu, beides Rezeptorkinasen, wurden in allen getesteten Ökotypen von *Arabidopsis* gefunden (Gómez-Gómez et al., 1999). Im Ökotyp Wassilewskaya (Ws-0) ist aber durch eine Punktmutation im FLS2-Rezeptor die Kinasedomäne des Rezeptors zerstört, was zu einem infunktionellen Protein führt (Zipfel et al., 2004). In Abbildung 3.10 A und 3.10 C wird gezeigt, dass Ws-0 Mesophyllzellen aufgrund dieser

Ergebnisse

Punktmutation nicht mehr in der Lage sind eine Membranpotentialdepolarisation als Antwort auf flg22 zu vermitteln. Im Gegensatz zu flg22 weist elf18 jedoch eine volle Aktivität in Ws-0 Mesophyllzellen auf (Abb 3.10 A). Durch konstitutive Expression des funktionellen FLS2 Rezeptor Proteins (Zipfel et al., 2004) zeigen transgene Ws-0 Pflanzen als Antwort auf flg22 wieder eine volle Membrandepolarisation (Abb 3.10 C). Im Gegensatz zu Ws-0 wird in der EF-Tu Rezeptor Mutante, *efr-1*, keine Depolarisation der Plasmamembran als Antwort auf elf18 mehr vermittelt, doch die Bindung von flg22 an FLS2 und die damit verbundene Initiierung der elektrischen Antwort scheint unbeeinflusst (Abb 3.10 B). Alle weiteren Ökotypen, die in dieser Arbeit zum Test von putativen flg22 oder elf18 insensitiven Mutanten benutzt wurden, stellen einen funktionellen genetischen Hintergrund für die Rezeptor vermittelte elektrische Antwort auf MAMPs/PAMPs dar (Abbildung 3.10 C).

Ergebnisse

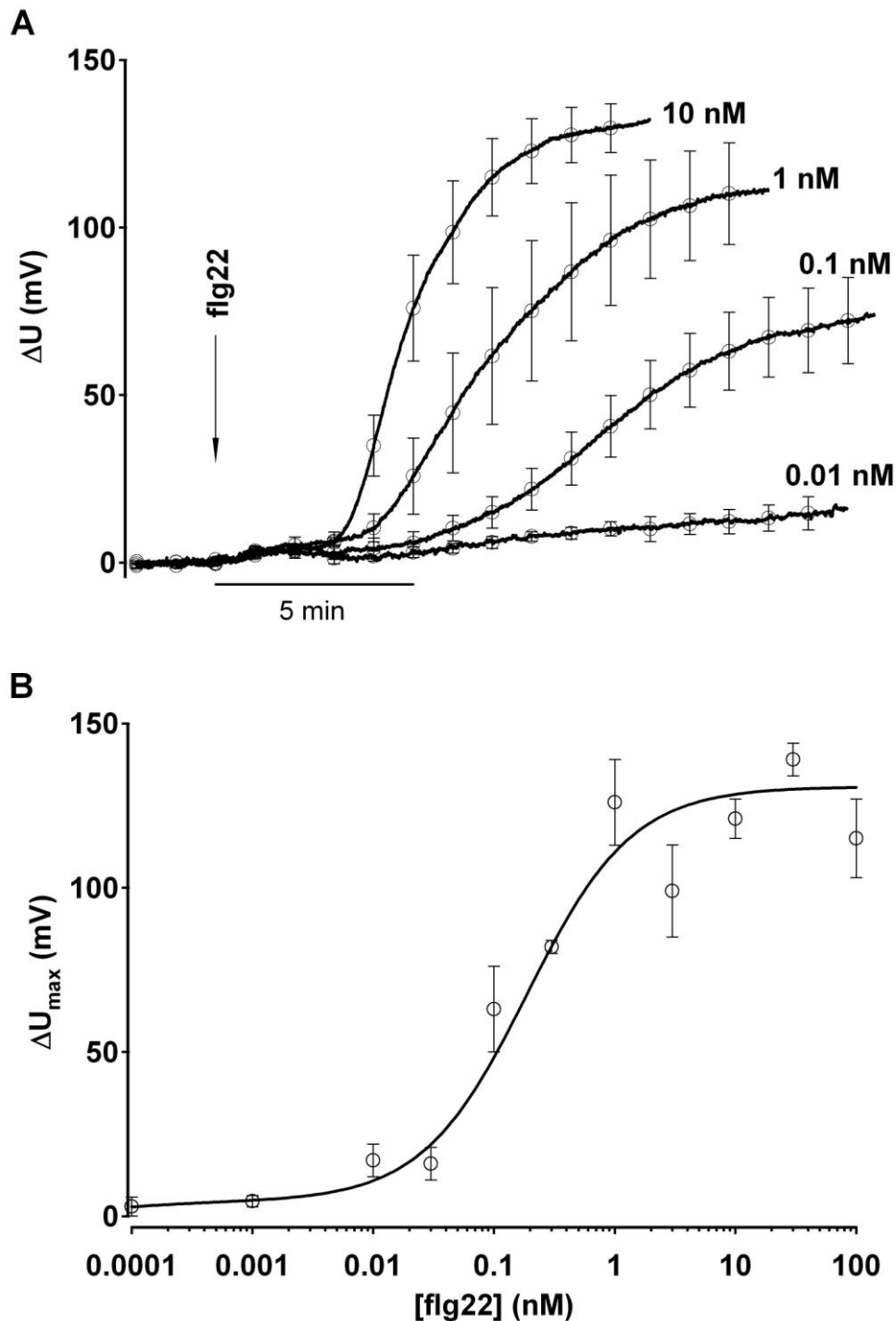


Abb. 3.9: Konzentrationsabhängigkeit der flg22-induzierten Depolarisation in Arabidopsis Mesophyllzellen. (A) Mit höheren Konzentrationen wird die Depolarisation schneller und ausgeprägter. (B) Die maximalen Werte der flg22-induzierten Depolarisation wurden gegen die jeweilige Elizitor Konzentration logarithmisch aufgetragen. Die Werte wurden mit einer Michaelis Menten Kinetik ($f(x) = \Delta U \cdot x / (EC_{50} + x)$) mit $\Delta U=130$ mV beschrieben. Der EC_{50} Wert beträgt ~ 0.2 nM. Jede Messung wurde an verschiedenen Blättern mit $n \geq 4$ unabhängigen Wiederholungen pro Elizitorkonzentration durchgeführt und der Standardfehler berechnet.

Ergebnisse

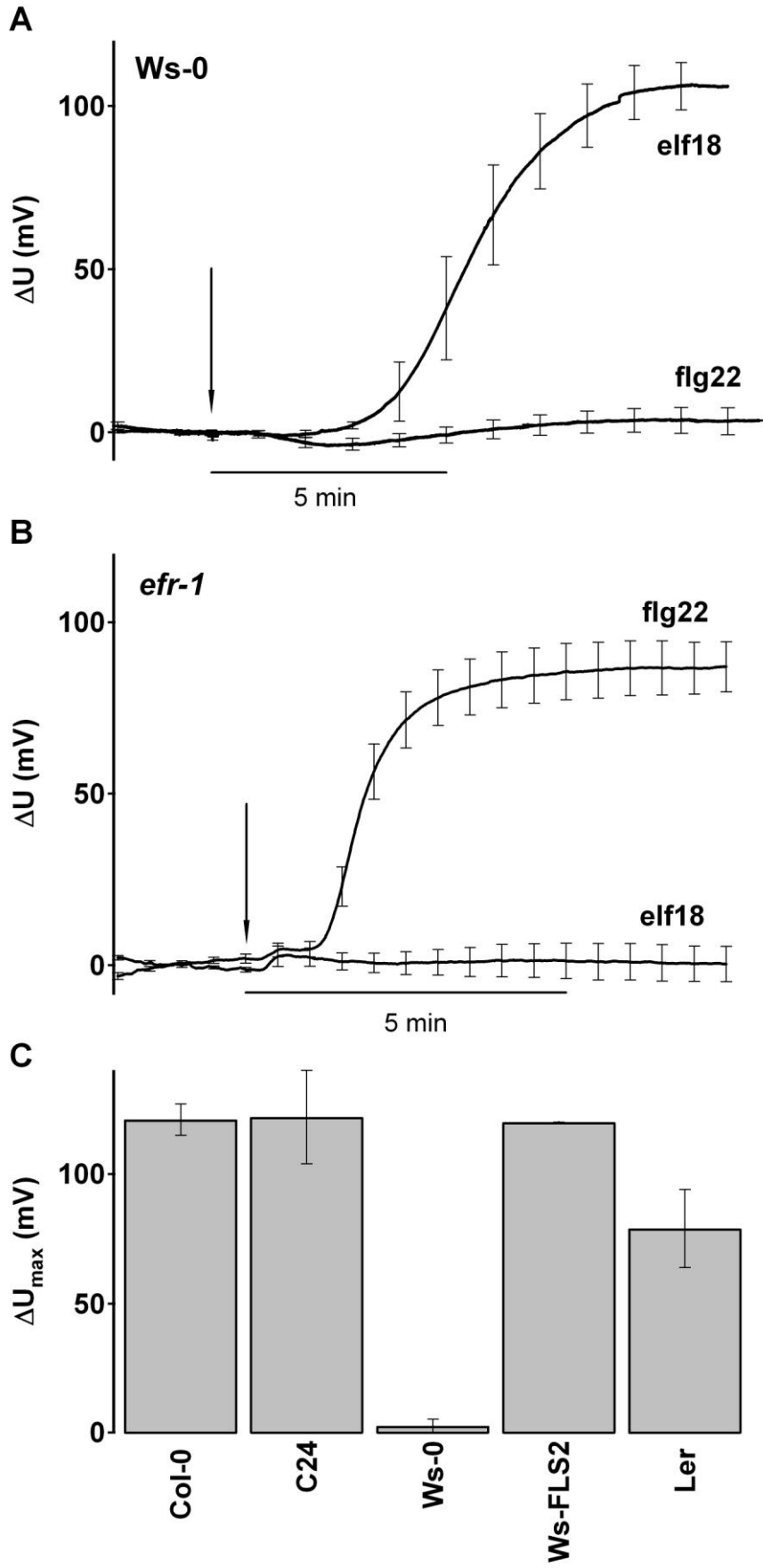


Abb. 3.10: Rezeptorabhängige Aktivierung der Depolarisation durch flg22 und elf18 in Arabidopsis Mesophyllzellen. (A) Plasmamembran Depolarisation induziert durch elf18 in *Arabidopsis acc. Wassilewskaya* (Ws-0) Mesophyllzellen. Aufgrund einer Punktmutation im Flagellin Rezeptor FLS2, kann in Ws-0 Mesophyllzellen keine Antwort durch flg22 vermittelt werden. Komplementiert mit dem funktionellen FLS2 Rezeptor erhielt dieser Ökotyp wieder Sensitivität für flg22 (gezeigt in (C)). (B) In *efr-1* ist der elf18 Rezeptor ausgeschaltet. Die Mesophyllzellen behalten ihre Sensitivität zu flg22, aber nicht zu elf18, da die Antwort den funktionellen EFR Rezeptor benötigt. (C) Die mittleren Spannungsdifferenzen der flg22-induzierten Depolarisation sind für die Ökotypen und Komplementationsmutante (*Arabidopsis acc. Col-0*, C24, Ws-0, Ws-0/FLS2p::FLS2-myc und *Landsbergis erecta* (Ler)) dargestellt. Die Werte sind aus mindestens 6 Messungen gemittelt und mit Standardfehlerbalken präsentiert.

Nach einer vollständigen Depolarisation und Repolarisation führte eine zweite Applikation von flg22 zu einer etwas schwächeren unvollständigen Depolarisation, welche durch eine nachfolgende Erstapplikation von elf18 zur vollständigen Depolarisation zu -80 mV führte (Abb 3.11 A). Auch in Experimenten, in denen eine halbmaximal effektive Konzentration von flg22 eingesetzt wurde, führte eine darauffolgende sättigende elf18 Gabe zur vollständigen Depolarisation des Membranpotentials (Abb 3.11 A).

Robatzek et al zeigte 2006, dass der FLS2 Rezeptor nach Liganden Bindung endozytiert wird. Nach 75 min wurde der Rezeptor wieder in der ursprünglichen Intensität an der Plasmamembran detektiert. Die Repolarisation, die nach Auswaschen von flg22 der Depolarisation folgt (Abb 3.4), dauerte vergleichbare 70 ± 9 Minuten ($n = 9 \pm SF$) (siehe Ergebnisse Teil 3.2.1). Die Reetablierung des Rezeptors an der Plasmamembran ist also Voraussetzung für eine erneute PAMP-induzierte Antwort. Wie in Abb 3.11 A zu sehen ist, zeigt die zweite Applikation von flg22 eine schwächere Depolarisation. Die Anzahl der FLS2 Rezeptoren könnte hierfür der Grund sein. Ein Indiz dafür ist die Beobachtung dass eine nachfolgende elf18 Applikation die Membran vollständig zu -60 mV depolarisiert. Verschiedene Elizitoren wie flg22 und elf18 werden von individuellen Rezeptoren wahrgenommen und aktivieren dann möglicherweise ähnliche oder sogar dieselben Reaktionswege, die schließlich zur Immunität der Pflanze beitragen. Die flg22 und elf18 Experimente zeigen weiterhin, dass beide PAMPs eine additive Wirkung aufweisen (Abb 3.11 A und B).

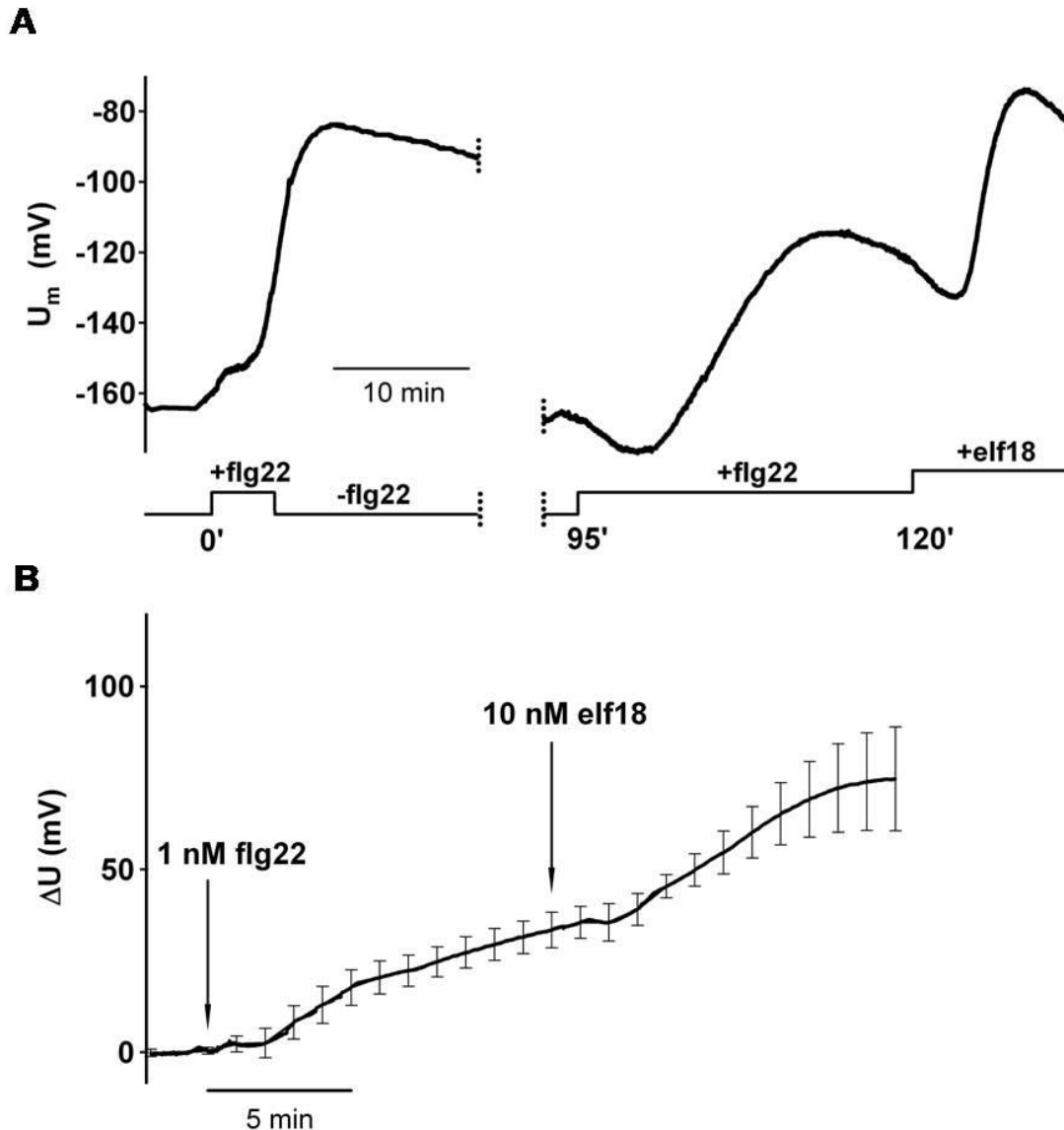


Abb. 3.11: Suboptimale Elizitorkonzentrationen können sich gegenseitig in der Depolarisationsantwort ergänzen. (A) Nach einer wiederholten Depolarisation mit flg22 erreicht das Membranpotential nach 1,5 Stunden nicht die maximale Depolarisation (siehe auch Abb 4, $n=9$). Eine zusätzliche Gabe von elf18 führt zu einer kompletten Depolarisation nach $U_m = -70$ mV. **(B)** Auch bei nicht sättigenden flg22 Konzentrationen (1 nM) und folgender Applikation von sättigenden elf18 Konzentrationen (10nM) in der Komplementationsmutante Ws-compFLS2 zeigen Mesophyllzellen einen Additionseffekt und die Zellen bleiben sensitiv auch gegenüber weiteren Elizitoren.

3.3 Welcher Ionentransport führt zu den flg22-induzierten elektrischen Signalen?

Mit der flg22-induzierten Depolarisation der pflanzlichen Plasmamembran sind Ionenströme verbunden. Zur Aufklärung dieser Ionenbewegungen wurden

Experimente mit ionenselektiven Elektroden, Ionenkanalblockern, unterschiedlichen Ionenkonzentrationen und der Kalzium-sensitiven Luziferase Aequorin durchgeführt. Des Weiteren wurden Ionenkanalmutanten elektrophysiologisch vermessen.

3.3.1 Flagellin induziert zahlreiche Ionenflüsse

Wie in Tabak, Tomaten und *Arabidopsis* Zellkulturzellen (Abb. 3.12 und Felix et al., 1999) konnte in intaktem *Arabidopsis* Mesophyllgewebe eine externe Alkalisierung von 0,5 bis 1,5 pH Einheiten als Antwort auf die Behandlung mit flg22 gemessen werden (Abb. 3.13 A). Um zusätzliche Informationen zur Größe und Richtung des Ionentransports zu erlangen wurden Ionen-selektive Mikroelektroden eingesetzt. Mit Hilfe der MIFETM-Technik (**M**icroelectrode **I**on **F**lux **E**stimation) wurden diese ionenselektiven Elektroden zwischen zwei Positionen mit einem Schrittmotor auf das pflanzliche Gewebe zu und wieder weg bewegt. Anhand der aufgezeichneten Spannung in den beiden Endpositionen kann der Ionenfluss berechnet werden (Erklärung siehe Teil 2.7.8). Die Badlösung enthielt wie bei den Einstichmessungen 100 μ M KCl, 1 mM CaCl₂ und wurde für die ionenselektiven Elektrodenmessungen nur sehr schwach mit 100 μ M MES/BTP zu pH6 gepuffert. Während der Messung ist keine Perfusion des Badmediums möglich. Daher wurde das zu testende Peptid mit einer Applikationspipette während der Messung lokal appliziert. Das dadurch gestörte Ionengleichgewicht in unmittelbarer Nähe der Membran baute sich jedoch nach etwa 10 s wieder auf. Wie in Abbildung 3.13 A zu sehen ist, wurde schon etwa nach einer Minute eine extrazelluläre Alkalisierung gemessen. Dieser Anstieg des pH Wertes wurde durch einen Einstrom von Protonen hervorgerufen, der nach $4,4 \pm 0,3$ min seinen maximalen Wert von 111 ± 27 nmol m⁻² s⁻¹ ($n = 13 \pm$ SF) erreichte. Sowohl der Protoneinstrom als auch die Alkalisierung zeigten eine transiente Kinetik und erreichten nach etwa 25 bzw. 60 min wieder ihre Ausgangswerte.

Ergebnisse

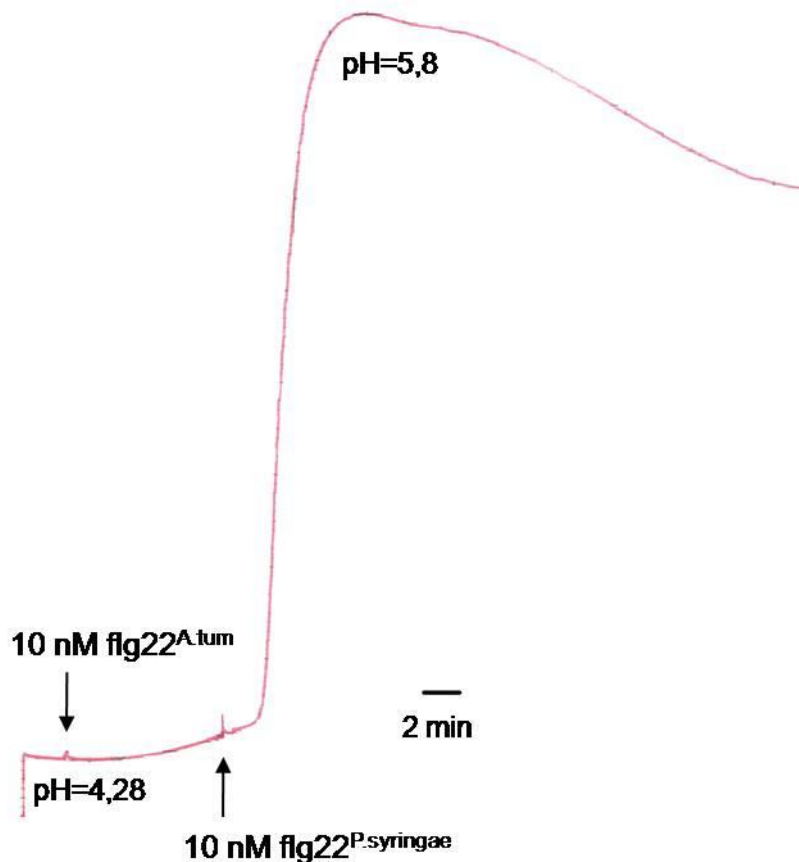


Abb. 3.12: flg22-induzierte externe Alkalisierung in Tabak Zellkulturzellen. Ausgehend von einem pH Wert von 4,3 alkalisieren 3 Tage alte Zellsuspensionskulturzellen um mehr als 1,5 pH Einheiten, wenn das aktive flg22 von *Pseudomonas syringae* DC3000 zugegeben wurde. Tabakzellkulturen sind insensitiv gegenüber flg22 von Agrobakterien.

Sehr ähnliche Ergebnisse ergaben Messungen mit Chlorid- und Kalium-selektiven Elektroden. Um stabile Werte mit einer möglichst hohen Auflösung zu erhalten, wurde für diese Messungen eine Badlösung von 100 μM KCl, 1 mM Kalziumglukonat und einer Pufferung des pH-Wertes bei pH 6 mit 100 μM MES/BTP gewählt. Wie in Abbildung 3.13 B und 3.13 C zu sehen ist, bewegten sich die Ausgangswerte der Kalium- und Chloridkonzentrationen um 100 μM und stiegen nach Zugabe vom Peptid flg22 um weitere 100 μM . Beide zeigten im Gegensatz zu Protonen einen Ausstrom. Der Ausstrom von Chlorid wies etwa zum gleichen Zeitpunkt wie Protonen nach $4,6 \pm 0,3$ min ein Maximum bei $751 \pm 104 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($n = 6 \pm \text{SF}$) auf. Damit ist der Ausstrom von Chloridionen um den Faktor sechs größer als der Protoneneinstrom. Der flg22-induzierte Ausstrom von Kalium wies ebenso einen

Ergebnisse

transienten Verlauf auf und erreichte nach $5,2 \pm 0,4$ min einen maximalen Wert von 597 ± 122 $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($n = 12 \pm \text{SF}$). Im Vergleich zu dem Protoneneinstrom war das Maximum des Kaliumausstromes also circa fünfmal größer und um 40 s verzögert.

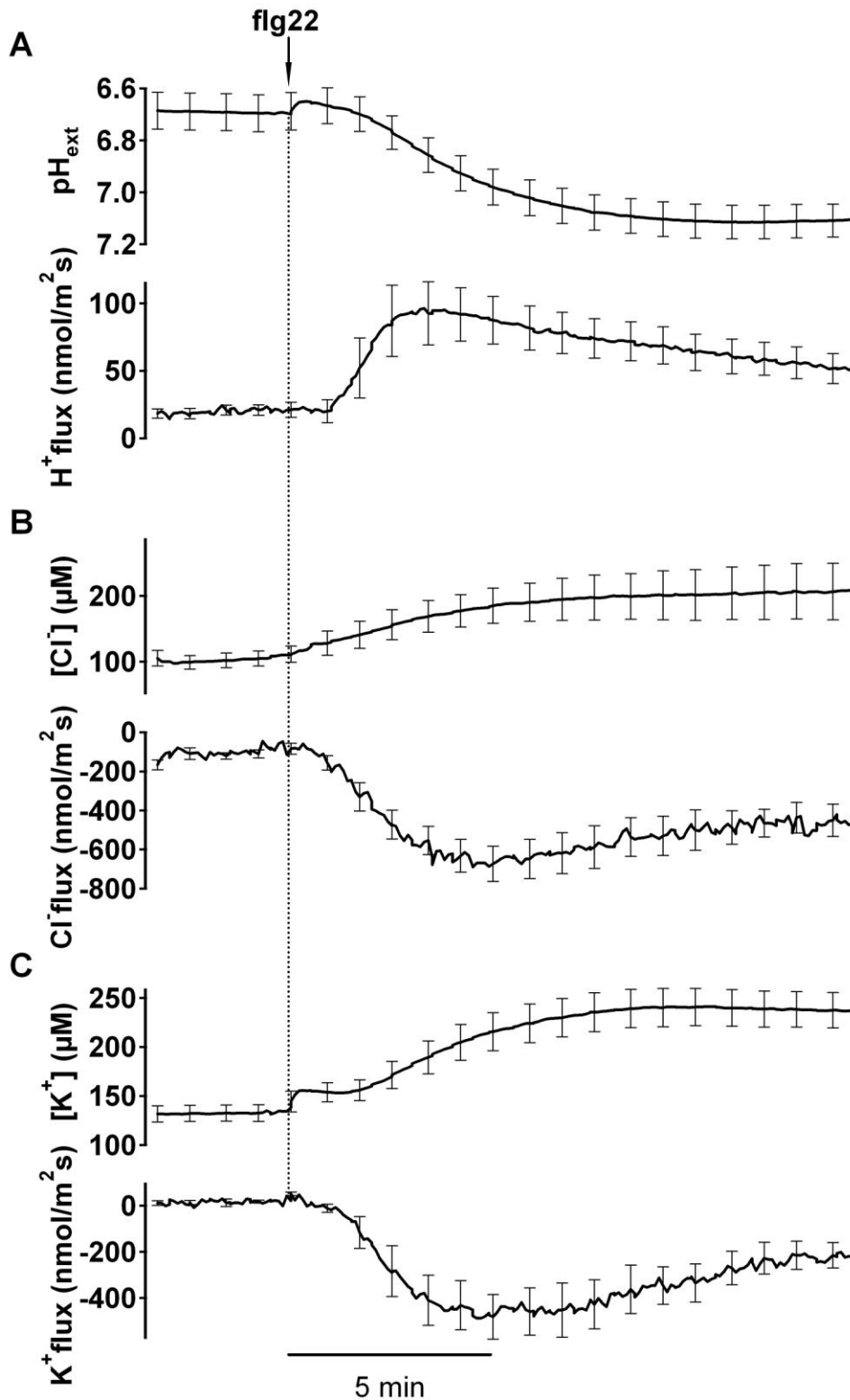


Abb. 3.13: flg22 induziert eine externe Alkalisierung durch einen Protoneneinstrom und eine Erhöhung der externen Chlorid- und

Kaliumkonzentration durch einen Chlorid- und Kaliumausstrom in *Arabidopsis* Mesophyllzellen (MIFE™). 10 bzw. 60 μm von *Arabidopsis thaliana* Col-0 Mesophyllzellen entfernt ändert sich durch Applikation von 10 nM flg22 das externe Ionengleichgewicht, hinsichtlich der externen Protonenkonzentration **(A)**, der Chloridkonzentration **(B)** und der Kaliumkonzentration **(C)**. Das Messen der Ionenkonzentration in 2 Positionen ermöglicht die Berechnung der Grösse und Richtung des Ionenflusses (jeweils untere Spur in (A) bis (C)). Definitionsgemäß und unabhängig von der Ladung des Ions ist ein positiver Ionenstrom ein Einstrom und ein Negativer ein Ausstrom. Jedes Experiment wurde 6 bis 14 Mal an unabhängigen Präparaten verschiedener Pflanzen wiederholt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardfehlern.

Selbst unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die verwendeten Elektroden nie eine 100 %-ige Selektivität nur für eine einzige Ionenspezies besitzen, war der beobachtete Kalium- und Chloridausstrom hinsichtlich Kinetik und Amplitude sehr ähnlich. Da sich darüber hinaus Chloridausstrom und Protoneneinstrom zeitlich nahezu überlagerten stellte sich die Frage, ob bzw. wie diese Prozesse eventuell miteinander gekoppelt sein könnten.

Um dieser Frage nachzugehen wurden simultane Messungen mit zwei verschiedenen ionenselektiven Elektroden durchgeführt (Abbildung 3.14 A und 3.14 B). Beide Elektroden befanden sich im gleichen Abstand zum Gewebe und sollten dem zu Folge exakt gleiche Bedingungen vorfinden.

Nach Applikation von flg22 konnte ein zeitgleicher Einstrom von Protonen und ein Ausstrom von Chlorid (Abb 3.14 A) beobachtet werden. Platzierte man Kalium- und Protonen-selektive Elektroden im Mikrometer Abstand voneinander, wurde eine zeitliche Verschiebung der Protonen- und Kaliumflüsse um etwa 30 s auflösbar (Abb 3.14 B). Eine direkte Kopplung des Kalium- und Protonentransportes war damit unwahrscheinlich und die Ergebnisse könnten auf eine Kopplung von Chlorid und Protonen und einem folgenden transienten Massenfluss von Kalium und Chlorid hinweisen. Experimente mit dem elf18 Peptid zeigten ähnliche, aber weniger ausgeprägte Ionenflüsse. Desweiteren konnten weder mit dem N-terminal verkürzten Peptid flg22 Δ 2 noch mit dem von *Agrobacterium tumefaciens* stammenden flg22 Ionenströme in *Arabidopsis* Mesophyllzellen detektiert werden (nicht gezeigt, aber analog Teil 3.2.2, Abb. 3.7).

Ergebnisse

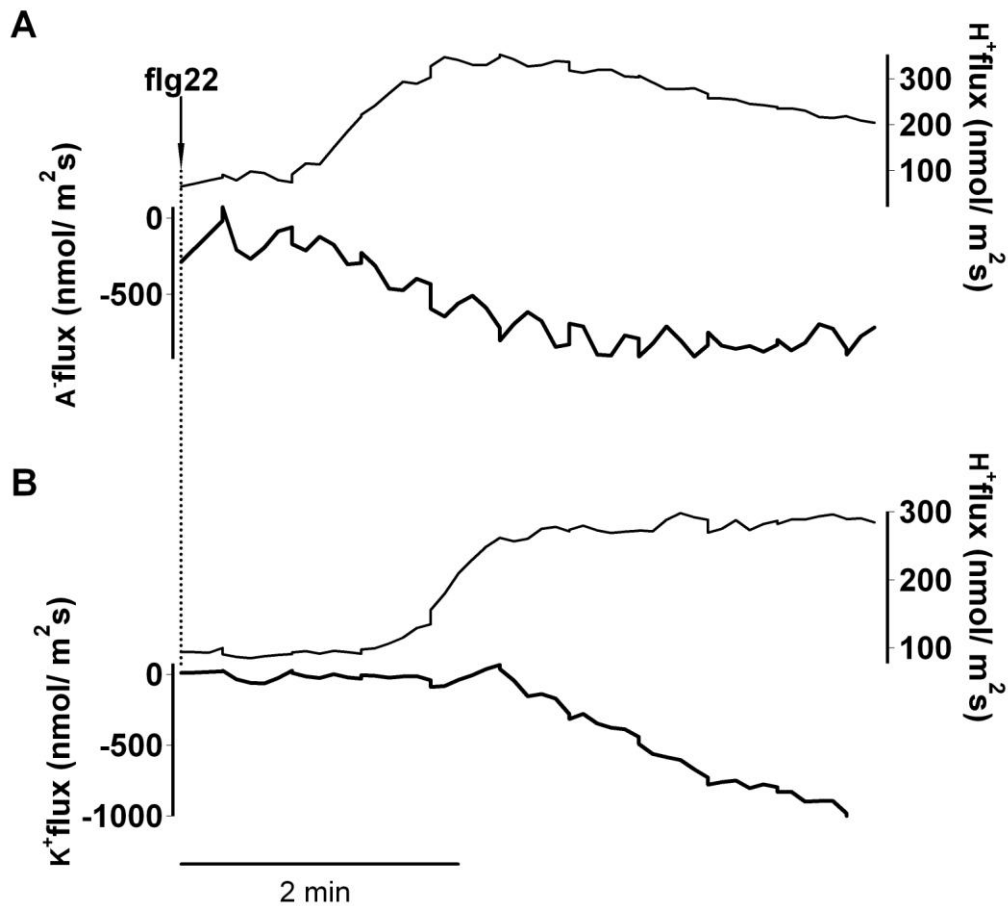


Abb. 3.14: Kombinationsmessungen mit 2 Ionen-selektiven Elektroden zeigten, dass der Chloridausstrom zeitgleich mit dem Protoneneinstrom stattfindet, jedoch zeitlich versetzt zum Kaliumausstrom. **(A)** nach Applikation von 10 nM flg22 beginnt der Protoneneinstrom und Chloridausstrom zur gleichen Zeit nach etwa 1 min und erreicht sein Maximum bereits nach 2 min, im Gegensatz dazu erreicht der Anionausstrom sein Maximum bei 4 min. **(B)** Kombiniert man Kalium- und Protonen-selektive Elektroden, kann man eine zeitliche Verschiebung des Kaliumausstromes um mehr als 30 s auflösen.

3.3.2 Die Elizitor-induzierte externe Alkalisierung

Eine externe Alkalisierung könnte auf eine Inhibierung der Protonen-ATPase in der Plasmamembran zurückzuführen sein. Pugin et al 1997 schlägt dagegen vor, dass der Elektronentransfer vom zytosolischen Elektronendonator NADPH zum Elektronenakzeptor an der extrazellulären Seite einen Verbrauch von Protonen durch verschiedene Reaktionen hervorrufen kann. Dieser Abbau des elektrochemischen Protonengradienten hätte wiederum eine Membrandepolarisation und externe Alkalisierung zur Konsequenz. Die Aktivierung des Plasmamembran Redox Systems

Ergebnisse

(der NADPH-abhängigen Oxidase) und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Pflanzen ist eine allgemeine Abwehrantwort der Pflanze auf Pathogene oder PAMPs. Es bleibt also die Frage offen, ob dieser Transport von Elektronen die Ursache für die Depolarisation und externe Alkalisierung als Antwort auf bakterielles Flagellin ist.

Diphenyl Iodonium Chlorid (DPI), ein Blocker der neutrophilen NADPH-Oxidase ist bekannt als Blocker der Elizitor-induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Simon-Plas et al., 1997). In *Arabidopsis* Mesophyllzellen konnte die flg22-induzierte Membrandepolarisation nach 5 bis 25 minütiger Behandlung mit 25 μM DPI nicht gehemmt werden (Abbildung 3.15 A). Da die flg22 abhängige ROS Produktion durch 10 μM DPI völlig gehemmt wird (Felix et al., 1999), scheint die flg22-induzierte Membrandepolarisation nicht direkt an die ROS Produktion gekoppelt zu sein oder ihr voranzugehen.

Ebenso ändert eine Alkalisierung der Badlösung von pH 6 auf pH 7,5 nichts an der Stärke der folgenden flg22-induzierten Depolarisation (Abbildung 3.15 B). Obwohl das Pilzgift Fusicoccin (FC) die H^+ -ATPase aktiviert und somit zur Hyperpolarisation der Membran führte (Abbildung 3.15 C) und auch einen gesteigerten Protonenausstrom hervorrief (MIFETM Daten nicht gezeigt), verhinderte die folgende Applikation von flg22, den flg22 bedingten Protoneneinstrom und die Membrandepolarisation nicht (Abb. 3.15 C). Diese Messungen lassen vermuten, dass es sich um eine Aufnahme von Protonen in die Zelle handelt, möglicherweise im Symport oder Antiport mit Anionen oder durch eine große Multiionenpore?

Ergebnisse

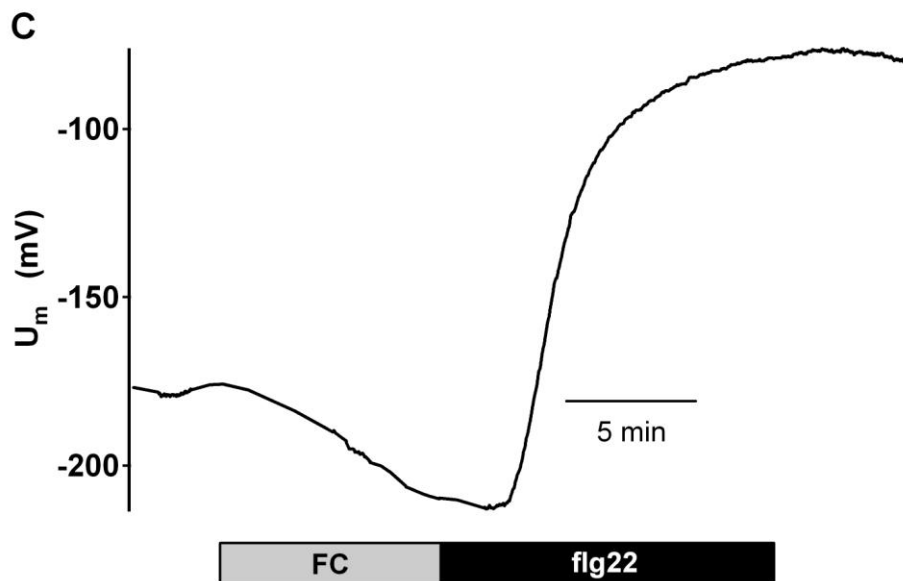
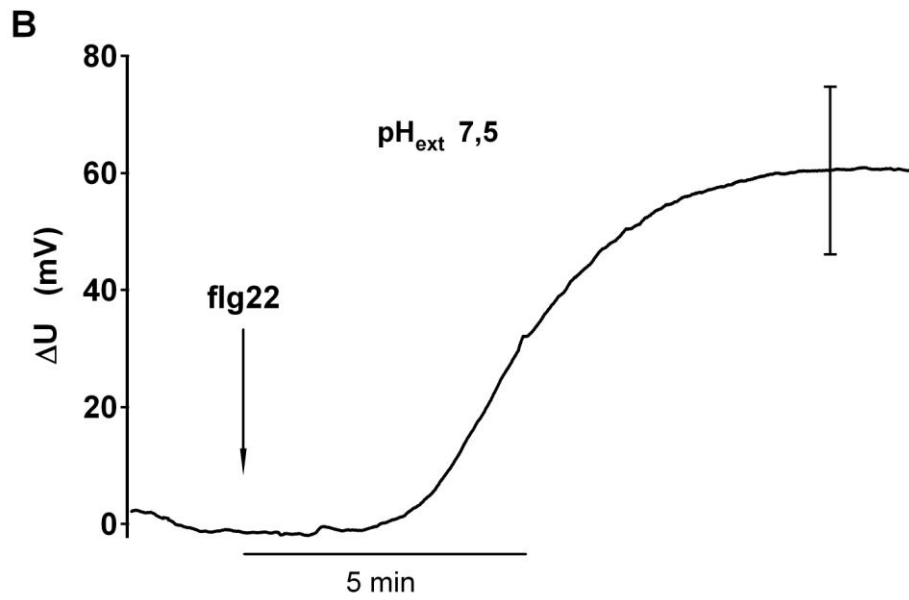
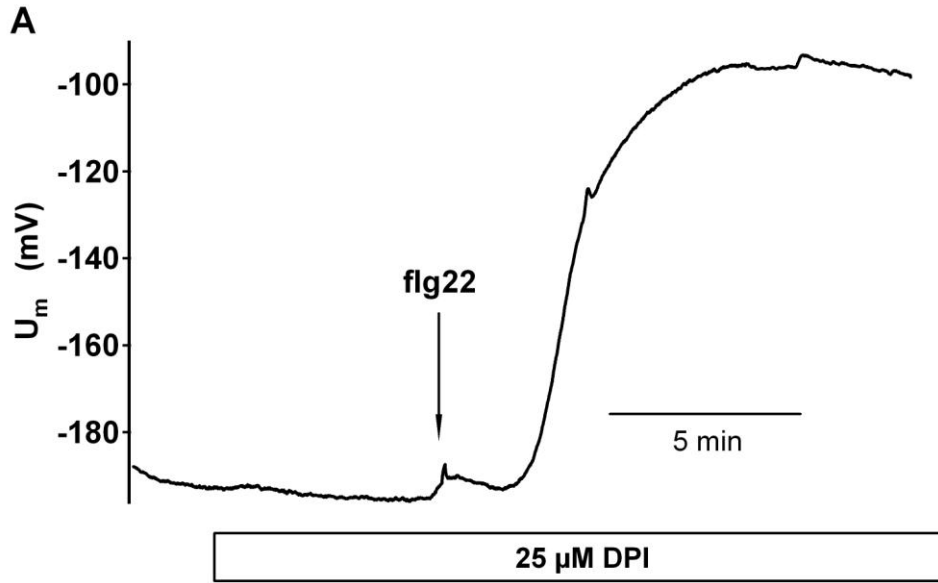


Abb. 3.15: Diphenyl Iodonium Chlorid (DPI), eine alkalische Badlösung oder das Pilzgift Fusicoccin haben keinen Effekt auf die flg22-induzierte Depolarisation von Arabidopsis Mesophyllzellen. (A) Arabidopsis Mesophyllzellen wurden mit 25 μ M DPI, ein Blocker der neutrophilen NADPH-Oxidase, 5 min oder 25 min vor flg22 (10 nM) Gabe inkubiert (n=3). **(B)** Eine Verringerung der externen Protonenkonzentration von pH 6 auf pH 7,5 zeigt keinen Effekt (n=5). **(C)** 100 μ M Fusicoccin führen durch Aktivierung der Protonen ATPase zu einer Hyperpolarisation der Membran um mehr als 40 mV. Diese Hyperpolarisation wird aber von der Depolarisation durch flg22 (10 nM) dominiert (n=3).

3.3.3 Kalzium als Signalmolekül in der basalen Immunität

Zahlreiche Stimuli führen zu einer zytosolischen Kalziumkonzentrationsänderung. Dies konnte für abiotische, wie zum Beispiel einem Kälteschock (Carpaneto et al., 2007) als auch für biotische Stimuli, wie zum Beispiel den Zelltod induzierenden pilzlichen Elizitor Cryptogein aus *Phytophthora cryptogea* (Lecourieux et al., 2005) gezeigt werden. Wie in Abb. 3.2 zu sehen ist, führten unterschiedliche Bakterienlysate (von Pseudomonaden, Agrobakterien und Azospirillen) zu einem transienten Anstieg des zytosolischen Kalziumspiegels. Eine Änderung des Kalziummusters in der Zelle scheint daher einen allgemeinen Mechanismus der Mikrobenerkennung in der Pflanze darzustellen (Nürnberg und Scheel, 2001; Romeis et al., 2001; Lecourieux et al., 2006 und darin enthaltende Referenzen). Um die Rolle des Kalziums als sekundären Botenstoff in der flg22 Erkennung zu untersuchen, wurden *Arabidopsis* C24 Blätter, die Apoaequorin konstitutiv exprimierten für Kalzium-sensitive Lumineszenzmessungen mit einem Photomultiplier oder einer hochsensitiven Lumineszenzkamera (für simultane Kalziumlumineszenz- und Einstichmessungen) verwendet.

Die zytosolische Kalziumkonzentration in Mesophyllzellen betrug in über 50 Experimenten etwa 100 nM $[Ca^{2+}]_{zyt}$. Ausgehend von dieser Kalziumkonzentration stieg sie in Mesophyllzellen als Antwort auf flg22 in einer Dosis abhängigen Weise. Beginnend bei 1 pM flg22 stieg $[Ca^{2+}]_{zyt}$ um etwa 100 nM (Abb 3.16 A inset) bis hin zu 1 μ M $[Ca^{2+}]_{zyt}$ bei sättigenden Konzentrationen von 1 und 10 μ M flg22 (Abb. 3.16 A). Interessanterweise startete bei hohen flg22 Konzentrationen das Kalziumsignal schon nach 30s und erreichte sein Maximum bereits nach einer Minute. Im Vergleich zu niedrigeren flg22 Konzentrationen sank das Signal schnell

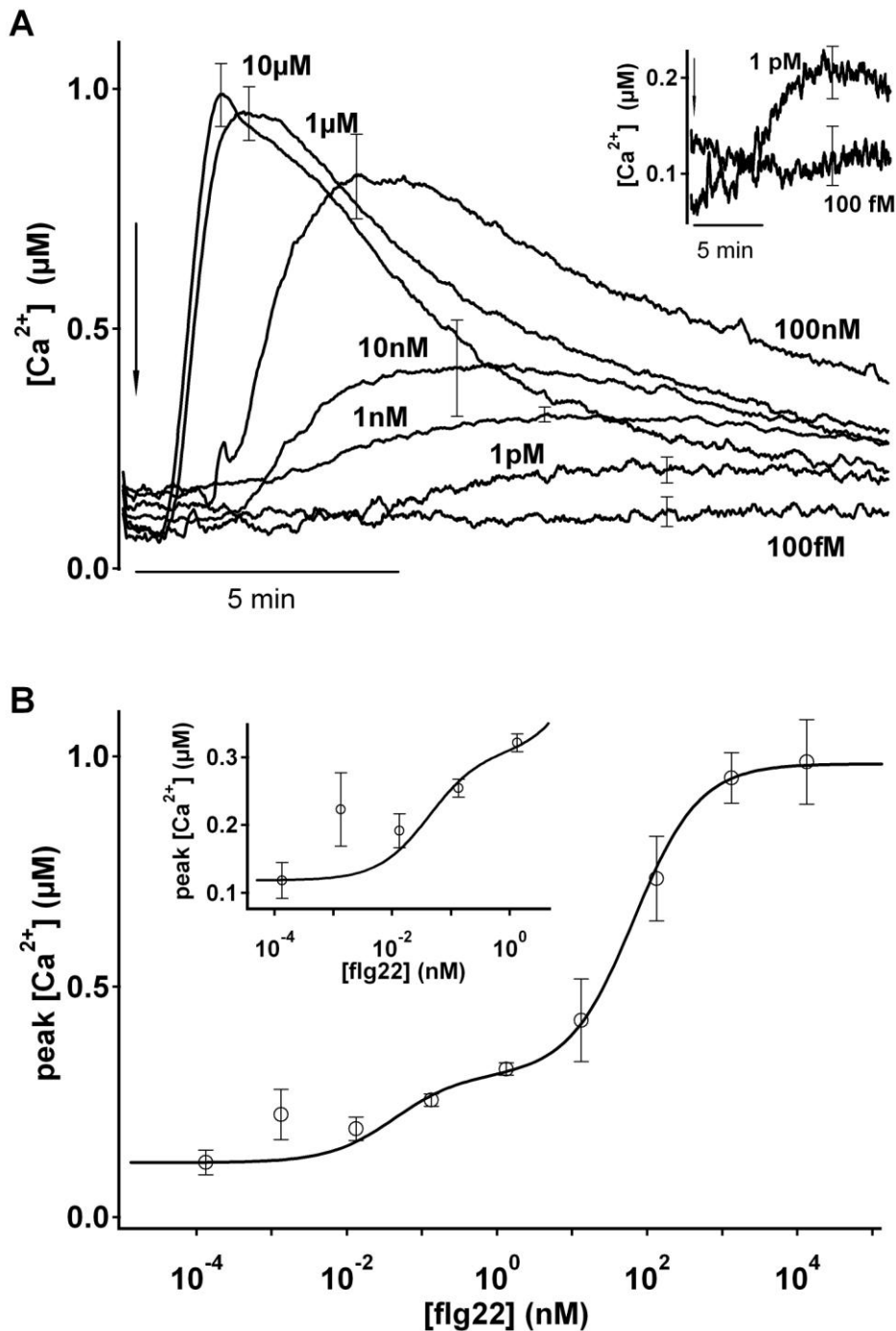


Abb. 3.16: Die flg22-induzierte zytosolische Kalziumsignatur in *Arabidopsis* C24 Aequorin Blattscheiben ist hochsensitiv. (A) flg22 moduliert das kalziuminduzierte Lumineszenzsignal Dosis-abhängig in seiner Kinetik und Amplitude. Flg22 wurde in Konzentrationen von 10 μM bis 100 fM appliziert (alle dargestellt in (B)). Für jede Konzentration wurden mindestens 6 unabhängige Experimente durchgeführt. Die Standardfehler sind als Fehlerbalken in (A) und (B) dargestellt. Inset: Bereits 1 pM flg22 erhöht $[Ca^{2+}]_{zyt}$ um 100 nM. **(B)** Die Maximalwerte der flg22-induzierten zytosolischen Kalziumkonzentrationen wurden gegen die applizierte flg22 Konzentration aufgetragen und mit einer doppelten Michaelis-Menten Kinetik beschrieben. Im Inset sind die kleinen Kalziumkonzentrationserhöhungen vergrößert dargestellt.

Ergebnisse

wieder auf das Ausgangsniveau zurück (ähnliche Ergebnisse konnte Lecourieux et al 2005 erzielen). Im Gegensatz zu Ergebnissen von Kadota et al. (2004) konnte ich in meinen Experimenten mit flg22 keinen biphasischen Kalziumpeak feststellen. Um die halbmaximale effektive flg22 Konzentration zu bestimmen, wurden die Maximalwerte logarithmisch gegen die applizierte flg22 Konzentration aufgetragen (Abbildung 3.16 B). Änderungen in $[Ca^{2+}]_{zyt}$ als Antwort auf flg22 Konzentrationen von 0,1 pM bis 10 μ M (jeweils $n \geq 6 \pm SF$) konnten am Besten mit einer doppelten Michaelis-Menten Kinetik beschrieben werden. Von einer Ausgangskonzentration von 100 nM $[Ca^{2+}]_{cyt}$ im Zytosol konnten maximale Werte von 1 μ M $[Ca^{2+}]_{zyt}$ bei $\geq 1 \mu$ M flg22 erreicht werden. Mit der Funktion

$$f(x) = [Ca^{2+}]_{initial} + [Ca^{2+}]_{max1} * x / (x + EC_{50 1}) + [Ca^{2+}]_{max2} * x / (x + EC_{50 2})$$

konnten zwei EC_{50} Werte beschrieben werden, wobei einer im hochaffinen Bereich (0,1 pM-1 nM) von 43 ± 2 pM und der Zweite im etwas niedrigeren hochaffinen Bereich (1 nM – 1 μ M) bei 67 ± 42 nM lag.

Im Gegensatz zu anderen Stimuli, wie z.B. einem Kälteschock oder K-Glutamat Applikation, ruft die Applikation von flg22 oder elf18 nur einen schwachen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration hervor (Abb. 3.17). Die Elizitor-induzierten Signale sind jedoch langanhaltender.

In Abb. 3.17 ist eine Spannungsspur dargestellt, die Membranspannungsänderungen als Antwort auf verschiedene Stressestimuli, beschreibt. Hier wurde die Membran durch flg22 Gabe anhaltend depolarisiert.

Dabei zeigte sich, dass Mesophyllzellen auch im depolarisierten Zustand auf einen Kältestimulus reagierten, der mit eisgekühlter Badlösung appliziert wurde. Durch den Kälteschock war eine kurze transiente Depolarisation zu beobachten. Desweiteren war auffällig, dass die durch Elizitorgabe depolarisierte Membran beschleunigt wieder repolarisierte. Ein zweiter Kälteschock führte ebenfalls zu einer Depolarisation zu -80 mV und daraufhin zu einer zunehmend beschleunigten Repolarisation. Die korrespondierenden Kalziumlumineszenzbilder, die abhängig vom Zeitpunkt der Aufnahme an der Zeitachse angeordnet sind, stellen die Intensität der Kalziumkonzentration im Zytosol in Falschfarben dar (Weiss/ rot, die maximale Intensität und schwarz/ blau die minimale Intensität). Zu beachten ist, dass die Belichtungszeit für den Kältestimulus nur eine Sekunde betrug, während aufgrund

Ergebnisse

der geringen Intensität des Signals die Elizitor-induzierte Kalziumlumineszenz, mit einer Belichtungszeit von 1 min aufgenommen wurde (Abb. 3.17).

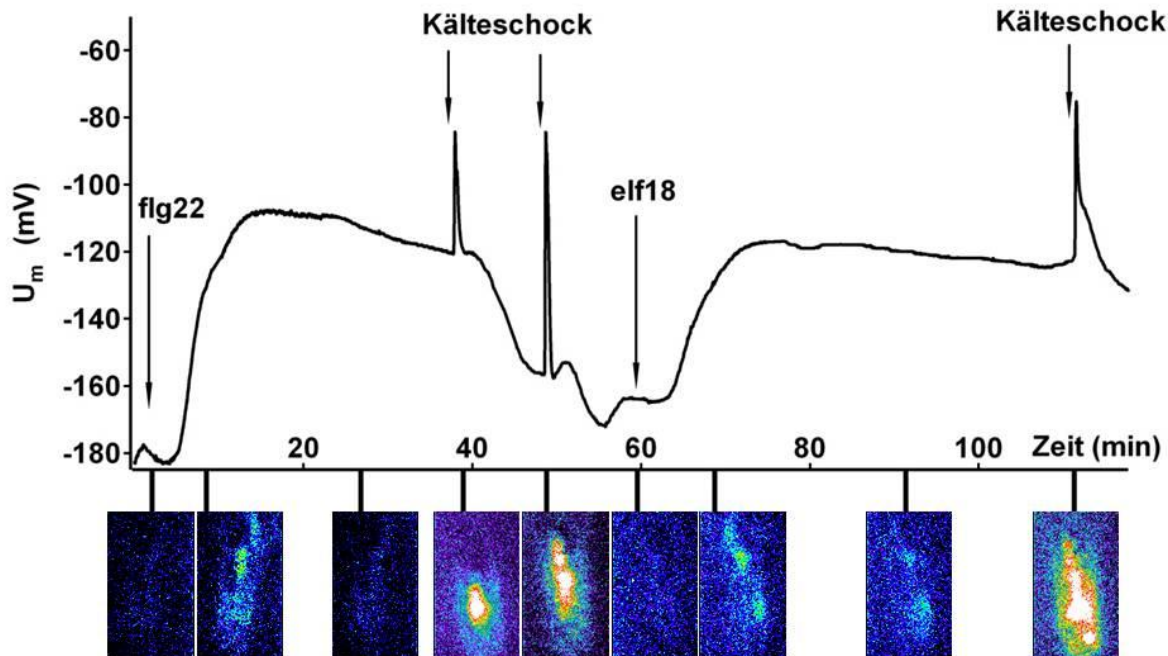


Abb. 3.17: Simultane Messungen von Membranpotentialänderungen und Aequorinlumineszenz durch verschiedene Elizitoren und Kälte in *Arabidopsis* C24 Aequorin Mesophyllzellen. Die Elizitor-induzierte Depolarisation der Membran (je 10 nM flg22 und elf18) wird von einem Kalziumsignal begleitet. Eine Belichtungszeit des hochsensitiven CCD Chips, von einer Minute, ermöglicht die Visualisierung des sehr kleinen Kalziumkonzentrationsänderungen im Zytosol (siehe auch Abb. 3.16). Ein Kälteschock, appliziert durch eine Eis-gekühlte Badlösung, induziert auch nach wiederholter Gabe eine schnelle Depolarisation der Membran und ein starkes Kalziumlumineszenzsignal (Belichtungszeit 1 s). Es wurden beispielhaft Bilder ausgewählt, die der Zeitachse der Spannungsspur zugeordnet wurden.

Mesophyllzellen, an denen Kälteschockexperimente durchgeführt wurden, zeigten auch nach der Protoplastierung immer noch die gleiche Sensitivität gegenüber dem Kältestimulus wie im intakten Gewebe (Carpaneto et al., 2007). Dieselben Protoplasten zeigten jedoch, in Kalziumlumineszenz- oder auch Patch-Clamp Experimenten auf alle getesteten Elizitoren, wie flg22 oder elf18, keine Antwort mehr ($n \geq 20$, Daten nicht gezeigt). Dies deutet daraufhin, dass unterschiedliche Kanäle oder unterschiedliche Regulationsmechanismen dem Kälte- induzierten bzw. Elizitor-induzierten Kalziumsignal zu Grunde liegen. Es stellt sich also die Frage, ob die starke und nur sehr langsam transiente Depolarisation durch flg22 möglicherweise

Ergebnisse

durch einen Kalziumpermeablen Kationenkanal vermittelt wird? Um eine mögliche Verknüpfung der Membrandepolarisation mit dem zytosolischen Kalziumspiegel zu studieren, wurden simultane Einstichmessungen und Aequorinlumineszenzexperimente in der Dunkelkammer einer Lumineszenzkamera durchgeführt (Abb. 3.17 und Abb. 3.18).

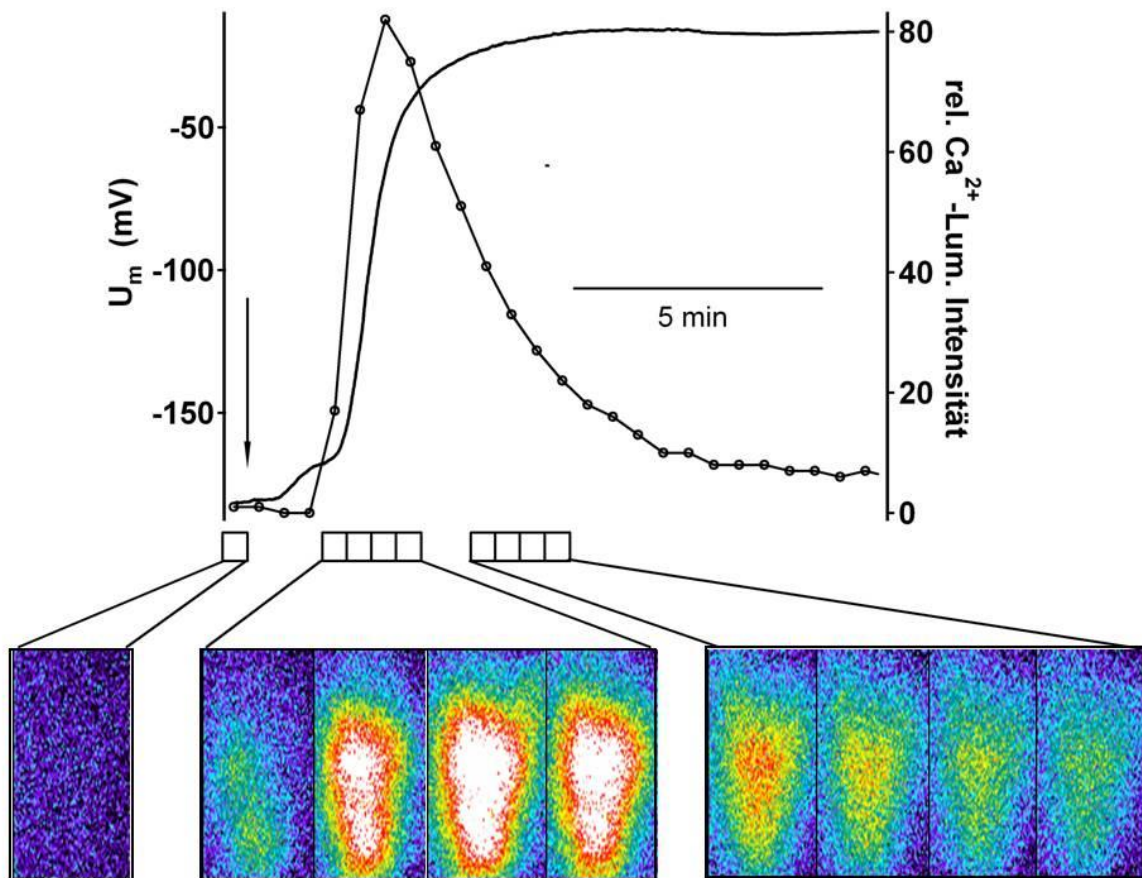


Abb. 3.18: Das flg22-induzierte zytosolische Kalziumsignal geht mit der Depolarisation in Arabidopsis C24 Aequorin Mesophyllzellen einher. Gleichzeitige Messung der Kalziumlumineszenz und des Membranpotentials. Aus den Lumineszenzbildern (Zeitpunkt der Aufnahme durch die schwarzen Kästchen gekennzeichnet), wurden relative Kalziumlumineszenzintensitätswerte berechnet (rechte Achse und Kreissymbole). Lumineszenzintensität wurde durch Falschfarben dargestellt; Schwarz/Blau indiziert niedrige Intensität und Rot/Weiss eine hohe Intensität.

Wie in Abbildung 3.18 gezeigt wird, wurde die Stärke der Lumineszenz, die in den Bildern mit Falschfarben dargestellt ist, mit dem Programm Metamorph (InvisiTron,

Ergebnisse

Germany) in relativen Werten dargestellt. Die Auftragung von quantitativen Datenpunkten der Kalziumlumineszenz (Linie mit Kreissymbolen) lässt sich so zeitlich besser mit der Spannungsspur (rechte Achse, durchgehende Linie) vergleichen. Wie in Abb. 3.18 zu sehen ist, entspricht ein Lumineszenzbild dem entsprechenden relativen Wert, der Lumineszenz, die über 30 s lang auf den Chip traf. Diese Art der Auswertung machte deutlich, dass das Kalziumsignal und die Depolarisation im gleichen Zeitrahmen begannen. Da das Kalziumsignal von kurzer, transientser Natur war, müssen andere Mechanismen das Anhalten der Depolarisation gewährleisten.

Eine Erhöhung der externen Kalziumkonzentration mit 20 mM Kalziumglukonat hatte keine Auswirkung auf die flg22-induzierte Membrandepolarisation im Vergleich zu Kontrollmessungen. Auch Blocker von Kationenkanälen wie 1 mM Cäsiumchlorid, 1 mM Zinkchlorid oder 2 mM Bariumchlorid beeinflussen die flg22-induzierte Membrandepolarisation nicht (Daten nicht gezeigt).

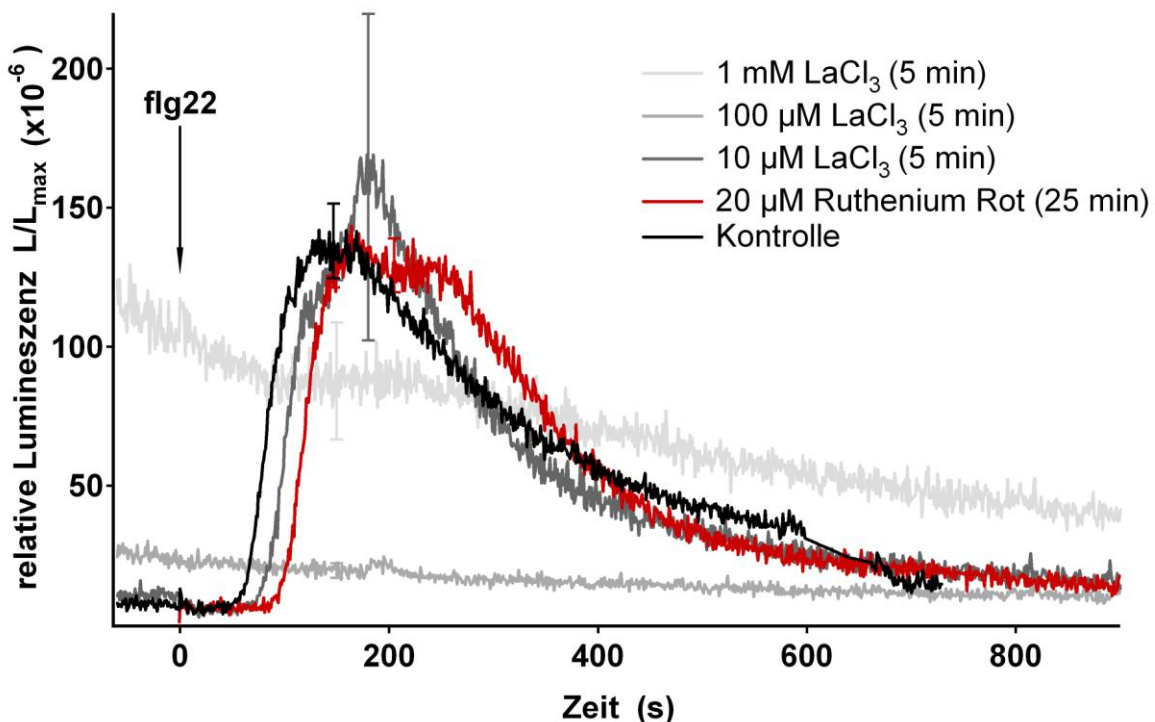


Abb. 3.19: Inhibierung der flg22^{P.syr.} induzierten zytosolischen Kalziumerhöhung durch Lanthan. Ab einer Konzentration von 100 μM Lanthanchlorid und nach 5 minutiger Inkubation von *Arabidopsis thaliana* C24 Aequorin Blattscheiben konnte eine völlige Inhibierung des Kalziumsignals beobachtet werden. Höhere Konzentrationen an Lanthan, hingegen, führten zu einer signifikanten zytosolischen Kalziumerhöhung, die das flg22 Signal sogar überdeckten. Blattscheiben, die in 20 μM Rutheniumrot 25 min lange inkubiert

Ergebnisse

wurden, zeigten aber keinen Block des Kalziumsignals bei flg22 Zugabe. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 verschiedenen Messungen mit dem Standardfehler.

Den einzigen wirksamen Inhibitor des Elizitor-induzierten Kalziumsignals stellte Lanthanchlorid dar (Abb. 3.19). Nach 5 minütiger Inkubation von *Arabidopsis* C24 Aequorin Blattstückchen mit LaCl_3 wurde das Kalziumsignal ab einer Blockerkonzentration von 100 μM vollständig gehemmt. Bei Konzentrationen von über 1 mM stieg der zytosolische Kalziumspiegel schon allein durch Zugabe des Blockers so stark an, dass das flg22-induzierte Kalziumsignal nicht mehr auflösbar war. Um diesen Block weiter zu untersuchen wurden zeitgleich noch Einstichexperimente durchgeführt und die Lumineszenz statt mit einem Photomultiplier, mit einer CCD Kamera detektiert (vergl. Abb 3.18). Schon bei der Applikation von sehr geringen Lanthankonzentrationen kam es zum Teil in simultanen Einstich- und Lumineszenzmessungen zu einem großen Abfall des Membranpotentials auf bis zu -50 mV, welches von einem Lumineszenzsignal begleitet wurde. Ob dieses Lumineszenzsignal durch zytosolisches Kalzium oder Lanthan hervorgerufen wurde ist offen. Das Lanthan-induzierte Lumineszenzsignal entsprach in seiner Kinetik der Depolarisation. In weiteren Vorexperimenten konnte jedoch festgestellt werden, dass die Lanthan-induzierte Depolarisation und Kalziumlumineszenz in jedem Mesophyllpräparat transient waren und sich das Membranpotential nach 30 bis 60 min wieder auf das Ausgangsruhepotential eingestellt hat. Ebenso war kein zytosolisches Kalzium durch Lumineszenz mehr zu detektieren. Um eine Dosisabhängigkeit der Flagelin induzierten Depolarisation von dem Blocker zu bestimmen wurde deshalb das Mesophyllgewebe mit dem Blocker eine Stunde lang vor der flg22 Applikation inkubiert, bis das Membranpotential wieder vollständig repolarisiert war (Abb. 3.20).

Ergebnisse

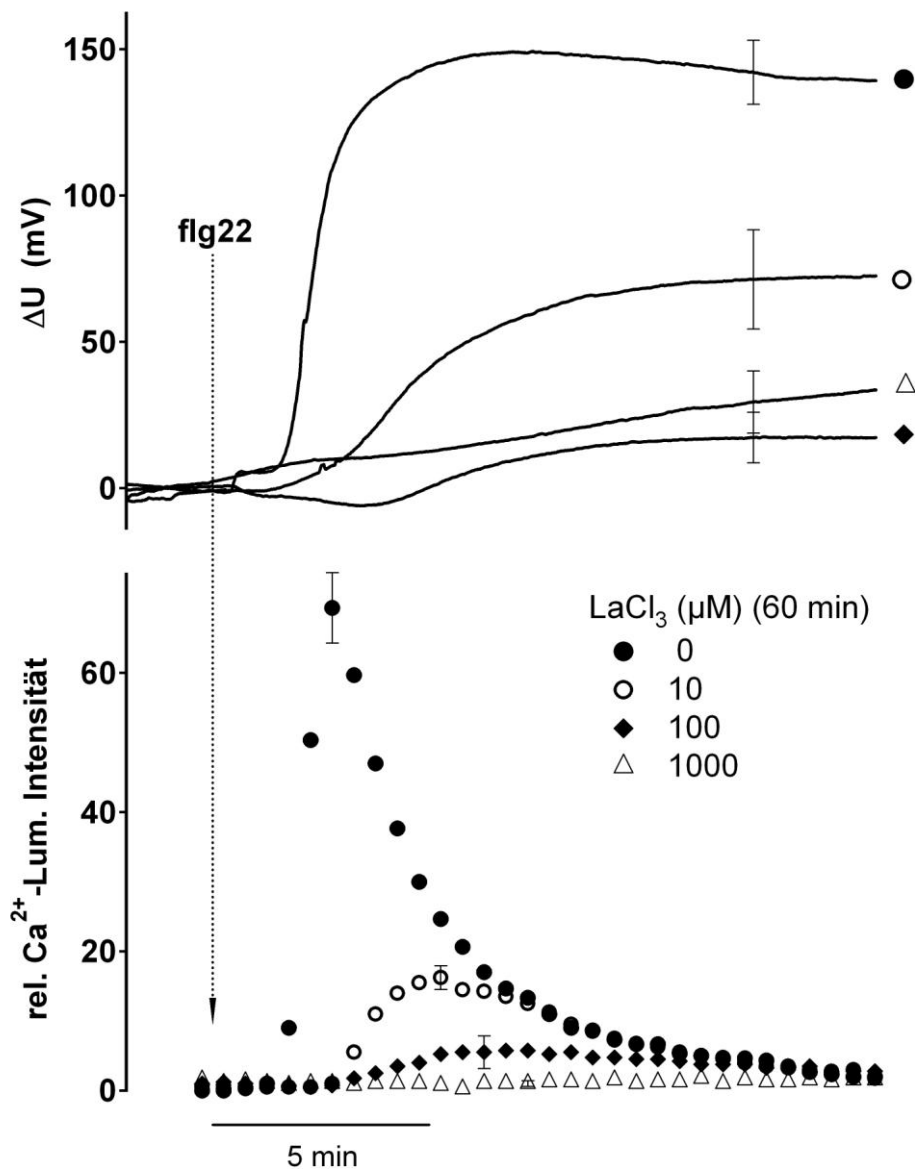


Abb. 3.20: Lanthan blockt die flg22-induzierte zytosolische Kalziuserhohung und die Depolarisation konzentrationsabhängig. Simultane Kalzium- und Membranpotentialmessungen an *Arabidopsis* Blättern (Symbole kennzeichnen zugehörige Messungen unter gleichen Bedingungen). Die Blätter wurden 1 h mit verschiedenen Konzentrationen von LaCl₃ von 10 μM bis 1 mM (je $n \geq 4 \pm \text{SF}$) inkubiert und dann auf 10 nM flg22 getestet.

Unter diesen Umständen blockten bereits 10 μM Lanthanchlorid (leere Kreise in Abb. 3.20) die flg22-induzierte Membrandepolarisation und das zytosolische Kalziumsignal etwa zur Hälfte im Gegensatz zu Kontrollblattern ohne Blocker (gefüllte Kreise). Bei einer Blockerkonzentration ab 1 mM Lanthan konnte keine Depolarisation und kein Kalziumsignal nach Applikation von flg22 mehr detektiert werden. Diese Daten zeigen eine direkte Verbindung der Depolarisation mit dem Kalziumsignal. Kalzium

Ergebnisse

könnte selbst für die Depolarisation verantwortlich sein, oder zur Aktivierung weiterer Kanäle führen, die dann eine Depolarisation der Membran hervorrufen.

Die bisherigen Experimente deuteten darauf hin, dass stromabwärts der Rezeptoren für flg22 (FLS2) als auch für elf18 (EFR) ähnliche, wenn nicht sogar gleiche Zielproteine aktiviert werden. So wurde zum Beispiel in Abbildung 3.11 gezeigt, dass bei nichtvollständiger Depolarisation der Membran nach flg22 Applikation, eine weitere Perfusion mit elf18 zu einer vollständigen Depolarisation führte. In folgendem Versuch sollte nun überprüft werden, ob bei Applikation des zweiten Elizitors (hier flg22) bei bereits depolarisierter Membran (durch 10 nM elf18), ein zweites messbares zytosolisches Kalziumsignal ausgelöst werden kann (Abb. 3.21). Zu diesem Zweck wurden gleichzeitige Einstich- und Kalziumlumineszenzmessungen durchgeführt.

Nach Gabe von elf 18 wurde ein transientes Kalziumsignal beobachtet (Abb. 3.21 A) und die Membran war innerhalb von 8 Minuten maximal depolarisiert. Die Zugabe von flg22 zu diesem Zeitpunkt, resultierte in einem zweiten Kalziumsignal, welches sich jedoch nur durch eine Schulter zeigte und nach etwa 15 min auf das zytosolische Ausgangsniveau zurückkehrte. Bei Applikation des flg22 11 min nach elf18 Gabe war bereits ein kleiner Kalziumpeak zu beobachten (Abb. 3.21 B). 16 min nach der ersten Elizitor Gabe (Abb. 3.21 C) konnte eine zweite Kalzium Reaktion auf einen weiteren Elizitor schließlich vollständig aufgelöst werden. Das zweite Kalziumsignal war allerdings deutlich geringer. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Kalziumleitfähigkeit einer hyperpolarisierten Membran größer ist als die einer depolarisierten Membran. Eine Desensibilisierung des Systems könnte ebenfalls Ursache dieser Beobachtung sein. Dies würde allerdings voraussetzen, dass mit Ausnahme des Rezeptors sowohl bei der Antwort auf elf18 als auch auf flg22 die gleiche Signaltransduktionskette aktiviert wird. Um die Kalziumsignalwege, die in der flg22 oder elf18 Antwort initiiert werden studieren zu können, wurden daher *Arabidopsis* Mutanten untersucht. Diese Ergebnisse werden mit allen anderen getesteten *Arabidopsis* Mutanten in Teil 3.6 dargestellt.

Ergebnisse

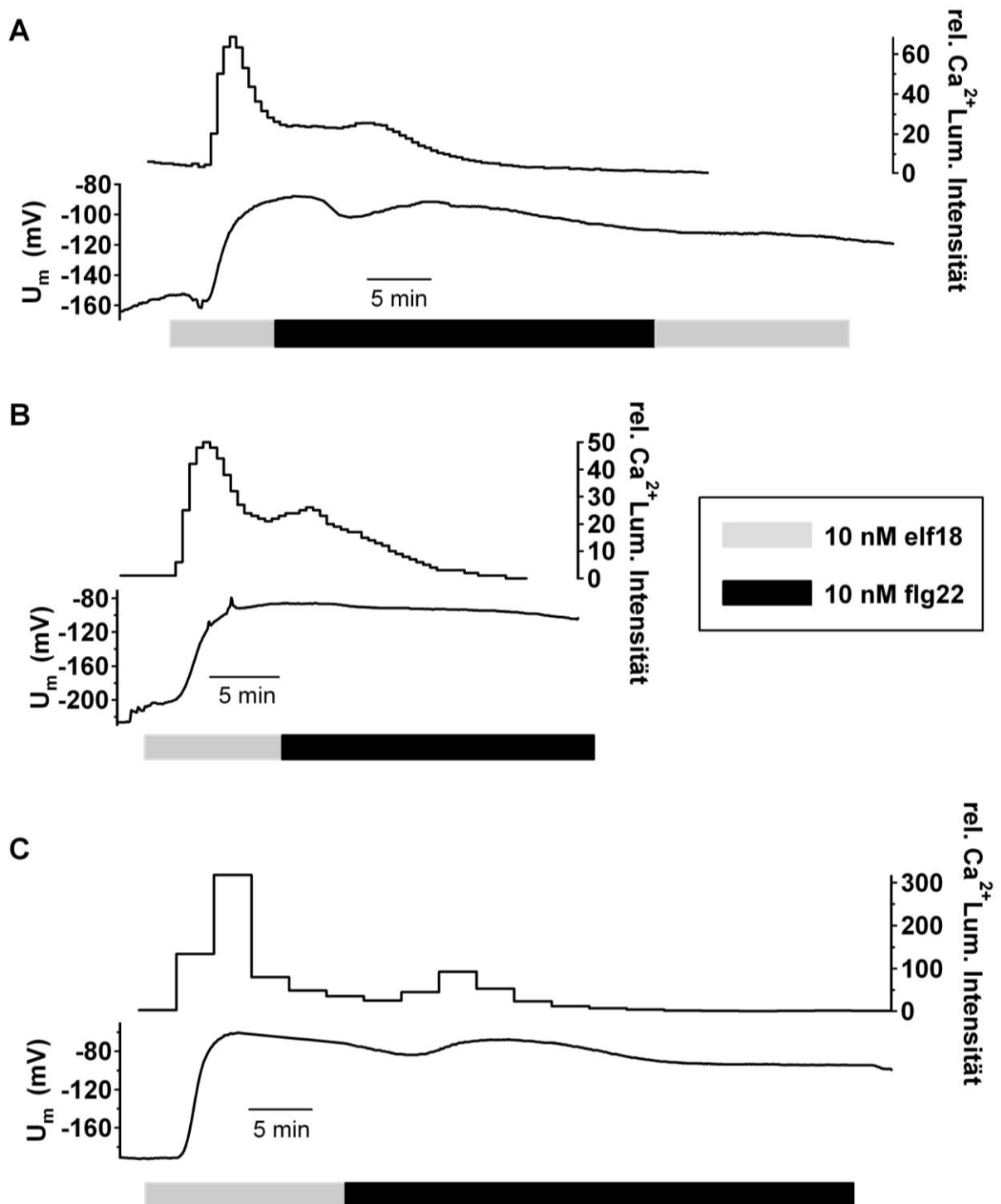


Abb. 3.21: Bereits mit elf18 elizitierte Mesophyllzellen bleiben sensitiv für flg22 und zeigen ein reduziertes Kalziumsignal bei bereits depolarisierter Membran (A) 8 min nach Depolarisation der Membran durch 10 nM elf18 (grauer Balken), kann man ein zweites Kalziumsignal durch 10 nM flg22 (schwarzer Balken) erkennen (Schulter). (B) Nach 11 min wird der Schulterpeak ausgeprägter. (C) Nach 16 min ist der zweite Kalziumpeak vom ersten getrennt und klar erkennbar.

3.3.4 Anionen dominieren die flg22-induzierte Membrandepolarisation

Die bisherigen Ergebnisse aus Messungen mit ionenselektiven Elektroden (Teil. 3.3.1) sowie die Daten zur Aequorinlumineszenz (Teil. 3.3.3) führen zu der Annahme, dass die flg22-induzierbare Depolarisation hauptsächlich durch Kalzium-abhängige Anionenkanäle hervorgerufen werden könnte. Zeitlich verzögert spielen wahrscheinlich auch Kaliumkanäle eine Rolle bei den Membranpotentialänderungen insbesondere der Repolarisation. Um diese Schlussfolgerungen zu überprüfen und zu bestätigen, wurde die Anionenkonzentration im Badmedium variiert und die flg22-induzierte Depolarisation gemessen. Bei einer 11-fachen Erhöhung der Chloridkonzentration von 2 mM in der Standardbadlösung auf 22 mM Cl^- konnte in 3 unabhängigen Messungen eine normale flg22 induzierbare Depolarisation gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Bei einer weiteren Erhöhung auf 50 mM Cl^- konnte in 2 von 6 Messungen eine völlige Inhibierung der Depolarisation durch flg22 gemessen werden (Abb. 3.22).

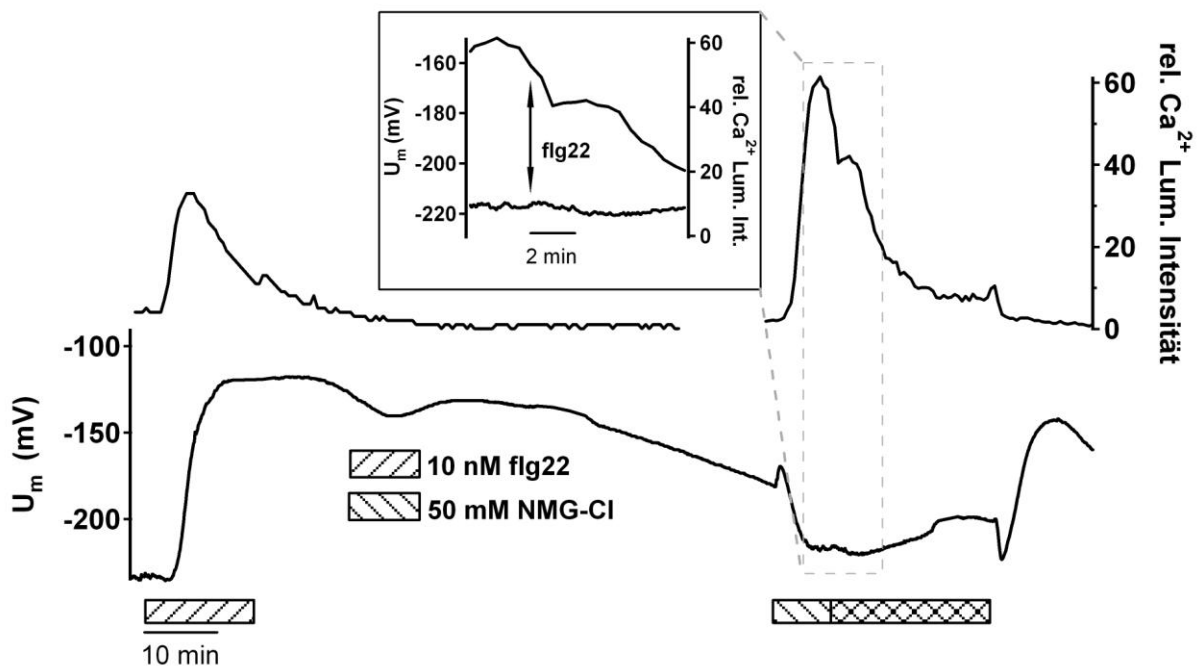


Abb. 3.22: Erhöhte externe Anionenkonzentrationen modulieren die flg22-induzierte Depolarisation der Plasmamembran in *Arabidopsis* Mesophyllzellen.

Ergebnisse

Nach einer Kontrollmessung unter Standardbedingungen wurde eine Depolarisation und ein Kalziumsignal nach 10 nM flg22 Gabe beobachtet. Das Auswaschen des Peptids führte zu einer langsamen Repolarisation des Membranpotentials und zum Abklingen des Kalziumsignals. Eine Erhöhung des Chloridgehaltes in der externen Lösung von 2 mM auf 52 mM resultierte in einer schnellen Hyperpolarisation und einem raschen Anstieg des zytosolischen Kalziumspiegels. Eine wiederholte Applikation von flg22 resultierte in einem Kalziumsignal (hier als Schulter zu sehen und im Kasten vergrößert), aber nicht in einer Depolarisation der Membran. Nach Auswaschen des NMG-Cl von 52 zurück auf 2 mM Chlorid depolarisiert die Membran auf das Level der flg22-induzierten Depolarisation zu diesem Zeitpunkt unter Kontrollbedingungen.

Jede Pflanze reagierte mehr oder minder stark auf die Applikation von flg22. Deshalb wurde vor dem Wechsel zu hohen Chloridkonzentrationen eine Kontrollmessung in der Standardlösung mit 2 mM Cl^- durchgeführt (Abb. 3.22). Unter diesen Bedingungen entsprachen der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration und die Potentialänderungen vergleichbaren Kontrollmessungen (vergl. Abb. 3.4 und 3.18). Nach einer Repolarisationsphase wurde dann die Chloridkonzentration auf 52 mM erhöht. Dies führte zu einer Hyperpolarisation und einem gleichzeitigen, signifikanten transienten zytosolischen Kalziumsignal. Diese Hyperpolarisation könnte mit Aufnahmemechanismen von Anionen zusammenhängen, was aufgrund der negativen Membranspannung wiederum in einer Aktivierung von beschriebenen hyperpolarisationsaktivierten, kalziumpermeablen Kanälen resultieren könnte (Gelli und Blumwald, 1997; Demidchik et al., 2002). Während sich das Kalziumsignal transient darstellte, relaxierte das Membranpotential auf über -200 mV. Während die folgende flg22 Applikation zu keiner signifikanten Änderung des Membranpotentials führte, konnte jedoch ein schnelles Ansteigen des zytosolischen Kalziums detektiert werden (Schulter in Abb. 3.22, Kasten). Nach Auswaschen des NMG-Chlorids sank die zytosolische Kalziumkonzentration auf Ruhewerte und die Membran depolarisierte zu Potentialen, die in Kontrollmessungen 40 min nach flg22 Gabe gemessen wurden.

Die Permeabilität von Anionenkanälen ist häufig nicht auf Chlorid begrenzt, sondern schließt neben Chlorid oft auch Nitrat ein (Frachisse et al., 1999; Barbier-Brygoo et al., 2000). Eine Depolarisation der Plasmamembran, die durch einen Anionenkanal getragen wird, resultiert aus einem Ausstrom von Anionen aus dem Zytosol der Zelle. Eine Anionenexudatanalyse sollte darüber Aufschluss geben, welches Anion bei der Applikation von flg22 aus der Zelle strömt (Abb. 3.23).

Ergebnisse

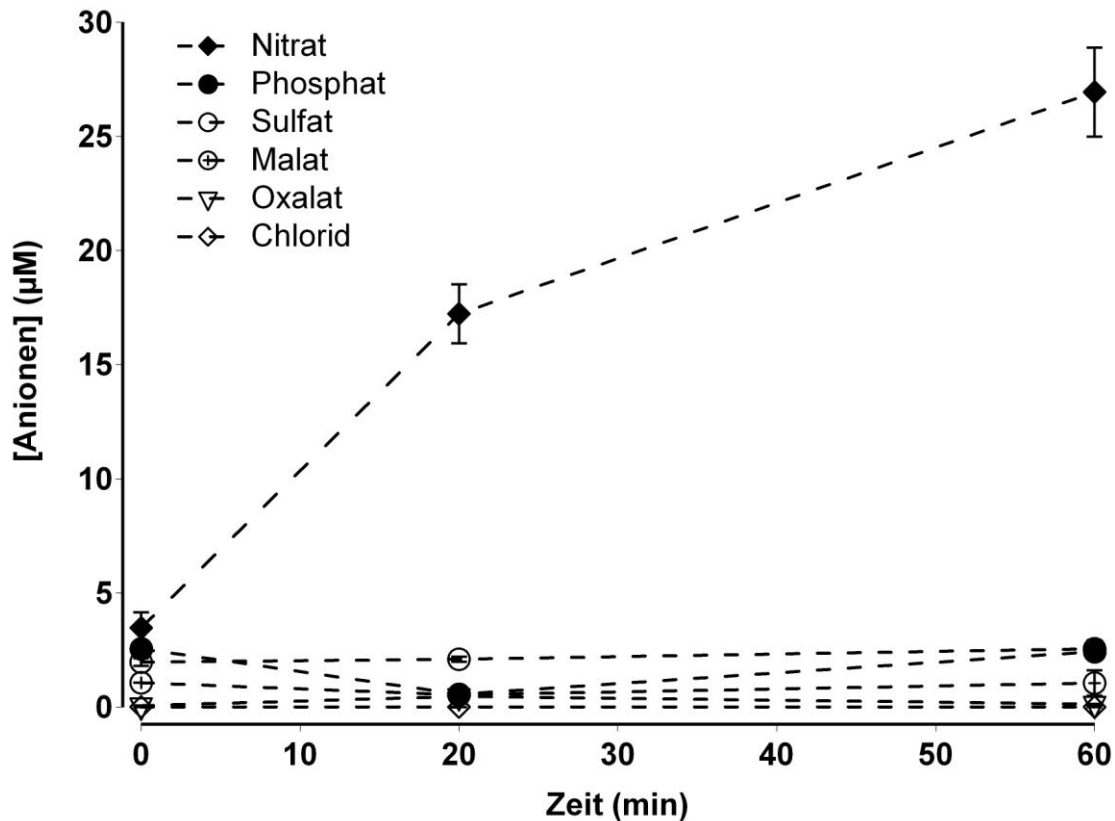


Abb. 3.23: flg22 induziert einen Nitratausstrom aus *Arabidopsis* Mesophyllzellen. Eine HPLC-Analyse der Exudate wurde zum Zeitpunkt der Applikation (t=0), t=20 min und t=60 min nach flg22 Behandlung durchgeführt. Im Gegensatz zu Chlorid, Oxalat, Malat, Sulfat und Phosphat konnte nur für Nitrat ein Anstieg in der apoplastischen Konzentration nachgewiesen werden. Das Experiment wurde 3 Mal wiederholt. Dargestellt sind die Anionenkonzentrationen in μM und die Standardfehler als Fehlerbalken.

Zu diesem Zweck wurde *Arabidopsis* Mesophyllgewebe mit 10 nM flg22 behandelt, der Mediumüberstand nach 0 min, 20 min und 60 min isoliert und der Anionengehalt mittels HPLC analysiert. Dabei zeigte sich, dass Pflanzen, die in MS-Medium angezogen wurden keinen Ausstrom von Chlorid aufwiesen. Im Gegensatz dazu stieg die Konzentration von Nitrat im Exudat von initial etwa $4 \mu\text{M}$ auf $17 \mu\text{M}$ nach 20 min und auf $27 \mu\text{M}$ nach 60 min. Neben Chlorid, wurden auch für Malat, Oxalat, Phosphat und Sulfat keine signifikanten Konzentrationsanstiege gefunden. Diese Ergebnisse deuten auf eine signifikante Nitrat-Permeabilität des beteiligten Anionkanals hin. In weiteren Experimenten wurde daher untersucht, ob das Aufheben dieses Anionengradienten einen Einfluss auf die flg22 vermittelte Depolarisation der Plasmamembran hat. In Einstichexperimenten mit *Arabidopsis* Mesophyllzellen wurde Nitrat in Form von N-Methylglucamin-Nitrat zur

Ergebnisse

Standardlösung dazugegeben und die flg22-induzierte Depolarisation gemessen. Bereits bei einer Konzentration von 5 mM Nitrat im Perfusionsmedium zeigten 11 von 15 flg22-induzierten Depolarisationen eine veränderte Kinetik. Diese modifizierte Antwort auf flg22 reichte von völliger Inhibition bis zu einer beschleunigten transienten Depolarisation im Minutenrahmen. 20 mM Nitrat in der Badlösung verhinderte die Depolarisation bei 3 von 4 Messungen völlig. Die Applikation von 50 mM Nitrat allein führte zu einer vollständigen Depolarisation der Mesophyllzellen, die sich auch über Stunden hinweg nicht wieder erholten.

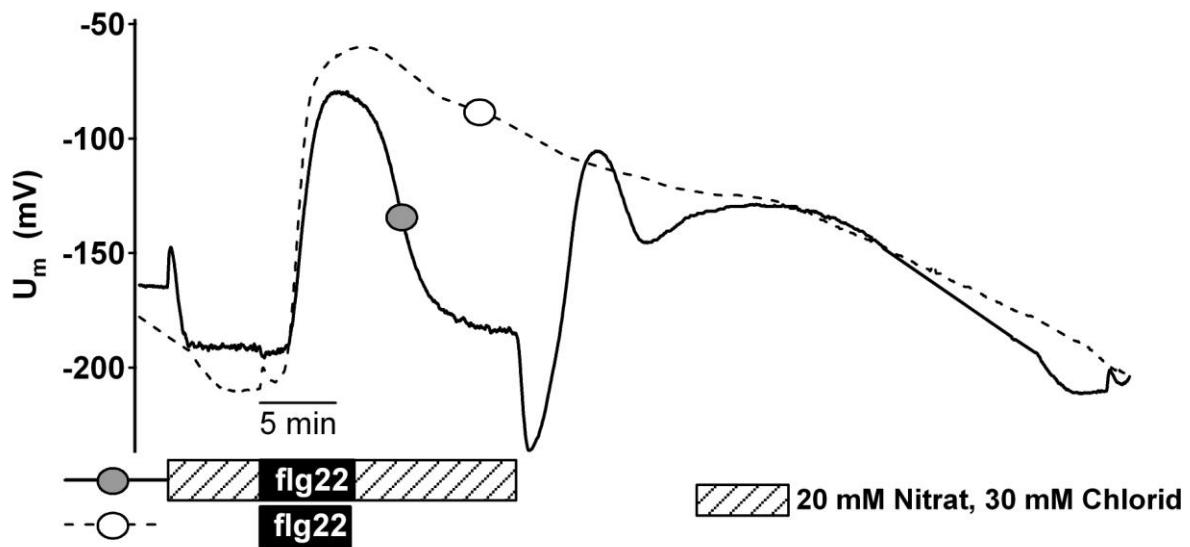


Abb. 3.24: schnelle transiente Depolarisation durch flg22 bei erhöhten externen Anionenkonzentrationen (Spannungsspur mit gefülltem Kreissymbol). Bei Anhebung der externen Anionen Konzentration (hier von 2 mM Cl^- auf 20 mM NO_3^- und 30 mM Cl^- ; gestrichelter Balken) hyperpolarisierte die Membran. Bei Applikation von 10 nM flg22 (Dauer der Applikation dargestellt anhand des schwarzen Balkens) zeigt sich in 9 von 16 gemessenen Mesophyllpräparaten eine schnelle Depolarisation gefolgt von einer schnellen Repolarisation. Wäscht man das Nitrat und Chlorid wieder aus, pegelt sich nach 5 bis 10 min das Membranpotential auf den Depolarisationsstatus der Kontrolle (weißes Kreissymbol) ein und die Repolarisationsgeschwindigkeit entspricht deckungsgleich dem der Kontrolle. Hier ist eines von 9 vergleichbaren Experimenten dargestellt.

Um das elektrochemische Potential über der Plasmamembran zu dem Umkehrpotential für Nitrat und Chlorid zu verschieben, wurde ein externes Medium mit 20 mM NMG-Nitrat und 30 mM NMG-Chlorid kombiniert. Tatsächlich konnte hier in 15 von 16 Messungen keine typische, flg22 abhängige Depolarisation gemessen werden. In 6 Fällen war die Depolarisation völlig inhibiert und in 9 Fällen zeigten sie

Ergebnisse

wie mit Nitrat allein eine schnelle transiente Depolarisation nach flg22 Applikation (Abb. 3.24).

Wie schon gezeigt wurde (Abb. 3.22), hyperpolarisiert das Membranpotential durch Erhöhung der externen Anionenkonzentration. Man könnte annehmen, dass hier Anionenaufnahmemechanismen aktiviert werden. Durch den flg22-induzierten Ausstrom depolarisiert die Membran bis zu dem Punkt, wo nun der fehlende Gradient wieder eine Repolarisation begünstigt (Abb. 3.24; Spur mit gefülltem Kreis gekennzeichnet). Ein Wiederherstellen des Anionengradienten durch Auswaschen des NMG-Chlorids und NMG-Nitrats auf 2 mM Cl⁻ in der Standardlösung liess das Membranpotential wieder auf ein Niveau depolarisieren, das vergleichbar mit der vorangegangenen flg22-induzierten Kontrolldepolarisation war (Abb. 3.24; Spur mit leerem Kreissymbol). Im weiteren Verlauf repolarisierte die Membran vergleichbar schnell wie die Kontrolle.

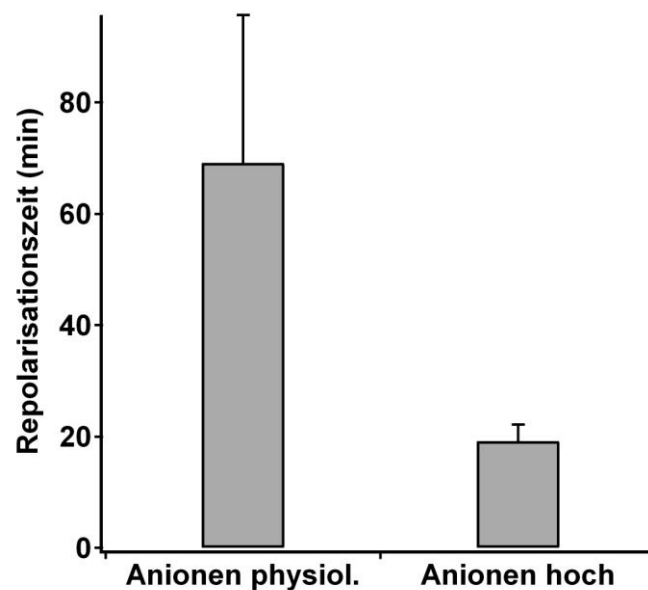


Abb. 3.25: Die Repolarisationsphase von Arabidopsis Mesophyllzellen nach der flg22-induzierten Depolarisation verkürzt sich signifikant in Anwesenheit von hohen externen Anionenkonzentrationen. Die Repolarisationphase verkürzt sich bei hohen externen Anionenkonzentrationen (30 mM NMG-Cl⁻ und 20 mM NMG-NO₃⁻; n = 9 ± SF) im Gegensatz zur Kontrolle (2 mM Cl⁻; n = 9 ± SF) auf ein Viertel zu etwa 20 min.

Nitrat könnte auch eine Signalwirkung haben und so die flg22-vermittelte Depolarisation beeinflussen. Messungen der flg22-ausgelösten

Ergebnisse

Membranpotentialdepolarisation in Anwesenheit von 5 μM NMG-Nitrat zeigten aber keinen Unterschied zu Messungen in der Kontrolllösung (Abb. 3.26).

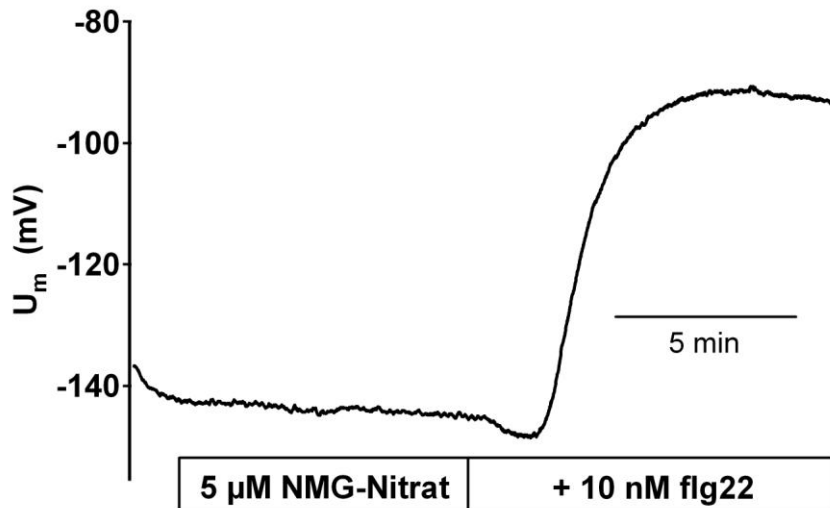


Abb. 3.26: Mikromolare Konzentrationen an externen Nitrat scheinen keine Signalwirkung auf die flg22-vermittelte Depolarisation zu haben. Nach einer über 8-minütigen Inkubation von 5 μM NMG-Nitrat depolarisierte das Membranpotential durch Applikation von 10 nM flg22 vergleichbar wie in Kontrollmessungen ($n=3$).

Um zu prüfen, ob auch andere Anionen neben Nitrat die Depolarisation auslösen könnten, wurden Pflanzen aufgezogen, die kein Nitrat mehr enthielten. Dies wurde erreicht indem diese Pflanzen in Nitrat-freiem Medium als Hydrokulturen gehalten wurden. Im Detail wurden Pflanzen in Hydrokultur für 4 Wochen auf 2 mM NH_4NO_3 aufgezogen. Diese Pflanzen wurden dann auf ein Medium mit 2 mM NH_4Cl als einziger N-Quelle umgesetzt und für weitere 3 Wochen kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt war kein Nitrat mehr nachweisbar (Abb. 3.27 A). Wie dem Diagramm zu entnehmen ist, waren die Hauptanionen im Zytosol/Vakuole Chlorid (20 mM),

Ergebnisse

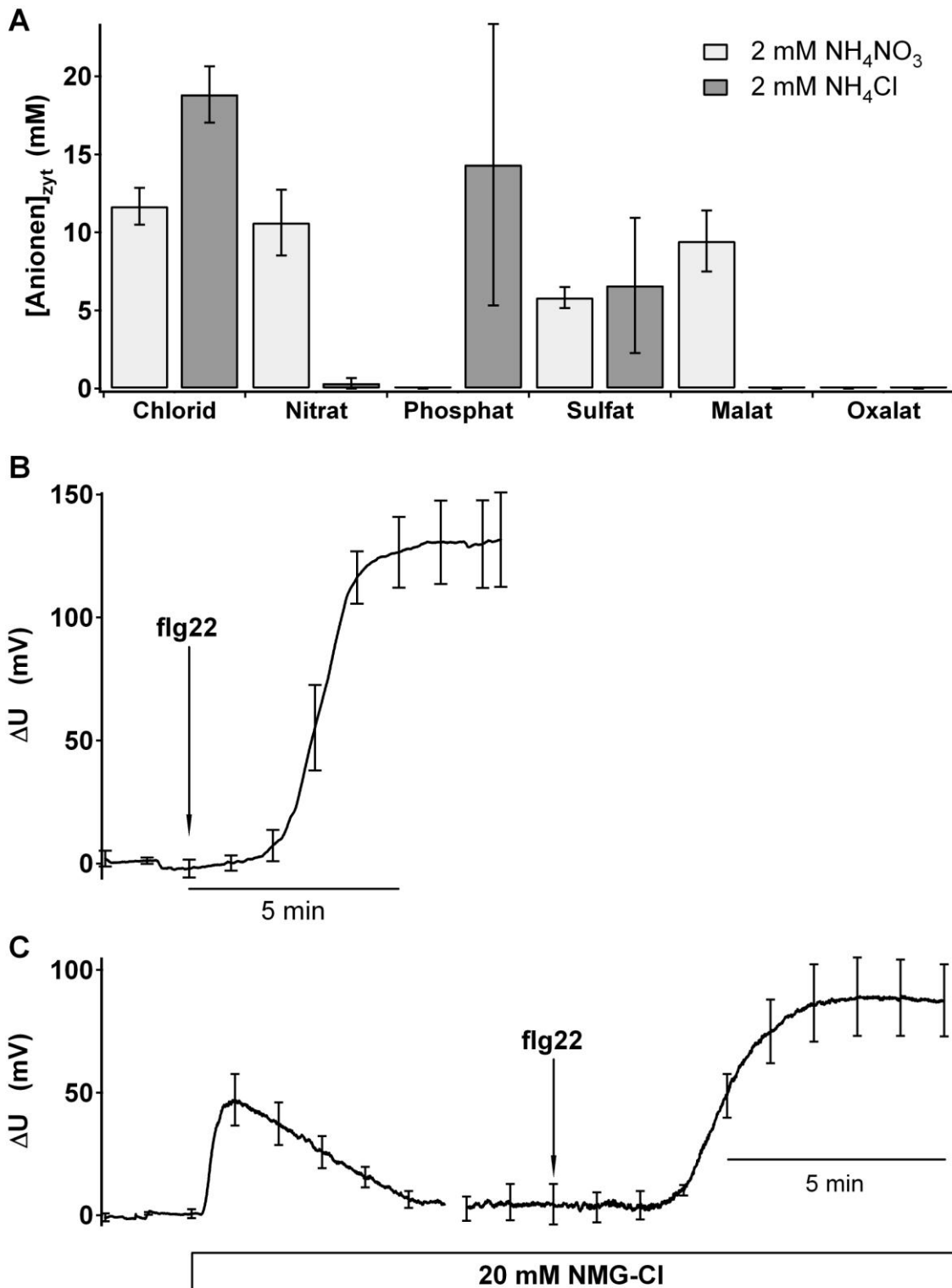


Abb. 3.27: In nitratfreien Mesophyllzellen kann eine vollständige Depolarisation durch flg22 auch durch andere Anionen gewährleistet werden. **(A)** durch HPLC ermittelte zytosolische Anionengehälter von 40 Tage alten *Arabidopsis* Col-0 Hydrokulturlpflanzen, die 10 Tage auf 2 mM NH₄NO₃ (dunklere Balken) und 2 mM NH₄Cl (helle Balken) wuchsen und für die Messungen in B und C verwendet wurden ($n = 3 \pm$ SF). **(B)** Nitratfreie Mesophyllzellen zeigen in Einstichexperimenten eine kontrollidentische Depolarisation als Antwort auf 10 nM flg22 ($n = 5 \pm$ SF). **(C)** Hebt

Ergebnisse

man die Konzentration von Chlorid im externen Medium als Hauptanion auf das zytosolische Level von 20 mM depolarisiert das Membranpotential transient und kehrt nach einigen Minuten wieder auf das Ruheausgangspotential zurück. Nachfolgende Applikation des flg22 Peptids (10 nM) führt zu einer im Vergleich zur Kontrolle etwas geringeren Depolarisation (vergl.(B); $n = 3 \pm SF$).

Phosphat (15 mM) und Sulfat (10 mM). Interessanterweise konnte bei diesen Nitratfrei aufgezogenen Pflanzen auch kein Malat nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war Malat zusammen mit Nitrat das am stärksten vertretene Anion in Kontrollpflanzen.

Pflanzen, die nachweislich kein Nitrat enthielten, zeigten eine Depolarisation in voller Ausprägung als Antwort auf flg22 Gabe (Abb. 3.27 B). Da die in der HPLC analysierte Konzentration des Chlorids etwa 20 mM betrug, wurde zur Minimierung des Chloridgradienten über der Plasmamembran, 20 mM NMG-Chlorid in die Perfusionslösung gegeben (Abb. 3.27 C). Die Nitrat-freien Mesophyllzellen reagierten darauf mit einer transienten Depolarisation der Membran, die nach 6 min wieder die Ausgangswerte erreichte. In diesem Falle führte die Verabreichung von erhöhten Anionenkonzentrationen im Außenmedium nicht zu einer Hyperpolarisation, sondern zu einer Depolarisation des Membranpotentials (vergleiche Abb. 3.22 und Abb. 3.24). Der Grund dieser transienten Depolarisation in Abb. 3.27 C ist nicht bekannt. Nach Wiederherstellung des Ruhepotentials ($t = 10$ min, -180 mV) wurde flg22 appliziert und eine Depolarisation gemessen, die vergleichbar mit Kontrollmessungen war. Da das Membranpotential noch weit von dem Umkehrpotential von Chlorid (unter diesen Bedingungen etwa 0 mV) entfernt war kann man leider keine klare Aussage darüber treffen, ob noch andere Anionen an der Depolarisation beteiligt sein könnten, auch wenn die flg22-induzierte Depolarisation (Abb. 3.27 C) um etwa 50 mV kleiner ausfällt als in der Kontrolle (Abb.3.27 B).

In Tabakpflanzen führt der nekrotisierende Elizitors Cryptogein zu einer hypersensitiven Reaktion und schließlich zum Zelltod. Die frühen Ereignisse an der Plasmamembran ähneln denen der flg22 induzierbaren Reaktion in Arabidopsis: Änderungen in zytosolischen Kalziummuster, pH, Anionen-Ausstrom, Depolarisation. Arbeiten von Wendehenne et al., (2002) zeigten, dass der putative Anionenkanalinhibitor Niflumsäure (NA) einen potenten Blocker der Cryptogein-induzierten Antwort darstellt. Aus Patch-Clamp Studien geht hervor, dass auch 5-Nitro-2(3-Phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) für zahlreiche Anionenkanäle ein

Ergebnisse

effektiver Blocker ist (Barbier-Brygoo et al., 2000). Wie in Abb. 3.28 A zu sehen ist, führte bereits die Gabe von 200 μM NPPB zu einem starken Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration, einer irreversiblen Depolarisation und schließlich zum Zelltod. Diese Ergebnisse bestätigen Experimente von Wendehenne et al., (2002) an Zellsuspensionszellen von Tabak. Bei einer Konzentration von 100 μM NPPB (Abb. 3.28 B) wurde ein durch den Blocker ausgelöstes transientes zytosolisches Kalziumsignal beobachtet welches mit einer um ca. + 20mV großen Membranpotentialänderung verbunden war.

Bei einer anschließenden flg22 Applikation konnte ein typisches Kalziumsignal detektiert werden und auch das Membranpotential depolarisierte vergleichbar zur Kontrolle. Letztere wurde nach Repolarisation des Membranpotentials und Rückkehr zu Standardbedingungen am selben Blattstück aufgenommen (Daten nicht gezeigt) Die flg22-induzierte Depolarisation und das zytosolische Kalziumsignal scheint demnach durch den tierischen Anionenkanalblocker NPPB nicht beeinflussbar zu sein.

Ergebnisse

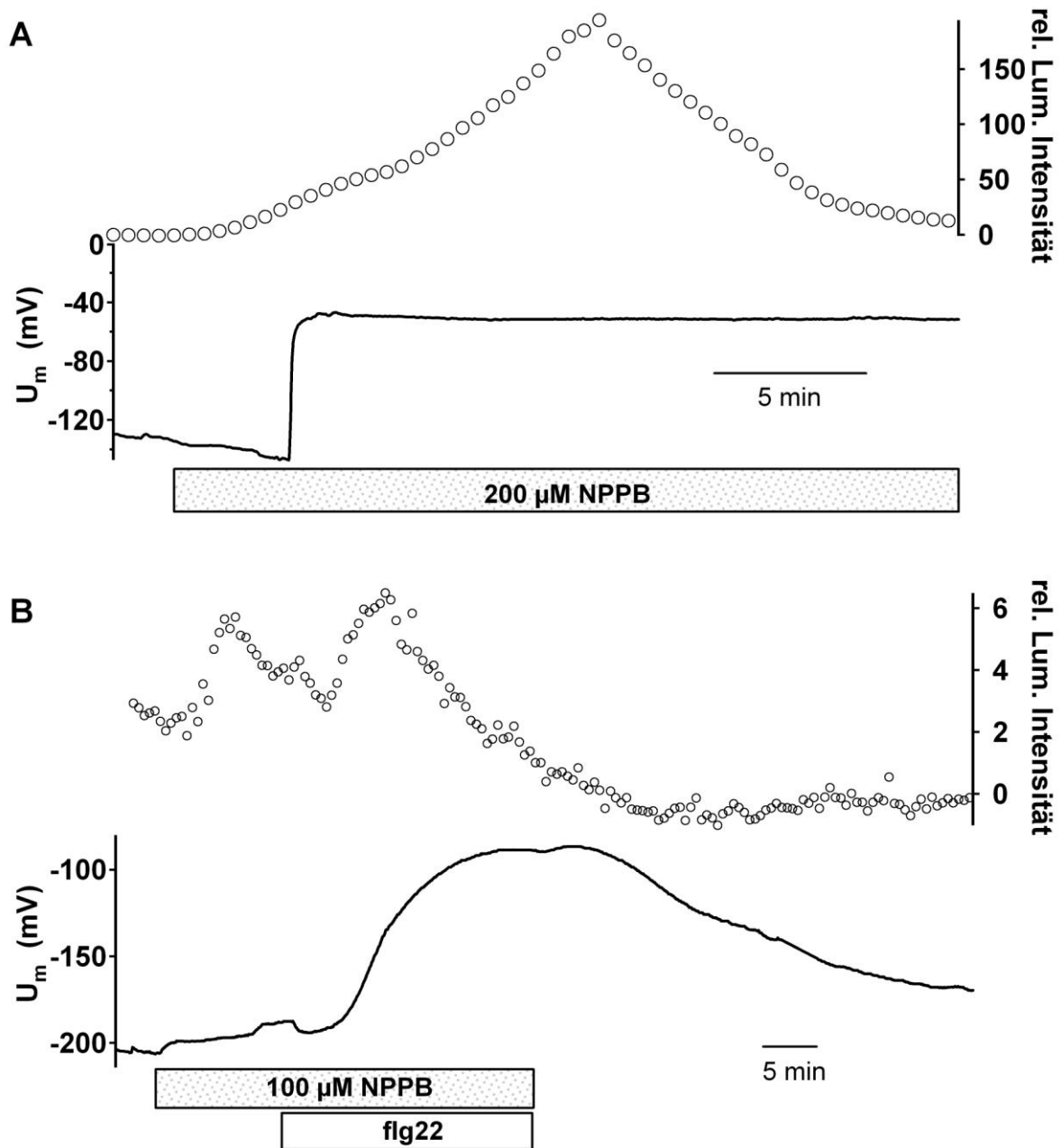


Abb. 3.28: NPPB, ein Anionenkanalblocker, blockte nicht die flg22-induzierte Depolarisation und auch nicht das Kalziumsignal. (A) 200 µM NPPB induziert ein zytosolisches Kalziumsignal, welches zu einer irreversiblen Depolarisation führte. **(B)** 100 µM NPPB konnte die flg22 vermittelte Antwort nicht hemmen.

Ähnlich verhielt es sich mit Niflumsäure (NA). 200 µM oder 100 µM frisch angesetzter Niflumsäure führte bei Mesophyllzellen zu einer starken Depolarisation von -210 mV auf -90 mV (Abb. 3.29 A). Diese Depolarisation war langanhaltend und bei folgender flg22 Applikation wurde keine Änderung des Membranpotentials mehr detektiert.

Ergebnisse

Verwendet man die 2 Tage alte bei -20°C weggefrorene NA-Stocklösung (20 mM), führte die Applikation von 100 oder 200 μM NA zu einer geringeren Depolarisation um etwa 40 bis 50 mV (Abb. 3.29 B).

Bei diesen Messungen konnte eine Depolarisation durch flg22 auf -50 mV simultan mit einem Kalziumsignal gemessen werden, wie es auch bei Kontrollmessungen beobachtet wurde. Der für den Elizitor Cryptogein beschriebene Block durch NA (Thomine et al., 1997; Wendehenne et al., 2002) liess sich für flg22 also nicht bestätigen. Da Cryptogein ein tabak-spezifischer Elizitor ist, könnten durch diese beiden Elizitoren verschiedene Ionenkanäle angesprochen werden, die eine unterschiedliche Pharmakologie aufweisen. Eine weitere Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte die Inhibitor-induzierte Membrandepolarisation sein. Aufgrund der bereits depolarisierten Membran wäre dann keine weitere Reaktion durch die Applikation des Elizitors zu erkennen.

Ergebnisse

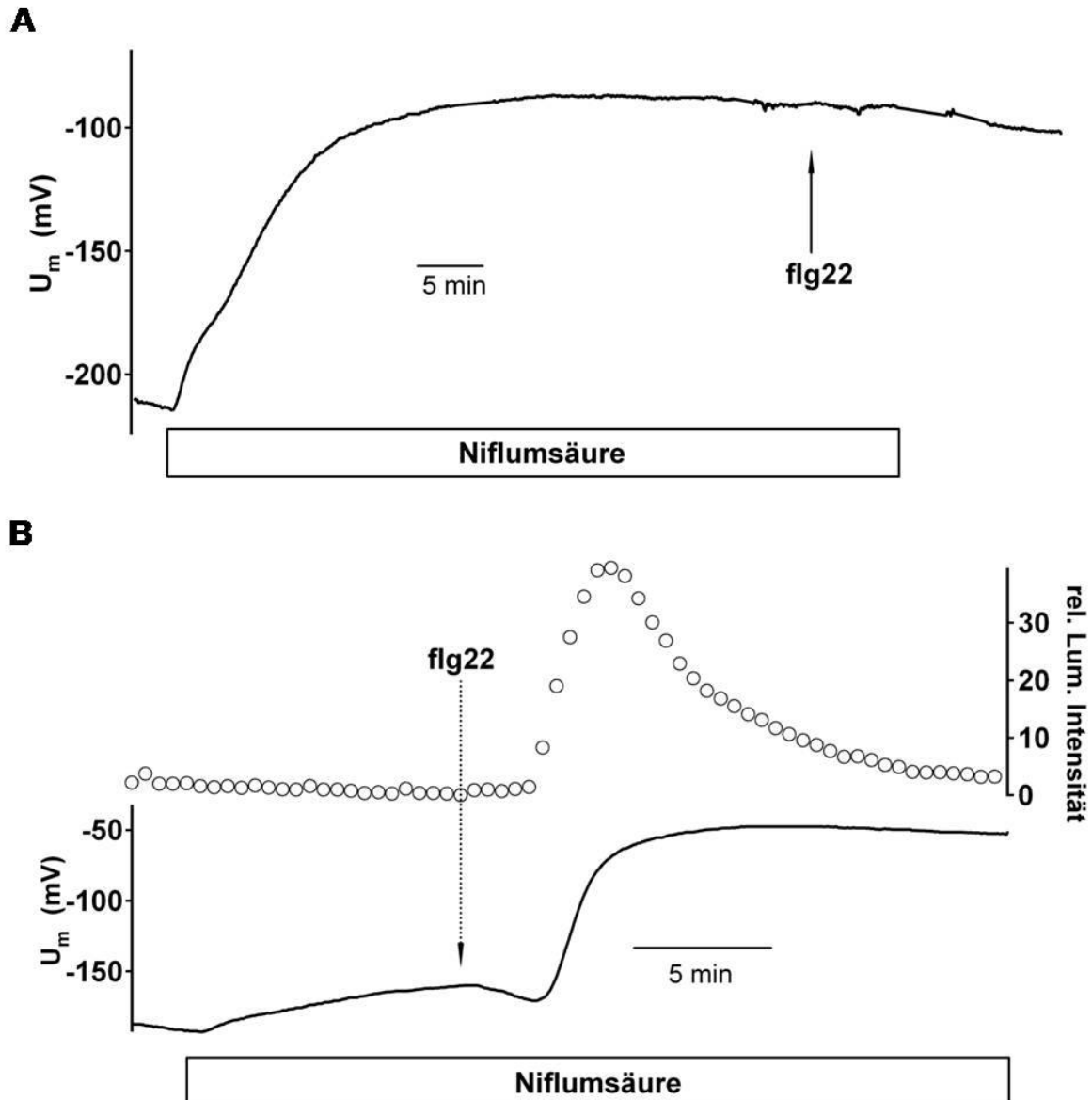


Abb. 3.29: Der Anionenkanalblocker Niflumsäure blockte die flg22-induzierte Membrandepolarisation und das zytosolische Kalziumsignal in *Arabidopsis* Mesophyllzellen nicht. (A) Die Applikation von 100 oder 200 μ M Niflumsäure (Gaymard et al., 1998) depolarisiert das Membranpotential vollständig. Eine anschließende flg22 Gabe hatte keine Potentialänderung mehr zur Folge. **(B)** der 2 Tage alte Blocker (100 μ M oder 200 μ M) führt zu einer leichten Depolarisation. Die flg22-induzierte Depolarisation und das zytosolische Kalziumsignal wurde jedoch nicht gehemmt. Das Experiment wurde 6 Mal, mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.3.5 Der flg22-induzierte Ausstrom von Kalium

Pflanzen sind mit vielen Signalen aus ihrer Umgebung konfrontiert. Oft reagieren sie daraufhin mit der Aktivierung von Kalzium- oder Anionenkanälen, wodurch die

Ergebnisse

Membran depolarisiert wird. Diese Depolarisation wiederum kann Depolarisations-aktivierte auswärtsgerichtete Kaliumkanäle aktivieren. Einen Ausstrom von Kalium nach Konfrontation von Pflanzen mit Pathogenen oder Elizitoren von Bakterien und Pilzen stellt oft eine der frühen Reaktionen der Pflanze dar (Blatt et al., 1999; Ivashikina et al., 2001). Um den flg22-induzierten Kaliumausstrom (siehe Abb. 3.13 C) zu untersuchen, wurden 6 Kaliumkanal-Verlustmutanten auf ihre flg22- und/oder elf18-induzierte Depolarisation getestet (Abb. 3.30). GORK und SKOR stellen die beiden Auswärtsgleichrichter in der Plasmamembran von *Arabidopsis* dar (Gaymard et al., 1998; Ache et al., 2000). Da diese Knockout-Mutanten beide den genetischen Hintergrund des Ökotyps *Ws-0* besitzen (Gaymard et al., 1998; Hossy et al., 2003), zeigten sie nur eine Antwort auf das Elongationsfaktorpeptid elf18 (Abb. 3.30 A). Expressionsanalysen konnten bisher die beiden Kaliumauswärtsgleichrichter nur in der Wurzel, Pollen oder Schließzellen nachweisen. Da aber im Laufe der flg22-induzierten Depolarisation der Plasmamembran auch ein Kaliumausstrom stattfindet, muss es auch eine Leitfähigkeit in Mesophyllzellen geben. In beiden *Arabidopsis* Mutanten war die Depolarisation/Repolarisation in ihrer Kinetik nicht beeinflusst (Abb. 3.30 A).

AKT1 und die modulatorische Untereinheit AtKC1 bilden in der Wurzel und auch in Hypokotyl- und Schließzellen Kaliumkanäle, die die Kaliumaufnahme vermitteln (Reintanz et al., 2002). Überraschenderweise zeigte die *akt1* Mutante (Hirsch et al., 1998) als Einzige der Kaliumkanalmutanten eine signifikant reduzierte Depolarisation als Antwort auf den Elizitor elf18 (Abb. 3.30). Diese Daten stehen allerdings im Widerspruch zum Expressionsmuster der AKT1 Transkripte, die nicht im Mesophyll zu finden sind (Lagarde et al., 1996). Weitere Messungen an dieser Mutante sind nötig, um hier die Natur der veränderten Elizitorantwort verstehen zu können. Interessanterweise fanden Ivashikina et al. (2001), dass GORK, AKT1 und AtKC1 die Repolarisation des Plasmamembranpotentials nach einer Pilz-Elizitor Behandlung in *Arabidopsis* Wurzelzellen vermitteln. Diese drei Kaliumkanäle konnten also in vorangegangenen Experimenten mit Elizitoren in Verbindung gebracht werden.

Ergebnisse

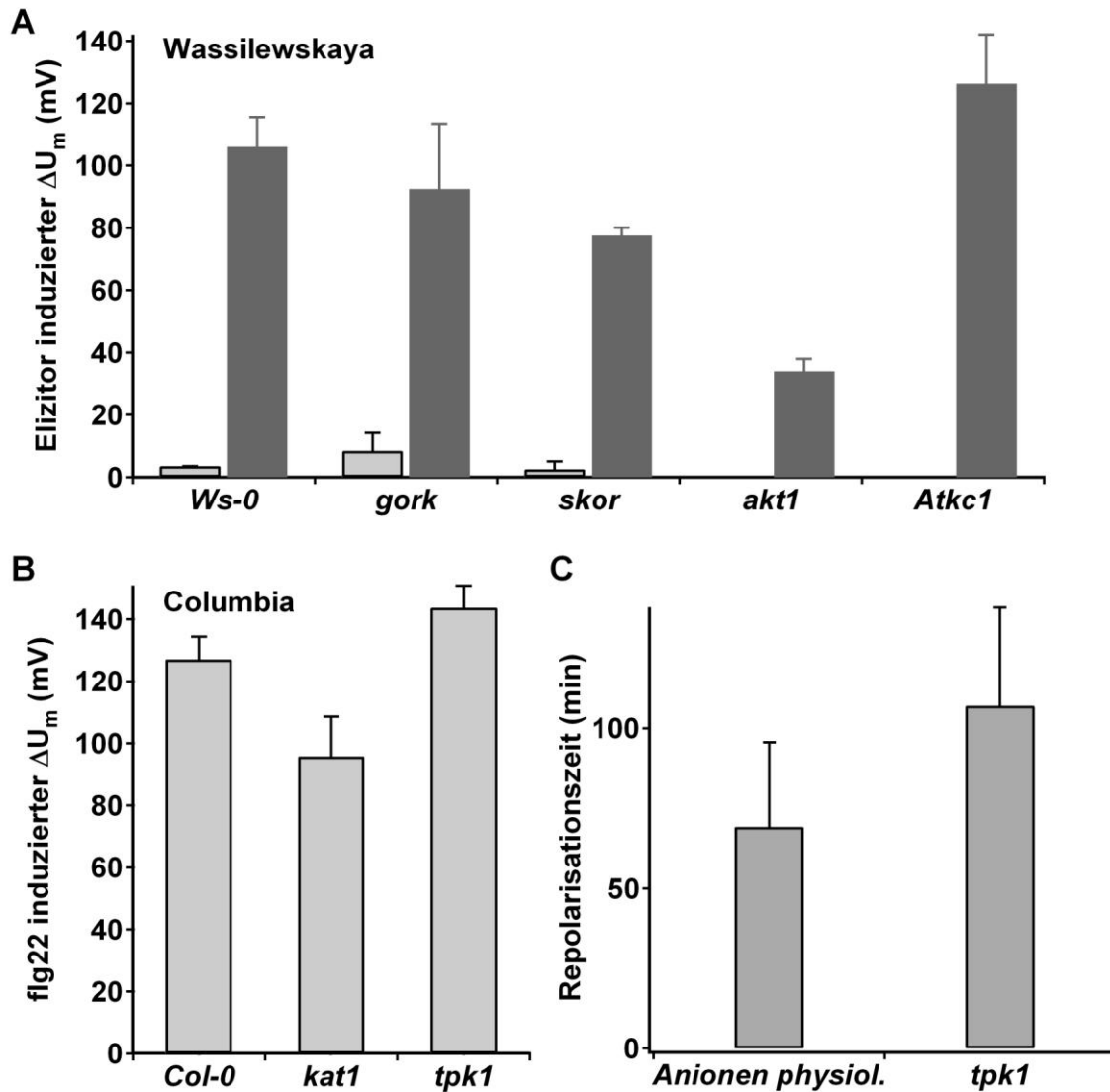


Abb. 3.30: Screening von *Arabidopsis* Kaliumkanal Knockout Mutanten auf die flg22 und elf18 induzierte Depolarisation in Mesophyllzellen. Die Kaliumkanalmutanten mit verschiedenen genetischen Ökotyp Hintergrund (beachte: *Ws-0* ist eine natürliche flg22 insensitive Mutante mit einem Stopkodon im FLS2 Rezeptor), wurden auf flg22 (heller Balken) und elf18 (dunkelgrauer Balken) getestet. Kaliumkanal Knockout Mutanten vom genetischen Hintergrund von *Ws-0* sind in **(A)**, von *Col-0* in **(B)** dargestellt. Die Membranpotentialänderung ist als Mittelwert von ≥ 3 Messungen mit dem Standardfehler angegeben. Der im Tonoplasten lokalisierte TPK1 wurde auf eine veränderte Repolarisationszeit hin untersucht **(C)**. Die Repolarisationsphase von der Kontrolle (2 mM Cl^- ; $n = 9 \pm \text{SF}$) und der *tpk1* Mutante ($n = 3 \pm \text{SF}$) ist vergleichbar.

Auch bei der KAT1 Verlustmutante konnte kein Unterschied in der flg22-induzierten Depolarisation gefunden werden (Abb. 3.30 B). TPK1 ist ein Tonoplasten lokalisierter Kaliumkanal, der unter anderem auch in Mesophyllzellen exprimiert ist (Gobert et al., 2007). Die *tpk1* Knockout Mutante (Gobert et al., 2007) zeigte ebenfalls keine

Ergebnisse

veränderte Depolarisation als Antwort auf flg22. Da ein Massenausfluss von Kalium schon wenige Minuten nach Elizitor Behandlung stattfindet (siehe Abb. 3.13 C), nimmt man an, dass auch aus der Vakuole Kalium freigesetzt werden muss. Die *tpk1* Mutante wurde deshalb nicht nur auf die flg22-induzierte Depolarisation, sondern auch auf eine veränderte Repolarisationszeit hin untersucht (Abb. 3.30 C). Es zeigte sich jedoch, dass die *tpk1* Mutante eine ausgeprägte Reaktion auf flg22 besaß, die nicht signifikant in ihrer Repolarisationsphase beeinflusst war.

In weiteren Experimenten, bei denen die externe Kaliumkonzentration variiert wurde, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der flg22-induzierten De- und Repolarisation der Plasmamembran (Daten nicht gezeigt). Diese Daten weisen daraufhin, dass das Fehlen einer Shakerkaliumkanaluntereinheit das Depolarisationsverhalten nach Elizitorgabe kaum beeinflusst, wie es schon für andere physiologische Prozesse wie z.B. der Stomabewegung gezeigt wurde (Reintanz et al., 2002).

3.4. Die flg22-induzierte Depolarisation setzt Phosphorylierungen unter anderem des Rezeptorkomplexes FLS2/BAK1 voraus

Nach der Bindung von flg22 durch den FLS2-Rezeptor, dimerisiert FLS2 mit einer weiteren Rezeptorkinase, BAK1. Daraufhin wird dieser Komplex endozytiert (Robatzek et al., 2006; Chinchilla et al., 2007). Durch Vorbehandlung mit K-252a (einem unspezifischen Kinaseinhibitor) konnte die Komplexbildung der beiden Serin/Threonin Kinasen BAK1 und FLS2 unterbunden werden (Chinchilla et al., 2007). Neben anderen sehr frühen Ereignissen während der Pathogen Erkennung, konnte auch die flg22-induzierte Depolarisation völlig von dem Kinase Inhibitor K-252a geblockt werden (Abb. 3.31 und Felix et al., 1991; Felix et al., 1999). In eigenen Membranpotentialmessungen konnte bestätigt werden, dass die Depolarisation als Antwort auf flg22 bei *bak1-3* Knockout Pflanzen ausbleibt, wie es auch für die FLS2 Verlustmutante gezeigt wurde (Daten nicht gezeigt). Beide Kinasen sind also essentiell für die Aktivierung von Ionenkanälen und die damit verbundene Depolarisation der Membran. Die Inhibitorstudien zeigen, dass der Depolarisation der Membran ein Phosphorylierungsereignis vorausgehen muss.

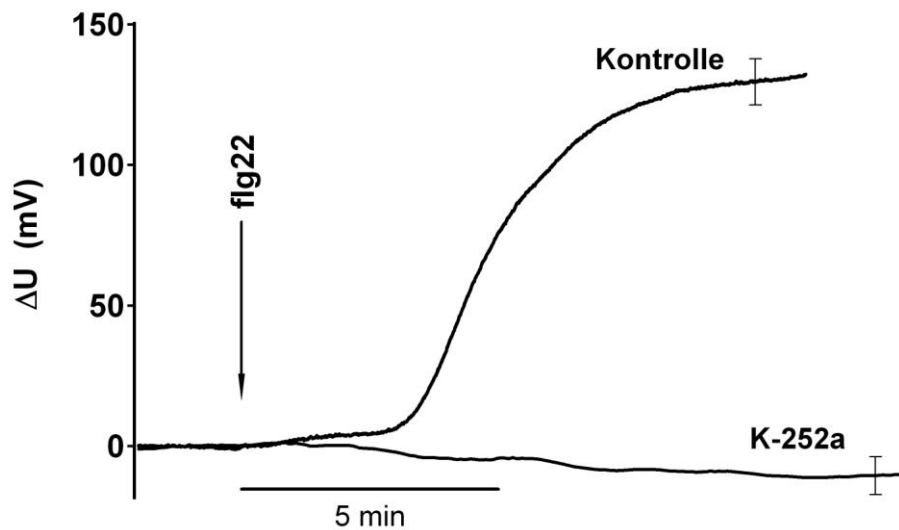


Abb. 3.31: K-252a, ein unspezifischer Kinaseinhibitor blockt die flg22 vermittelte Depolarisation vollständig. 10 μ M K-252a wurde eine Stunde vor der Applikation von 10 nM flg22 zu den Mesophyllpräparaten gegeben. Die Kontrolle wurde nicht vorbehandelt. Blockexperiment und Kontrolle je $n = 4 \pm$ SF.

3.5 Flg22 und die SA vermittelte Resistenz

Pike et al. (2005) konnten zeigen, dass die Vorbehandlung von *Arabidopsis* Pflanzen mit Salizylsäure einen Einfluss auf die funktionelle Expression des Avirulenzproteins avrRpt2 hat. SA-vorbehandelte Pflanzen wiesen zudem eine signifikante Reduktion des Elektrolytausstroms, der gewöhnlich nach einem Pathogenstimulus einsetzt, auf. Da die Beteiligung von Salizylsäure in der basalen Immunität noch nicht eindeutig geklärt ist, ((Hauck et al., 2003; Zipfel et al., 2004) gegen (DebRoy et al., 2004; Melotto et al., 2006)) wurde *Arabidopsis* Mesophyll Gewebe durch Besprühen mit 1,5 mM Salizylsäure vorbehandelt und die Zellen nach 24 h auf die flg22-induzierte Depolarisation getestet. Wie in der Abbildung 3.32 zu sehen ist, wiesen SA vorbehandelte Zellen eine Reduktion der flg22-induzierten Depolarisation um etwa 50% auf. Tsuda et al. (2008) konnten zeigen, dass die Behandlung mit flg22 schon nach 6 Stunden zu einem erhöhten SA Spiegel in *Arabidopsis* führte. Deshalb sollte untersucht werden, ob eine Vorbehandlung mit dem Elizitor selbst (10 nM flg22) einen Einfluss auf eine 24 h spätere flg22-induzierte Depolarisation hat. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Vorbehandlung des Mesophyllgewebes mit

Ergebnisse

10 nM flg22 keinen Effekt auf eine spätere Depolarisation hatte, im Vergleich zur Kontrolle und im Gegensatz zur Salizylsäurevorbehandlung (Abb. 3.32).

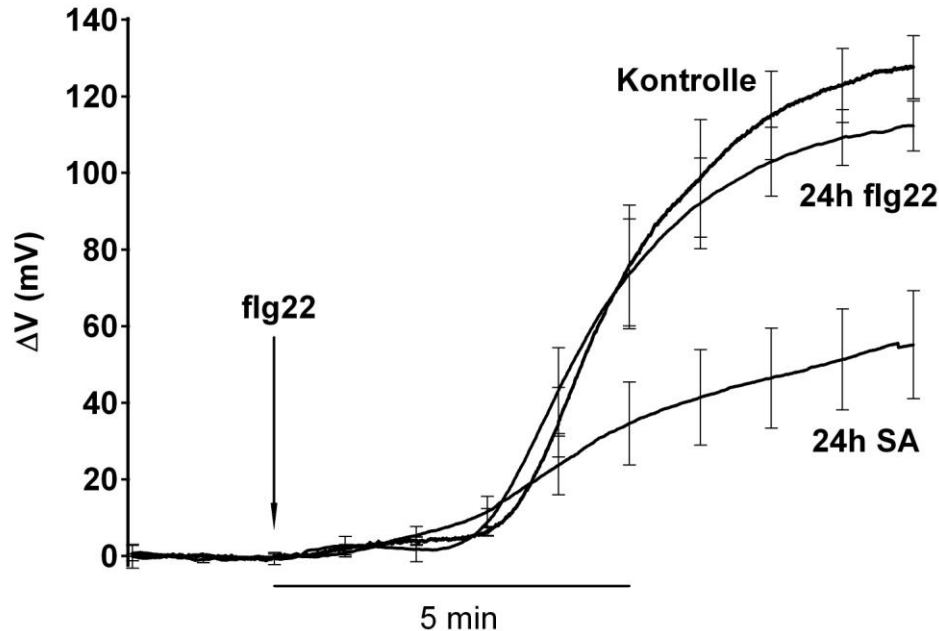


Abb. 3.32: *Arabidopsis* Mesophyllzellen reagierten nach eine Vorbehandlung mit Salizylsäure mit einer reduzierten Depolarisationsamplitude nach Gabe von flg22. Sprühhinokulation mit dem flg22 Peptid beeinflusste die 24 h später folgende flg22-induzierte Membrandepolarisation jedoch nicht. *Arabidopsis thaliana* Col-0 Blätter wurden mit 10 nM flg22 Druckinfiltration ($n = 4 \pm \text{SF}$) oder mit 1,5 mM (SA) durch Besprühen vorbehandelt. 24 Stunden später wurden die Blätter auf 10 nM flg22 getestet. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten nur die SA vorbehandelten Blätter eine geringere Depolarisation.

3.6 Analyse von *Arabidopsis* Mutanten, die in den Signalwegen der Pathogenabwehr und Resistenzmechanismen involviert sind oder sein könnten

Zur Auffindung weiterer Komponenten der Flagellin-induzierten Depolarisation oder von Ereignissen, die möglicherweise der Depolarisation vorgeschaltet sind, wurden zahlreiche *Arabidopsis*mutanten auf eine modifizierte Depolarisation als Antwort auf flg22-Gabe untersucht (Abb. 3.33). TPC1 (SV Kanal) kodiert für einen Kationen permeablen Vakuolenkanal (Peiter et al., 2005). Die Knockoutmutante *tpc1* und auch die Punktmutante *fou2* (Bonaventure et al., 2007), die eine veränderte Kalziumabhängigkeit besitzt, zeigten keine signifikanten Abweichungen in ihrer flg22-

Ergebnisse

induzierten Depolarisation von Kontrollpflanzen (Abb. 3.33 A; Kontrollen siehe Abb. 3.10 C).

Dnd1/cngc2 stellt eine Mutante des CNGC2 Kanals dar, der durch die Bindung von cyclischen Nukleotiden aktiviert wird. Interessanterweise weist auch die *dnd1/cngc2* Mutante (Clough et al., 2000) keine reduzierte Depolarisation als Antwort auf flg22 auf. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Ali et al. (2007). In dieser Publikation wird CNGC2 in *Arabidopsis* Schließzellprotoplasten mit dem LPS-Elizitor induzierten Kalziumeinstrom in Verbindung gebracht (Ali et al., 2007). Nach meinen Ergebnissen müsste flg22, allerdings einen anderen Kalziumkanal in *Arabidopsis* Mesophyllzellen aktivieren.

Schließzellen reagieren auf die Gabe von ABA mit sich wiederholenden transienten Kalziumeinströmen. Die *gca2* Mutante ist in Schließzellen in ihrem Kalziummustern als Antwort auf ABA modifiziert (Pei et al., 2000). Verfolgt man die Stärke der Depolarisation als Antwort auf flg22, so scheint die Amplitude der Depolarisation reduziert zu sein. Weiterführende Untersuchungen an dieser Mutante, besonders in Hinblick auf das flg22-induzierte Kalziumsignal, könnten für das Verständnis der Flagellin Antwort von Pflanzen von Interesse sein.

Die *chs-3* Mutante zeigt eine höhere Sensitivität für niedrigere Temperaturen (chilling sensitive) (Provart et al., 2003). Hier wäre interessant zu untersuchen, ob sich hinter dieser Mutation eine Komponente der Membran-abhängigen Antwort auf Kälte, in der auch Kalzium beteiligt ist (Carpaneto et al., 2007) verbirgt. Stände dieses auch im Zusammenhang mit Kalzium, so zeigen meine Ergebnisse (Abb. 3.33 A) jedoch, dass diese Mutante in der flg22-induzierten Depolarisation der Membran nicht beeinflusst ist.

Die root hair-defective *rhd2-1* Mutante besitzt eine infunktionelle NADPH Oxidase AtRBOH C, wodurch Störungen bei der lokalen Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und dem externen pH-Wert entstehen (Monshausen et al., 2007). Dies wiederum beeinflusst die Aktivität von ROS-aktivierten Kalziumkanälen (Mori und Schroeder, 2004). Nach Gabe von flg22 zeigten diese Pflanzen jedoch eine Antwort (Abb. 3.33 B). Die NADPH Oxidasen AtrbohD und AtrbohF werden für eine volle ROS Produktion während der inkompatiblen Interaktion von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*avrRPM1*) und *Arabidopsis thaliana* benötigt. In diesen Mutanten wurde ein reduzierter Elektrolytverlust nach Infektion festgestellt und auch

Ergebnisse

der Zelltod war reduziert (Torres et al., 2002). In der Einzelmutante *AtrbohD*, die eine stark unterdrückte ROS Produktion aufweist, zeigte sich eine Depolarisation als Antwort auf flg22-Gabe, die jedoch in ihrer Amplitude reduziert war. Ein noch stärkerer Effekt auf die flg22-induzierte Depolarisation weist die Doppelmutante *AtrbohD/F* auf. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass diese NADPH Oxidase Mutanten als Antwort auf flg22 keine ROS mehr bildeten. Da jedoch noch eine Depolarisation zu beobachten war, kann man davon ausgehen, dass die ROS Produktion nicht die Depolarisation der Membran hervorruft oder dieser vorangeht.

Komponenten, die an der flg22-aktivierten MAPkinase Kaskade beteiligt sind (Zhang und Klessig, 2001; Meszaros et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007), wie MPK3/4/6 scheinen keine Wirkung auf die sehr frühe Antwort der Membrandepolarisation durch flg22 zu haben. In *mpk3*, *mpk4* und *mpk6* Mutantpflanzen wurden Depolarisationen nachgewiesen, die im Kontrollbereich liegen (Abb.3.33 C). Die Aktivierung oder Hochregulierung von diesen MAPKinasen hat also keinen direkten Rückkopplungseffekt auf die Aktivierung von Ionenkanälen durch flg22.

Für CPK3 konnte gezeigt werden, dass diese Kalzium-abhängige Kinase zusammen mit CPK6 an der ABA-Regulierung von S-Typ Anionenkanälen und Kalziumpermeablen Kanälen in Schließzellen eine Rolle spielen (Mori et al., 2006). Die getestete flg22 Antwort von CPK3 Knockout Pflanzen oder CPK3 Überexprimierern entspricht jedoch Kontrollmessungen (Abb. 3.33 C).

Arabidopsis Mutanten, die in der SA abhängigen Signaltransduktion gestört sind, wie z.B. *npr1-3* (Cao et al., 1994) und *nahG* (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994); zeigten ebenfalls keine modifizierte Depolarisation nach Gabe von flg22 (Abb. 3.33 D). Die in Teil 3.5 beschriebene Vorbehandlung mit Salizylsäure und die damit einhergehende verminderte Depolarisation durch flg22, lässt weitere Experimente mit diesen Mutanten jedoch interessant erscheinen.

Ein weiteres Protein, welches an den frühen Antworten von Flagellin beteiligt ist, ist GRP-7, welches für ein Glycin-reiches RNA-Bindeprotein in *Arabidopsis thaliana* kodiert (Heintzen et al., 1997). In Versuchen mit flg22 wurde in *Atgrp-7* Mutanten im Gegensatz zu Wildtyppflanzen deutlich weniger Kallose abgelagert (Fu et al., 2007). In unseren Untersuchungen zeigten *Atgrp-7* Pflanzen keine ausgeprägte, aber doch

Ergebnisse

eine klare Depolarisation der Membran von Mesophyllzellen als Antwort auf flg22 (Abb. 3.33 D). Dieses Protein ist also nicht an der Ionenkanalaktivierung beteiligt oder davor geschaltet.

Da der FLS2 Rezeptor putative Glykosylierungsstellen besitzt haben wir eine Glykosylierungsmutante *cg1-1-T*, der das Schlüsselenzym zur Herstellung von komplexen Glykanen fehlt und die Doppelmutante *cg1-1-T stt3-2*, die zusätzlich im ER eine verminderte Glykosylierungsaktivität zeigt (persönliche Mitteilung von A. von Schaewen) auf flg22 getestet. Die flg22-induzierte Depolarisation der *cg1-1-T* Mutante entsprach Kontrollmessungen, während die Doppelmutante eine reduzierte Antwort auf flg22 zeigte. Dies muss jedoch noch durch weitere Messungen untermauert werden. Die Rolle der Glykosylierungen am FLS2 Rezeptor ist noch nicht klar, scheint jedoch für die Aktivierung der Kinasedomäne und der folgenden Ionenkanalaktivierung nicht essentiell zu sein.

Ergebnisse

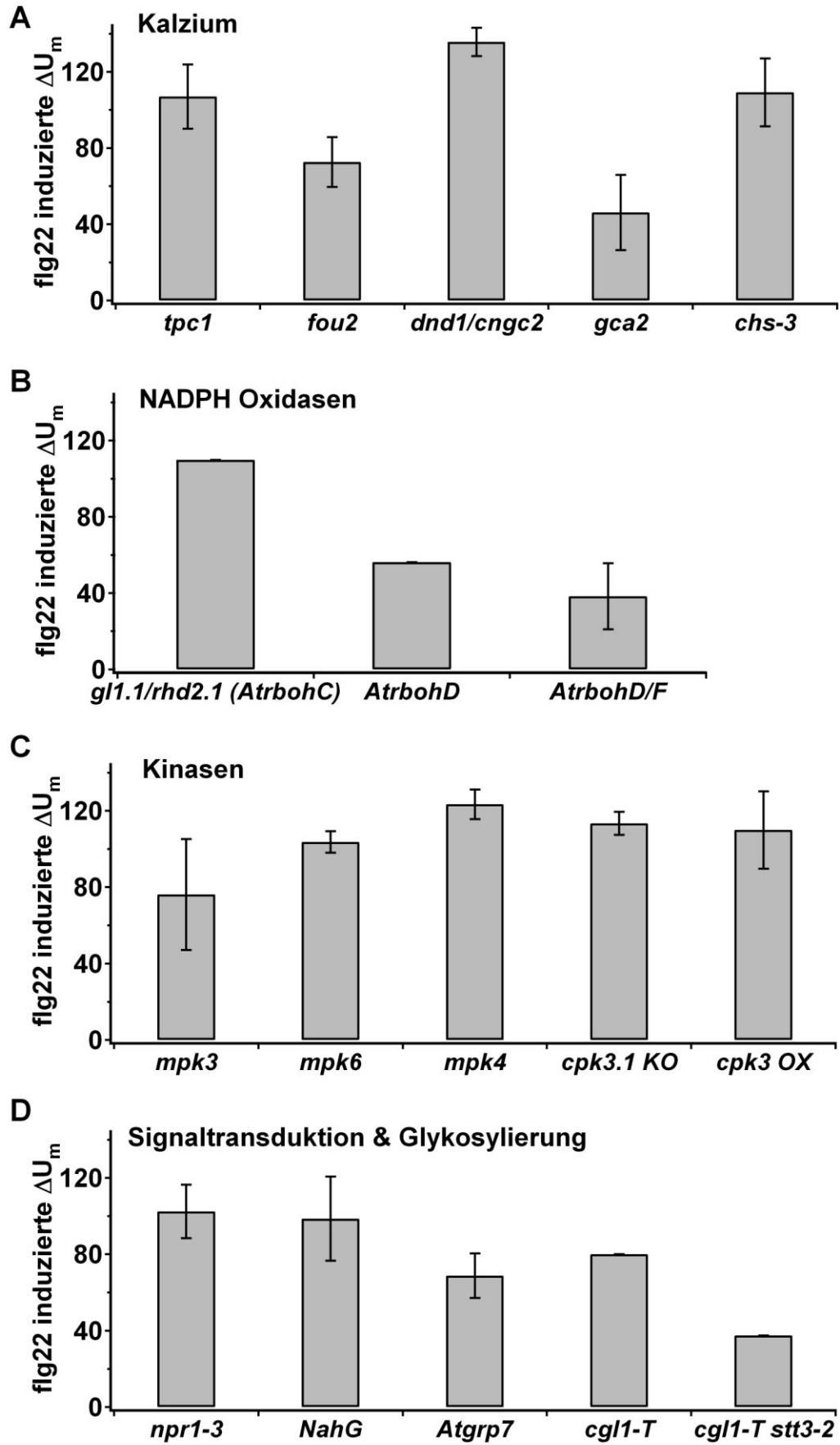


Abb. 3.33: Analyse von Arabidopsis knockout Mutanten, die an der Pathogenabwehr beteiligt sein könnten. Mit Hilfe von Membranpotentialmessungen (je Mutante $n \geq 3 \pm SF$) wurden diese Mutanten auf ihre Reaktion nach Gabe von 10 nM flg22 getestet. Es wurden (putative) Mutanten der Kalziumsignalübermittlung **(A)**, der ROS-Produktion (NADPH Oxydasen) **(B)** sowie Kinasen **(C)** und Mutanten des Salizylsäure-, und des Glykosylierungsweges **(D)** getestet. Im Balkendiagramm sind die mittleren Membranpotentialänderungen und die Standardfehler gezeigt. (Kontrollmessungen der verschiedenen Ökotypen sind in Abb. 3.10 C dargestellt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ausgenommen der PAMP-Rezeptormutanten *fls2* und *efr1* und der Kinasemutante *bak1* keine der bisher untersuchten Mutanten direkt vor der Depolarisationsantwort von flg22 geschaltet ist. Einige Mutanten (*gca2*, *cgl1-T* *stt3-2*, *AtrbohD/F* und *akt1*) zeigten jedoch eine schwächere Depolarisation als Antwort auf Gabe von flg22.

Weitere interessante Mutanten, die es in Zukunft zu untersuchen gäbe gehören vorrangig zu denen, die für Anionenkanäle und unselektive Kationenkanäle kodieren. Experimente an Kanalmutanten der erst kürzlich entdeckten SLAC1 ähnlichen Anionenkanäle (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008) oder weiterer Mitglieder der CNGC Familie (White et al., 2002; Ali et al., 2007; Demidchik und Maathuis, 2007) bringen möglicherweise Aufschlüsse über die an der Depolarisation beteiligten Genprodukte, die durch nicht nekrotisierende Elizitoren hervorgerufen wird.

4. Diskussion

Die ersten Berührungspunkte zwischen Pflanze und Mikroorganismus befinden sich auf den Oberflächen der beiden interagierenden Organismen. Die Wahrnehmung von PAMPs/MAMPs durch die Pflanzen beginnt mit einem Rezeptor-vermittelten Schritt an der Plasmamembran. Die Pflanze muss bei der Perzeption von biotischen Stimuli zwischen einer symbiontischen, assoziativen oder auch pathogenen Interaktion differenzieren können. Dementsprechend müssen nach der Erkennung des Interaktionspartners verschiedene Signalwege aktiviert werden. Wir haben bakterielle Extrakte von vier verschiedenen Bakterienarten getestet. Dabei wurde auf die bakteriellen PAMPs flg22 und elf18 mit elektrophysiologischen Untersuchungen im Detail eingegangen, da für diese beiden Elizitoren der dazugehörige Rezeptor bekannt war. Flagellin wird von FLS2 und der Elongationsfaktor TU von EFR wahrgenommen (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Zipfel et al., 2006).

4.1 PAMPs/MAMPs vermitteln Membranpotentialänderungen

Bakterielle Lysate des Wurzel-assoziativen *Azospirillum brasilense*, des Wurzelhalsgallen-induzierenden *Agrobacterium tumefaciens* und des virulenten oder avirulenten *Pseudomonas syringae* induzierten alle ein in der Amplitude unterschiedliches aber dennoch signifikantes zytosolisches Kalziumsignal in *Arabidopsis* Mesophyllzellen (Abb. 3.2 A-D). Diese zytosolische Kalziumerhöhung beginnt schon nach weniger als einer Minute und weist darauf hin, dass alle getesteten Bakterien PAMPs/MAMPs besitzen, die von *Arabidopsis* detektiert werden können. Auch nach der Erkennung von Pilzelizitoren, wie Cryptogein, sind zytosolische Kalziumerhöhungen beschrieben worden (Lecourieux et al., 2005). Die bakteriellen PAMPs flg22 aus der bakteriellen Flagelle von *Pseudomonas syringae* und das 18 Aminosäure-lange Peptid elf18 aus dem Elongationsfaktor Ef-TU aus *Escherichia coli* wurden bisher in Interaktionsstudien zwischen Pflanze und Bakterium am intensivsten untersucht. Beide lösen in der Pflanze eine basale Immunität aus. Bei Zugabe dieser Elizitoren zu einem pflanzlichen Zellkulturmedium wurde das Medium rasch alkalisch (Felix et al., 1999; Kunze et al., 2004). Der molekulare Mechanismus, dem diese PAMPs/MAMPs-induzierte Alkalisierung

Diskussion

unterliegt, ist nicht völlig geklärt. Auch über elektrische Signale nach Zugabe der bakteriellen Elizitoren flg22 und elf18 gibt es in pflanzlichen Zellkulturen keine Erkenntnisse. Jedoch weisen die beiden Membran-assoziierten Abwehrantworten, die externe Alkalisierung (Abb. 3.12) und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), auf eine Änderung der Membranspannung hin. Unsere elektrophysiologischen Analysen zeigen, dass flg22 und elf18 eine Depolarisation der Plasmamembran in *Arabidopsis* Mesophyll- und Wurzelhaarzellen induzieren, die mit Ionenflüssen verbunden sein muss (Abb. 3.4, 3.5 B, 3.10 A).

Für viele Phytopathogene dient die Wurzelzone als Eintrittsstelle in die Pflanze. Wir haben deshalb Wurzelhaare an der vorderen Wurzelhaarzone mit Mikroelektroden eingestochen (Abb. 3.5 A) und untersucht, wie diese auf Flagelline verschiedener Mikroorganismen reagieren. Analog zu Mesophyllzellen reagierten Wurzelhaarzellen auf das bakterielle Lysat der getesteten Bakterien (Abb. 3.2). Jedoch zeigten die Flagelline von *Azospirillum brasilense* und *Agrobacterium tumefaciens* an Wurzelhaarzellen keine Aktivierung von Ionenflüssen und dadurch auch keine Depolarisation der Membran (Abb. 3.8 A). Gleiche Ergebnisse erzielten wir in Mesophyllzellen. Das 22 Aminosäuren lange Peptid flg22 aus *Agrobacterium tumefaciens* induzierte im Gegensatz zum flg22 aus den Krankheitserregern *Pseudomonas syringae* oder *Pseudomonas avenae* keine Änderungen im Membranpotential (Abb. 3.5 B, 3.8 B) und auch keine zytosolische Kalziumerhöhung (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es in Agrobakterien und Azospirillen noch andere PAMPs/MAMPs geben muss, die zu einem Kalziumsignal und auch zu Membranpotentialveränderungen führen. Da Messungen an Wurzelhaaren sehr aufwendig, zeitintensiv und deshalb weniger geeignet für quantitative Messungen sind, wurden die weiteren Studien an Mesophyllzellen durchgeführt.

Membranpotentialmessungen mit intakten Bakterien oder Bakterienlysaten von *Pseudomonas syringae* an *Arabidopsis* Mesophyllzellen zeigten eine Depolarisation, die vergleichbar zu der flg22-induzierten Depolarisation war (vergl. Abb. 3.4 und 3.1). Im Gegensatz zu flg22 bleibt die Membran aber anhaltend depolarisiert und die Membranspannung repolarisiert auch nach Stunden nicht zu dem anfänglichen Ruhepotential. In früheren elektrophysiologischen Interaktionsstudien zwischen Pflanze und Bakterium wurden die Bakterien in das Mesophyllgewebe infiltriert, wodurch die ersten beiden Stunden, bis zur Erholung des Pflanzengewebes für

Messungen unzugänglich waren (Keppler und Novacky, 1986; Pavlovkin et al., 1986). In folgenden Studien wurde ein Dexamethason induzierbares System verwendet, in der die Effektor-vermittelte Interaktion von AvrRPT2 aus *Pseudomonas* mit dem *Arabidopsis* Rezeptor RPS2 elektrophysiologisch anhand von Membranpotentialmessungen in Mesophyllzellen untersucht wurde (Pike et al., 2005). Pflanzen, die durch PAMPs oder Effektoren behandelt wurden, zeigten ebenfalls eine anhaltende Depolarisation, die nach einigen Stunden zu einem hohen Elektrolytverlust und in den Zelltod führten (Pike et al., 1998; Pike et al., 2005). Unsere Messungen mit flg22 und elf18 zeigten im Gegensatz dazu eine langsame aber deutliche Repolarisation innerhalb von 70 ± 9 min ($n = 9 \pm SF$) (Abb. 3.4). Diese Behandlung mit PAMPs führte nicht zur HR (Zipfel et al., 2004). Ausgehend von sehr negativen Ruhemembranpotentialen in *Arabidopsis* Mesophyllzellen (Abb. 3.4) reagierten die mit Mikroelektroden eingestochenen Zellen mit einem starken Potentialabfall als Antwort auf flg22 oder elf18. Die Änderungen im Membranpotential begannen 1 bis 3 Minuten nach dem der Elizitorstimulus die Zellen erreichte. Im Gegensatz zu Stimuli wie Kälteschock oder Glutamat (Knight et al., 1996; Forde und Lea, 2007), welche eine schnelle transiente Depolarisation induzieren, erscheint die flg22-induzierte Depolarisation verhältnismäßig langsam (Abb. 3.4 und 3.17).

4.2 Die Bindung von flg22 und FLS2

Die relativ langsame Depolarisation und Repolarisation weisen darauf hin, dass flg22 und FLS2 nach dem Binden einen stabilen Komplex bilden, der nachgeschaltete Ionenkanäle im offenen Status hält. Die Bildung dieses Komplexes und die Aktivierung der ersten Abwehrantworten scheint einige Minuten zu benötigen. Wäscht man in dieser Phase das flg22 wieder aus, erhält man keine Depolarisation. Beginnt die Membranspannung abzufallen konnte dieser Vorgang auch durch schnelles Auswaschen des Peptids nicht mehr gestoppt werden. Für Bindungsstudien wurde ein verkürztes Peptid von flg22 hergestellt, welchem zwei Aminosäuren am C-Terminus fehlten (Bauer et al., 2001). Dieses Peptid, flg22 Δ 2, bindet an FLS2 und wirkt antagonistisch zu flg22. In Abbildung 3.7 wird gezeigt, dass das verkürzte flg22 Δ 2 zu keiner Depolarisation führte. Das aktive flg22 konnte aber das flg22 Δ 2 aus dem Liganden-Rezeptor-Komplex verdrängen und dadurch den

Diskussion

Rezeptor und Ionenkanäle aktivieren. Flg22 scheint aber keine höhere Affinität zum Rezeptor zu besitzen, da die Intensität der Depolarisation im Durchschnitt um die Hälfte reduziert war. Dies weist auf eine kompetitive Interaktion der beiden Peptide am Rezeptor hin, da man davon ausgehen kann, dass mit 100 nM flg22 Δ 2 die FLS2 Rezeptoren gesättigt sind (siehe Abb. 3.9).

Kürzlich zeigten Robatzek et al. (2006), dass flg22 Δ 2 (siehe Abb. 3.7) an den Rezeptor FLS2 bindet, aber im Gegensatz zu flg22 nicht zu einer Rezeptor-vermittelten Endozytose führt (Robatzek et al., 2006). Die Tatsache, dass die Depolarisation im gleichen Zeitrahmen wie die flg22-induzierte Rezeptor-Liganden Komplex Internalisierung, also 1 bis 3 Minuten nach der Applikation stattfindet, könnte auf einen Zusammenhang beider Prozesse hinweisen. Gestützt wird diese Annahme durch die Repolarisations- und Resensibilisierungszeit der Zelle von 70 ± 9 min ($n = 9 \pm SF$) (Abb. 3.4). Es konnte gezeigt werden, dass die Relokalisation des FLS2 Rezeptors nach der flg22-induzierten Internalisierung im gleichen Zeitrahmen erfolgt (Robatzek et al., 2006). In diesen Studien wurde der FLS2 Rezeptor mit dem fluoreszierenden Protein GFP gekoppelt. Eine vorherige Behandlung der Zellen mit elf18 führte nicht, wie die folgende Applikation von flg22 zu einer Dislokation des fluoreszierenden Rezeptors von der Membran. Dies zeigt, dass die Depolarisation der Membran möglicherweise an der Internalisierung beteiligt, aber diese nicht oder nicht allein induziert (Robatzek et al., 2006). Die Beobachtung, dass es bei der zweiten oder dritten Wiederholung der Elizitorgabe nach der jeweiligen Repolarisationsphase zu einer etwas langsameren und schwächeren Depolarisation kommt, weist darauf hin, dass die Repolarisation zur vollen Reaktivierung des Systems nicht ausreicht. Die Anzahl der Rezeptoren in der Membran könnte eine wiederholte Antwort auf den Elizitorstimulus limitieren. Um die Verbindung zwischen Membranpotentialänderungen und der Rezeptorendozytose aufzuklären, könnten neben der Fluoreszenzaufzeichnung der Rezeptorinternalisierung simultane Einstichmessungen an den Pflanzen von Interesse sein. Auch wäre es interessant zu sehen, ob die Depolarisation durch Endozytosehemmer beeinflusst werden kann.

Die Reaktivierung und Wiederholbarkeit der FLS2 Rezeptor-vermittelten Immunantworten, stehen im Widerspruch zu akuten Ionenverlusten und dem folgenden HR-induzierten Zelltod in der Effektor-vermittelten Immunität (Pugin et al., 1997; Wendehenne et al., 2002; Pike et al., 2005). Neben einem Mechanismus, der vom Elizitor abhängig ist, scheint es einen bis jetzt unbekanntem regulatorischen

Mechanismus zu geben, der die Stärke der Immunantwort bestimmt. Dies kann einerseits zum Wiederherstellen der normalen Zellfunktion und dem sogenannten „Primen“ führen oder andererseits, nachdem ein bestimmter Punkt überschritten wurde, zum HR-vermittelten Zelltod und Nekrosen führen (Lecourieux et al., 2005; Jones und Dangl, 2006).

4.3 Multiple PAMP/MAMP Rezeptoren – derselbe Signalweg?

Experimente am *Arabidopsis* Ökotyp Wassilewskaya (Ws-0), der eine natürliche Punktmutation im FLS2 Rezeptor trägt, welche in einer Nichtfunktionalität des Rezeptors resultiert, zeigten, dass die Aktivierung von Ionenkanälen durch flg22 abhängig vom funktionellen Rezeptor ist (Abb. 3.10 A). Übereinstimmend damit ruft elf18 in den gleichen Pflanzen dennoch eine klare Antwort an der Membran hervor. Die *efr-1* Mutanten (Zipfel et al., 2006) im genetischen Col-0 Hintergrund hingegen sind nicht mehr fähig elf18 wahrzunehmen (Abb. 3.10 B). Bis auf Ws-0 konnten alle getesteten *Arabidopsis* Ökotypen das bakterielle flg22 wahrnehmen. Transgene Ws-0/FLS2p::FLS2-myc erhielten durch die Komplementation mit dem funktionellen Rezeptor die volle Sensitivität zurück (Abb. 3.10 C).

Bei einer nicht vollständigen Depolarisation der Membranspannung nach einer suboptimalen Elizitorgabe ist interessanterweise die Applikation eines weiteren Elizitors ausreichend, um eine vollständige Depolarisation zu erreichen (Abb. 3.11 A, B). Auch in der Natur ist die Pflanze stets mehreren verschiedenen Pathogenen ausgesetzt. Die Konzentration der PAMPs in der natürlichen Umgebung ist möglicherweise eher gering. Ein additiver Verstärkungseffekt kann also für die Pflanze von Nutzen sein. Diese Versuche weisen auch darauf hin, dass flg22 und elf18 dieselben Plasmamembran Ionenkanäle oder Ionentransporter aktivieren können (Abb. 3.11).

Übereinstimmend mit genetischen Studien unterstützen die Ergebnisse unserer elektrophysiologischen Studien die Hypothese, dass beide Signalwege der flg22- und elf18-induzierten Immunantwort, unterhalb der jeweiligen Rezeptoren in einen einzigen Signalweg übergehen. Dennoch unterscheiden sich die beiden Immunantworten hinsichtlich der Stärke der Ionenflüsse und des Kalziumsignals (siehe unten).

Diskussion

Wie eingangs beschrieben, induzieren zahlreiche Bestandteile von Pathogenen oder auch Nützlingen eine Immunantwort. Neben der Depolarisation der Plasmamembran erhöht sich im gleichen Zeitrahmen die zytosolische Kalziumkonzentration (Abb. 3.2; 3.17). Simultane Messungen der Membranspannung und die Aufzeichnung von zytosolischen Kalziumerhöhungen in *Arabidopsis* Mesophyllzellen wurden mit Hilfe einer hochsensitiven Lumineszenzkamera im C24 Aequorinsystems durchgeführt (Abb. 3.17). Um festzustellen, ob nach einem ersten Kalziumanstieg durch Elizitor 1, ein weiterer ausgelöst werden kann, wurde nach wenigen Minuten ein zweiter Elizitor appliziert (Abb. 3.21). Nach einem transienten Kalziumpeak durch elf18 führte die Folgeapplikation von flg22 zu einer zweiten Schulter im Kalziumsignal (Abb. 3.21 A, B). Wurde flg22 mit einer größeren zeitlichen Distanz zur elf18-Stimulation appliziert so führte dies zu einem kleineren Kalziumpeak (Abb. 3.21 C). Das Kalziumsignal scheint also auch in bereits depolarisierten Zellen stattzufinden. Aus elektrophysiologischen Studien an Kationen-selektiven Ionenkanälen ist bekannt, dass diese Kanäle hauptsächlich Hyperpolarisations-aktiviert sind, jedoch sind sie bereits bei Spannungen von -60 mV offen (Demidchik und Maathuis, 2007 und beinhaltende Referenzen). Das bedeutet, dass Kalzium auch bei einer bereits depolarisierten Membranspannung noch einströmen könnte.

Unsere Ergebnisse an Wurzelhaaren und Mesophyllzellen und auch die ubiquitäre Expression des FLS2 Rezeptors lassen vermuten, dass auch andere Pflanzentypen an der FLS2 vermittelten basalen Abwehr beteiligt sind. Neueste Studien von Melotto et al. (2006) haben gezeigt, dass die Wahrnehmung des *Pseudomonas* flg22 durch *Arabidopsis* Schließzell FLS2 Rezeptoren zu einem Stomaschluss führt. Dieser Mechanismus repräsentiert eine erfolgreiche Strategie zur Verhinderung der bakteriellen Invasion durch Schließzellen in das Pflanzengewebe (Melotto et al., 2006). Die Autoren dieser Arbeit verwendeten Mutanten, die in Abszissinsäure Signalwegen gestört sind und führten Versuche mit der OST1 Verlustmutante sowie mit NO durch. Sie konnten zeigen, dass der flg22-induzierte Schließzellschluss über diese bekannten Stomaschluss-Signalwege führt. Bakterien haben sich auf diese Abwehrantwort von Pflanzen eingestellt. Das von den Bakterien hergestellte Coronatin wird in die Pflanze transportiert und scheint in die Abwehrmechanismen der Pflanze einzugreifen, so dass die Pflanze zu einem Wiederöffnen der Schließzellen gezwungen wird. Bis heute ist jedoch kein Ionenkanal, Pumpe oder Transporter, der von flg22 oder Coronatin aktiviert wird

Diskussion

charakterisiert oder bekannt. Auch ist nicht bekannt, ob verschiedene Pflanzenzellen, wie Mesophyllzellen, Wurzelhaarzellen oder Schließzellen den gleichen Signalweg mit ähnlichen oder gleichen Komponenten in der frühen Antwort der basalen Immunität nutzen. Eine neuere Arbeit von Zhang et al (2008) beschreibt eine Regulierung der Schließzell Kaliumströme durch das bakterielle Flagellin in *Arabidopsis*, welche auch von einem G-Protein Untereinheit abhängig ist (Zhang et al., 2008). Die molekulare Identifizierung von Ionenkanälen und Transportern, die während der PAMP-aktivierten basalen Abwehrmechanismen eine Rolle spielen, muss in weiteren Experimenten erfolgen. Erst nach der Identifizierung und Charakterisierung der einzelnen beteiligten Transportsysteme können elektrische Abwehrantworten der Pflanze aufgeschlüsselt werden. Entsprechende Mutanten sollten daraufhin eine Unterscheidung der verschiedenen Abwehrantworten erleichtern und deren Funktion in der Signalkette aufdecken. Das wird auch helfen die Verbindung zwischen den elektrischen Antworten an der Membran und anderen Abwehrantworten, wie ROS- und Ethylensynthese als auch der Rezeptorendozytose zu verstehen.

Eigene Versuche, in Tabakschließzellen an intakten Pflanzen einzustechen und flg22-induzierte Ionenströme oder eine Depolarisation zu messen, sind bis jetzt fehlgeschlagen (Holger Marten, persönliche Mitteilung). Möglicherweise wird durch den Einstich einer Doppelelektrode zur Klemmung der Spannung und Messung der Stromantwort schon eine Abwehrantwort aktiviert, die zum Schließzellschluss führt. Hier könnten nichtinvasive Methoden, wie zum Beispiel mit ionenselektiven Elektroden (siehe MIFE™ Technik Teil 2.7) möglicherweise zu besseren Ergebnissen führen.

Wie auch in anderen Arbeitsgruppen (z.B. Pike et al., 2005) ist es bis jetzt nicht gelungen, flg22-induzierte Kalziumsignale, Membranpotentialänderungen oder auch Ionenströme in Protoplasten zu detektieren. Protoplasten zeigten allein schon durch die Behandlung mit degradierenden Enzymen wie Zellulasen oder Pektinasen eine gesteigerte Expression von PR spezifischen Genen wie zum Beispiel einigen WRKY Transkriptionsfaktoren, was auch durch Behandlung mit Elizitoren wie zum Beispiel flg22 geschieht (eigene Daten, nicht gezeigt; Navarro et al., 2004). Protoplasten sind bereits einer Vielzahl von PAMP/MAMPs während des Präparationsprozesses ausgesetzt (Zellulase-, Pektinase-generierte Zellwandfragmente), so dass diese

Diskussion

möglicherweise bereits desensibilisiert oder „gerüstet“ wurden. Versuche an Protoplasten, die über Nacht bei 4°C regenerieren konnten, zeigten in Patch Clamp oder Lumineszenzexperimenten keine Elizitor-spezifische Antwort (eigene Daten, nicht gezeigt).

Zellkulturzellen stellen ein Einzelzellsystem dar, welches im Gegensatz zu Protoplasten auf Elizitoren reagiert und sogar in Standardversuchen, wie dem pH Assay Verwendung findet. Unsere Messungen an Tabak-Zellkulturzellen zeigten eine starke Alkalisierung des extrazellulären Mediums als Antwort auf die Zugabe von flg22 von *Pseudomonas syringae*. Erste Einstichexperimente an diesen Zellkulturzellen mit Hilfe von doppelläufigen Mikroelektroden zeigten sehr heterogene Ergebnisse. Als Antwort auf flg22 konnte eine Hyperpolarisation oder eine Depolarisation der Membran gemessen werden. In den meisten Fällen jedoch konnte keine Reaktion gemessen werden (Daten nicht gezeigt n = 20). Das Zellkultursystem ist sehr vielversprechend, um unter optimierten Bedingungen flg22-induzierte Ionenströme messen zu können, doch bringt es auch Schwierigkeiten mit sich. Zellkulturzellen werden permanent geschüttelt und 3 Tage alte Kulturen reagieren auf eine kurze Unterbrechung des Rotationsvorganges mit einer starken Alkalisierung im Medium. Auch der pH Assay kann nach einer Rotationsunterbrechung erst nach einer Stunde, in der die Zellen sich erholen und sich das Medium wieder ansäuert, durchgeführt werden.

Elektrophysiologische Studien der flg22- oder elf18-induzierten Ströme sind also auch weiterhin von großem Interesse. Vor Allem das Auffinden eines Einzelzellsystems ist besonders wichtig, um Elizitor-induzierte Ströme unter Spannungsklemmenbedingungen studieren zu können.

Neben den PAMP/MAMPs flg22 und elf18 sind weitere Elizitoren bekannt, die in verschiedenen Pflanzen einen Abfall des Membranpotentials auslösen. Einen ähnlichen Verlauf einer Elizitor-induzierten Depolarisation konnten z.B. Pugin et al. (1997) mit Hilfe des pilzlichen Cryptogeins in *Nicotiana tabaccum* cv Xanthi Zellkulturzellen sowie Pike et al. (1998) nach Gabe des Harpinproteins aus *Erwinia amylovora* in Mesophyllzellen von *Nicotiana tabaccum* var. Samsun NN Blattstreifen messen. In eigenen Messungen zeigten Mesophyllzellen von Tabakblättern var. Samsun NN eine Sensitivität gegenüber flg22 von *Pseudomonas syringae* und auch gegenüber Cryptogein von *Phytophthora cryptogea* (Abb. 4.1).

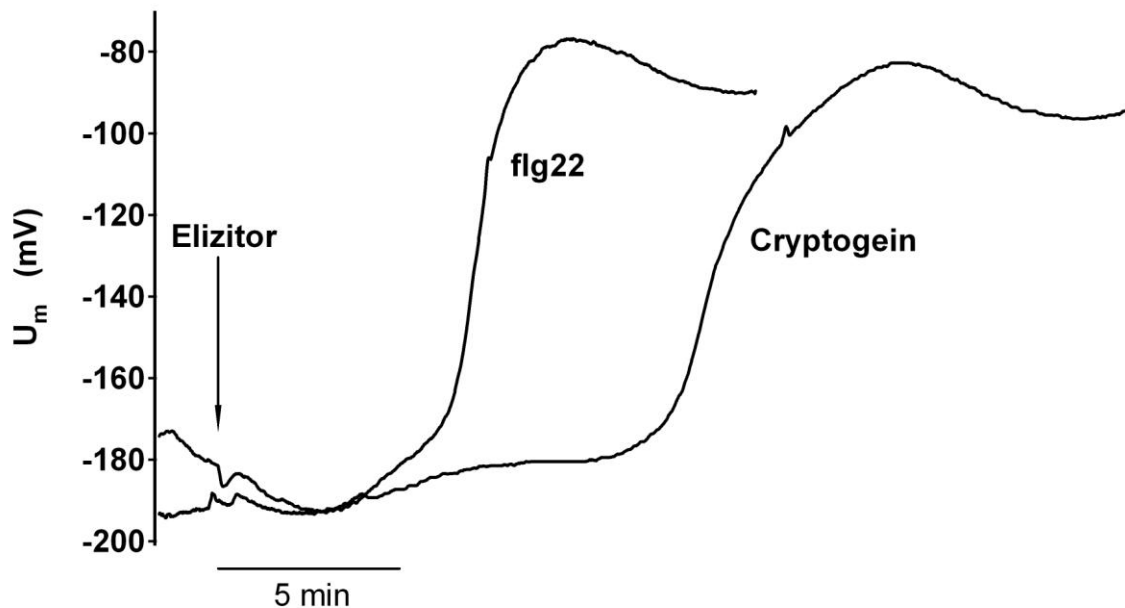


Abb. 4.1: Membrandepolarisation von *Nicotiana tabaccum* var. Samsun NN Mesophyllzellen induziert durch 10 nM flg22 oder Cryptogein.

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, unterschieden sich die Antworten der beiden Elizitoren kaum in ihrem Verlauf, jedoch stark in der Zeit zwischen der Applikation der Elizitoren (markiert mit einem Pfeil) bis zur Aktivierung der Depolarisation. Cryptogein wird wahrscheinlich von einem noch nicht bekannten Rezeptor wahrgenommen. Zur Ionenkanalaktivierung benötigt dieser Signaltransduktionsweg aber etwa doppelt so lange (ca. 10 min) wie im Fall von flg22. Außerdem unterscheidet sich die Wirkung der Elizitoren auch durch die Tatsache, dass Cryptogein, wie auch Harpin im Gegensatz zu flg22 und elf18 bei Injektion in Blätter Nekrosen bilden (Pike et al., 1998; Kunze et al., 2004; Zipfel et al., 2004). Im Gegensatz dazu führen flg22 und elf18 auch ohne die HR zu einer basalen Immunität.

4.4 flg22 bindet FLS2 mit einer hohen Affinität und aktiviert Ionenströme konzentrationsabhängig

Dosis Dosis-Effekt Studien an *Arabidopsis* Mesophyllzellen zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit der flg22-induzierten Membrandepolarisation (Abb.

3.9 A). Mit höheren Elizitorkonzentrationen beschleunigte sich die Depolarisationsantwort und die Amplitude (ΔV) erreichte erst bei etwa 10 nM flg22 das Maximum von ca. 120 mV. Unter den Versuchsbedingungen von 100 μ M KCl im extrazellulären Medium konnte ein stark negatives Membranpotential erhalten werden, das von etwa -180 mV zu -80 bis -60 mV nach Elizitorgabe depolarisierte. Diese Bedingungen wurden so gewählt, um auch in Experimenten mit Ionen-selektiven Elektroden arbeiten zu können. Bei flg22 Konzentrationen unterhalb 10 nM verlief die Depolarisationsantwort mit geringer werdenden Konzentrationen immer langsamer und kleiner. Unterhalb von 10 pM flg22 konnte keine signifikante Membranpotentialänderung detektiert werden. Mit Hilfe einer Michaelis Menten Kinetik konnte die Konzentrationsabhängigkeit genau beschrieben werden (Abb. 3.9 B). Der berechnete EC_{50} Wert von etwa 0,2 nM flg22 war dabei 10-fach weniger sensitiv als bei der Berechnung des EC_{50} Wertes durch den pH Assay in Zellkulturen, der bei etwa 30 pM lag (Felix et al., 1999). Für elf18 wurden EC_{50} Werte zwischen 0,1 und 0,4 nM berechnet (Kunze et al., 2004). Auch im Tabak System konnten mit Cryptogein ähnliche Affinitäten bestimmt werden. Die Bindungsspezifität für den noch unbekanntem Cryptogein Rezeptor wurde mit 2 nM bestimmt (Wendehenne et al., 1995; Bourque et al., 1999). Für den Cryptogein-induzierten Nitratausstrom wurde ein etwas höherer EC_{50} Wert von 4 nM festgestellt (Wendehenne et al., 2002). Diese Affinitätsbestimmungen zeigen, dass die frühen Immunantworten an der Membran von den verschiedenen Rezeptoren mit einer ähnlichen Empfindlichkeit vermittelt werden.

4.5 Das flg22-induzierte Kalziumsignal ist an die Membrandepolarisation gekoppelt

Flg22 und elf18 lösen wie auch die bakteriellen Lysate ein zytosolisches Kalziumsignal in der Pflanzenzelle aus (vergl. Abb. 3.2, Abb. 3.16 A und 3.17). Um die Sensitivität des Kalziumsignals zu studieren, wurde mit einem Photomultiplier die Kalzium-induzierte Lumineszenz in *Arabidopsis* C24 Aequorin Blattstückchen als Antwort auf eine flg22 Konzentrationsreihe von 100 fM bis 10 μ M getestet (Abb. 3.16 A). Bei einer hohen flg22 Konzentration im mikromolaren Bereich ist ein ausgeprägter Kalziumpeak, der schnell wieder auf die zytosolische Ausgangskonzentration zurückkehrt, zu beobachten. Mit niedrigen Konzentrationen

Diskussion

wird das Signal flacher und anhaltend. Sogar bei sehr niedrigen Konzentrationen wie 1 pM konnte ein klarer Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration detektiert werden (Abb. 3.16 A Inset). In der Analyse der Maximalwerte des Kalziumeinstroms wurden diese Werte gegen die eingesetzte flg22 Konzentration aufgetragen und konnten mit einer doppelten Michaelis Menten Kinetik beschrieben werden. Die Daten konnten deshalb nicht mit einem einzigen EC_{50} Wert beschrieben werden. Auch die integrierte Fläche unter dem Kalziumpeak, die der absoluten Menge an eingeströmten Kalzium entspricht, lässt sich am besten mit einer doppelten MM Kinetik beschreiben. Die zwei berechneten EC_{50} Werte betragen 67 ± 42 nM und 43 ± 2 pM (Abb. 3.16 B). Der erste Wert von 43 pM liegt im Bereich des EC_{50} Wertes des pH Assays von 30 pM. Da die Depolarisation einen etwa 10mal höheren EC_{50} Wert von 0,2 nM flg22 besitzt, ist eine direkte Kopplung des Kalziumsignals und der Membrandepolarisation eher unwahrscheinlich. Die EC_{50} Werte könnten auf eine Kopplung zwischen Protonen und Kalzium hinweisen. Kinetiken mit zwei Affinitäts-Komponenten wurden bereits für den Kaliumtransport gezeigt (Epstein et al., 1963). Da für das bakterielle Flagellin nur eine Bindungsstelle am FLS2 Rezeptor bekannt ist, könnten zum einen zwei Kalziumspeicher mit verschiedenen Affinitäten aktiviert werden oder möglicherweise sind es gar zwei verschiedene Prozesse, die eine Kalziumausschüttung, abhängig von der vorliegenden Elizitorkonzentration, induzieren. Lecourieux et al. zeigte (2005), dass neben einem zytosolischen Kalziumpeak auch der Kalziumspiegel im Zellkern als Antwort auf Elizitoren ansteigt. Sie konnten ein Maximum der Kalziumkonzentration nach 3 min (kleine Erhöhung) und nach 72 min feststellen, wobei der zweite Kalziumanstieg sehr viel größer und über Stunden anhaltend war.

Um die Verbindung zwischen Membranpotential und Kalziumsignal zu untersuchen wurden simultane Experimente an denselben Blattstückchen mit Hilfe einer Lumineszenzkamera durchgeführt, wobei in dem Dunkelkabinet ein Einstichmessplatz aufgebaut wurde. Die Berücksichtigung der zeitlichen Auflösung des Kamerasystems verdeutlicht, dass der Anstieg der zytosolischen Kalziumänderung mit der Depolarisation überlappte. Eine Ableitung der Depolarisation nach der Zeit, legt offen, dass der erste Teil bis zum Kalziumpeak mit der Potentialänderung deckungsgleich übereinstimmt. Da das Kalziumsignal transient ist, kann es für den zweiten Teil der langsamen oder anhaltenden

Diskussion

Depolarisation nicht verantwortlich sein (Abb. 3.18). Hier müssen andere Ionen mitbeteiligt sein.

Im Gegensatz dazu zeigten Membranpotentialmessungen nach einem Kälteschock (Abb. 3.17) und bei Gabe von Glutamat (Daten nicht gezeigt) eine Übereinstimmung des transienten Charakters von Depolarisation und Kalziumsignal. Diese beiden Kalziumsignale waren im Vergleich zu Elizitor-induzierten Kalziumsignalen durch flg22 oder elf18 auch um mehr als hundertmal grösser in ihrer Lumineszenzintensität. Beachtlich ist die beschleunigte Repolarisation der flg22-depolarisierten Membran nach einem Kälteschock (Abb. 3.17). Gründe hierfür könnten unter anderen die Kälteinaktivierung von Faktoren sein, die dazu beitragen, dass die Zelle depolarisiert bleibt. Auch das große Kalziumsignal ist ein möglicher Grund für die beschleunigte Repolarisation, da es zu einer „Neudefinition“ des Kalziumhaushalts führen könnte.

Durch eine Lokalisation des Aequorinproteins im Nukleus von Tabakzellen konnten Lecourieux et al. (2005) zeigen, dass flg22 neben einem zytosolischen Kalziumsignal auch ein Kalziumsignal im Zellkern induziert. Diese Kalziuserhöhung zeichnet sich durch einen kleinen Peak innerhalb der ersten Minuten aus, welchem ein großes Signal nach etwa 30 min folgt, das über Stunden anhält. Rutheniumrot ist ein bekannter Inhibitor für das Entleeren interner Kalziumspeicher (Pottosin et al., 1999). In unseren Experimenten hatte dieser Blocker keinen Einfluss auf das flg22-induzierte Kalziumsignal (Abb. 3.19). Blockexperimente mit Lanthanchlorid zeigten, dass höhere Lanthankonzentrationen von etwa 1 mM auch ohne den Elizitor gravierende Kalziumsignale (Abb. 3.19) und auch eine Depolarisation der Plasmamembran hervorrufen können (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Zellen eine Stunde vorher mit einer definierten Lanthankonzentration behandelt und danach elektrophysiologisch und luminometrisch in Simultanmessungen untersucht (Abb. 3.20). Bei Lanthankonzentrationen von etwa 100 μ M konnte ein Block des Kalziumsignals gemessen werden. Mit dieser Lanthanchloridkonzentration wurde in Simultanexperimenten auch die Membrandepolarisation gehemmt, dies untermauert zusätzlich die Initialisierung der Depolarisation durch Kalzium. In Experimenten mit einer Protonen-selektiven Elektrode, wurde auch der Protoneneinstrom durch Lanthanchlorid vollständig gehemmt. Kalzium scheint also auch dem Protonentransport voranzugehen oder mit Protonen gekoppelt zu sein. Simultane Experimente mit einer Kalzium- und einer

Protonen-selektiven Elektrode haben aufgrund der Auflösungsgrenze der Kalzium-selektiven Elektrode und des kleinen Kalziumsignals durch flg22 keine Ergebnisse liefern können (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu dem flg22/FLS2-aktivierten Kalzium-permeablen Ionenkanal ist der Kälte-aktivierte Kationenkanal Lanthan-permeabel (Carpaneto et al., 2007).

Die Tatsache, dass eine bereits durch den Elizitor elf18-depolarisierte Zelle nach wenigen Minuten auf einen weiteren flg22 Stimulus mit einem Kalziumsignal reagieren kann, weist darauf hin, dass der Kationenkanal, der durch flg22 aktiviert wird, nicht obligatorisch hyperpolarisations-aktiviert sein muss (Abb. 3.21 C).

4.6 Flg22 induziert multiple Ionenflüsse in Arabidopsis Mesophyllzellen

Zusätzlich zu der zytosolischen Kalziumerhöhung (Abb. 3.18) und der Alkalisierung des Apoplasten (Abb. 3.12 und Felix et al., 1999; Zipfel et al., 2006), zeigten *Arabidopsis* Mesophyllzellen durch beide Peptide flg22 und elf18 einen Ausstrom von Anionen und Kalium (Abb. 3.13 B, C). Durch apoplastische Messungen mit Ionen-selektiven Elektroden konnten neben den Ionenkonzentrationen auch die Ionenflüsse berechnet werden. Die externe Alkalisierung konnte durch einen Protoneneinstrom erklärt werden (Abb. 3.13 A). Wie der Anionen- und Kaliumausstrom besaß der Einstrom von Protonen einen transienten Charakter. Der maximale Protonenfluss von $111 \pm 27 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ wurde jedoch schon Minuten vorher erreicht, bevor Anionen und Kalium ihr Maximum von $751 \pm 104 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bzw. $597 \pm 122 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, erreichten (Abb. 3.13). Da die Amplitude des Anionenausstroms etwa 5 bis 6 mal höher ist als der Einstrom von Protonen, erscheint eine direkte Kopplung von H^+/Cl^- wie für den CLC-Typ Antiporter beschrieben wurde, eher unwahrscheinlich und kann nicht für die gesamten Protonen- und Anionenströme verantwortlich sein (Picollo und Pusch, 2005; de Angeli et al., 2006). Alternativ wäre zu überprüfen, ob durch die NADPH Oxidase ein Superoxidanion produziert wird, welches im Apoplasten von einer SOD unter Verbrauch von Protonen zu Sauerstoff und H_2O_2 umgesetzt wird. Dies würde einen Zusammenhang zwischen der ROS Produktion und der externen Alkalisierung herstellen.

In Experimenten mit zwei Ionen-selektiven Elektroden (Abb. 3.14), konnte gezeigt werden, dass Protoneneinstrom und Anionenausstrom zur exakt gleichen Zeit beginnen (Abb. 3.14 A). Der Kaliumausstrom beginnt allerdings im Vergleich zum Protoneneinstrom um mehr als eine halbe Minute später (Abb. 3.14 B). Der Ausstrom von Kalium durch Depolarisations-aktivierte Kaliumauswärtsgleichrichter kann erst bei depolarisierter Membranspannung, positiv von E_K , stattfinden. Die zeitliche Abfolge der Ionenflüsse lässt vermuten, dass die Initialisierung der Depolarisation durch Kalzium aber auch durch Protonen und Anionen vermittelt wird. Messungen mittels der MIFETM Technik von elf18-induzierten Ionenströmen, zeigen ähnliche Ionenströme in *Arabidopsis* Mesophyllzellen wie sie bei flg22 Zugabe beobachtet wurden. Auffallend ist jedoch, dass sie kleiner und somit auch schlechter aufzulösen sind. Dies stimmt mit der Hypothese überein, dass verschiedene Elizitoren ähnliche oder gleiche Signalwege anschalten, aber sich durch die Stärke der induzierten Abwehrantworten unterscheiden (vergl. 4.2 und Jones und Dangl, 2006). Dies kann zum einen auf Unterschiede in der Ebene der Rezeptoren zurückzuführen sein, wie es auch für die unterschiedliche Beteiligung der BAK1 Kinase an der FLS2 oder EFR1 Rezeptoraktivierung bekannt ist (Chinchilla et al., 2007). Trotz der Unterschiede in der Höhe der Ionenströme zwischen dem flg22 und dem elf18 Peptiden, zeigen doch beide in anderen Antworten wie zum Beispiel der Depolarisation der Membranspannung eine sehr hohe Übereinstimmung und haben sogar einen additiven Effekt (Abb. 3.11).

4.7 Der Ausstrom von Nitrat und anderen Anionen führt zu Änderungen im Membranpotential

Wie für den nekrotisierenden Pilzelizitor Cryptogein beschrieben wurde (Wendehenne et al., 2002; Garcia-Brugger et al., 2006), weist auch die pflanzliche Antwort auf flg22 auf eine Aktivierung von Anionenkanälen hin (Abb. 3.13 B). Diese Hypothese wird von unseren Messungen unterstützt, in denen Mesophyllzellen, die hohen externen Anionenkonzentrationen ausgesetzt sind, auf flg22 nicht mehr mit einer Membrandepolarisation antworten (Abb. 3.22). Unter diesen Bedingungen wurde der elektrochemische Anionengradient über der Plasmamembran reduziert und die Rezeptor-vermittelte Anionenkanalaktivierung und resultierende Depolarisation der Membran wird so nicht sichtbar (Abb. 3.22). In einigen

Diskussion

Messungen, in denen die externen Anionenkonzentrationen von Chlorid und Nitrat erhöht wurden, konnte man als Antwort auf flg22, eine schnelle transiente Depolarisation beobachten, die durch Auswaschen des Peptids wieder auf das Kontrollniveau repolarisierte (Abb. 3.24). Zusammenfassend hat sich also die Repolarisationszeit von 70 ± 9 min auf etwa 20 min unter hohen extrazellulären Anionenkonzentrationen verkürzt (Abb. 3.25). Möglicherweise werden durch den schwächeren Anionengradienten weniger Anionen aus dem Zytosol entlassen, wodurch es zu einer schnelleren Repolarisation kommt. Diese Experimente demonstrieren den großen Einfluss von Anionen auf die flg22-induzierte Depolarisation. Um zu überprüfen ob Nitrat als Signalmolekül wirken könnte, führte ich die Experimente unter $5 \mu\text{M}$ Nitrat durch (Abb. 3.26). Diese geringe Konzentration von Nitrat hat aber keinen Effekt auf die Membrandepolarisation und scheidet somit als Signalmolekül aus. Die starke Wirkung von hohen Nitratkonzentrationen im Badmedium auf das Membranpotential und die Chloridelektroden Daten warfen die Frage auf, welches Anion als Antwort auf flg22 aus dem Zytosol ausströmt. Mit Hilfe einer HPLC Analyse des Exudates aus dem Apoplasten sollte diese Frage beantwortet werden. Nitrat konnte eindeutig als einziges Anion bestimmt werden, das nach einer flg22 Behandlung dort zu finden war (Abb. 3.23). Es konnte im Gegensatz zu den mit MIFETM erhobenen Daten kein Ausstrom von Chlorid gemessen werden. Möglicherweise besitzt die Chloridelektrode jedoch eine genügend hohe Leitfähigkeit für Nitrat und andere Anionen, so dass nicht ein Ausstrom von Chlorid, sondern von Anionen gemessen wurde. *Arabidopsis* Hydrokulturrpflanzen wiesen, nach 10 Tagen Wachstum auf Nitrat-freiem Medium, keine messbaren zytosolischen Nitratkonzentrationen mehr auf (Abb. 3.27 A). Die Mesophyllzellen dieser Pflanzen antworteten auf flg22 jedoch mit einer vollen Depolarisation. Dies weist stark darauf hin, dass auch andere Anionen als Nitrat an der Depolarisation mitwirken. Wird zusätzlich der Chloridgradient über der Plasmamembran mit 20 mM NMG-Chlorid reduziert, kann auch weiterhin eine Depolarisation als Antwort auf flg22 gemessen werden (Abb. 3.27 C), welche erwartungsgemäß etwas geringer ausfiel als unter Standardbedingungen in 2 mM externem Chlorid (Abb. 3.27 B). Dies deutet darauf hin, dass Chlorid in Nitrat-freien Pflanzen das Nitrat als transportiertes Anion ersetzen kann. Auch für das pilzliche Cryptogein wurde ein Ausstrom von Chlorid (Pugin et al., 1997; Kadota et al., 2004b) oder Nitrat (Wendehenne et al., 2002) beschrieben. Dieser Elizitor induziert die HR durch Produktion von ROS und unter

Diskussion

anderen sind auch MAPKinasen an der Abwehrantwort beteiligt. Wendehenne et al., (2002) konnte zeigen, dass die ROS Produktion und auch die Aktivierung/Induktion der MAPKinasen durch Anionenkanalblocker wie Niflumsäure und NPPB gehemmt werden konnten. Der Anionenausstrom ist demnach eine essentielle Komponente, die vor der ROS Produktion und der MAPKinse Aktivierung geschaltet ist (Wendehenne et al., 2002). In eigenen Versuchen, mittels der simultanen Membranspannungs- und Kalziumlumineszenzmessung, haben wir einen großen Effekt der beiden Anionenblocker allein auf das Membranpotential und auf den Kalziumhaushalt detektieren können (Abb. 3.28 und 3.29). Der spezifische Block der flg22-induzierten Anionenkanäle ist uns jedoch durch pharmakologische Agentien nicht gelungen. Experimente an einer *Arabidopsis* Doppelmutante *AtrbohD/F*, die für die Elizitor-induzierte ROS Produktion verantwortlich sind, zeigen eine klare Depolarisationsantwort auf flg22 Gabe (Abb. 3.33), aber keine flg22-induzierte H₂O₂ Produktion mehr (Daten nicht gezeigt). Desweiteren konnte die Depolarisation nicht durch DPI, einen NADPH Oxidase Hemmer geblockt werden, was die Vermutung bestärkt, dass die Produktion von ROS nicht vor der Depolarisation geschaltet ist und diese auslöst (Abb. 3.15 A). Die Verbindung zwischen den ROS und der Elizitor-stimulierten Depolarisation der Plasmamembran ist noch nicht vollständig geklärt. Das Vorhandensein von EF Händen an einer zytosolischen Domäne der NADPH Oxidase weist jedoch auf eine Regulierung durch Kalzium hin.

Der Fakt, dass der Konzentrations-abhängige Block durch Lanthanchlorid nicht nur den Kalziumeinstrom verhindert, sondern auch die Depolarisation der Membran, weist auf eine Kalzium-abhängige Aktivierung als wesentlichen Stimulus für die Aktivität von Anionenkanälen hin (Nürnberg et al., 1994b; Nürnberg et al., 1994a; Pugin et al., 1997). Dies wird auch durch Experimente gestützt, in denen das Verschieben des Potentials zum Umkehrpotential der Anionen hin durch Reduzierung des Anionengradienten zu einer völligen Inhibition der Depolarisation durch flg22 führte, während ein Kalziumsignal noch detektiert werden konnte (Abb. 3.22). Zeitgleich zur Membrandepolarisation wird die NADPH Oxidase möglicherweise durch Kalzium aktiviert, was aber noch durch weitere Experimente bewiesen werden muss. Die Aktivierung von Hyperpolarisations-aktivierten Kalziumkanälen und Kalzium-aktivierten Anionenkanälen, die an der Schließzellbewegung beteiligt sind, wurden auch als allgemeine Elemente in der

ABA- und Pilzelizitor-Signalkette vermutet (Klüsener et al., 2002 und beinhaltende Referenzen).

4.8 Neben Lanthan konnte kein effektiver Blocker der flg22-induzierten Ionenflüsse gefunden werden

Auf der Suche nach Inhibitoren, die die flg22-induzierte Depolarisation in Mesophyllzellen beeinflussen, konnte neben dem beschriebenen Block durch Lanthan kein effektives Agens gefunden werden. Fusicoccin behandelte Mesophyllzellen zeigten zunächst die erwartete Hyperpolarisierung und depolarisierten nach flg22 Gabe wie in Kontrollmessungen (Abb. 3.15 C). Auch DPI, ein Blocker der NADPH Oxidase, sowie die NADPH Oxidase Knockout Pflanze *AtrbohD/F* gaben eine normale Depolarisation als Antwort auf flg22 (Abb. 3.33). Diese Befunde zeigen uns, dass die Alkalisierung weniger durch einen Elektronentransport vom Zytosol in den Apoplasten, wobei die NADPH Oxidasen als Elektronendonatoren dienen, stattfindet (Pugin et al., 1997), sondern über einen Einstrom von Protonen (Abb. 3.13 A). Ob es sich hierbei um einen Kanal, einen Anti- oder Symporter handelt, ist noch zu klären. Im Falle eines Antiports oder Symports wäre es interessant welche Art von Ion mittransportiert wird. Anhand unserer Ionenflussmessungen wäre Kalzium oder Chlorid/Nitrat möglich. Wie oben bereits diskutiert, konnten ebenfalls keine potenten Anionenkanalblocker gefunden werden (Teil 4.7). Unspezifische Kationenkanalblocker, wie Cäsiumchlorid, Bariumchlorid und Zinkchlorid waren allesamt ohne Effekt auf die flg22-induzierte Depolarisation in *Arabidopsis* Mesophyllzellen. Versuche mit variierenden Ionenkonzentrationen von Kalzium, Protonen, Kalium, Chlorid und Nitrat im Badmedium, zeigten nur bei Erhöhung der Anionenkonzentrationen einen modulierenden Effekt auf die Membranpotentialdepolarisation durch flg22. Dies unterstreicht die entscheidende Funktion von Anionen bei der flg22-induzierten Depolarisation.

4.9 Kinaseaktivität ist essentiell für die Elizitor-induzierte Ionenkanalaktivierung

Wie auch in Arbeiten von anderen Gruppen sind die Elizitor-induzierten frühen Abwehrantworten und ebenso die flg22-induzierte Membrandepolarisation durch den Kinaseinhibitor K-252a inhibiert (Abb. 3.31, Felix et al., 1991; Kadota et al., 2004b; Lamotte et al., 2004; Robatzek et al., 2006). Desweiteren scheint der FLS2 Rezeptor eine weitere Rezeptor-artige Kinase BAK1 als eine zweite Untereinheit im Rezeptorkomplex, zur vollen Aktivierung der flg22 Antwort, zu benötigen (Chinchilla et al., 2007). *Arabidopsis bak1-4* Knockout Pflanzen zeigten keine flg22-induzierte Plasmamembrandepolarisation mehr. Das unterstreicht die Bedeutung von BAK1 als essentielle Rezeptoruntereinheit neben FLS2 (Daten nicht gezeigt). Phosphorylierungen gehören also zu den ersten Aktivitäten des FLS2 Rezeptors oder auch möglicher anderer Kinasen, die im Signalweg zwischen PAMP Rezeptor und allen weiteren Abwehrantworten lokalisiert sind.

4.10 Gibt es eine Verbindung zwischen der Systemischen Resistenz und der basalen Immunität?

Pflanzen sind in der Lage eine systemische Resistenz zu entwickeln. Wird ein Pflanzenteil von einem Pathogen befallen, so löst dieser Befall in uninfizierten Pflanzenteilen eine erhöhte Resistenz aus. Salizylsäure spielt dabei eine entscheidende Rolle für die Signalübermittlung und Resistenzausbildung. Auch durch eine externe Applikation von Salizylsäure (SA) kann eine systemische Resistenz induziert werden (Ryals et al., 1996; Hammerschmidt, 1999; Alvarez, 2000; Heath, 2000). RPS2 *Arabidopsis* Pflanzen, die Dexamethason-induzierbar, die zytosolische Expression eines pathogenen Effektors erlauben, reagieren mit einer Abwehrantwort. Bei diesen „Abwehr“-induzierten Pflanzen resultierte eine 24 Stunden Vorbehandlung mit Salizylsäure in einer Hemmung des Effektor-induzierten Elektrolytverlustes, der HR und auch der Membrandepolarisation (Pike et al., 2005). Eine Vorbehandlung mit SA von *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern 24 Stunden vor dem Einstich und ein folgender Test auf flg22, resultierte in etwa 50% der Messungen in einer völligen Blockade der Depolarisation (Abb. 3.32). In *dnd1* Pflanzen, die den CNGC2 Ionenkanal nicht mehr besitzen, ist der Salizylsäuregehalt auch in nicht infizierten Pflanzen stark erhöht (Yu et al., 1998). Unsere Messungen zeigten jedoch keine

Reduktion der Depolarisation, sondern eine stark ausgeprägte Reaktion auf flg22 (Abb. 3.33 A). Wie in *dnd1* ist auch in *hrl1* Pflanzen der Salizylsäuregehalt erhöht. Diese Pflanzen zeigen eine erhöhte Resistenz, ohne jedoch den Zelltod einzuleiten (Yu et al., 1998; Devadas und Raina, 2002). Die Behandlung mit flg22 führte zu einer Anreicherung von SA innerhalb von 6 Stunden (Tsuda et al., 2008). Wird z.B. flg22 24 Stunden vor dem Experiment in das Mesophyll infiltriert, konnte keine veränderte oder reduzierte Membrandepolarisation als Antwort auf flg22 gemessen werden (Abb. 3.32). Mesophyllzellen von *npr1-3* und transgene NahG Pflanzen, in denen der Salizylsäurelevel ebenfalls gestört ist, depolarisierten wie bei Messungen an Kontrollpflanzen (Abb. 3.33 D). Diese Experimente lassen darauf schließen, dass der Salizylsäuregehalt keinen starken Effekt auf die Ionenkanalaktivierung durch flg22 hat. Zur eindeutigen Klärung dieser Frage bedarf es jedoch weiterer Experimente. Die systemische Resistenz bereitet die gesamte Pflanze innerhalb weniger Stunden auf einen weiteren Pathogenbefall vor. In weiteren Versuchen sollte getestet werden, ob sich die Membranpotentialänderung ebenfalls über das Gewebe und weitere Organe ausbreiten kann, wie es für Signale des SAR gezeigt wurde. Lokal appliziert, induziert flg22 eine Depolarisation, die sich auch auf weitere Regionen im Blatt ausbreitet. Über kleine Distanzen im selben Blatt schwächt sich das Depolarisationssignal jedoch schon stark ab. (Daten von Jörg Fromm, Hamburg). Die Potentialänderungen eignen sich in *Arabidopsis thaliana* demnach nicht als Signal, welches sich auf benachbarte Blätter oder Gewebe ausbreiten kann. Für diesen Zweck werden chemische Signale, wie z.B. Salizylsäure diskutiert (Beckers und Spoel, 2006).

4.11 Die Membrandepolarisation ist eine der ersten Reaktionen der basalen Immunität in Pflanzen

Auf der Suche nach Genen, die an der Signaltransduktion von der Perzeption des Elizitos am FLS2 Rezeptor bis zur Membrandepolarisation eine Rolle spielen, wurden einige ausgesuchte *Arabidopsis* Mutanten auf eine Modifizierung des Depolarisationsverhaltens hin untersucht.

Der FLS2 Rezeptor besitzt zahlreiche putative Glykosylierungsstellen. Welche Rolle spielen diese Glykosylierungen für den Rezeptor und sind diese an seiner Regulierung beteiligt? Eine Glykosylierungsmutante *cgl1-T*, die keine komplexen

Diskussion

Glykane mehr herstellen kann, und eine Doppelmutante *cg1-T stt3-2*, die auch im ER eine verminderte Glykosylierungsaktivität zeigt (persönliche Mitteilung von A. von Schaewen), waren in der flg22-induzierten Depolarisation der Plasmamembran in *Arabidopsis* Mesophyllzellen nicht beeinflusst (Abb. 3.33 D). Anhand dieser Mutanten konnten keine Aussagen über eine putative Rolle von Glykosylierungen in der FLS2 Rezeptoraktivierung und der folgenden Initiierung von Ionenströmen gemacht werden.

Es wird vermutet, dass Kalzium eines der ersten Komponenten in der Signalkette der basalen Immunität darstellt. Schon wenige Minuten nachdem der Rezeptor den Elizitor flg22 gebunden hat, wird ein zytosolisches Kalziumsignal induziert (Abb. 3.16 A).

Die flg22-induzierte ROS Produktion wird von den NADPH Oxidasen D und F vermittelt. Beide besitzen EF Hände, die auf eine Kalziumregulierung schließen lassen. Da Einzelverlustmutanten und die Doppelmutante *AtRbohD/F* keine ROS Produktion als Antwort auf flg22 (Daten nicht gezeigt), aber eine Depolarisation der Membran (Abb. 3.33 B) aufweisen, scheint die Produktion von H₂O₂ durch AtRBOHD/F also kein essentielles Signal für die Aktivierung von Kalzium-permeablen Kanälen oder Transportern, die an der Depolarisation beteiligt sind, zu sein. Ionenkanalaktivierung und die ROS-Produktion liegen wahrscheinlich auf getrennten Signaltransduktionswegen. Die infunktionelle NADPH Oxidase AtRBOHC, welche vom Gen *rhd2* kodiert wird und in der Wurzel expremiert ist, zeigt Störungen bei der Lokalisierung von ROS, die mit veränderten pH Werten im Apoplasten einhergehen (Monshausen et al., 2007). Membranpotentialmessungen ergaben jedoch keine Modifikation der Depolarisationsantwort nach Applikation von flg22 in Mesophyllzellen (Abb. 3.33 B).

Der TPC1 Kanal aus Tabak scheint in BY-2 Zellkulturzellen an dem Cryptogein-induzierten Kalziumsignal beteiligt zu sein (Kadota et al., 2004a). Ranf et al. (2007) zeigen andererseits, dass der in der Vakuole lokalisierte TPC1 aus *Arabidopsis* (Peiter et al., 2005) nicht an dem Kalziumsignal bei biotischen oder abiotischen Stresstimuli beteiligt ist (Ranf et al., 2008). Auch unsere Messungen an der *tpc1* Knockout Mutante bestätigen diese Ergebnisse (Abb. 3.33 A). In einer weiteren *Arabidopsis* Mutante von TPC1 (*fou-2*) wurde eine erhöhte Konzentration von Jasmonsäure als Antwort auf Verwundung gefunden und ebenso zeigten diese Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber der Infektion durch den Pilz *Botrytis*

cinerea (Bonaventure et al., 2007). Die *fou-2* Mutante zeichnet sich durch die Einführung einer Punktmutation in die Sequenz des Spannungssensors aus. Dies führt zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des TPC1 Kanals in Richtung des physiologischen Spannungsbereiches und ein Kalziumausstrom aus der Vakuole könnte stattfinden. Möglicherweise spielt ein TPC1 vermitteltes Kalziumsignal eine Rolle in der systemischen Resistenz, wahrscheinlich jedoch nicht in der frühen Antwort der basalen Abwehr (Abb. 3.33 A und Ranf et al., 2007). Das *dnd1* oder *cngc2* Gen, welches für einen Kalzium-permeablen Ionenkanal kodiert (Clough et al., 2000), wurde von Ali et al. (2007) auf Elizitoren hin untersucht. Das bakterielle PAMP Lipopolysaccharid scheint den CNGC2 Kanal zu aktivieren. In der Knockout Mutante ist die flg22-induzierte Depolarisation komplett vorhanden (Abb. 3.33 A). Im Falle, dass der CNGC2 Kanal auch während der FLS2/flg22 Interaktion aktiviert wird, muss dies jedoch in der Signaltransduktionskette hinter der Membranpotentialdepolarisation stehen. Das Gen, welches für die Kalziumleitfähigkeit kodiert, die an den Anionenausstrom gekoppelt ist, muss noch identifiziert werden. In Schließzellen wurde eine Beteiligung von ABA beim flg22-induzierten Stomaschluss beschrieben (Melotto et al., 2006). Inwiefern dies auch in anderen Zelltypen zutrifft ist nicht bekannt. Die *gca2 Arabidopsis* Mutante zeigt ein modifiziertes Kalziummuster als Antwort auf ABA (Pei et al., 2000). Unsere Messungen an Mesophyllzellen von *gca2* Verlustmutanten, zeigten zwar ein reduziertes aber klares Depolarisationssignal auf flg22 (Abb. 3.33 A). Auch in der Mutante *chs-3*, die in der Kälteantwort abweichende Reaktionen aufweist (Provar et al., 2003), wird durch flg22 das Membranpotential depolarisiert (Abb. 3.33 A). Auch Ethylen ist mit Stressantworten innerhalb der ersten Minuten eng verbunden (Felix und Boller, 2003; Kunze et al., 2004; Silke Robatzek; persönliche Mitteilung) und wird mit der Signaltransduktion über MAPKinasen in Verbindung gebracht (Chang, 2003). In der Signalkette unterhalb der frühen Antworten, wie ROS Produktion, Ethylen und der Ionenkanalaktivierung, sind mehrere Kinasen geschaltet. Die MAPKinasen 3, 4 und 6, sowie die Kalzium-abhängige Proteinkinase 3 haben keinen Effekt auf die flg22-induzierte Membranpotentialdepolarisation (Abb. 3.33 C). Auch in *grp-7* Knockoutpflanzen, welchen ein Glycin-reiches RNA-Bindeprotein fehlt, konnte nach ABA Behandlung eine Einleitung des Zelltodes festgestellt werden (Heintzen et al., 1997). In Versuchen mit flg22 reagierten diese Pflanzen mit einer

Diskussion

deutlich verringerten Ablagerung von Kallose (Fu et al., 2007). Auf die flg22-induzierte Depolarisation hat dieser Defekt jedoch keinen Einfluss (Abb. 3.33 C).

Die genetische Aufklärung von pflanzlichen Anionenkanälen und Transportern steht sozusagen noch am Anfang. Bis heute sind nur wenige Gene für putative Kandidaten für den Anionenausstrom in *Arabidopsis* bekannt.

Bei der Applikation von hohen Anionenkonzentrationen in das Badmedium kommt es zu einer Hyperpolarisation und einer zytosolischen Kalziumerhöhung (Abb. 3.22). Die Aufnahme von Anionen in die Zelle könnte durch einen Symport von Anionen mit Kalzium oder anderen Kationen erklärt werden. In *Arabidopsis* gibt es ein Protein in der Plasmamembran (AtCCC), welches für den einzigen Homologen des tierischen Na/K/Cl Symporter kodiert (Colmenero-Flores et al., 2007). Bis jetzt gibt es keine detaillierten Studien über die Elektrophysiologie dieses Transporters. In Zukunft sollten Untersuchungen von Verlustmutanten dieses Kanals klären, ob dieser Transporter auch eine Rolle in der basalen Immunität spielt. In Experimenten mit Ionen-selektiven Elektroden zeigte Hubert Felle (1994) einen Symport von Protonen und Chloridionen in Wurzelhaarzellen von *Sinapis alba*. Auch mehrere andere Gruppen beschrieben einen Protonen-getriebenen Chlorid/Protonen Symport (Sanders, 1980; Beilby und Walker, 1981; Felle, 1994). Ob dieser jedoch auch in der basalen Immunität eine Rolle spielt muss in weiteren Experimenten überprüft werden.

Vor kurzem wurde ein Nitratausstromtransporter NAXT 1 (Nitrate Excretion Transporter 1) in der Wurzelplasmamembran von *Arabidopsis* entdeckt, der zu einer von sieben Subgruppen einer großen NRT1/PEPTIDE TRANSPORTER (NRT1/PTR) Familie gehört (Tsay et al., 2007). Dieser Transporter sorgt für den spezifischen Efflux von Nitrat, der an die Aufnahme von Protonen gekoppelt ist (Segonzac et al., 2007). Dieser Transporter befindet sich hauptsächlich in Wurzelrindenzellen, aber auch zu kleinerem Teil in Blättern und könnte somit auch für weitere Experimente von Interesse sein. Interessante Kandidaten für flg22-induzierte Anionenkanäle stellen auch die Mitglieder der SLAC1 (Slow Anion Channel-Associated 1) Proteinfamilie dar. Proteine dieser Familie sind in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis* exprimiert und sind an der Anionenhomöostase beteiligt (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Erste Experimente an den Knockout Pflanzen sind in Arbeit und öffnen neue Perspektiven in noch relativ unbekanntem Feld der Anionenkanäle und Transporter. In Schließzellen konnte gezeigt werden, dass die Kalzium-abhängigen

Diskussion

Proteinkinasen CPK3 und CPK6 an der Regulation von S-Typ Anionen- und Kalzium-permeablen Kanälen beteiligt sind (Mori et al., 2006). *Arabidopsis cpk3*-Verlustmutanten zeigten jedoch keinerlei Veränderungen in der flg22-induzierten Membranpotentialdepolarisation (Abb. 3.33 C).

Neben einem Anionenausstrom kommt es auch, zu einem zeitlich leicht verschobenen Ausstrom von Kalium (Abb. 3.13 C; 3.14 B). Auch in früheren Arbeiten wurde eine Beteiligung von Kaliumströmen als Antwort auf verschiedene Elizitoren beschrieben (Ebel, 1998; Blatt et al., 1999; Ivashikina et al., 2001). Der Kaliumausstrom könnte einerseits von einem grossen „Leak-like“ Kanal, wie der in Petersilie beschriebene LEAC (large conductance elicitor-activated ion channel) hervorgerufen werden (Zimmermann et al., 1997) oder von einem Depolarisations-aktivierten Kaliumkanal. Unsere Ergebnisse zeigen, dass keiner der getesteten auswärtsgerichteten Kaliumkanaluntereinheit knockout-Mutanten eine modifizierte Depolarisation als Antwort auf flg22 oder elf18 zeigt (Abb. 3.30 A, B). Durch das Fehlen beider bekannter Auswärtsgleichrichter aus *Arabidopsis* GORK und SKOR (Gaymard et al., 1998; Ache et al., 2000) konnte keine veränderte Depolarisation und auch keine beschleunigte Repolarisation nachgewiesen werden. AKT1 bildet mit der Untereinheit AtKC1 in Wurzelgewebe und auch Hypokotyl- und Schließzellen heteromere Kaliumkanäle, die unter anderem der Kaliumaufnahme dienen (Reintanz et al., 2002). Auch wenn GORK, AKT1 und AtKC1 an der Repolarisation des Plasmamembranpotentials in *Arabidopsis* Wurzelzellen nach einer Pilzelizitorgabe mitbeteiligt sind, scheinen diese Kanäle in der flg22- und elf18-induzierten Antwort keine entscheidende Rolle für Depolarisation und auch für die Repolarisation zu spielen (Abb. 3.30 A). TPK1 ist im Tonoplasten von Mesophyllzellen lokalisiert (Gobert et al., 2007). Eine Mobilisierung von Kalium aus der Vakuole könnte das Depolarisationsverhalten der Plasmamembran entscheidend beeinflussen. In der *tpk1* Mutante (Gobert et al., 2007), zeigte sich jedoch in Form oder Verlauf keine veränderte Depolarisation oder Repolarisation (Abb. 3.25; 3.30 B). Die molekulare Identifizierung von Ionenkanälen und Transportern, die in den PAMP vermittelten basalen Abwehrmechanismen angeschaltet werden, bleibt somit offen. Um tiefreichende Einblicke in die elektrischen Vorgänge nach einem Pathogenbefall zu erhalten, wird in Zukunft die Identifizierung der beteiligten Transportproteine von entscheidender Bedeutung sein.

4.12 Ionentransport in der basalen Immunität – ein Modell

In dem folgenden Modell wurden die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst (Abb. 4.2). Die Flagellinbindung an den FLS2 Rezeptor (1) führt innerhalb weniger Minuten zu einer Aktivierung von Kinasen und eventuell anderen noch unbekanntem Faktoren (2). Die flg22-abhängige Aktivierung der folgenden Ionenströme und auch von ROS sind abhängig von der Kinaseaktivität des FLS2 Rezeptors und der BAK1 Kinase, die mit FLS2 in einem Komplex interagiert (Chinchilla et al., 2007). Als initiales Signal wird eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration vermutet (3). Zu den ersten Ereignissen an der Membran gehört auch die Aktivierung der NADPH Oxidasen AtRBOH D und F, welche 2 EF Hände besitzen und abhängig von Kalziumsignalen angeschaltet werden (4). Nach dem zytosolischen Kalziumsignal werden Anionenkanäle geöffnet, wodurch Nitrat, Chlorid und möglicherweise auch andere Anionen, ihrem chemischen Gradienten folgend, ausströmen (5). Dies ruft eine Depolarisation der Plasmamembran hervor (6). Die erhöhte Konzentration von Anionen im Apoplasten könnte zu einer Aktivierung von protonen-gekoppelten Chlorid- (Felle et al., 1994) oder auch Nitrat Symportern (McClure et al., 1990a, 1990b; Plassard et al., 1999) führen (7), deren Transportraten die apoplastische Alkalisierung und den Protoneneinstrom erklären würden. Die Depolarisation sollte aufgrund dieser niedrigen Transportraten allerdings nicht signifikant beeinflusst sein. Der Fakt, dass Lanthan das zytosolische Kalziumsignal, die ROS Produktion, die Depolarisation und die externe Alkalisierung blockt, weist darauf hin, dass für alle diese Ereignisse das initiale Kalziumsignal (3) essentiell ist. Durch die Depolarisation der Membran kommt es dann letztendlich zu einem zeitverschobenen Ausstrom von Kalium, wahrscheinlich durch Depolarisations-aktivierte Kaliumkanäle (8). Zwei verschiedene EC₅₀-Werte für den flg22-induzierten Kalziumstrom (siehe Teil: 3.3.3) weisen auf mehr als einen Kalzium-leitenden Kanal hin. Neuere Studien weisen darauf hin, dass CNGC2 Elizitor-aktiviert werden kann (Ali et al., 2007). CNGC2 kann für das erste Kalziumsignal nicht verantwortlich sein, da *dnd1/cngc2* Knockout Pflanzen eine ausgeprägte Depolarisation als Antwort auf flg22 zeigen. Die Rolle eines weiteren Kalzium-leitenden Ionenkanals muss für das flg22/FLS2 System aber noch genauer untersucht werden (9). Möglicherweise ist für das flg22-induzierte Kalziumsignal auch ein anderer CNGC Kanal als CNGC2 verantwortlich. In Studien mit Aequorin, lokalisiert im Nukleus, konnte auch im Zellkern ein Kalziumsignal

detektiert werden. Dieses war jedoch zeitlich verschoben zum zytosolischen Kalziumsignal (10). Im gleichen Zeitrahmen wie die Ionenkanalaktivierung und die ROS Produktion ist, wurde in den ersten Minuten ein Ethylensignal beschrieben (11) (Silke Robatzek, persönliche Mitteilung). Nach etwa 20 Minuten verschwindet der Rezeptor-Liganden-Komplex durch Endozytose von der Plasmamembran (12) (Robatzek et al., 2006). Zu klären wäre noch ob die Produktion von Ethylen (11) und die Endozytose (12) auch zu den frühen Kalzium-aktivierten Pathogenantworten von Pflanzen gehören oder ob diese über andere Signalmoleküle geschaltet werden. Ebenso ist nicht bekannt, inwiefern Depolarisation, Endozytose und Ethylenproduktion zusammenhängen. Allein durch die Depolarisation werden PAMP Rezeptoren jedoch nicht von der Plasmamembran endozytiert (Robatzek et al., 2006). Zu den späteren Reaktionen der Zelle gehören die Aktivierung von MAP Kinasen (13) und WRKY Transkriptionsfaktoren (14). MAP Kinasen wie MPK3, 4 oder 6, die durch Elizitoren aktiviert werden, zeigten jedoch keinen Feedbackmechanismus auf die Depolarisationsantwort in *Arabidopsis* Mesophyllzellen. Die Rolle der Depolarisation in der Aktivierung der MAP Kinasen und Transkriptionsfaktoren bleibt offen.

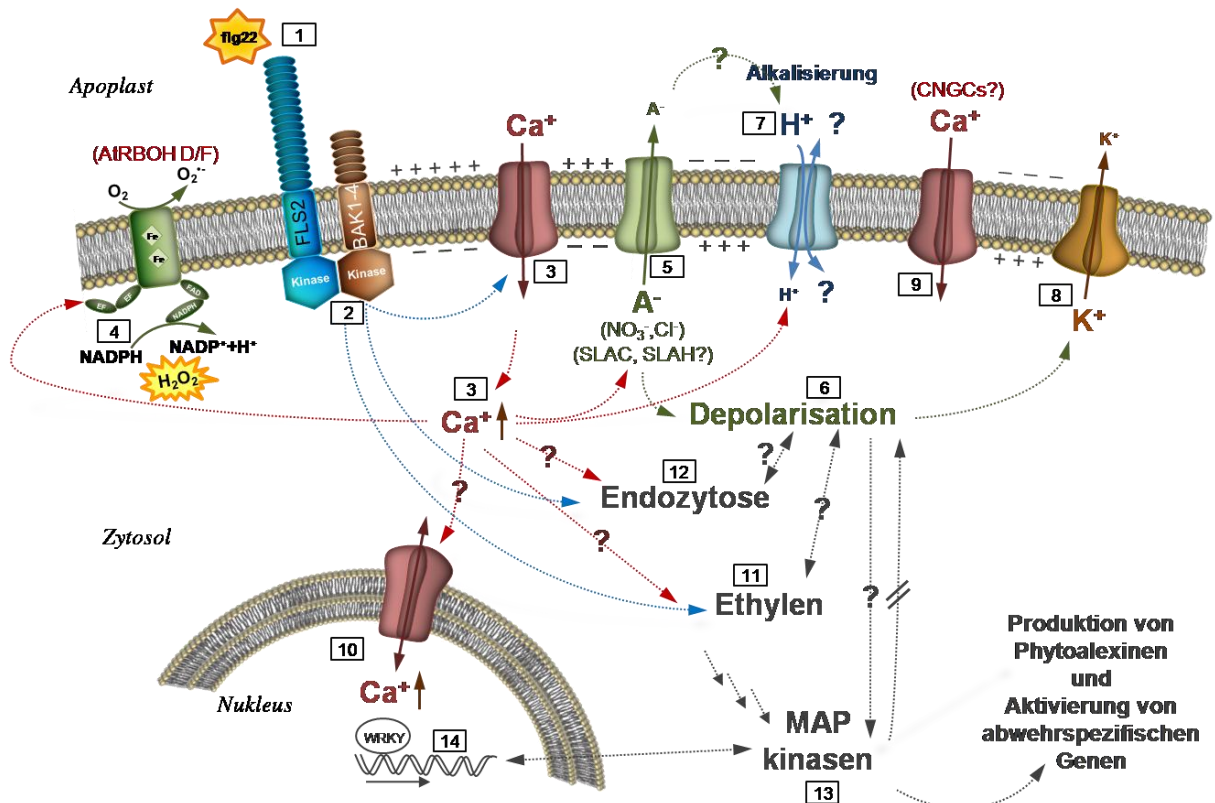


Abb. 4.2: Modell der flg22-induzierten frühen Abwehrantworten in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen.

5. Zusammenfassung

An der pflanzlichen Plasmamembran geschieht die erste Wahrnehmung von mikrobiellen Molekülen, die MAMPs genannt werden. MAMP/PAMP Rezeptoren leiten frühe Abwehrantworten, wie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), externe Alkalisierung oder Ethylen, ein. Die *Arabidopsis* FLS2 rezeptorartige Kinase (RLK) stellt einen plasmamembran-lokalisierten MAMP Rezeptor dar, der über die Detektion des Flagellum von *Pseudomonas* species, eine basale Immunität in *Arabidopsis thaliana* vermittelt. Flg22, der kürzeste aktive Teil des bakteriellen Flagellins besteht aus 22 Aminosäuren und ist der bestuntersuchte bakterielle Elizitor, der in Pflanzen eine basale Immunität hervorruft. Über die Rolle von Ionenkanälen in der basalen Immunität von Pflanzen war noch nicht viel bekannt. In der vorliegenden Arbeit zeigen wir eine starke Beteiligung von Ionenflüssen in der Initiationsphase der basalen Immunität. Unsere Messungen an intakten *Arabidopsis* Pflanzen und Pflanzengewebe sind in höchstem Masse reproduzierbar und öffnen eine neue Sicht, über die Natur von Ionttransporten in der Pflanzen - Mikroben Interaktion.

Als Antwort auf die Applikation von flg22, haben wir nach einer Verzögerungsphase von etwa 2 Minuten eine transiente, dosis-abhängige Depolarisation ($EC_{50}=0,2$ nM) in Mesophyll- und Wurzelhaarzellen von *A. thaliana* messen können. Nach dem Auswaschen des Peptidelizitors und der Erholung des Membranpotentials zu Ruhepotentialwerten innerhalb von 70 ± 9 min konnte die Depolarisation mehrere Male wiederholt werden. Im Gegensatz dazu war die Depolarisation anhaltend, wenn die *Arabidopsis* Mesophyllzellen mit intakten *Pseudomonaden* behandelt wurden. Das um 2 Aminosäuren kürzere Peptid flg22 $\Delta 2$ oder das Flagellin anderer Bakterien (*Agrobacterium* or *Azospirillum*) führten zu keiner Membrandepolarisation. Ebenso konnten keine Membranspannungsänderungen in dem *Arabidopsis* Ökotypen Ws-0, dem der funktionelle FLS2 Rezeptor fehlt, detektiert werden. Die Komplementation von Ws-0 Pflanzen mit dem intakten FLS2 Rezeptorgen rief eine Resensibilisierung für flg22 hervor. Mit dem EF-Tu Elizitor Peptid aus *E.coli*, welches durch den *Arabidopsis* MAMP Rezeptor EFR detektiert wird, wurden ähnliche Ergebnisse erzielt.

Auf der Basis von Aequorin wurden Kalzium-induzierte Lumineszenzmessungen durchgeführt, in denen ein transienter Anstieg der zytosolischen

Zusammenfassung

Kalziumkonzentration als Antwort auf die Applikation von flg22 gemessen werden konnte. Dosis-Abhängigkeitsmessungen von flg22 und $[Ca^{2+}]_{cyt}$ wiesen zwei unterschiedliche EC_{50} Werte, von 43 ± 2 pM und 67 ± 42 nM, auf. Möglicherweise wird auf zwei verschiedene Kalziumpools zugegriffen oder es werden zwei verschiedene Kalziumleitfähigkeiten aktiviert. Weitere Kalziumlumineszenz Experimente, in denen verschiedene bakterielle Lysate getestet wurden, ergaben, dass nicht nur Bestandteile von avirulenten und virulenten Pseudomonaden, sondern auch von *Agrobacterium tumefaciens* und *Azospirillum brasilense* einen ähnlichen zytosolischen Kalziumanstieg erzeugen. Dies weist darauf hin, dass nicht nur Flagellin von Pseudomonas und das EF-Tu Peptid von E.coli, sondern auch weitere mikrobielle Muster (MAMPS) durch ihre entsprechenden Rezeptoren in *Arabidopsis* Mesophyllzellen ähnliche zytosolische Kalziumfluktuationen induzieren.

Die Ionenkanalaktivierung und folgende Depolarisation benötigt die aktive Rezeptorkinase, was in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ist, in denen der Kinaseinhibitor K-252a die Depolarisation vollständig blockt. In *bak1-4* Arabidopsis Pflanzen, in denen die FLS2 Untereinheit BAK1 – eine weitverbreitete RLK, die auch mit dem Brassinosteroid Rezeptor assoziiert ist – fehlt, konnte keine Depolarisation als Antwort auf flg22 gemessen werden. Dies weist auf die Benötigung beider RLKs – FLS2 und BAK1 – zur flg22-induzierten Ionenkanalaktivierung hin.

Zur Identifizierung der Ionen, die für die flg22-induzierte Membrandepolarisation verantwortlich sind, wurden 3 verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt: Messungen von Ionenflüssen mit Ionen-selektiven Mikroelektroden, Membranpotential Messungen und Ionenkanalblocker.

Arabidopsis Mesophyllzellen zeigten die typische Alkalisierung des Apoplasten als Antwort auf flg22. Nicht-invasive MIFETM Experimente mit Ionen-selektiven Elektroden ergaben, dass der pH-Anstieg durch einen Einstrom von Protonen hervorgerufen wurde. Zusätzlich wurde ein Ausstrom von Chlorid und Kalium aufgezeichnet. Ähnlich wie das Kalziumsignal waren alle detektierten Ionenströme von transientser Natur. In zeitgleichen Experimenten mit mehreren Ionen-selektiven Elektroden konnte gezeigt werden, dass der Kaliumausstrom im Gegensatz zu den anderen beteiligten Ionen der flg22 Antwort zeitlich verzögert beginnt.

Im zweiten Ansatz wurden Membranpotential-Messungen durchgeführt, während in der externen Lösung die Konzentrationen von Protonen, Kalzium, Kalium oder Anionen variiert wurden. Nur eine Änderung des Anionengradienten hatte einen

Zusammenfassung

entscheidenden Einfluss auf die flg22-induzierte Depolarisation, was die Wichtigkeit der Anionenkanalaktivierung unterstreicht. Exudat Analysen ergaben, dass Nitrat das bevorzugt transportierte Ion ist. Um zu testen, ob noch weitere Anionen beteiligt sind, wurden Nitrat-freie Pflanzen kultiviert. Auch diese zeigten flg22-induzierte Depolarisationen. Es ist also anzunehmen, dass auch andere Anionen zur Membrandepolarisation beitragen.

Unter zahlreichen getesteten Ionenkanalblockern erwies sich lediglich Lanthan als effektiver Blocker des flg22-induzierten zytosolischen Kalziumanstiegs, des Protoneneinstroms und der Membrandepolarisation. Da Lanthan bekanntlich unspezifische Kationenkanäle blockt, kann man an diesem Punkt davon ausgehen, dass Kalzium-aktivierte Anionenkanäle die Membrandepolarisation vermitteln und darauf eine Aktivierung von auswärtsgerichteten Kaliumkanälen folgt.

Um näher zu untersuchen an welchem Punkt sich die flg22-induzierte Ionenkanalaktivierung in der Signaltransduktionskette der basalen Immunität befindet und durch welche Genprodukte die Ionenflüsse hervorgerufen werden, wurden zahlreiche *Arabidopsis* Mutanten der Kalzium-, SA-, MAPKinasen Signalwege, der NADPH Oxdasen oder von Ionenkanälen getestet. Bis jetzt zeigten alle von uns getesteten Mutanten kontrollähnliche Depolarisationen als Antwort auf flg22.

Auf der Suche nach Einzelzell Systemen mit denen man die Ionenströme messen kann, die die ausgeprägte und reproduzierbare Membrandepolarisation hervorruft, fanden wir, dass *Arabidopsis* Protoplasten keine flg22-spezifische Stromaktivierung zeigen. Wahrscheinlich findet schon im Herstellungsprozess der Protoplasten ein sogenanntes „Primen“ der Zellen statt, da sie schon mit einer ganzen Reihe an „elizitierenden Stoffen“ in Berührung kamen. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen überein, dass Protoplasten wie auch flg22-behandelte Zellen eine Hochregulierung von Resistenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren wie WRKY22 aufweisen. Erste Experimente mit Tabakzellkulturzellen ergaben keine reproduzierbare Aktivierung von Ionenströmen durch flg22 unter Spannungsklemmbedingungen. Zukünftige Studien mit Doppelläufigen-Mikroelektroden Spannungsklemmexperimenten oder externen ionenselektiven Elektroden an intakten Schliesszellen werden helfen weitere Informationen über die Natur der Ionenkanäle in der basalen Immunität oder generell in der Pflanzen-Mikroben Interaktion zu erhalten. Über die elektrophysiologische Charakterisierung der multiplen Ionenströme in der basalen Immunität hinaus, ist natürlich der nächste wichtige Schritt das oder die Gene zu

Zusammenfassung

finden, die für die Ionenkanäle oder Transporter kodieren, die durch nicht nekrotisierende Elizitoren wie flg22 in der basalen Immunantwort in Pflanzen aktiviert werden. Zu guter Letzt könnten diese Untersuchungen neue Möglichkeiten eröffnen Pflanzen zu produzieren, die eine höhere basale Immunität besitzen.

6. Summary

The plant plasma membrane represents the first site for recognition of microbial patterns called MAMPs. MAMP receptors mediate early defense responses including production of reactive oxygen species (ROS), external alkalinisation or ethylene. The *Arabidopsis* FLS2 receptor-like kinase (RLK) represents a plasma-membrane localized MAMP receptor that provides for innate immunity in *Arabidopsis thaliana* plants by specifically recognizing the flagellum (flg) of *Pseudomonas* species. Flg22, the shortest active part of flagellin, composed by 22 aminoacids is the best established bacterial elicitor that induces innate immunity in plants. About the role of ion channels in innate immunity nothing was known yet. In the current work we show a strong involvement of ion fluxes in the initiating phase of innate immunity. Our measurements on intact *Arabidopsis* plants and plant tissues are highly reproducible and open a new view of ion channel functions in plant microbe interactions.

In response to the application of flg22, after a delay of about 2 minutes, we recorded a transient, dose-dependent depolarization ($EC_{50}=0.2$ nM) in mesophyll and root hair cells of *A. thaliana*. Following wash-out of the peptide elicitor and recovery of the membrane potential to resting potential values within 70 ± 9 min, depolarizations could be elicited several times. In contrast, depolarization was sustained when challenging *Arabidopsis* plants with intact *Pseudomonas syringae* bacteria. No membrane depolarization was evoked upon application of flg22 Δ 2, a truncated flg22 peptide, or by application of flagellin from other bacteria (*Agrobacterium* or *Azospirillum*). Likewise, depolarization was not observed in the natural knockout mutant of the *Arabidopsis* ecotype Ws-0 lacking the functional FLS2 receptor. Complementation of transgenic Ws-0 plants with the functional FLS2 receptor restored flg22 sensitivity, indicating that FLS2 is essential for flg22 evoked membrane potential changes. Similar results were obtained using the *E. coli* EF-Tu elicitor peptide elf18, which is recognized by the *Arabidopsis* MAMP receptor EFR.

Aequorin based calcium measurements allowed us to record a transient increase in cytosolic calcium concentration in response to applied flg22. Dose-response studies revealed two distinct EC_{50} values for the calcium response of 43 ± 2 pM and 67 ± 42 nM respectively. This indicates that two different calcium pools or two different calcium permeabilities in the plasma membrane were activated by flg22. In calcium experiments using different bacterial lysates not only virulent (vir) or avirulent

summary

(*avir*) *Pseudomonas syringae* but also *Agrobacterium tumefaciens* and *Azospirillum brasilense* lysates that do not contain an active flagellin showed a similar calcium rise. This suggests that not only flagellin from *Pseudomonas* and the EF-Tu Peptide from *E.coli* but also additional microbial and pathogenic patterns can be recognized by their cognate receptors in *Arabidopsis* mesophyll cells inducing similar calcium alterations.

In line with a requirement of receptor-kinase activity for ion channel activation and subsequent depolarization, the latter was completely blocked by the kinase inhibitor K-252a. In *bak1-4* *Arabidopsis* plants, lacking the FLS2 subunit BAK1 – a promiscuous RLK also associated with the brassinosteroid receptor - no depolarisation was measured in response to flg22. This indicated that both RLKs – FLS2 and BAK1 – are required for flagellin induced ion channel activation.

In order to identify the ions responsible for the flg22 induced membrane depolarization we used three different experimental approaches: vibrating ion-selective micro-electrodes, membrane potential measurements and ion channel blockers.

Arabidopsis mesophyll cells showed the typical alkalization of the apoplast in response to flg22. Noninvasive experiments with vibrating ion-selective electrodes revealed that this pH rise was due to an influx of protons. In addition an efflux of chloride and potassium was recorded. All fluxes were transient in nature, as was the observed calcium signal. Simultaneous measurements using two ion-selective electrodes showed a delay of the potassium efflux in comparison to the other ions that participate in the flg22 response.

In the second approach, membrane potential measurements were performed while changing extracellular concentrations of protons, calcium, potassium or anions. Changing the anion gradient had the greatest impact on flg22 induced depolarization, suggestive of anion channel activation. Exudates analyses of flg22 treated leaves revealed that nitrate was the favored anion transported. To test for the involvement of additional anions we cultured nitrate-free plants and found that those still exhibited flg22 induced depolarizations, indicating that efflux of other anions contribute to the membrane potential depolarization.

Among many putative channel blocking agents tested, only lanthanum was identified to be potent in blocking the flg22 induced the cytosolic calcium rise, proton influx, and membrane potential depolarization. Since lanthanum represents a non-specific cation

summary

channel blocker, we favor to conclude that a calcium dependent activation of anion channels mediated membrane potential depolarization and consequently outward rectifying potassium channels.

To get an impact at which point the flg22 induced ion channel activation is placed in the signal transduction chain and which gene product could mediate the ion fluxes numerous *Arabidopsis* mutants with respect to calcium-, SA-, MAP kinase signaling, NADPH oxidases or ion channels were tested. Till now all mutants exhibited control like depolarization responses upon flg22 treatment.

In order to find an ion current according to the intense and reproducible membrane depolarisation we looked for single cell systems. However *Arabidopsis* protoplasts did not show any flg22 specific current activation probably because the cells already saw a latter of “eliciting agents” in the preparation process. This is in line with our results that protoplasts and flg22 treated cells both show an unregulation of resistance specific transcription factors as WRKY22. First experiments with cultured tobacco cells revealed no reproducible activation of ion currents under voltage clamp conditions. Future studies with double-barreled microelectrode voltage-clamp or external ion selective electrodes on intact guard cells may help to gain further information about the nature of ion channels in innate immunity or plant microbe interaction in general. Of course, all over the electrophysiological characterization of the multiple ion fluxes in innate immunity the next important step would be to discover the gene(s) coding for ion channels or transporters activated by non necrotic elicitors as flg22 in the innate immune response of plants. These investigations could open new possibilities to produce plants that are basically more resistant against pathogens.

7. Referenzen

- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E., und Martin, G.B.** (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2851-2856.
- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., und Hedrich, R.** (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Lett* **486**, 93-98.
- Adams, J.A.** (2003). Activation Loop Phosphorylation and Catalysis in Protein Kinases: Is There Functional Evidence for the Autoinhibitor Model? *Biochemistry* **42**, 601-607.
- Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., Tsaltas, D., Leng, Q., von Bodman, S., und Berkowitz, G.A.** (2007). Death Don't Have No Mercy and Neither Does Calcium: Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and Innate Immunity. *Plant Cell* **19**, 1081-1095.
- Allen, D.G., Blinks, J.R., Prendergast, F.G.** (1977). Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration--a calcium-independent component. *Science* **195**, 996-998.
- Alvarez, M.E.** (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology* **44**, 429-442.
- Amano, M., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T., und Shiraishi, T.** (1997). Association between ion fluxes and defense responses in pea and cowpea tissues. *Plant Cell Physiol* **38**, 698-706.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.A., Bjorn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O., und Mundy, J.** (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal* **24**, 2579-2589.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., und Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Atkinson, M.M., Keppler, L.D., Orlandi, E.W., Baker, C.J., und Mischke, C.F.** (1990). Involvement of Plasma Membrane Calcium Influx in Bacterial Induction of the K/H and Hypersensitive Responses in Tobacco. *Plant Physiol* **92**, 215-221.
- Ausubel, F.M.** (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* **6**, 973-979.
- Axtell, M.J., und Staskawicz, B.J.** (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**, 369-377.

Referenzen

- Axtell, M.J., Chisholm, S.T., Dahlbeck, D., und Staskawicz, B.J.** (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol Microbiol* **49**, 1537-1546.
- Barbara Schulz-Lessdorf, G.L., Rainer Hedrich,.** (1996). GCAC1 recognizes the pH gradient across the plasma membrane: a pH-sensitive and ATP-dependent anion channel links guard cell membrane potential to acid and energy metabolism. *The Plant Journal* **10**, 993-1004.
- Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikhine, G., Frachisse, J., und Maurel, C.** (2000). Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim Biophys Acta* **1465**, 199-218.
- Bauer, Z., Gomez-Gomez, L., Boller, T., und Felix, G.** (2001). Sensitivity of different ecotypes and mutants of *Arabidopsis thaliana* toward the bacterial elicitor flagellin correlates with the presence of receptor-binding sites. *J Biol Chem* **276**, 45669-45676.
- Beckers, G.J., und Spoel, S.H.** (2006). Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biol (Stuttg)* **8**, 1-10.
- Beilby, M.J., und Walker, N.A.** (1981). Chloride transport in *Chara*. I. Kinetics and current-voltage curves for a probable proton symport. *J. Exp. Bot.* **32**, 43-54.
- Bittel, P., und Robatzek, S.** (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 335-341.
- Blatt, M.R., Grabov, A., Brearley, J., Hammond-Kosack, K., und Jones, J.D.G.** (1999). K⁺ channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *The Plant Journal* **19**, 453-462.
- Blein, J.P., Milat, M.L., und Ricci, P.** (1991). Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*: Possible plasmalemma involvement. *Plant Physiol* **95**, 486-491.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., und Scheel, D.** (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**, 1425-1440.
- Boller, T.** (1995). Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 189-214.
- Bonaventure, G., Gfeller, A., Proebsting, W.M., Hortensteiner, S., Chetelat, A., Martinoia, E., und Farmer, E.E.** (2007). A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **49**, 889-898.
- Bourque, S., Binet, M.N., Ponchet, M., Pugin, A., und Lebrun-Garcia, A.** (1999). Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem* **274**, 34699-34705.

Referenzen

- Bretz, J.R., Mock, N.M., Charity, J.C., Zeyad, S., Baker, C.J., und Hutcheson, S.W.** (2003). A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. *Molecular Microbiology* **49**, 389-400.
- Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Alvarez, J., Pozzan, T., Rizzuto** (1995). Transfected Aequorin in the Measurement of Cytosolic Ca²⁺ Concentration ([Ca²⁺]_c). *J. Biol. Chem.* **270**, 7.
- Bush, D.S.** (1993). Regulation of Cytosolic Calcium in Plants. *Plant Physiol* **103**, 7-13.
- Cao, S., Jiang, L., Song, S., Jing, R., und Xu, G.** (2006). AtGRP7 is involved in the regulation of abscisic acid and stress responses in Arabidopsis. *Cellular & Molecular Biology Letters* **11**, 10.
- Carpaneto, A., Ivashikina, N., Levchenko, V., Krol, E., Jeworutzki, E., Zhu, J.K., und Hedrich, R.** (2007). Cold transiently activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells. *Plant Physiol* **143**, 487-494.
- Chang, C.** (2003). Ethylene signaling: the MAPK module has finally landed. *Trends in Plant Science* **8**, 365-368.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., und Felix, G.** (2006). The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., und Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497-500.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., und Staskawicz, B.J.** (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* **124**, 803-814.
- Clough, S.J., Fengler, K.A., Yu, I.-c., Lippok, B., Smith, R.K., Jr., und Bent, A.F.** (2000). The Arabidopsis dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9323-9328.
- Coaker, G., Falick, A., und Staskawicz, B.** (2005). Activation of a Phytopathogenic Bacterial Effector Protein by a Eukaryotic Cyclophilin. *Science* **308**, 548-550.
- Colcombet, J., Thomine, S., Guern, J., Frachisse, J.M., und Barbier-Brygoo, H.** (2001). Nucleotides provide a voltage-sensitive gate for the rapid anion channel of Arabidopsis hypocotyl cells. *J Biol Chem* **276**, 36139-36145.
- Colmenero-Flores, J.M., Martínez, G., Gamba, G., Vázquez, N., Iglesias, D.J., Brumós, J., und Talón, M.** (2007). Identification and functional characterization of cation/chloride cotransporters in plants. *The Plant Journal* **50**, 278-292.

Referenzen

- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., und Mauch-Mani, B.** (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **7**, 210-216.
- Dangl, J.L., und Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Dardick, C., und Ronald, P.** (2006). Plant and Animal Pathogen Recognition Receptors Signal through Non-RD Kinases. *PLoS Pathogens* **2**, e2.
- de Angeli, A., Thomine, S., Frachisse, J.M., Ephritikhine, G., Gambale, F., und Barbier-Brygoo, H.** (2007). Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Lett* **581**, 2367-2374.
- de Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.M., Thomine, S., Gambale, F., und Barbier-Brygoo, H.** (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**, 939-942.
- DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y.-B., Nomura, K., und He, S.Y.** (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9927-9932.
- Delaney, T.P., Friedrich, L., und Ryals, J.A.** (1995). Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6602-6606.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., und Ryals, J.** (1994). A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science* **266**, 1247-1250.
- Demidchik, V., und Maathuis, F.J.** (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytol* **175**, 387-404.
- Demidchik, V., Bowen, H.C., Maathuis, F.J.M., Shabala, S.N., Tester, M.A., White, P.J., und Davies, J.M.** (2002). Arabidopsis thaliana root non-selective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *The Plant Journal* **32**, 799-808.
- Devadas, S.K., und Raina, R.** (2002). Preexisting systemic acquired resistance suppresses hypersensitive response-associated cell death in Arabidopsis hrl1 mutant. *Plant Physiol* **128**, 1234-1244.
- Durrant, W.E., und Dong, X.** (2004). SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 185-209.
- Ebel, J.** (1998). Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *Bioessays* **20**, 569-576.
- El-Maarouf, H., Barny, M.A., Rona, J.P., und Bouteau, F.** (2001). Harpin, a hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett* **497**, 82-84.

Referenzen

- Epstein, E., Rains, D.W., Elzam, O.E.** (1963). Resolution of dual mechanism of potassium absorption by barley roots. *PNAS* **49**, 684-692
- Ersek, T., Novacky, A., und Pueppke, S.G.** (1986). Compatible and Incompatible Rhizobia Alter Membrane Potentials of Soybean Root Cells. *Plant Physiol* **82**, 1115-1118.
- Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q., und Alfano, J.R.** (2003). The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Molecular Microbiology* **49**, 377-387.
- Felix, G., und Boller, T.** (2003). Molecular Sensing of Bacteria in Plants. THE HIGHLY CONSERVED RNA-BINDING MOTIF RNP-1 OF BACTERIAL COLD SHOCK PROTEINS IS RECOGNIZED AS AN ELICITOR SIGNAL IN TOBACCO. *J. Biol. Chem.* **278**, 6201-6208.
- Felix, G., Regenass, M., und Boller, T.** (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* **4**, 307-316.
- Felix, G., Grosskopf, D.G., Regenass, M., und Boller, T.** (1991). Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8831-8834.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., und Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* **18**, 265-276.
- Felle, H.H., und Zimmermann, M.** (2007). Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta* **226**, 203-214.
- Felle, H.H., Kondorosi, Á., Kondorosi, É., und Schultze, M.** (1996). Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *The Plant Journal* **10**, 295-301.
- Felle, H.H.** (1994). The H⁺/Cl⁻ Symporter in Root-Hair Cells of *Sinapis alba* (An Electrophysiological Study Using Ion-Selective Microelectrodes). *Plant Physiol* **106**, 1131-1136.
- Felle, H.H., Kondorosi, Á., Kondorosi, É., und Schultze, M.** (1998). The role of ion fluxes in Nod factor signaling in *Medicago sativa*. *The Plant Journal* **13**, 455-463.
- Felle, H.H., Kondorosi, É., Kondorosi, Á., und Schultze, M.** (2000). How Alfalfa Root Hairs Discriminate between Nod Factors and Oligochitin Elicitors. *Plant Physiol* **124**, 1373-1380.
- Forde, B.G., und Lea, P.J.** (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J Exp Bot* **58**, 2339-2358.

Referenzen

- Fouts, D.E., Abramovitch, R.B., Alfano, J.R., Baldo, A.M., Buell, C.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., D'Ascenzo, M., Gwinn, M.L., Lazarowitz, S.G., Lin, N.-C., Martin, G.B., Rehm, A.H., Schneider, D.J., van Dijk, K., Tang, X., und Collmer, A.** (2002). Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2275-2280.
- Frachisse, J.-M., Thomine, S., Colcombet, J., Guern, J., und Barbier-Brygoo, H.** (1999). Sulfate Is Both a Substrate and an Activator of the Voltage-Dependent Anion Channel of Arabidopsis Hypocotyl Cells. *Plant Physiol* **121**, 253-262.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B.R., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D., und Alfano, J.R.** (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* **447**, 284-288.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., und Ryals, J.** (1993). Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science* **261**, 754-756.
- Gambale, F., und Uozumi, N.** (2006). Properties of shaker-type potassium channels in higher plants. *J Membr Biol* **210**, 1-19.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., und Pugin, A.** (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 711-724.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferriere, N., Thibaud, J.B., und Sentenac, H.** (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell* **94**, 647-655.
- Gelli, A., und Blumwald, E.** (1997). Hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channels in the plasma membrane of tomato cells. *J Membr Biol* **155**, 35-45.
- Glazebrook, J.** (1999). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 280-286.
- Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K., und Maathuis, F.J.** (2007). The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10726-10731.
- Goldman, D.E.** (1943). Potential, impedance, and rectification in membranes. *Journal of General Physiology* **27**, 23.
- Gómez-Gómez, L., und Boller, T.** (2000). FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* **5**, 1003-1011.
- Gómez-Gómez, L., und Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science* **7**, 251-256.

Referenzen

- Gómez-Gómez, L., Felix, G., und Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **18**, 277-284.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., und Ryals, J.** (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* **8**, 629-643.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., und Mansfield, J.** (2000). The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* **23**, 441-450.
- Guo, H., und Ecker, J.R.** (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**, 667-677.
- Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G., und Greenberg, J.T.** (2002). A Functional Screen for the Type III (Hrp) Secretome of the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**, 1722-1726.
- Hamilton, D.W., Hills, A., Kohler, B., und Blatt, M.R.** (2000). Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4967-4972.
- Hammerschmidt, R.** (1999). PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annual Review of Phytopathology* **37**, 285-306.
- Hauck, P., Thilmony, R., und He, S.Y.** (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8577-8582.
- He, D.Y., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N., und Minami, E.** (1998). Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the elicitor, *N*-acetylchitoheptaose. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **11**, 1167-1174.
- He, P., Shan, L., Lin, N.-C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nurnberger, T., und Sheen, J.** (2006). Specific Bacterial Suppressors of MAMP Signaling Upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* Innate Immunity. *Cell* **125**, 563-575.
- Heath, M.C.** (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* **44**, 321-334.
- Hedrich, R., und Marten, I.** (1993). Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells. *The EMBO Journal* **12**, 897-901.
- Hedrich, R., und Kudla, J.** (2006). Calcium Signaling Networks Channel Plant K⁺ Uptake. *Cell*

Referenzen

125, 1221-1223.

Heintzen, C., Nater, M., Apel, K., und Staiger, D. (1997). AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8515-8520.

Higashi, K., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., und Ichinose, Y. (2008). Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* **279**, 303-312.

Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., und Sussman, M.R. (1998). A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition. *Science* **280**, 918-921.

Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Porée, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Véry, A.-A., Simonneau, T., Thibaud, J.-B., und Sentenac, H. (2003). The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5549-5554.

Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., und Mudgett, M.B. (2003). Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular Microbiology* **50**, 377-389.

Ichimura, K., Casais, C., Peck, S.C., Shinozaki, K., und Shirasu, K. (2006). MEKK1 Is Required for MPK4 Activation and Regulates Tissue-specific and Temperature-dependent Cell Death in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 36969-36976.

Inohara, N., und Nunez, G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**, 371-382.

Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H.H., und Hedrich, R. (2001). K⁺ channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Lett* **508**, 463-469.

Jakobek, J.L., Smith, J.A., und Lindgren, P.B. (1993). Suppression of Bean Defense Responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **5**, 57-63.

Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B., und Stebbins, C.E. (2006). A Bacterial Inhibitor of Host Programmed Cell Death Defenses Is an E3 Ubiquitin Ligase. *Science* **311**, 222-226.

Johnson, L.N., Noble, M.E.M., und Owen, D.J. (1996). Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation. *Cell* **85**, 149-158.

Jones, J.D.G., und Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.

Journot-Catalino, N., Somssich, I.E., Roby, D., und Kroj, T. (2006). The Transcription Factors WRKY11 and WRKY17 Act as Negative Regulators of Basal Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **18**, 3289-3302.

Referenzen

- Kadota, Y., Furuichi, T., Ogasawara, Y., Goh, T., Higashi, K., Muto, S., und Kuchitsu, K.** (2004a). Identification of putative voltage-dependent Ca^{2+} -permeable channels involved in cryptogein-induced Ca^{2+} transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **317**, 823-830.
- Kadota, Y., Goh, T., Tomatsu, H., Tamauchi, R., Higashi, K., Muto, S., und Kuchitsu, K.** (2004b). Cryptogein-Induced Initial Events in Tobacco BY-2 Cells: Pharmacological Characterization of Molecular Relationship among Cytosolic Ca^{2+} Transients, Anion Efflux and Production of Reactive Oxygen Species. *Plant Cell Physiol.* **45**, 160-170.
- Katz, V., Fuchs, A., und Conrath, U.** (2002). Pretreatment with salicylic acid primes parsley cells for enhanced ion transport following elicitation. *FEBS Lett* **520**, 53-57.
- Katz, V.A., Thulke, O.U., und Conrath, U.** (1998). A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol* **117**, 1333-1339.
- Kawano, T., und Muto, S.** (2000). Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *J Exp Bot* **51**, 685-693.
- Kepler, L.D., und Novacky, A.** (1986). Involvement of Membrane Lipid Peroxidation in the Development of a Bacterially Induced Hypersensitive Reaction. *Phytopathology* **76**, 104-108.
- Keshavarzi, M., Soyulu, S., Brown, I., Bonas, U., Nicole, M., Rossiter, J., und Mansfield, J.** (2004). Basal Defenses Induced in Pepper by Lipopolysaccharides Are Suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 805-815.
- Kim, H.-S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J., und Dangl, J.L.** (2005a). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6496-6501.
- Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., und Mackey, D.** (2005b). Two *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**, 749-759.
- Klüsener, B., und Weiler, E., W.** (1999). Pore-forming properties of elicitors of plant defense reactions and cellulolytic enzymes. *FEBS Lett* **459**, 263-266.
- Klüsener, B., Young, J.J., Murata, Y., Allen, G.J., Mori, I.C., Hugouvieux, V., und Schroeder, J.I.** (2002). Convergence of Calcium Signaling Pathways of Pathogenic Elicitors and Abscisic Acid in *Arabidopsis* Guard Cells. *Plant Physiol* **130**, 2152-2163.
- Knight, H., Trewavas, A.J., und Knight, M.R.** (1996). Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* **8**, 489-503.

Referenzen

- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., und Trewavas, A.J.** (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352**, 524-526.
- Kochian, L.V., Shaff, J.E., Kühtreiber, W.M., Jaffe, L.F., and Lucas, W.J.** (1992). Use of an extracellular, ion selective, vibrating microelectrode system for the quantification of K⁺, H⁺ and Ca²⁺ fluxes in maize roots and maize suspension cells. *Planta* **188**, 601-610.
- Kohler, A., Schwindling, S., und Conrath, U.** (2002). Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiol* **128**, 1046-1056.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., und Felix, G.** (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *Plant Cell* **16**, 3496-3507.
- Kurusu, T., Yagala, T., Miyao, A., Hirochika, H., und Kuchitsu, K.** (2005). Identification of a putative voltage-gated Ca²⁺ channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice. *The Plant Journal* **42**, 798-809.
- Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S., und Grignon, C.** (1996). Tissue-specific expression of *Arabidopsis* *AKT1* gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *The Plant Journal* **9**, 195-203.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., und Wendehenne, D.** (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol* **135**, 516-529.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., und Ryals, J.** (1995). Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 863-870.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., und Ryals, J.** (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal* **10**, 71-82.
- Lebaudy, A., Very, A.A., und Sentenac, H.** (2007). K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Lett* **581**, 2357-2366.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., und Pugin, A.** (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol* **171**, 249-269.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., und Pugin, A.** (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana glauca* cells. *Plant Cell* **14**, 2627-2641.

Referenzen

- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., und Pugin, A.** (2005). Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* **38**, 527-538.
- Lee, J., Klüsener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A.P., Panopoulos, N.J., Noller, J., Weiler, E.W., Cornelis, G.R., Mansfield, J.W., und Nürnberger, T.** (2001). HrpZPspH from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore invitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 289-294.
- Leng, Q., Mercier, R.W., Yao, W., und Berkowitz, G.A.** (1999). Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol* **121**, 753-761.
- Levchenko, V., Konrad, K.R., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., und Hedrich, R.** (2005). Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4203-4208.
- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., und Lamb, C.** (1996). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* **6**, 427-437.
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., und Walker, J.C.** (2002). BAK1, an Arabidopsis LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling. *Cell* **110**, 213-222.
- Linsmaier, E.M.a.S., F.** (1965). Organic growth factor requirements of tobacco. *Tissue cultures. Physiologia Plantarum* **18**, 100-127.
- Lopez-Solanilla, E., Bronstein, P.A., Schneider, A.R., und Collmer, A.** (2004). HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Molecular Microbiology* **54**, 353-365.
- Ludwig, A.A., Saitoh, H., Felix, G., Freymark, G., Miersch, O., Wasternack, C., Boller, T., Jones, J.D., und Romeis, T.** (2005). Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10736-10741.
- Mackey, D., Holt, B.F., 3rd, Wiig, A., und Dangl, J.L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**, 743-754.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., und Dangl, J.L.** (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379-389.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., und Raskin, I.** (1990). Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection. *Science* **250**, 1002-1004.

Referenzen

- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L., und Dietrich, R.A.** (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* **26**, 403-410.
- Marten, I., Zeilinger, C., Redhead, C., Landry, D.W., al-Awqati, Q., und Hedrich, R.** (1992). Identification and modulation of a voltage-dependent anion channel in the plasma membrane of guard cells by high-affinity ligands. *The EMBO Journal* **11**, 3569-3575.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J., und Sessa, G.** (2003). UNDERSTANDING THE FUNCTIONS OF PLANT DISEASE RESISTANCE PROTEINS. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 23-61.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A., und Guerinot, M.L.** (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**, 1646-1667.
- Mathieu, Y., Jouanneau, J.P., Thomine, S., Lalous, D., und Guern, J.** (1994). Cytosolic protons as secondary messengers in elicitor-induced defence responses. *Biochem Soc Symp* **60**, 113-130.
- McClure, P.R., Kochian, L.V., Spanswick, R.M., und Shaff, J.E.** (1990). Evidence for Cotransport of Nitrate and Protons in Maize Roots : I. Effects of Nitrate on the Membrane Potential. *Plant Physiol* **93**, 281-289.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., und He, S.Y.** (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* **126**, 969-980.
- Menke, F.L.H., van Pelt, J.A., Pieterse, C.M.J., und Klessig, D.F.** (2004). Silencing of the Mitogen-Activated Protein Kinase MPK6 Compromises Disease Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 897-907.
- Meszaros, T., Helfer, A., Hatzimasoura, E., Magyar, Z., Serazetdinova, L., Rios, G., Bardoczky, V., Teige, M., Koncz, C., Peck, S., und Bognar, L.** (2006). The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *The Plant Journal* **48**, 485-498.
- Métraux, J.-P., Ahi-Goy, P., Staub, T., Speich, J., Steinemann, A., Ryals, J., und Ward, E.** (1991). Induced resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers).
- Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., und Inverardi, B.** (1990). Increase in Salicylic Acid at the Onset of Systemic Acquired Resistance in Cucumber. *Science* **250**, 1004-1006.
- Mikes, V., Milat, M.-L., Ponchet, M., Ricci, P., und Blein, J.-P.** (1997). The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett* **416**, 190-192.

Referenzen

- Mishra, N.S., Tuteja, R., und Tuteja, N.** (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys* **452**, 55-68.
- Mithöfer, A., und Mazars, C.** (2002). Aequorin-based measurements of intracellular Ca²⁺-signatures in plant cells. *Biol Proced Online* **4**, 105-118.
- Monshausen, G.B., Bibikova, T.N., Messerli, M.A., Shi, C., und Gilroy, S.** (2007). Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20996-21001.
- Mori, I.C., und Schroeder, J.I.** (2004). Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol* **135**, 702-708.
- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriac, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M., und Schroeder, J.I.** (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* **4**, e327.
- Nakagami, H., Soukupova, H., Schikora, A., Zarsky, V., und Hirt, H.** (2006). A Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase Mediates Reactive Oxygen Species Homeostasis in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **281**, 38697-38704.
- Nam, K.H., und Li, J.** (2002). BRI1/BAK1, a Receptor Kinase Pair Mediating Brassinosteroid Signaling. *Cell* **110**, 203-212.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., und Jones, J.D.G.** (2004). The Transcriptional Innate Immune Response to flg22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. *Plant Physiol* **135**, 1113-1128.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., und Iba, K.** (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*.
- Newman, I.A.** (2001). Ion transport in roots: measurement of fluxes using ion-selective microelectrodes to characterize transporter function. *Plant, Cell and Environment* **24**, 1-14.
- Newman, I.A., Kochian, L.V., Grusak, M.A., und Lucas, W.J.** (1987). Fluxes of H⁺ and K⁺ in corn roots: Characterisation and stoichiometries using ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol* **84**, 1177-1184.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B.F., und Dangl, J.L.** (2003). RECOGNITION AND RESPONSE IN THE PLANT IMMUNE SYSTEM. *Annual Review of Genetics* **37**, 579-609.
- Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R.T., Katagiri, F., und Dangl, J.L.** (2000). Eukaryotic Fatty Acylation Drives Plasma Membrane Targeting and Enhances

Referenzen

- Function of Several Type III Effector Proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* **101**, 353-363.
- Nürnbergger, T., und Scheel, D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response *Trends in Plant Science* **6**, 372-379.
- Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., und Scheel, D.** (1994a). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449-460.
- Nürnbergger, T., Colling, C., Hahlbrock, K., Jabs, T., Renelt, A., Sacks, W.R., und Scheel, D.** (1994b). Perception and transduction of an elicitor signal in cultured parsley cells. *Biochem Soc Symp* **60**, 173-182.
- Pavlovkin, J., Novacky, A., und Ullrich-Eberuis, C.** (1986). Membrane potential changes during bacteria induced hypersensitive reaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **28**, 125-135.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., und Schroeder, J.I.** (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.
- Peiter, E., Maathuis, F.J., Mills, L.N., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A.M., und Sanders, D.** (2005). The vacuolar Ca^{2+} -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* **434**, 404-408.
- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L.M., Janes, M.D., Buell, C.R., Tang, X., Collmer, A., und Alfano, J.R.** (2002). Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7652-7657.
- Picollo, A., und Pusch, M.** (2005). Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature* **436**, 420-423.
- Pike, S.M., Zhang, X.C., und Gassmann, W.** (2005). Electrophysiological characterization of the *Arabidopsis* avrRpt2-specific hypersensitive response in the absence of other bacterial signals. *Plant Physiol* **138**, 1009-1017.
- Pike, S.M., Ádám, A.L., Pu, X.A., Hoyos, M.E., Laby, R., Beer, S.V., und Novacky, A.** (1998). Effects of *Erwinia amylovora* harpin on tobacco leaf cell membranes are related to leaf necrosis and electrolyte leakage and distinct from perturbations caused by inoculated *E. amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**, 39-60.
- Plassard, C., Meslem, M., Souche, G., und Jaillard, B.** (1999). Localization and quantification of net fluxes of H^+ along maize roots by combined use of pH-indicator dye videodensitometry and H^+ -selective microelectrodes. *Plant & Soil* **211**, 29-39.
- Plieth, C.** (2001). Plant calcium signaling and monitoring: pros and cons and recent experimental approaches. *Protoplasma* **218**, 1-23.

Referenzen

- Pottosin, II, und Schönknecht, G.** (2007). Vacuolar calcium channels. *J Exp Bot* **58**, 1559-1569.
- Pottosin, II, Dobrovinskaya, O.R., und Muniz, J.** (1999). Cooperative block of the plant endomembrane ion channel by ruthenium red. *Biophys J* **77**, 1973-1979.
- Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C., und Genschik, P.** (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* **115**, 679-689.
- Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewavas, A.J., und Knight, M.R.** (1994). Oxidative Signals in Tobacco Increase Cytosolic Calcium. *Plant Cell* **6**, 1301-1310.
- Provar, N.J., Gil, P., Chen, W., Han, B., Chang, H.S., Wang, X., und Zhu, T.** (2003). Gene expression phenotypes of Arabidopsis associated with sensitivity to low temperatures. *Plant Physiol* **132**, 893-906.
- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., und Guern, J.** (1997). Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell* **9**, 2077-2091.
- Qiu, J.-L., Fiil, B.K., Petersen, K., Nielsen, H.B., Botanga, C.J., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, M.C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., Brodersen, P., Grasser, K.D., Mattsson, O., Glazebrook, J., Mundy, J., und Petersen, M.** (2008). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal* **27**, 2214-2221.
- Ranf, S., Wünnenberg, P., Lee, J., Becker, D., Dunkel, M., Hedrich, R., Scheel, D., und Dietrich, P.** (2008). Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca²⁺ signals induced by abiotic and biotic stresses. *The Plant Journal* **53**, 287-299.
- Reboutier, D., Frankart, C., Vedel, R., Brault, M., Duggleby, R.G., Rona, J.P., Barny, M.A., und Bouteau, F.** (2005). A CFTR chloride channel activator prevents HrpN(ea)-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Physiol Biochem* **43**, 567-572.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K., und Hedrich, R.** (2002). AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel alpha -subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4079-4084.
- Robatzek, S., Chinchilla, D., und Boller, T.** (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev.* **20**, 537-542.
- Robert-Seilaniantz, A., Shan, L., Zhou, J.-M., und Tang, X.** (2006). The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Type III Effector HopF2 Has a Putative Myristoylation Site Required for Its Avirulence and Virulence Functions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 130-138.

Referenzen

- Roberts, S.K.** (2006). Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytol* **169**, 647-666.
- Roden, J., Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y., und Mudgett, M.B.** (2004). Characterization of the Xanthomonas AvrXv4 Effector, a SUMO Protease Translocated into Plant Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 633-643.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R., und Jones, J.D.G.** (2001). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *The EMBO Journal* **20**, 5556-5567.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., und Hunt, M.D.** (1996). Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819.
- Ryan, P.R., Shaff, J.E. & Kochian, L.V.** (1992). Aluminium toxicity in roots. Correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminium-sensitive and aluminium-tolerant wheat cultivars. *Plant Physiol* **99**, 1193-1200.
- Sagi, M., Davydov, O., Orazova, S., Yesbergenova, Z., Ophir, R., Stratmann, J.W., und Fluhr, R.** (2004). Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell* **16**, 616-628.
- Sanders, D.** (1980). The mechanism of Cl⁻ transport at the plasma membrane of *Chara corallina*. I. Cotransport with H⁺. *J Membr Biol* **53**, 129-141.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., und Harper, J.F.** (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**, 401-417.
- Scholz-Starke, J., Naso, A., und Carpaneto, A.** (2005). A perspective on the slow vacuolar channel in vacuoles from higher plant cells. *J Chem Inf Model* **45**, 1502-1506.
- Schroeder, J.** (1995). Anion channels as central mechanisms for signal transduction in guard-cells and putative functions in roots for plant-soil interactions. *Plant Molecular Biology* **28**, 353-361.
- Segonzac, C., Boyer, J.-C., Ipotesi, E., Szponarski, W., Tillard, P., Touraine, B., Sommerer, N., Rossignol, M., und Gibrat, R.** (2007). Nitrate Efflux at the Root Plasma Membrane: Identification of an Arabidopsis Excretion Transporter. *Plant Cell* **19**, 3760-3777.
- Shabala, S.N., Newman, I.A., und Morris, J.** (1997). Oscillations in H⁺ and Ca²⁺ Ion Fluxes around the Elongation Region of Corn Roots and Effects of External pH. *Plant Physiol* **113**, 111-118.
- Shan, L., Thara, V.K., Martin, G.B., Zhou, J.-M., und Tang, X.** (2000). The Pseudomonas AvrPto Protein Is Differentially Recognized by Tomato and Tobacco and Is Localized to the Plant Plasma Membrane. *Plant Cell* **12**, 2323-2338.

Referenzen

- Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W., und Dixon, J.E.** (2002). A Yersinia Effector and a Pseudomonas Avirulence Protein Define a Family of Cysteine Proteases Functioning in Bacterial Pathogenesis. *Cell* **109**, 575-588.
- Shen, Q.-H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, I.E., und Schulze-Lefert, P.** (2007). Nuclear Activity of MLA Immune Receptors Links Isolate-Specific and Basal Disease-Resistance Responses. *Science* **315**, 1098-1103.
- Shiu, S.H., und Bleecker, A.B.** (2001). Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. *Science* **2001**, re22.
- Sigee, D.S.** (1993). *Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspects.* (Cambridge, Great Britain: Press Syndicate of the University of Cambridge).
- Simmons, C.R., Fridlender, M., Navarro, P.A., und Yalpani, N.** (2003). A maize defense-inducible gene is a major facilitator superfamily member related to bacterial multidrug resistance efflux antiporters. *Plant Molecular Biology* **52**, 433-446.
- Simon-Plas, F., Rustérucchi, C., Milat, M.L., Humbert, C., Montillet, J.L., und Blein, J.P.** (1997). Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant, Cell and Environment* **20**, 1573-1579.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., und Metraux, J.** (1997). SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology* **35**, 235-270.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., und Krysan, P.J.** (2007). MEKK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiol* **143**, 661-669.
- Sun, W., Dunning, F.M., Pfund, C., Weingarten, R., und Bent, A.F.** (2006). Within-Species Flagellin Polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and Its Impact on Elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-Dependent Defenses. *Plant Cell* **18**, 764-779.
- Tellström, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Kuster, H., und Niehaus, K.** (2007). The Lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* Suppresses Defense-Associated Gene Expression in Cell Cultures of the Host Plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **143**, 825-837.
- Thomine, S., Guern, J., und Barbier-Brygoo, H.** (1997). Voltage-dependent anion channel of Arabidopsis hypocotyls: nucleotide regulation and pharmacological properties. *J Membr Biol* **159**, 71-82.
- Thulke, O., und Conrath, U.** (1998). Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *The Plant Journal* **14**, 35-42.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., und Jones, J.D.** (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 517-522.

Referenzen

- Torres, M.A., Jones, J.D., und Dangl, J.L.** (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **37**, 1130-1134.
- Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E., und Jones, J.D.** (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *The Plant Journal* **14**, 365-370.
- Tsay, Y.F., Chiu, C.C., Tsai, C.B., Ho, C.H., und Hsu, P.K.** (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* **581**, 2290-2300.
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D., und Katagiri, F.** (2008). Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *The Plant Journal* **53**, 763-775.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmaki, A., Brosche, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J.I., und Kangasjarvi, J.** (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*.
- Van Der Biezen, E.A., und Jones, J.D.G.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 454-456.
- Very, A.A., und Sentenac, H.** (2002). Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends in Plant Science* **7**, 168-175.
- Volkov, A.G.** (2006). *Plant Electrophysiology*. (Heidelberg: Springer-Verlag).
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P., und Ryals, J.A.** (1991). Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **3**, 1085-1094.
- Ward, J.M., Pei, Z.M., und Schroeder, J.I.** (1995). Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *Plant Cell* **7**, 833-844.
- Wendehenne, D., Binet, M.N., Blein, J.P., Ricci, P., und Pugin, A.** (1995). Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett* **374**, 203-207.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.-M., Barbier-Brygoo, H., und Pugin, A.** (2002). Nitrate Efflux Is an Essential Component of the Cryptogein Signaling Pathway Leading to Defense Responses and Hypersensitive Cell Death in Tobacco. *Plant Cell* **14**, 1937-1951.
- White, P.J., und Broadley, M.R.** (2003). Calcium in plants. *Ann Bot (Lond)* **92**, 487-511.
- White, P.J., Bowen, H.C., Demidchik, V., Nichols, C., und Davies, J.M.** (2002). Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim Biophys Acta* **1564**, 299-309.

Referenzen

- Xu, X., Chen, C., Fan, B., und Chen, Z.** (2006). Physical and Functional Interactions between Pathogen-Induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 Transcription Factors. *Plant Cell* **18**, 1310-1326.
- Yu, D., Chen, C., und Chen, Z.** (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* **13**, 1527-1540.
- Yu, I.C., Parker, J., und Bent, A.F.** (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in Arabidopsis dnd1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7819-7824.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., und Durner, J.** (2004). Innate immunity in Arabidopsis thaliana : Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15811-15816.
- Zhang, S., und Klessig, D.F.** (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**, 520-527.
- Zhang, W., He, S.Y., und Assmann, S.M.** (2008). The plant innate immunity response in stomatal guard cells invokes G-protein-dependent ion channel regulation. *The Plant Journal*.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., und Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2751-2755.
- Zipfel, C., und Felix, G.** (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 353-360.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., und Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* **428**, 764-767.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., und Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**, 749-760.

8. Anhang

Abkürzungsverzeichnis:

°C - Grad **C**elsius

μ – **m**ikro (10^{-3})

A. th. - **A**rabidopsis *th*aliana

ABA - Abscisinsäure (engl.: **a**bsciscic **a**cid)

Abb. – **A**bbildung

AKT1 – **A**rabidopsis **K**⁺ **T**ransporter1

AS – **A**minosäure

AtKC1 – **A**rabidopsis *th*aliana **K**⁺ **c**hannel1

BAK1 - **B**RI1-associated receptor **k**inase1

BSA - Rinderserum-Albumin (engl.: **b**ovine **s**erum **a**lbumin)

bzw. - **b**eziehungsweise

ca. - **c**irca

Ca²⁺ - **C**alciumion

[Ca²⁺]_{cyt} - **c**ytosolische **C**alciumkonzentration

CaM - **C**almodulin

Cl⁻ - **C**hloridion

cm - Zentimeter

CNGC - engl.: **c**yclic-**n**ucleotide-**g**ated **c**hannel

Col-0 - Columbia

CSP – **c**old **s**hock **p**rotein

d. h. - **d**as **h**eißt

DNA - Desoxyribonukleinsäure (engl.: **d**esoxyribonucleic **a**cid)

DPI – **D**iphenyl Iodonium Chlorid

E.coli - **E**scherichia **c**oli

EFR – **E**F-Tu **R**ezeptor

et al. - **e**t **a**lii

f - femto (10^{-12})

FC - **F**usicoccin

FG – **F**rischgewicht

Anhang

FLS2 – **F**lagellin **S**ensing **2**

g - **G**ramm

GFP - engl.: **g**reen **f**luorescent **p**rotein

GORK – **g**uard cell **o**utward **r**ectifying **K**⁺ channel

h - Stunde (engl.: **h**our)

H₂O – Wasser

HPLC – **h**igh **p**ressure **l**iquid **c**hromatography

HR – **H**ypersensitive **R**esponse

IAA - engl.: Indole-3-**a**cetic **a**cid

IRAK – **I**nterleukin-1 **R**ezeptor **a**ssoziierte **K**inase

K⁺ - **K**aliumion

KAT1 – **K**⁺ **A**rabidopsis **T**ransporter**1**

l - **L**iter

LB-Medium - **L**uria-**B**ertani-Medium

LIX – **l**iquid **i**on **e**xchanger

LRR-RLK - **L**eucine rich repeat receptor like **k**inase

M – **M**olar

MAMP – **m**icrobe **a**ssoziierte **m**olecular **p**attern

Mg²⁺ - **M**agnesiumion

MIFETM – **m**icroelectrode ion **f**lux **e**stimation

min – **M**inute

MM – **M**ichaelis **M**enten

MS - **M**urashige und **S**koog

n – **N**ano (10⁻⁶)

N - Stickstoff (engl.: **n**itrogen)

NA – Niflumsäure (engl.: **n**iflumic **a**cid)

NADH - **N**icotinamid-**A**denin-**D**inucleotid, reduzierte Form

NADPH - **N**icotinamid-**A**denin-**D**inucleotid-**P**hosphat, reduzierte Form

NH₃ - Ammoniak

NH⁴⁺ - Ammoniumion

NO – Stickstoffmonoxid

NPPB - 5-**N**itro-2(3-**P**henylpropylamino) **b**enzoic acid

NSCC - nicht-selektiver Kationenkanal (engl.: **n**on-**s**elective **c**ation **c**hannel)

Nt - *Nicotiana tabaccum*

Anhang

O₂ - Sauerstoff (engl.: **o**xxygen)

OD - **o**ptische **D**ichte

OD₆₀₀ - **o**ptische **D**ichte bei $\lambda = 600$ nm

p – **p**iko (10^{-9})

PAMP – **p**athogen **a**ssociated **m**olecular **p**attern

PM – **P**lasma**m**embran

PR – **P**athogen-**R**esistenz-

RLK – **r**eceptor **l**ike **k**inase (rezeptorartige Kinase)

RLP - **r**eceptor **l**ike **p**rotein (rezeptorartiges Protein)

ROS – reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive **o**xxygen **s**pecies)

rpm - engl.: rotations **p**er **m**inute

s – **S**ekunde

SA – Salizylsäure (**s**alicylic **a**cid)

SKOR – **s**telar **K**⁺ **o**utward **r**ectifying channel

s.o. - **s**iehe **o**ben

s.u. - **s**iehe **u**nten

SF – **S**tandard**f**ehler

TPK1 – **T**wo **P**ore **K**⁺ **C**hannel**1**

U - Spannung

u. a. - **u**nter **a**nderem

V - **V**olt

vgl. - **v**ergleiche

Vol - **V**olumeneinheit(en)

Ws-0 , Wassilewskaya

z.B. - **z**um **B**eispiel

Curriculum vitae et studiorum

Elena Jeworutzki

Geburtstag und Geburtsort: 03. Februar 1979, Magdeburg
Adresse: Gross Quassow 24, 17237 USERIN, Germany
Tel.: + 49 3981-204756
mobil: + 49 179-7909313
Familienstand: ledig, 1 Sohn (*24/01/2009)

Ausbildung

1985-1989 Besuch der Grundschule, Mannheim Vogelstang

1989-1990 Besuch des Feudenheim Gymnasiums, Mannheim

1990-1994 Besuch des Gymnasium Markbreit

1994-1997 Besuch des Gymnasium Carolinum in Neustrelitz

1997 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

1998-2000 Grundstudium und Vordiplom an der Universität des Saarlandes

2000-2003 Hauptstudium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Schwerpunkte auf Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Pharmazeutische Biologie, Ökologie der Pflanze, Pharmakologie und Toxikologie und Mikrobiologie)

Mai 2003 Mündliche Diplomhauptprüfung in den Fächern Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Pharmazeutische Biologie und Ökologie der Pflanze

Juni 2003 – Mai 2004 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel: "Studien zur Spannungsabhängigkeit und pH Regulierung der pflanzlichen Kaliumkanäle GORK und TPK4 aus *Arabidopsis thaliana* (L.)" unter Anweisung von Dr. Dietmar Geiger und PD Dr. Dirk Becker

Seit Juli 2004 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter Anleitung von PD Dr. D. Becker und PD Dr. M.R.G. Roelfsema

Fremdsprachenkenntnisse

Anhang

Fortgeschrittene Kenntnisse in der geschriebenen und gesprochenen englischen Sprache und grundlegende Kenntnisse der französischen Sprache

Internationale Erfahrungen

Vom 28.11.2005 bis zum 16.12.2005, Besuch von Prof. Dr. J.T.M. Elzenga's Labor am Institut für Pflanzenphysiologie, Zentrum für ökologische und evolutionäre Studien, Universität Groningen, Haren, Niederlande, zur Untersuchung von Elizitor induzierten Ionenströmen in *Arabidopsis* Mesophyll Zellen; Erlernen der MIFE™ Technik

Vom 13.03.2006 bis zum 18.03.2006, zweiter Besuch im Labor von Prof. Dr. J.T.M. Elzenga's am Institut für Pflanzenphysiologie, Zentrum für ökologische und evolutionäre Studien, Universität Groningen, Haren, Niederlande, um die Messungen zur Untersuchung von Elizitor induzierten Ionenströmen an *Arabidopsis* Mesophyllzellen mit Kalzium-selektiven Elektroden zu vervollständigen

Vom 21.09.2008 bis zum 19.12.2008, Kooperations Projekt mit dem Titel "Functional characterisation of ion transporters in plant cells" zwischen dem Julius-von-Sachs Institute of Biosciences, Würzburg und dem Institute of Biophysics, Genova; Italy;

(Deutsche Forschungsgemeinschaft GZ: JE 546/3-1)

Kongresse

- 13th International Workshop on Plant Membrane Biology, Montpellier, France, 6-10 Juli 2004.

- Botanikertagung, Deutsche Botanische Gesellschaft, Braunschweig, Germany, September 2004

- 14th International Workshop on Plant Membrane Biology, Valencia, Spain, 26-30 Juli 2007.

Publikationen

Internationaler Journale

1) Carpaneto, A., Ivashikina, N., Levchenko, V., Krol, E., **Jeworutzki, E.**, Zhu, J. and Hedrich, R. (2007) Membrane-delimited response of *Arabidopsis* mesophyll cells to

cold is triggered via a calcium-permeable cation channel. *Plant Physiology* 143: 487-94.

2) **Jeworutzki, E.**, Roelfsema, M.R.G., Anschütz, U., Krol, E., Arents, M., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R. and Becker, D. (2009) Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca^{2+} -associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant Journal* under revision

In den "Abstracts" internationaler Kongresse

1) Jeworutzki, E., Geiger, D., Dietrich, P., Carpaneto, A., Roller, A., Bertl, A., Hedrich, R. and Becker, D.

Biophysical characterization of *AfTPK4*, a novel plant tandem-pore K^{+} -channel.

13th International Workshop on Plant Membrane Biology, Montpellier, France, 6-10 July 2004.

2) Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R.G., Anschütz, U., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R. and Becker, D.

Activation of the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR leads to Ca^{2+} -associated opening of plasma membrane anion channels.

14th International Workshop on Plant Membrane Biology, Valencia, Spain, 26-30 July 2007.

Elena Jeworutzki

Date and place of birth: 03 February 1979, Magdeburg, Germany
Address: Gross Quassow 24, 17237 USERIN, Germany
Tel.: + 49 3981-204756
mobile: + 49 179-7909313
Marital status: Not married, 1 Son (*24/01/2009)

Education

- 1998-2004 studies of biology at the University of Saarbrücken and the Julius Maximilians University of Würzburg
- May 2004 diploma of biology (with stress on molecular plant physiology and biophysics, pharmaceutical biology, plant ecophysiology, pharmacology and microbiology)
diploma work entitled: "studies on the voltage dependence and pH regulation of the plant potassium channels GORK and TPK4 of *Arabidopsis thaliana* (L.)"
- Since July 2004: PhD thesis entitled "Early electrical response in plant-microbe recognition events" under the supervision of Dr. Dirk Becker and Dr. MRG Roelfsema in the lab of Prof. Dr. Rainer Hedrich, at the Julius-von-Sachs Institute of Biosciences, Maximillians University of Würzburg

Languages

Advanced knowledge of written and spoken English, basic knowledge of French

International experience

- From 28/11/2005 to 16/12/2005, visit of Prof. Dr. J.T.M. Elzenga's laboratory at the institute of plant physiology, center for ecological and evolutionary studies, University of Groningen, Haren, the Netherlands, to investigate elicitor induced fluxes in *Arabidopsis* mesophyll cells with the technique of vibrating ion selective electrodes.
- From 13/03/2006 to 18/03/2006, second visit to Prof. Dr. J.T.M. Elzenga's laboratory at the institute of plant physiology, center for ecological and evolutionary studies, University of Groningen, Haren, the Netherlands, to complete measurements

on elicitor induced ion fluxes in *Arabidopsis* mesophyll cells with the technique of vibrating calcium electrodes

- From 21/09/2008 to 19/12/2008, cooperation project "Functional characterisation of ion transporters in plant cells" between the Julius-von-Sachs Institute of Biosciences, Würzburg and the Institute of Biophysics, Genova; Italy;
(Deutsche Forschungsgemeinschaft GZ: JE 546/3-1)

Congresses

- 13th International Workshop on Plant Membrane Biology, Montpellier, France, 6-10 July 2004.
- Botanikertagung, Deutsche Botanische Gesellschaft, Braunschweig, Germany, September 2004
- 14th International Workshop on Plant Membrane Biology, Valencia, Spain, 26-30 July 2007.

Publications

Publications in refereed international journals

1) Carpaneto, A., Ivashikina, N., Levchenko, V., Krol, E., **Jeworutzki, E.**, Zhu, J. and Hedrich, R. (2007) Membrane-delimited response of *Arabidopsis* mesophyll cells to cold is triggered via a calcium-permeable cation channel. *Plant Physiology* 143: 487-94.

2) **Jeworutzki, E.**, Roelfsema, M.R.G., Anschütz, U., Krol, E., Arents, M., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R. and Becker, D. (2009) Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant Journal* under revision

Abstracts published in the proceedings of international congresses

1) Jeworutzki, E., Geiger, D., Dietrich, P., Carpaneto, A., Roller, A., Bertl, A., Hedrich, R. and Becker, D.

Biophysical characterization of *AfTPK4*, a novel plant tandem-pore K⁺-channel.

Anhang

13th International Workshop on Plant Membrane Biology, Montpellier, France, 6-10 July 2004.

2) Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R.G., Anschütz, U., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R. and Becker, D.

Activation of the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR leads to Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels.

14th International Workshop on Plant Membrane Biology, Valencia, Spain, 26-30 July 2007.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Rainer Hedrich danken, in dessen Labor diese Arbeit durchgeführt wurde und der mit vielen anregenden Ideen und mit Rat und Elan die Experimente mitverfolgt und unterstützt hat.

An zweiter Stelle möchte ich meinem Betreuer PD Dr. Dirk Becker danken, der auch in schweren Zeiten an mich geglaubt hat und mit seiner optimistischen Art und natürlich seiner fürsorglichen Betreuung zum Gelingen dieser Arbeit einen grossen Teil beigetragen hat.

Desweiteren möchte ich PD Dr. Rob Roelfsema danken, der mich in die verschiedenen Einstichtechiken mit Mikroelektroden eingearbeitet hat und mir bereitwillig bei Problemen mit Rat und Wissen zur Seite stand.

Für die Bereitstellung der Messapparatur um die MIFETM Messungen durchzuführen und für das herzliche Willkommen in seinem Labor in Groningen, Niederlande, möchte ich Prof. Dr. Theo Elzenga danken. An dieser Stelle möchte ich auch Marten Staal und dem ganzen Groninger Labor für die Einarbeitung und Unterstützung bei den MIFETM Messungen danken. Prof. Dr. Thomas Boller und Prof. Dr. Jürg Felix und weiteren Mitarbeitern seien gedankt für die Bereitstellung von zahlreichen Arabidopsismutanten, Elizitoren und auch für hilfreiche Kommentare zu meinen Arbeiten.

Ganz Besonders möchte ich Dr. Dietmar Geiger danken, der die Hauptlast der Korrektur meiner Arbeit getragen hat!

Für Korrekturarbeiten und Hilfe bei Arbeiten mit kalzium-selektiven Elektroden möchte ich Prof. Dr. Irene Marten herzlich danken.

Nicht zu vergessen und ein besonderer Dank gilt den Sekretären, technischen Assistenten, Gärtnern, den Elektronikern und Mechanikern des Institutes für ihre einwandfreien Arbeiten. Jeden einzelnen aufzuzählen wäre zuviel...aber ein grosses Danke auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Gespräche...!

Zum Schluss möchte ich Dr. Armando Carpaneto, meiner ganzen Familie und im Besonderen meinen Eltern danken, die immer an mich geglaubt und mich stets unterstützt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 11.09.2009

.....

Elena Jeworutzki