

Induktion morphologischer Veränderungen der Plastidenhüllmembranen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Martin Hartmut Schattat

geboren am 04.01.1978 in Grimma

Eine Dissertation ist wie ein Abenteuer:

*Noch grün hinter den Ohren tritt man vor die Tür, um das Abenteuer zu beginnen.
Schnell merkt man, dass die übersichtlichsten Aufgaben sich zu umfangreichen Quests entwickeln!
Auf seinem Weg stößt man auf viele Abzweigungen, von denen sich einige als Sackgasse erweisen.
Nie kann man sicher sein, was hinter der nächsten Ecke auf den Wissenteurer wartet.
Es können fantastische Geheimnisse sein oder unüberwindliche Hindernisse.
Allzu oft muss man auf seinem Weg für kleine Erfolge harte Zwergenarbeit leisten und viele
kleine Kämpfe bestehen. Doch am Ende aller Strapazen und Entbehrungen, nach einem letzten Kampf
in der Drachenhöhle, mit Papier und Bleistift,
erwartet den Wissenteurer ein **Schatz** und die Erkenntnis,
dass es mit **Freunden** einfach besser geht!*

AvR

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Zielstellung	1
1. Einleitung	3
1.1. Was sind Stromuli und wie wurden sie entdeckt?	3
1.2. Was ist bis heute über Stromuli bekannt?	4
1.3. Mögliche Funktionen von Stromuli	7
1.4. Stromuli und deren Reaktion auf Umweltreize	9
2. Zielstellung	11
II. Ergebnisse	13
3. Modellsystem	14
3.1. Die obere Epidermis von <i>A. thaliana</i> als Modellsystem	14
3.2. Charakterisierung des Modellgewebes	16
3.3. Diskussion	27
4. Zucker	30
4.1. Experimentelle Prozedur	30
4.2. Saccharoseabhängige Induktion	34
4.3. Stromuliinduktion durch saccharoseähnliche Kohlehydrate	41
4.4. Stromuliinduktion durch Glukose und Fruktose	46
4.5. Weitere Glukose enthaltende Disaccharide	49
4.6. Trehalose, ein Glukose-Disaccharid mit besonderer Bedeutung	52
4.7. Wirkung ausgewählter Zucker auf Chloroplasten von <i>A. thaliana</i>	56
4.8. Wirkung von Saccharose auf Chloroplasten anderer Spezies	59
4.9. Wirkung von Turanose auf die Ultrastruktur von Chloroplasten in <i>A. thaliana</i>	60
4.10. Modell zur Induktion von Stromuli durch Zucker	62
5. Diurnaler Lichtrhythmus	65
5.1. Stromuli im Tagesverlauf (12h Tag / 12h Nacht)	65
5.2. Stromuli im Verlauf eines veränderten Lichtrhythmus	66
5.3. Zusätzliche und ergänzende Experimente	67
5.4. Diskussion Lichtrhythmus	70

6. Trockenstress	73
6.1. Durchführung	73
6.2. Ergebnisse	73
6.3. Diskussion	74
7. Pathogene	77
7.1. Pathogeninteraktion mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
7.2. Pathogeninteraktion mit <i>Nicotiana benthamiana</i>	93
7.3. VIGS Screen	105
8. Inhibieren der Translation und Myosinaktivität	112
8.1. Inhibieren der Translation	112
8.2. Inhibieren der Myosinaktivität	115
III. Allgemeine Diskussion	123
9. Gemeinsamkeiten der Stromuliinduktion	124
10. Funktion von Stromuli	127
11. Stromuli eine frühe Erfindung?	137
12. Modell zur Stromuliinduktion in Epidermiszellen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	140
13. Die Epidermis als Modellsystem zur Analyse von Stromuli	142
14. Ausblick	144
IV. Material und Methoden	147
15. Material	148
16. Methoden	153
V. Anhang	161
17. Berechnungen	162
18. Literaturverzeichnis	165
19. Abkürzungsverzeichnis	177

Zusammenfassung

Stromuli sind tubuläre Ausstülpungen der Plastidenhüllmembranen und können mehrere μm weit ins Zytoplasma ragen. Ihr Vorkommen scheint abhängig vom Gewebe und dem Entwicklungsstadium reguliert zu sein. Für ihre Stabilität und die zum Teil hohe Dynamik ist ein intaktes Aktinskelett und die Aktivität von Myosinen notwendig. Darüber hinaus ist bis heute nur wenig über ihre Regulation, ihren genetischen Hintergrund und ihre Funktion bekannt. So fehlen für die meisten in der Literatur diskutierten Funktionen bisher die experimentellen Evidenzen. Das zur Verfügung stehende Wissen über Stromuli wurde bisher hauptsächlich über beschreibende Methoden in verschiedenen Spezies und Geweben erlangt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die obere Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana* als Modellsystem für die Analyse von Stromuli etabliert. Mit Hilfe des Modellsystems war es möglich, verschiedene extrazelluläre Kohlehydrate, Belichtung, Befall mit filamentösen Pathogenen und den bakteriellen Elicitor flg22 als natürlich vorkommende Induktoren der Stromulibildung in *A. thaliana* zu identifizieren. Andauernde Dunkelheit, Verlust des Turgors und Seneszenz wurden als Repressoren der Stromulibildung erkannt. Zusätzlich erwies sich *Agrobacterium tumefaciens* als Induktor von Stromuli in *Nicotiana benthamiana*, was zur Entwicklung eines genetischen Screens für Stromulibildung relevante Gene führte. Durch die Anwendung verschiedener löslicher Inhibitoren konnte zudem gezeigt werden, dass zwischen dem auslösenden Signal und der Bildung von Stromuli die Translation an 80S-Ribosomen notwendig ist.

Mit Hilfe des Modellsystems und der etablierten Methode zur Datenaufnahme war es möglich, den Einfluss verschiedener Bedingungen, auf einer hohen Datengrundlage (530.100 Plastiden) aufbauend, zu analysieren. Eine Reihe der identifizierten stromuliinduzierenden Faktoren hat einen großen Einfluss auf den Kohlehydrathaushalt, was zu der Annahme führt, dass die Regulation der Stromulihäufigkeit eng mit diesem verbunden ist. Als zentrales Element der Regulation der Stromulihäufigkeit spielt vermutlich die Aktivität der Hexokinase eine bedeutende Rolle. Zur Umsetzung des zuckerabhängigen Signals ist Proteinsynthese notwendig und macht deshalb Transkriptionsanalysen zu einer vielversprechenden Methode, Stromuliinduktion zu analysieren.

Teil I.

Einleitung und Zielstellung

1. Einleitung

1.1. Was sind Stromuli und wie wurden sie entdeckt?

Seit dem das *green fluorescent protein* (GFP) Mitte der 1990er Jahre für die Expression in Pflanzen adaptiert wurde, haben Fluoreszenzproteine die Sicht auf die pflanzliche Zelle verändert (Mathur, 2007). Die Expression von neuen sowie weiterentwickelten Fluoreszenzproteinen (FP) und deren Fusionen macht es heute möglich den Vorgängen in der Zelle direkt zuzusehen. Eine dieser Applikationen ist die Markierung von Zellkompartimenten durch Fusionen aus einem kompartimentspezifischen Sortierungssignal und einem FP. Die ersten transgenen Pflanzen, die eine Fusion aus einem plastidären Transportsignal und GFP exprimierten, enthüllten die äußere Form der Plastiden (Köhler et al., 1997). Entgegen der angenommenen, regelmäßigen Linsenform konnten die Autoren mit Hilfe der GFP-Markierung des Stromas, tubuläre Fortsätze beobachten. Diese Fortsätze erstreckten sich oft weit in das Zytoplasma und zeichneten sich durch eine bemerkenswerte Dynamik aus. Erst als Artefakte der GFP-Überexpression verdächtigt, konnten Köhler et al. (1997) durch Studium früherer Literatur feststellen, dass diese Strukturen auch ohne die Anwendung von FP bereits durch andere Autoren beobachtet wurden (zusammengefasst in Köhler et al., 1997; Gray et al., 2001). Neben Fluoreszenzaufnahmen dieser tubulären Strukturen in der Alge *Acetabularia*, in denen die Plastidenhüllmembranen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren (Menzel, 1994), existierten bereits Videoaufnahmen von Plastiden in verschiedenen Samenpflanzen, welche die Dynamik dieser Strukturen sehr deutlich zeigten (Wildman et al., 1962). Leider erfuhren die Filmaufnahmen von Wildman et al. (1962) sowie die Beschreibung weiterer Autoren zu ihrer Zeit kaum Beachtung. Köhler et al. (1997) nannten die Membranausstülpungen in ihrer Publikation der Plastiden nach deren Eigenschaften *stromules* (*stroma filled tubules*). Obwohl durch lichtmikroskopische Kontrastverfahren (DIC und Phasenkontrast) sichtbar zu machen, ist die Beobachtung auf diese Weise nicht in allen Geweben möglich. Markierung des Stromas mit FP macht die Beobachtung in allen Geweben möglich (Abb. 1.1 rechts).

Stromuli sind ins Licht des Interesses gerückt. In den Jahren nach ihrer Wiederentdeckung durch Köhler et al. (1997) rückten Stromuli¹, ins Licht des Interesses. Sie stellen einen Aspekt in der Biologie der Plastiden dar, welcher bis zu diesem Zeitpunkt weitestgehend unbeachtet geblieben ist. Plastiden sind der Ort zahlreicher essentieller Reaktionswege und ein wichtiger Speicher für Kohlehydrate, Proteine und Lipide. Seit ihrer Aufnahme als Endosymbionten haben sich aus den vermutlichen Vorfahren der rezenten Cyanobakterien die Plastiden zu vielgestaltigen Organellen entwickelt. Ihrer Veränderlichkeit verdanken sie auch ihren Namen.

¹Dem Plural *Stromuli* wird in dieser Arbeit der Singular *Stromulus* gegenüber gesetzt.

1. Einleitung

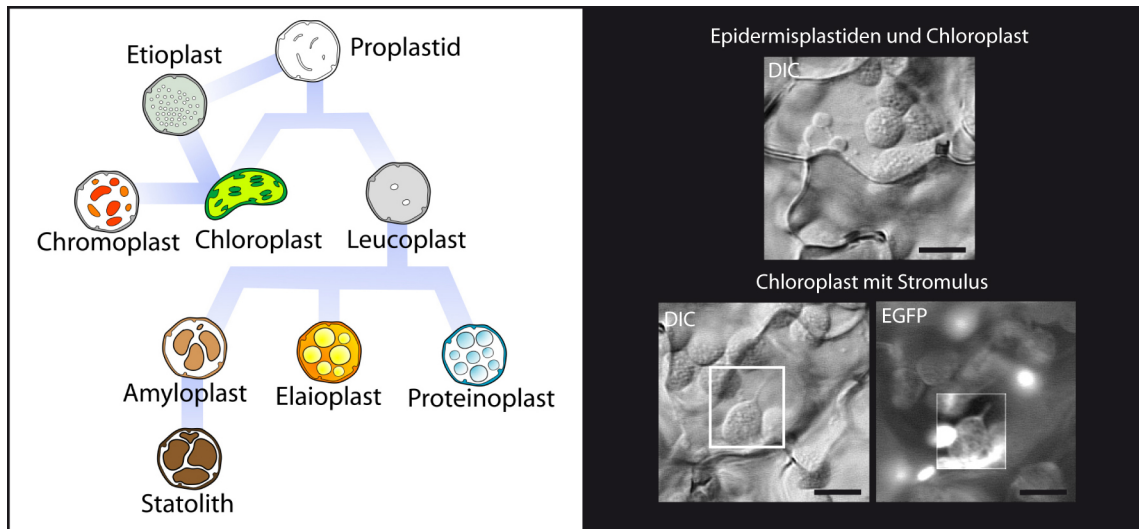


Abbildung 1.1.: Plastidentypen höherer Pflanzen und Stromulus im Mesophyll von *Arabidopsis thaliana* - links: schematische Darstellung der verschiedenen Plastidentypen (Schema entliehen aus Wikipedia, 2010); Proplastid: undifferenzierte Plastiden der Bildungsgewebe; Etioplast: entsteht aus Proplastiden, wenn sich Keimlinge unter Lichtausschluss entwickeln; Chloroplasten: sind der Ort der Photosynthese, das Chlorophyll in ihrem ausgeprägten Endomembransystem färbt sie grün; Chromoplasten: akkumulieren sekundäre Pflanzenstoffe wie Carotin, welche sie dann einfärben; Leucoplasten: farblos mit wenig ausgeprägtem Endomembransystem sind in den meisten nicht-gefärbten Geweben zu finden, aus ihnen lassen sich die Speicherplastiden ableiten; Amyloplasten: dienen der Stärkespeicherung; Elaioplasten: dienen der Lipidspeicherung; Proteinoplasten: dienen der Proteinspeicherung; Statolithen: besitzen große Stärkekörner und spielen im Gravitropismus der Wurzelspitze eine bedeutende Rolle - **rechts:** Chloroplasten des Palisadenparenchyms von *A. thaliana*, oben ohne und unten mit Stromulus (Kästchen). Das Epifluoreszenzbild rechts zeigt, dass der Stromulus dieser Pflanzenlinie mit EGFP-markiertem Stroma gefüllt ist. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

So leitet sich das Wort Plastide vom griechischen *plastos* ab, was *geformt* bedeutet. Diese Plastizität äußert sich darin, dass die einzelnen an ihrer Farbe unterschiedenen Plastidentypen sich bei Bedarf ineinander umwandeln können. Ihre Wandelbarkeit macht einen wesentlichen Bestandteil der Totipotenz von Pflanzenzellen aus. Ausgenommen davon sind nur Plastiden in seneszentem Gewebe (Abb. 1.1 links).

1.2. Was ist bis heute über Stromuli bekannt?

Struktur und Zusammensetzung Abb. 1.2 auf der nächsten Seite zeigt schematisch, wie man sich die Bildung von Stromuli vorstellt. Die beiden Hüllmembranen heben sich von der Plastidenoberfläche ab und ziehen einen mit Stroma gefüllten *Schlauch* aus der Plastidenhülle heraus. Wie dabei die beiden Hüllmembranen zusammengehalten werden und ob der Membranbereich, der den Stromulus bildet, sich in seiner Zusammensetzung von dem des Plastidenkörpers unterscheidet ist noch unklar (Hanson and Sattarzadeh, 2008).

Inhalt von Stromuli - Stromuli sind nach heutigem Wissen ausschließlich mit Stroma gefüllt und zeichnen sich somit durch das Fehlen von Thylakoiden aus (Abb. 1.2). Unter Fluoreszenzbedingungen äußert sich dies durch das Fehlen von Chlorophyllfluoreszenz in den Stromuli. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen sich ebenfalls keine Endomembranen im Stromulus nachweisen (Sage and Sage, 2009). Da bisher alle Stromaproteine im Plastidenkörper und in den Stromuli nachgewiesen wurden, fehlen bis heute die Hinweise auf ein eventuell stromulispezifisches Proteom (Kwok and Hanson, 2004a).

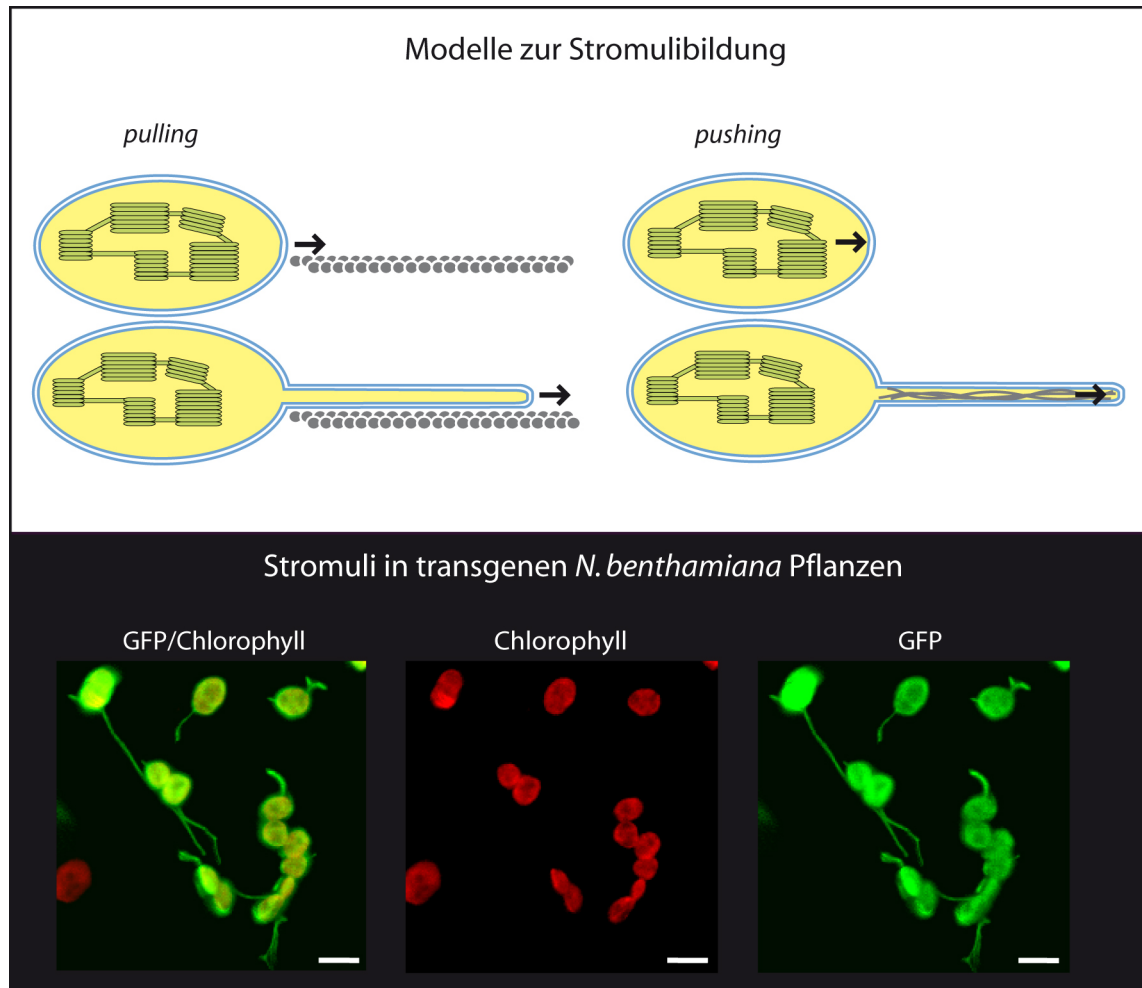


Abbildung 1.2.: Modelle zur Stromulibildung und Stromuli in *N. benthamiana* - oben: Schematische Darstellung der beiden Modelle zur Stromulibildung; gelb Stroma; grün Thylakoide; blau äußere und innere Hüllmembran; grau stützende Elemente - unten: Maximumprojektion eines CLSM z-Stapels, der Stromuli in der Epidermis von transgenen *N. benthamiana* zeigt. Die Pflanzen exprimieren stromadirigiertes EGFP. Die Chlorophyllfluoreszenz ist ausschließlich im Plastidenkörper zu finden, die Stromuli sind frei von Chlorophyll. Der Größenbalken entspricht 10 µm.

Strukturelle Grundlage - Wie die Aufnahmen von Gunning (2005) zeigen, sind Stromuli sehr dynamisch. Ihre Bildung und ihre Rückzug kann innerhalb weniger Sekunden erfolgen. Für das schnelle Ausformen und Stabilisieren solcher Membranröhren lässt sich ein Stütz- oder Zugsystem postulieren. Dafür sind grundsätzlich zwei Möglichkeiten denkbar (Abb. 1.2 oben) und werden in der Literatur diskutiert (Hanson and Sattarzadeh, 2008). Nach dem *pushing*-Modell werden Stromuli von innen nach außen gedrückt und durch ein internes Skelett gestützt. Als Bausteine für dieses Skelett diskutieren Hanson and Sattarzadeh (2008) die zum Tubulin ähnlichen *FtsZ*-Proteine der Plastiden, weisen aber gleichzeitig darauf hin, dass deren Rolle in der Stromulibildung noch nicht geklärt ist. Dem *pushing*-Modell wird das *pulling*-Modell gegenübergestellt, nach dem die Stromuli aus der Oberfläche des Plastiden herausgezogen und von außen stabilisiert werden. Der überwiegende Teil der bisher veröffentlichten Daten lässt das *pulling*-Modell als wahrscheinlich erscheinen. So haben Versuche mit Zytoskeletthinhibitoren gezeigt, dass die Stromuli von außen durch Aktin gestützt werden und dass Tubulin für die Stabilität keine Rolle spielt (Kwok and Hanson, 2003). Zudem können in Zellen, die

1. Einleitung

FP markiertes Aktin exprimieren häufig Stromuli beobachtet werden, die sich entlang von Aktinfilamenten bewegen (Kwok and Hanson, 2004b), was die Theorie eines äußeren Skelettes bekräftigt.

Motorische Kraft - Das *pulling*-Modell postuliert eine motorische Kraft, die von außen angreift und den Stromulus aus der Plastidenoberfläche zieht. Durch die Behandlungen mit BDM² (Hemmer der ATPase-Aktivität von Myosinen) konnten die Myosine als treibende Kraft der Stromulusbildung identifiziert werden (Natesan et al., 2005; Hanson and Sattarzadeh, 2008; Natesan et al., 2009). Da BDM als Inhibitor aller Myosinklassen gilt, blieb die Frage offen, welche der beiden in Pflanzen anzutreffenden Myosinklassen (XI und VIII) an der Stromulusbildung beteiligt ist. Natesan et al. (2009) konnten über transientes Silencing der Myosine der Klasse XI in *Nicotiana benthamiana* diese als treibende Kraft für die Stromulibildung identifizieren. Dass Mitglieder dieser Myosinfamilie (XI-2 und XI-F) mit Plastiden und Stromuli interagieren, zeigten Sattarzadeh et al. (2009) durch transiente Expression.

Stromulihäufigkeit Bereits Köhler et al. (1997) fiel auf, dass Stromuli nicht in allen Geweben gleich häufig auftreten, sondern gewebespezifisch und abhängig von der Entwicklung reguliert zu sein scheinen (Köhler and Hanson, 2000). Allgemein gelten heute Chloroplasten enthaltende Gewebe als arm an Stromuli und nicht-grüne Gewebe als eher reich an Stromuli (Hanson and Sattarzadeh, 2008). Dass eine Beziehung zwischen dem Art des Plastiden und der Stromulihäufigkeit besteht, wird bei der Umwandlung von Chloroplasten in eine andere Plastidenformen deutlich. So nimmt bei der Umwandlung von Chloroplasten in Leukoplasten während der Kultur von *Nicotiana tabacum* Kalli (Köhler and Hanson, 2000) die Stromulihäufigkeit deutlich zu. Waters et al. (2004) beschrieben bei der Umwandlung von Chloroplasten in Chromoplasten während der Reifung von Tomatenfrüchten ähnliche Vorgänge. Als möglichen Grund dafür, dass Mesophyllzellen so wenig Stromuli bilden, führen Holzinger et al. (2007a) die hohe Dichte der Chloroplasten an, die nur wenig Platz für das Auswachsen von Stromuli bietet. Auf diese Weise erklären sich die Autoren, dass Stromuli in Mesophyllzellen an Stellen mit nicht sehr dicht liegenden Chloroplasten gefunden werden. Dies zeigt, dass bis heute noch keine schlüssige Erklärung dafür vorliegt, worin sich die Gewebespezifität der Stromulihäufigkeit begründet und welche Gemeinsamkeiten die einzelnen Gewebe mit hoher Stromulizahl haben.

Morphologie In den letzten Jahren wurde das Bild der linsenförmigen Plastiden durch die mikroskopischen Studien an mit FP markierten Pflanzen relativiert. So ist heute klar, dass die Plastiden von den beiden Hüllmembranen fließend umgeben werden. Sie entsprechen eher einer mobilen Hülle, als einer starren Kapsel. Die in älterer Literatur bereits als sehr dynamisch beschriebene Plastidenhülle wurde dort auch treffend als *mobile jacket* bezeichnet (Gray et al., 2001). Auf Grund der Veränderlichkeit der Plastidenhülle sahen sich Holzinger et al. (2007a) veranlasst einen Stromuli-definierenden Formenindex einzuführen, der die eher langen, dünnen Stromuli von den breiteren, amorphen Protrusionen zu unterscheiden hilft.

²2,3-Butanedione monoxime

Wie divers die Form von Plastiden und Stromuli sein kann, offenbart sich durch das Studium verschiedener Gewebe und Mutanten. Besonders variabel in dieser Hinsicht zeigten sich die Wurzelgewebe, von denen Köhler and Hanson (2000) die meristematische, die Elongations- und die Differenzierungszone ebenso wie die ausdifferenzierte Wurzel genauer untersuchten. Tabakzellen, die in Flüssigkulturmedium kultiviert werden, entwickeln besonders lange Stromuli (Köhler and Hanson, 2000). Außerdem finden sich lange Stromuli auch in Tabaknektarien (Natesan et al., 2005).

Obwohl Stromuli in Tomatenfrüchten bis zu 100 nm dünn sein können (Pyke and Howells, 2002) sind typischere Stromuli 0,4 - 0,8 µm dick und reichen in ihrer Länge von wenigen µm bis zu 60 µm (Gray et al., 2001). Entgegen der ersten Annahmen haben die an der Teilung der Plastiden beteiligten Proteine keine essentielle Rolle in der Stromulibildung, können aber einen Einfluss auf deren Morphologie haben. Holzinger et al. (2008) beschreiben, dass Zellen der Stamenfilamente von *arc5*-Mutanten³ und verschiedene andere Gewebe der *arc6* Mutanten eine veränderte Stromulihäufigkeit aufweisen.

1.3. Mögliche Funktionen von Stromuli

Stromuli lassen sich in vielen verschiedenen Zellen finden. Dies wirft die Frage nach der Funktion von Stromuli auf. Abhängig vom untersuchten Gewebe werden in der Literatur verschiedene Funktionen diskutiert.

Transfer von Stroma Stromuli wurden in manchen Zellen als interplastidäre Verbindungen beobachtet (Köhler et al., 1997; Tirilapur et al., 1999). Durch Bleichexperimente (*fluorescence recovery after photobleaching* FRAP) konnte gezeigt werden, dass stromales GFP über einen Stromulus zwischen zwei Plastidenkörpern fließen kann. Zu diesem Verhalten sind auch größere Proteinkomplexe wie die Rubisco und die Aspartat-Aminotransferase fähig (Kwok and Hanson, 2004a)). Hanson and Sattarzadeh (2008) sagten voraus, dass selbst dünne Stromuli mit 100 nm im Durchmesser, weit genug sind um durchlässig für große stromale Einheiten, wie Ribosomen und RNA/Protein-Komplexe zu sein.

Erfolgt ein gerichteter Transport? Die Diffusionsfreiheit von GFP im Stromulus ist im Vergleich zu der im Zytosol sehr gering (Köhler et al., 2000). Die Mobilität des GFP im Stroma entspricht etwa der von in die Membran insertierten Proteinen, was durch die hohe Viskosität des Stromas erklärt wird. Köhler et al. (2000) zeigten mittels NaCN⁴- und FCCP⁵-Behandlung, dass es neben der Diffusion eine zweite aktive und ATP-abhängige Bewegungsform größerer GFP-Pakete geben muss. Auf welche Weise dies erfolgt und ob dies über längere Strecken gerichtet der Fall ist, konnten die Autoren mit ihren Versuchen nicht klären.

Transfer von DNA Mit der Wiederentdeckung der Stromuli kam die Vorstellung auf, dass Plastiden analog zu Bakterien mit Hilfe dieser Strukturen untereinander genetische Informa-

³*arc* entspricht *accumulation and replication of chloroplasts*; Diese Mutanten zeichnen sich durch eine vom Wildtyp abweichende Chloroplastenzahl im Mesophyllgewebe der Blätter aus.

⁴Natriumcyanid ist ein Inhibitor der Atmungskette

⁵Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone ist ein Protonophor

1. Einleitung

tionen austauschen könnten. Hanson and Sattarzadeh (2008) führen aus, dass es zur Zeit keine Hinweise für den Austausch von ganzen Plastomen zwischen Plastiden gibt. Auch wenn keine ganzen Plastome ausgetauscht werden, so könnten dennoch kleine DNA- oder RNA-Moleküle über Stromuli zwischen zwei Plastiden bewegt werden. Auf diese Weise erklären Hibberd et al. (1998), dass 2-4 Tage nach dem Beschuss des Gewebes mit einem GFP-Konstrukt, welches durch einen plastidären Promotor exprimiert wird, 20 % der transformierten Zellen GFP in allen Chloroplasten zeigen. Da es sehr unwahrscheinlich ist, dass alle Plastiden einer Zelle durch einen Partikel getroffen wurden, vermuten die Autoren, dass entweder das GFP oder der Vektor über Stromuli ausgetauscht wurde. Weitere Hinweise auf einen solchen Transfer kommen aus Mikroinjektionsversuchen, bei denen Plasmide ohne Replikationsursprung in einen Chloroplasten pro Zelle gespritzt werden. Nach 3 Tagen waren in den Zellen bis zu 12 Chloroplasten durch GFP markiert (Knoblauch et al., 1999). Der entgeltige Beweis, dass Stromuli für diesen Austausch verantwortlich sind, steht noch aus.

Vergroößerung der Plastidenoberfläche Eine andere Funktion, die den Stromuli zugesprochen wird, ist die Vergrößerung der Membranoberfläche des Plastiden (Hanson and Sattarzadeh, 2008). In einer Beispielrechnung würde ein 30 µm Stromulus mit 0,9 µm Durchmesser 9 % des Volumens und 34 % der Oberfläche eines typischen Tomatenplastiden repräsentieren (Waters et al., 2004). Hanson and Sattarzadeh (2008) geben zu bedenken, dass ein 3 µm Plastid für einen 10 µm Stromulus ca. 20 % an zusätzlicher Membran benötigt. Als Quelle für diese zusätzliche Membran sehen die Autoren die bereits als *mobile jacket* erwähnte, entspannte (*relaxed*) Membran, die um manche Plastiden herum zu erkennen ist. Gründe für eine möglichst große Kontaktfläche zwischen Plastid und Zytosol scheint es genügend zu geben, da der Import von mehr als 3000 im Zellkern codierter Proteine und der Austausch von kleinen Molekülen, Zwischenprodukten sowie Ionen bewältigt werden muss (Weber, 2004; Weber and Fischer, 2007). Nach Hanson and Sattarzadeh (2008) würde die Bildung von Stromuli auf die genannte Weise den Austausch fördern.

Verkürzung der Diffusionsdistanz Mit Hilfe von Stromuli scheint es verankerten Plastiden möglich einen Teil ihrer Hüllmembranen und des Stromas in die Nähe entfernter Organellen und anderer Kompartimente zu bringen. Auf diese Weise können Plastiden an Metabolite oder Signale gelangen, ohne sich mit ihrem gesamten Plastidenkörper zu bewegen. Diese mögliche Funktion wird in der Literatur in verschiedenen Zusammenhängen diskutiert.

Mitochondrien, Peroxisomen und Endoplasmatisches Retikulum (ER) - Besonders zu Mitochondrien und Peroxisomen scheinen Plastiden über Stromuli Kontakt aufzunehmen (Köhler et al., 1997; Kwok and Hanson, 2004d; Gunning, 2005). Hanson and Sattarzadeh (2008) spekulieren, dass die Mitochondrien durch den Kontakt das für sie von den Plastiden produzierte Digalactosyldiacylglycerol erhalten. Ebenso wäre ein Austausch von Zwischenprodukten der Photorespiration zwischen Peroxisomen und Plastiden durch engen Kontakt über Stromuli effektiver. Durch den Kontakt zum ER könnten Plastiden direkt Proteine, Fettsäuren und Lipide aufnehmen.

Arbuskeln - Die sich nach der Etablierung von Arbuskeln (Hyphen eines symbiotischen

Pilzes im Inneren der Pflanzenzelle) bildende, enge Assoziation von Plastiden und Stromuli um die pilzlichen Strukturen scheint ebenfalls dem Verkürzen der Diffusionsdistanz und somit einem effektiveren Stoffaustausch zwischen den Partnern der Symbiose zu dienen (Fester et al., 2001; Hans et al., 2004; Lohse et al., 2005, 2006).

Kommunikation zwischen Kompartimenten - Die von Kwok and Hanson (2004c) in Tabakzellkulturen beobachteten, langen Stromuli reichten vom Plastidenkörper am Zellkern ausgehend bis zur Plasmamembran. Sie sind ein Beispiel wie Stromuli zwei entfernte Kompartimente miteinander verbinden können. Die Autoren vermuten, dass diese Brücke zum Austausch von Informationen oder Metaboliten zwischen dem Zellkern und der Plasmamembran Verwendung findet. Experimentelle Daten, die diese Annahme unterstützen, liegen bisher nicht vor.

Abschnüren von Vesikeln - Wildman et al. (1962) beschreiben, wie sich Vesikel von der Stromulispitze abschnüren und sich danach frei im Zytosol bewegten. Die durch die Autoren beschriebenen Vesikel korrespondieren vermutlich mit den von anderen Autoren im Zytosol von transgene Pflanzen beobachteten GFP-haltigen Vesikeln (Arimura et al., 2001; Pyke and Howells, 2002; Waters et al., 2004). Ishida et al. (2008) zeigten, dass in seneszenten Blättern diese mit Stroma gefüllten Plastidenfragmente in die Vakuole eintreten, um dort degradiert zu werden. Die Autoren vermuten, dass so Aminosäuren aus den Stromaproteinen wieder freigesetzt werden und der Pflanze für neue Synthesen zur Verfügung steht. In diesem Zusammenhang dienen sie vermutlich dem Recycling von organisch gebundenem Stickstoff. Hanson and Sattarzadeh (2008) diskutieren diese Vesikel aber auch als Möglichkeit Stroma unabhängig vom Plastidenkörper in der Zelle zu bewegen.

retrograde signaling - Hanson and Sattarzadeh (2008) sehen in dem sehr häufig beschriebenen engen Kontakt von Plastiden und Stromuli zum Zellkern eine Möglichkeit die postulierte Plastid-zu-Zellkern Kommunikation (*retrograde signaling*; Nott et al., 2006) zu unterstützen oder erst zu ermöglichen. Jedoch fehlt auch hierfür noch die experimentelle Evidenz.

1.4. Stromuli und deren Reaktion auf Umweltreize

Stromuli als Sensoren Frühe Beschreibungen von tubulären Strukturen an Plastiden stammen aus den Beobachtungen von gestressten Pflanzen. Dies erklärt vielleicht auch, dass Stromuli und unregelmäßig geformte Plastiden nicht als typisch für Plastiden erkannt worden sind, sondern eher als Konsequenz der Stressantwort (Gray et al., 2001; Kwok and Hanson, 2004d). Die enge räumliche Nähe und die Assoziation zur Plasmamembran weckte in Kwok and Hanson (2004c) die Frage, ob Stromuli Sensoren oder Überträger von externen Signalen sind. In der Tat konnten Huang et al. (2006) Protein-Protein-Interaktionen zwischen einem Plasmamembranprotein (GPA1⁶) und einem Protein der Plastidenhüllmembran (THF1⁷) finden. GPA1 ist die einzige α -Untereinheit des heterotrimeren-G-Protein-Signalkomplexes in *A. thaliana* (Ma, 2001) und macht eine Signalfunktion dieser Interaktion sehr wahrscheinlich.

⁶ *G-Protein alpha subunit 1*

⁷ *thylakoid formation 1*

1. Einleitung

Obwohl THF1 auch in Stromuli gefunden wird fehlen weitere experimentelle Evidenzen und so bleibt noch offen, ob tatsächlich eine Weitergabe von Signalen auf diesem Wege erfolgt.

Temperaturbedingte Stromuliinduktion Der Zusammenhang zwischen der Reaktion von Pflanzen auf verschiedene Umweltbedingungen und der Bildung von Stromuli wird erst seit wenigen Jahren untersucht. Die bisher einzigen detaillierten Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Einfluss verschiedener Temperaturen auf Stromuli und Protrusionen von *A. thaliana* (Holzinger et al., 2007a). Unter erhöhten Temperaturen (40°C im Vergleich zu 25°C) beobachteten Holzinger et al. (2007b) eine Zu- und bei niedrigeren Temperaturen (10°C) eine Abnahme der Stromulihäufigkeit im Mesophyll.

Dass ein ökophysiologischer Zusammenhang zwischen den Stromuli und der Umgebungstemperatur existiert, zeigten die Autoren indem sie auf gleiche Weise *Ranunculus glacialis* und andere an Kälte angepasste alpine Pflanzen erhöhten Temperaturen aussetzten (Buchner et al., 2007). Auch diese Pflanzen reagierten auf den Temperatursprung mit vermehrter Stromulibildung. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Gielwanowska et al. (2005) nach ihren Untersuchungen an *Deschampsia antarctica* und spekulierten, dass die vergrößerte Kontaktfläche zu anderen Organellen einen Vorteil unter widrigen Bedingungen darstellt. Obwohl die Bedeutung der Stromulibildung unter extremen Temperaturen noch unklar ist (Hanson and Sattarzadeh, 2008), zeigen die Arbeiten, dass die Suche nach stromuliinduzierenden oder reprimierenden Bedingungen geeignet ist, um neue Hinweise auf die physiologische Bedeutung dieser Strukturen zu erlangen.

2. Zielstellung

Wie die Einleitung zeigt ist das Wissen über die Regulation, die strukturelle Grundlage und die Funktion der Stromuli noch sehr begrenzt und man beginnt gerade erst Versuchsansätze, die über eine reine Beschreibung hinaus gehen, zu entwickeln. Um Hinweise über diese Aspekte zu bekommen, ist eine systematische Suche nach Bedingungen unter denen Stromuli induziert oder reprimiert werden ein vielversprechender Ansatz. Durch die Identifizierung solcher Bedingungen können sich wertvolle Hinweise ergeben, in welchen zellulären Vorgängen Stromuli involviert sind. Aus den gewonnenen Erkenntnissen sollten sich gezielt Ansätze zur genaueren Charakterisierung dieser physiologischen Vorgänge und der molekularen Hintergründe ableiten lassen. Dadurch dass die bis heute durchgeführten Untersuchungen an einer Vielzahl verschiedener Pflanzen, Geweben und physiologischer Zustände erfolgt sind, ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander eingeschränkt. Die Wahl EINES Modellsystems zur Untersuchung der Stromuli würde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bedeutend vereinfachen. Aus diesen Überlegungen ergaben sich die folgenden Ziele:

1. Etablieren eines möglichst flexibel einsetzbaren Modellsystems für die Analyse von Stromuli
2. Charakterisierung des Modellsystems in Bezug auf Zell-, Plastiden- sowie Stromuliparameter, um das weitere Vorgehen zu planen und die Reaktion des Systems in späteren Experimenten einschätzen zu können
3. Eine Analyse der Kompetenz verschiedener Bedingungen Stromuli zu induzieren oder zu reprimieren

Da zu Beginn der Arbeit nicht abzusehen war, welche Art von Faktoren einen Einfluss auf Stromuli haben, wurden die getesteten Bedingungen so gewählt, dass sie möglichst verschiedene Umwelteinflüsse widerspiegeln. Deshalb wurde der Einfluss biotischer (Pathogene) sowie abiotischer Umweltfaktoren (Trockenheit und Lichtrhythmus) untersucht. Das gewährleistet, dass die erhaltenen Daten eine gewisse biologische Relevanz besitzen. Da Umweltreize und die Reaktionen der Pflanzen auf diese sehr komplex sein können, wurden zusätzlich spezifische Stimuli, wie Inhibitoren und Metabolite, eingesetzt.

Die Diversität der verwendeten Bedingungen macht es notwendig jeden Themenkomplex mit einer eigenen kurzen Einleitung einzuführen und die erhaltenen Ergebnisse mit einer eigenen Diskussion kurz abzuschließen. Die Ergebnisse aller einzelnen Teile, werden am Ende in einer *Allgemeinen Diskussion* übergreifend diskutiert.

Teil II.

Ergebnisse

3. Modellsystem

In diesem Kapitel wird dargelegt nach welchen Kriterien das, für die überwiegende Zahl der Experimente, eingesetzte Modellsystem ausgewählt wurde. Die Charakterisierung des gewählten Modellsystems, an Hand verschiedener Zell- und Plastidenparameter, bildete die Grundlage für die weiteren Analysen.

3.1. Die obere Epidermis von *A. thaliana* als Modellsystem

Um für die systematische Suche nach stromuliinduzierenden und -reprimierenden Bedingungen geeignet zu sein, sollte das Modellsystem einen hohen Anteil an Stromuli aufweisen, sich einfach mikroskopisch analysieren lassen und anschließende genetische Arbeiten ermöglichen. Die Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana*, welche hier als Modellsystem gewählt wurde erfüllt diese Bedingungen.

Bei genauerer Betrachtung muss man bei der rosettenbildende Pflanze *A. thaliana* zwischen mehreren “Epidermiskategorien” unterscheiden. Diese Kategorien leiten sich zum einen aus dem bifazialen Blattaufbau ab, bei dem zwischen einer oberen und unteren Epidermis unterschieden werden muss, und zum anderen von der Tatsache, dass sich die Laubblätter der Rosette während der vegetativen Phase in verschiedenen Entwicklungsstadien befinden. Diese Entwicklungsstadien lassen sich vom Apikalmeristem im Zentrum der Rosette ausgehend grob in junge (sich noch entfaltende), erwachsene (fertig entfaltete) und sich bereits in der Seneszenz befindende Blätter einteilen (Abb. 3.1 auf der nächsten Seite). Da Unterschiede bezüglich der Stromuli in den sich ergebenden 6 Epidermiskategorien nicht auszuschließen waren, musste vor dem Beginn der eigentlichen Arbeiten entschieden werden, welche Epidermiskategorie letztendlich weiter als Modellsystem genutzt werden sollte. Als Entscheidungsgrundlage sollten zum einen, die in den Epidermen angetroffene morphologische Vielfalt der Stromuli und zum anderen deren Anzahl pro Blattfläche (Stromulidichte = SP) dienen. Eine hohe Stromulidichte würde garantieren, dass sich mit wenigen mikroskopischen Aufnahmen, eine große Anzahl von Stromuli für eine aussagekräftige Charakterisierung dokumentieren lassen.

Zur Erfassung der Daten siehe Material und Methoden 16 auf Seite 154.

3.1.1. Ergebnisse

Stromuli lassen sich in morphologische Klassen einordnen. Der mit 94,9 % bei weitem größte Anteil der Stromuli war einfachen, filamentösen Charakters. In einzelnen Fällen war an den Plastiden nicht nur ein Stromulus, sondern zwei oder drei Stromuli zu beobachten.

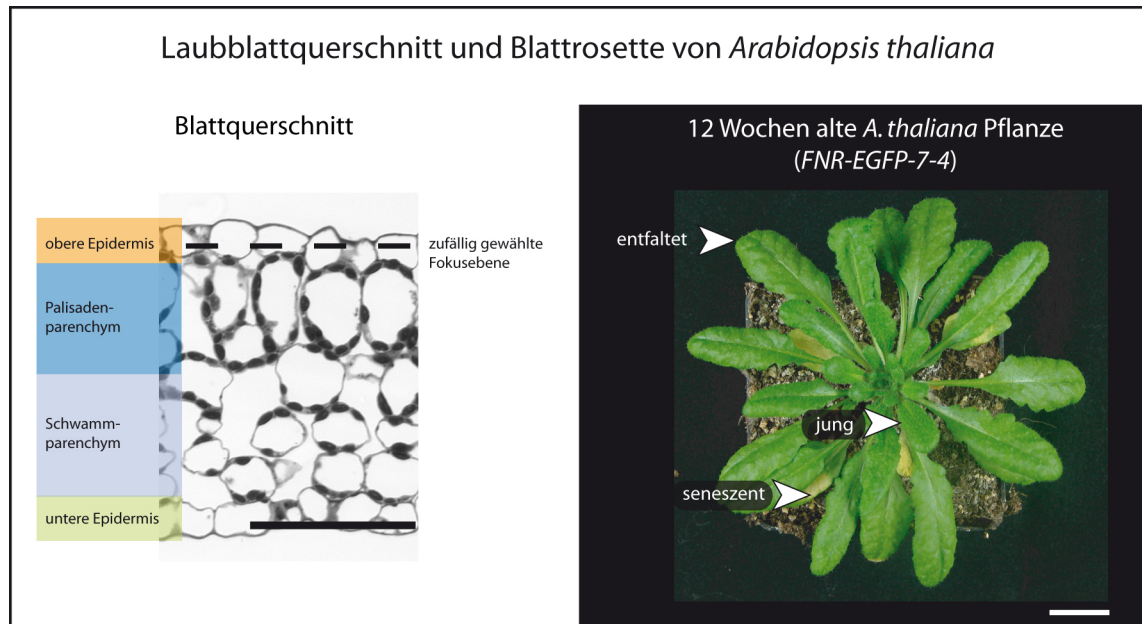


Abbildung 3.1.: Laubblattquerschnitt und Blattrosette von *A. thaliana* - links) zeigt das Graustufenbild eines mit Toluidinblau gefärbten Semidünnschnittes durch ein entfaltetes Rosettenblatt einer ca. 12 Wochen alten *A. thaliana* Pflanze (rechts). Die verwendete Färbung lässt besonders intensiv die Chloroplasten, hier dunkelgraue, fast schwarze Flächen, erkennen. Als unterbrochene Linie ist beispielhaft die Lage einer Fokusebene eingezeichnet, wie sie für die Aufnahmen der Voruntersuchung durch die Epidermis gelegt wurden. Der Größenbalken entspricht 50 μm . rechts) 12 Wochen alte *A. thaliana* Pflanze mit markierten Blättern unterschiedlicher Entwicklungsstadien (Pfeilköpfe), wie sie für die Voruntersuchungen eingesetzt wurden. Entwicklungsstadien: a) **jung** mit sich noch entfaltender Blattspreite und gestauchtem Blattstiel b) Blattspreite ist voll **entfalt**et und homogen grün, der Blattstiel ist voll gestreckt c) die Blattspreite ist voll entfaltet zeigt jedoch, als äußerlich sichtbares Zeichen von **Seneszenz**, bereits vergilbende Stellen. Der Größenbalken entspricht 2 cm.

Die filamentösen Stromuli werden im Folgenden als Klasse A bezeichnet (A1=ein Stromulus; A2 und A3 mit zwei bzw. drei Stromuli). 2,3 % der stromulitragenden Plastiden (49 Beobachtungen) schienen durch einen filamentösen Stromulus untereinander verbunden zu sein, solche interplastidären Verbindungen wurden unter Klasse B zusammengefasst. Ungefähr mit gleicher Häufigkeit (2,8 % entsprechen 58 Beobachtungen) wurden Plastiden beobachtet, deren Hüllmembranen Ausstülpungen formten, die in ihrem Erscheinen eher als amorph zu bezeichnen sind, darunter fallen zum Beispiel henkelförmige und am Ende stark aufgeblasene Formen. Diesen Plastiden wurde die Klasse C zugewiesen (Abb. 3.2 auf Seite 17).

Die Stromulidichte nimmt mit zunehmendem Blattalter ab. Da von jeder Epidermiskategorie eine gleich große Fläche (2,35 μm^2) mikroskopisch dokumentiert wurde, lassen sich die Stromulizählungen der einzelnen Kategorien miteinander vergleichen (Abb. 3.2). Die Häufigkeit mit der stromulitragende Plastiden in den Epidermen beobachtet werden konnten, wurde mit zunehmendem Blattalter (jung > entfaltet > seneszent) deutlich geringer. Dies trifft auf die oberen und auf die untere Epidermen gleichermaßen zu. Interessanterweise sind in den einzelnen Blattentwicklungsstadien immer in der oberen Epidermis mehr stromulitragende Plastiden dokumentiert worden als in der unteren.

Die Form der Stromuli ist unabhängig von der Epidermiskategorie Wenn die Dichte der Stromuli sich so stark in den einzelnen Blattentwicklungsstadien zu ändern scheint und sich

3. Modellsystem

obere und untere Epidermis unterscheiden, stellt sich die Frage, ob die Morphologie der Stromuli ebenfalls ähnlich große Unterschiede aufweist. Überraschenderweise bleiben in allen Kategorien, die filamentösen Stromuli (Klasse A) mit über 90 % deutlich die dominierende Form. Stromuli der Klasse B und C teilen sich die restlichen Prozente, wobei sich die Anteile zwischen den einzelnen Klassen in den selben Dimensionen bewegen. Allein in der unteren Epidermis der seneszenten Blätter konnten keine Stromuli der Klasse B und C gefunden werden. Die einzelnen Epidermiskategorien unterscheiden sich demnach nur sehr gering in Bezug auf die morphologische Vielfalt der in ihnen angetroffenen Stromuli (Abb. 3.2 B), die Stromulidichte bleibt der augenscheinliche Unterschied.

Da die Stromuliformen sich in den einzelnen Epidermiskategorien kaum unterschieden, wurde auf Grund der hohen Stromulidichte für die weiteren Arbeiten die obere Epidermis von jungen Rosettenblättern als Modellsystem gewählt.

3.2. Charakterisierung des Modellgewebes

Wie bereits angedeutet ist es wichtig das Testsystem in seinem "unbeeinflussten" Zustand zu definieren. Der folgende Teil beschäftigt sich durch die Erfassung verschiedener Zell- und Plastidenparameter mit dem gewählten Modellgewebe und soll hauptsächlich dazu dienen, diejenigen Parameter zu identifizieren mit deren Hilfe später die Reaktion der Zellen auf die verschiedenen applizierten Bedingungen beschrieben werden soll.

z-Stapel erfassen alle Plastiden und Stromuli. Die bisher verwendete Methode zur Dokumentation der Epidermis, bei der nur eine Fokusebene pro betrachtetem Epidermisabschnitt aufgenommen wurde (Abb. 3.1 auf der vorherigen Seite), hat sich zwar als geeignet für die Voruntersuchung herausgestellt, liefert aber nur einen sehr begrenzten Eindruck der Zellen, was für eine genaue Charakterisierung nicht mehr ausreichend ist. Aus diesem Grund wurde von jedem betrachteten Abschnitt eine Reihe von Aufnahmen, entlang der z-Achse durch die Epidermis, angefertigt. Die erhaltenen Bilderfolgen, mit in die Tiefe wandernder Fokusebene (z-Stapel), erfassen in dem entsprechenden Abschnitt jede Plastide des Gewebes mit eventuell assoziierten Stromuli. Auf diese Weise wurden in 8 verschiedenen Blättern des gleichen Entwicklungsstadiums insgesamt 80 unabhängige Blattbereiche mit z-Stapeln epifluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. An Hand der z-Stapel wurde (a) die sichtbare Fläche der Zellen als Maß ihrer Größe, (b) die Länge und Breite der Plastiden, (c) deren Häufigkeit pro Zelle sowie (d) die Länge der abgebildeten Stromuli bestimmt. Die Daten wurden so erfasst, dass im Gegensatz zu den Voruntersuchungen, die einzelne Zelle mit ihren Plastiden und Stromuli als Einheit gesehen werden kann (Tabelle 16.2 auf Seite 155 beschreibt mit wenigen Kennwerten den Umfang der erhaltenen Daten). Mit Hilfe der bestimmten Parameter wird im Folgenden die Epidermis mit Blick auf die Zellen, Plastiden und Stromuli hauptsächlich durch Korrelationen zwischen zwei Parametern betrachtet. Um zu verdeutlichen, wie sich die Parameter im Gewebe äußern, wurde ein z-Stapel zu Illustration den Diagrammen zur Seite gestellt.

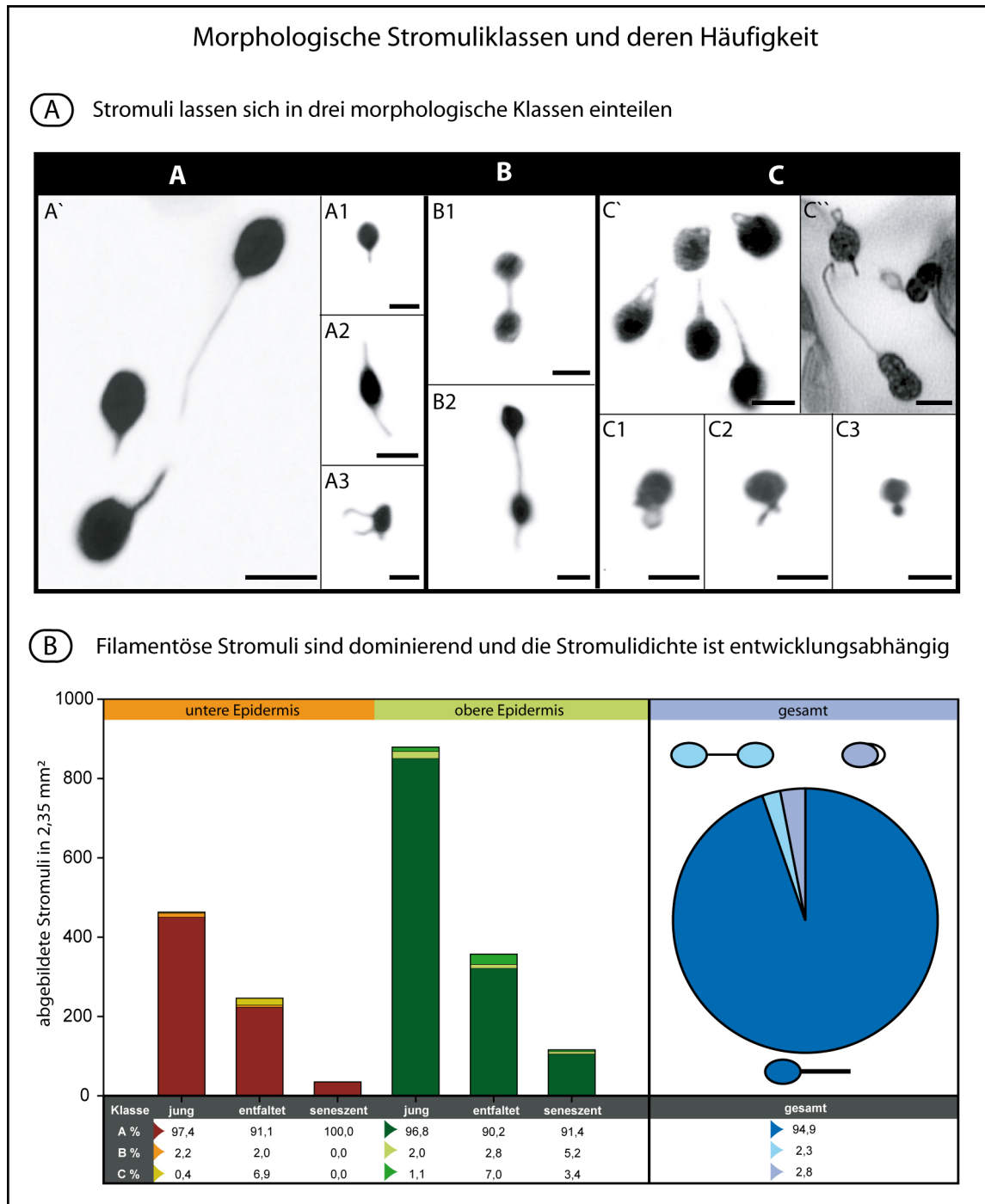


Abbildung 3.2.: Morphologische Stromuliklassen und deren absolute Häufigkeiten - **A)** Beispielaufnahmen (invertierte Graustufenfluoreszenz) der gebildeten Stromuliklassen A, B und C - **Klasse A (filamentös)** Plastid mit einem Stromulus (A1), zwei (A2) bzw. drei (A3) Stromuli; A' mehrere Typ A1 Plastiden, wie sie im Verband in der Zelle gefunden wurden - **Klasse B (plastidenverbindend)** in B1 und B2 scheinen zwei Plastiden über einen Stromulus verbunden zu sein - **Klasse C (amorph)** C1 der Stromulus entspringt der Plastidenoberfläche und verbindet sich mit dieser wieder; C2 zwei Stromuli entstehen an der selben Stelle; C3 seitlich am Plastiden gebildeter Knubbel; C' und C'' Plastiden im Verband in der Zelle; **B) Links:** Anzahl an Stromuli, die je Epidermiskategorie auf einer Fläche von 2,35 mm² beobachtet wurden. In den einzelnen Balken des Diagramms sind die drei Stromuliklassen farblich voneinander abgehoben. Zusätzlich ist zum besseren Verständnis die prozentuale Verteilung der Klassen unterhalb des Diagramms aufgeschlüsselt (Details siehe Text). **Rechts:** Relativer Anteil der Stromuliklassen bezogen auf alle beobachteten Stromuli (Details siehe Text). Größenbalken entsprechen 4 µm

3.2.1. Zellen in der Epidermis

Die Epidermis setzt sich aus überwiegend kleinen Zellen zusammen. Abbildung 3.3 auf der nächsten Seite zeigt, dass die obere Epidermis aus sehr unterschiedlich großen Zellen zusammengesetzt ist. Die obere Epidermis wird auf die Anzahl bezogen deutlich von *sehr kleinen* Zellen (bis $497 \mu\text{m}^2$) dominiert. Die Häufigkeit von immer größeren Zellen nimmt exponentiell¹ ab. Dass dies nicht zwangsweise bedeutet, dass *sehr kleine* Zellen auch die Fläche dominieren zeigt A in der gleichen Abbildung. Auf die gesamte eingenommene Fläche bezogen sind die *sehr kleinen* Zellen von deutlich geringerer Bedeutung, da *kleine* ($994\mu\text{m}^2$ und $1491\mu\text{m}^2$) und *mittlere* ($1988\mu\text{m}^2$ bis $2982\mu\text{m}^2$) Zellen den bedeutend größeren Anteil ausmachen (für die Aufstellung der Größenklassen, siehe Material und Methoden).

3.2.2. Plastiden in der Epidermis

Wie soeben gezeigt setzt sich die obere Epidermis aus Zellen unterschiedlichster Größe zusammen. Es stellt sich die Frage, wie sich Plastiden als stromulibildende Organellen innerhalb dieser großen Variabilität verhalten.

Die Anzahl der Plastiden ist abhängig von der Zellgröße, die Plastidengröße jedoch nicht.

Plastidenzahl - Aus Untersuchungen an Mesophyllzellen von Monokotyledonen (Ellis and Leech, 1985; Pyke and Leech, 1987) und Dikotyledonen (Pyke and Leech, 1992; Leech and Pyke, 1988) ist bekannt, dass es eine strenge Korrelation zwischen der Zellgröße und der Chloroplastenzahl gibt. Die hier beobachtete Beziehung zwischen der Plastidenzahl pro Zelle und den einzelnen Zellgrößenklassen zeigt, dass auch in der Epidermis mit zunehmender Zellgröße die Plastidenzahl linear² ansteigt (Abb. 3.4 auf Seite 20).

Plastidengröße - Im Rahmen der Zell- und Organelldifferenzierung kommt es zu einer einheitlichen Volumenzunahme der Plastiden im Parenchym (Ellis and Leech, 1985). Die gemittelte Plastidengröße in den einzelnen Zellgrößenklassen der hier untersuchten Epidermis zeigt, dass die Plastiden innerhalb der ersten drei Größenklassen ($497 \mu\text{m}^2$ bis $1491 \mu\text{m}^2$) deutlich mit der Fläche der Zelle an Größe zunehmen (Abb. 3.5 auf Seite 21; ungepaarter-t-Test zwischen den ersten drei Größenklassen $p < 0,001$). Die gezeigten, einzelnen Datenpunkte lassen vermuten, dass bei Verwendung kleinerer Größenkategorien dieser Trend noch deutlicher zu erkennen wäre. In immer größeren Zellen können ab $1491 \mu\text{m}^2$ keine signifikanten Größenänderungen der Plastiden beobachtet werden. Die in einer Zelle vorhandenen teilen sich stattdessen (Pyke and Leech, 1992, 1994). Die höheren Varianzen der Werte in den größeren Zellkategorien (ab $3976 \mu\text{m}^2$) sind durch die geringer werdende Datengrundlage bedingt.

3.2.3. Stromuli in der Epidermis

Da eine Veränderung des Anteils stromulitragender Plastiden im Rahmen späterer Experimente ein vielversprechendes Maß für die Reaktion des Gewebes auf verschiedene Bedingungen

¹ ($y = ae^{-bx}$ mit $R^2=0,98085887$)

²(R^2 von 0,9602)

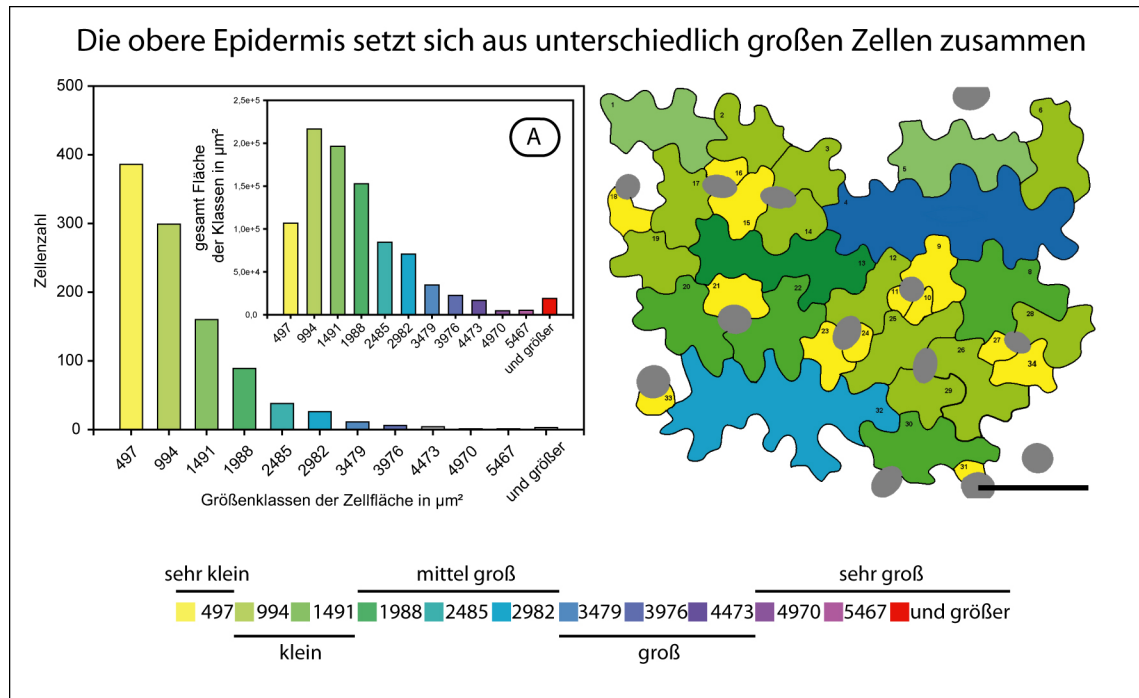


Abbildung 3.3.: Zellgrößenverteilung - Lins Häufigkeitsverteilung der Zellgrößen; Die einzelnen Größenklassen umfassen $497\mu\text{m}^2$ (angegebene Zahl entspricht dem Höchstwert in der Kategorie); Kategorie “und größer” fasst alle Zellen zwischen $5467\mu\text{m}^2$ und dem Maximum zusammen. **A’** zeigt die von allen Zellen der entsprechenden Kategorie eingenommene Fläche. **Rechts**) Zellsilhouetten eines der z-Stapel; Entsprechend ihrer Zellgröße wurden die Silhouetten eingefärbt (Stomata in grau); Der Größenbalken entspricht $50\mu\text{m}$. Unter dem Diagramm ist die Farbcodierung für die Zellgrößenklassen gezeigt.

darstellt, war in erster Linie von Interesse, wie häufig Stromuli in der Epidermis anzutreffen sind.

Die Stromulihäufigkeit beschreibt den Anteil stromulitragender Plastiden. Durch die Aufnahme von z-Stapeln lässt sich der Anteil aller stromulitragenden Plastiden im beobachteten Epidermisbereich genau in Zahlen fassen und als relativer Wert ausdrücken. Dieser relative Wert wird im Folgenden als Stromulihäufigkeit (S_H 3.1) bezeichnet und ergibt mit 100 multipliziert den entsprechenden prozentualen Wert ($S_H\%$ 3.2). Da die filamentösen Stromuli (Klasse A1, A2 ...) bei weitem überwiegen, wurde in diesem Teil ausschließlich die morphologische Klasse A für die Analysen herangezogen. Die sich aus den 1023 Zellen ergebende $S_H\%$ lag bei 12,45 %, was bedeutet, dass ungefähr jeder achte Plastid im Gewebe mindestens einen Stromulus besaß. Es zeigte sich, dass lediglich in 32 % aller Zellen stromulitragende Plastiden vorgefunden wurden. Der zahlenmäßig größte Teil der Epidermiszellen war erstaunlicherweise frei von Stromuli (326 Zellen mit Stromuli, 697 Zellen ohne Stromuli).

$$S_H = \left(\frac{\sum n_{+str}}{\sum n_{+str} + \sum n_{-str}} \right) \quad (3.1)$$

$$S_H\% = S_H * 100 \quad (3.2)$$

n_{+str} =Plastiden mit Stromuli, n_{-str} =Plastiden ohne Stromuli

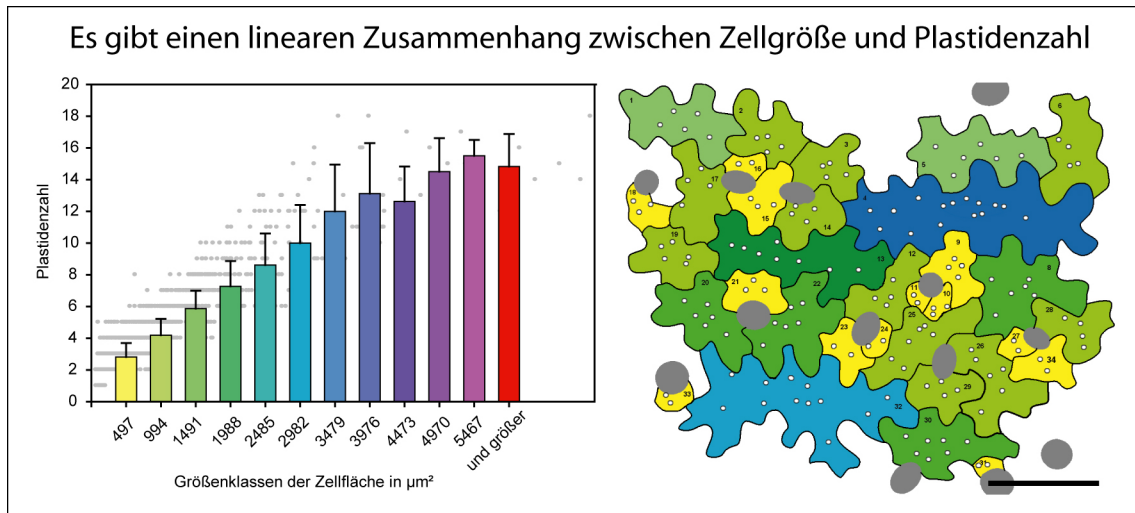


Abbildung 3.4.: Mittlere Plastidenzahl pro Zelle - Links) mittlere Plastidenzahl innerhalb der festgelegten Zellgrößenklassen mit Standardabweichung; Um die Verteilung und Anzahl der einzelnen Datenpunkte (Zellen) zu verdeutlichen, sind hinter den Balken mit grauen Punkten die Einzelwerte dargestellt. Es wird deutlich, dass die Datengrundlage der einzelnen Klassen nicht gleich ist und die Anzahl der Datenpunkte in den größeren Kategorien, aus Konsequenz immer weniger großer Zellen (siehe Abbildung 3.3 auf der vorherigen Seite), sinkt. **Rechts)** eingefärbte Zellsilhouetten mit markierter Positionen der Plastiden (weiße Punkte). Der Größenbalken entspricht 50 μm .

Zellen mit vielen Stromuli sind in der Epidermis selten. Aus der Differenz zwischen der Anzahl von Zellen mit Stromuli (326) und der Gesamtanzahl von Stromuli (602) wird deutlich, dass es Zellen gibt, die mehr als nur eine stromulitragende Plastide besitzen. Tatsächlich machen Zellen mit mehr als einem Stromulus ca. 50 % aller Stromuli enthaltenden Zellen aus (162 Zellen mit einem Str.; 164 Zellen mit mehr als einem Str.). Die Häufigkeitsverteilung zeigt, dass Zellen mit wenigen Stromuli sehr häufig sind und Zellen mit einer höheren Stromulizahl exponentiell³ seltener werden.

Bestimmt man den Anteil stromulitragender Plastiden in den 326 Stromuli enthaltenden Zellen zeigt sich, dass in 86 % der Zellen maximal die Hälfte der Plastiden Stromuli trägt. Von den restlichen 14 % haben lediglich in 5 Zellen (2 %) alle Plastiden einen Stromulus. Der Anteil von Plastiden mit Stromuli in den meisten Zellen ist demnach eher moderat.

Je größer eine Zelle ist um so wahrscheinlicher hat sie mindestens einen stromulitragenden Plastiden Bei späteren Arbeiten, bei denen nur Einzelzellen analysiert werden können (Bsp.: biolistische Transformation von T-DNA-Mutanten), ist es wichtig abzuschätzen mit welcher Wahrscheinlichkeit in einer bestimmten Zelle Stromuli zu erwarten sind. Es stellt sich die Frage, ob es durch die gemessenen Parameter definierte Zellpopulationen gibt, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit mindestens einen Stromulus beinhalten. Abbildung 3.7 auf Seite 23 (A und B) zeigt, dass der Anteil stromulienthaltender Zellen mit der Zellgröße (definiert durch Plastidenzahl oder Zellgröße)⁴ deutlich zunimmt. In sehr kleinen Zellen mit wenigen Plastiden liegt der Anteil von Zellen mit Stromuli deutlich unter 50 %, in immer größeren Zellen mit mehr Plastiden steigt deren Anteil auf über 80 %.

³($y = ae^{-bx}$ mit $R^2=0,9612$)

⁴Wie die lineare Beziehung zwischen Zellgröße und Plastidenzahl zeigt, ist sowohl die Zellfläche, als auch die Plastidenzahl geeignet, um die Zellgröße zu definieren (siehe Abb. 3.4).

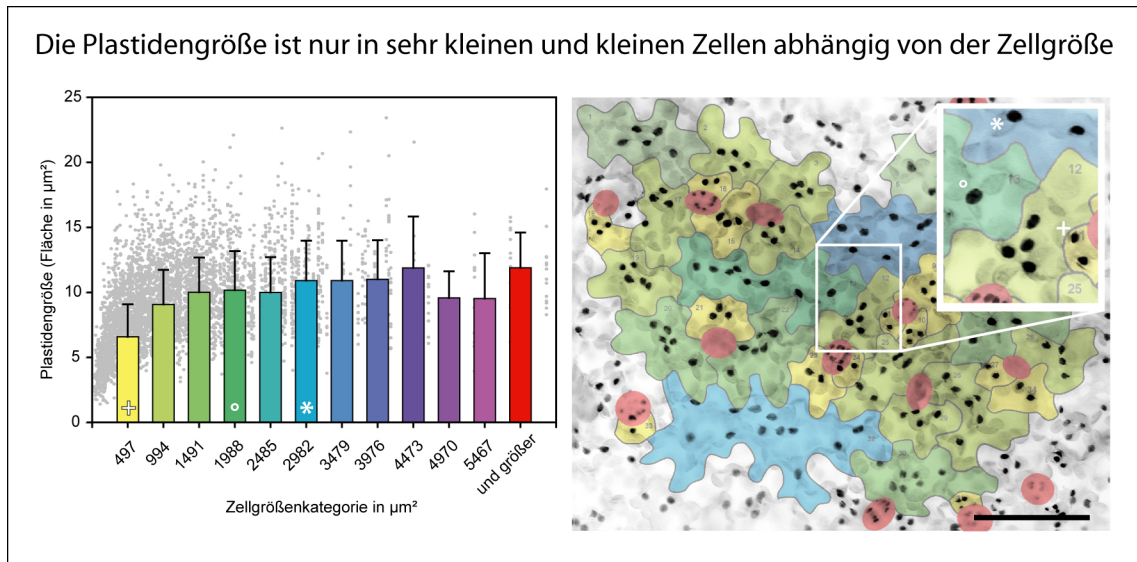


Abbildung 3.5.: Mittlere Plastidengröße - Links) mittlere Plastidengröße mit Standardabweichung innerhalb der festgelegten Zellgrößenklassen; grau, einzelne Datenpunkte; “+”, “o” und “*” markieren Größenklassen von denen ein Ausschnitt mit Plastiden (rechts) gezeigt ist. Rechts) Overlay, aus einem negativierten Graustufenfluoreszenzbild (siehe Material und Methoden) mit erweiterter Tiefenschärfe und den eingefärbten Zellkonturen der Epidermiszellen; Die ausgewählten Plastiden zeigen, dass die Plastiden sich in ihrer Größe nur in den ersten drei Größenklassen sich deutlich unterscheiden. Größenbalken entspricht 50 μm .

Die Stromulihäufigkeit ist weitgehend unabhängig von der Plastidenzahl der Zellgröße

Es drängt sich daraus folgend die Frage auf, ob es für eine Plastide in größeren Zellen wirklich eine höhere Wahrscheinlichkeit gibt einen Stromulus zu besitzen. Eine Möglichkeit dies zu hinterfragen ist es, die Stromulihäufigkeit innerhalb der einzelnen Kategorien zu bestimmen. Für diesen Zweck wurden die Plastiden aller Zellen in den einzelnen Klassen addiert und mit den entsprechenden stromulitragenden Plastiden verrechnet. Es zeigt sich, dass die Mehrheit der Zellgrößenklassen eine Stromulihäufigkeit von 10-15 % aufweisen. Weder in Bezug auf die Zellgröße noch in Bezug auf die Plastidenzahl ist ein deutlicher Trend zu einer höheren Stromulihäufigkeit zu erkennen (Abb. 3.7 auf Seite 23). Aus den Werten heben sich in beiden Fällen lediglich zwei Größenklassen mit einer Stromulihäufigkeit über 20 % von den restlichen Werten geringfügig ab (2982 μm^2 , “3479 μm^2 ”, “13 und 14” und “15 und größer”). Die Wahrscheinlichkeit für einen Plastiden einen Stromulus zu tragen ist unabhängig von der Zellgröße. Große Zellen haben häufiger Stromuli, weil sie über mehr Plastiden verfügen.

Die überwiegende Zahl von Stromuli ist kürzer als der Plastidenkörper

Eine der möglichen Funktionen, die für Stromuli diskutiert werden, ist dass über deren Ausbildung eine Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Plastid und Zelle erreicht wird (siehe Einleitung). Bestimmend für die Oberfläche eines Stromulus ist neben dem Durchmesser von 0,1 μm bis 0,8 μm vor allem dessen Länge (Hanson and Sattarzadeh, 2008). Die sich aus den gemessenen Stromulilängen ergebende Häufigkeitsverteilung (Abb. 3.8 A) zeigt, dass es keine Standardstromulilänge in der Epidermis gibt. Da immer länger werdende Stromuli exponentiell seltener werden, erscheint die Anwendung des Medians zur Beschreibung der Verteilungsmitte angebrachter als das arithmetische Mittel (vergleiche die Werte in Abbildung 3.8). Der bestimmte Median von 1,6 μm zeigt, dass obwohl Stromuli mit mehr als 10 μm Länge gefunden wurden

3. Modellsystem

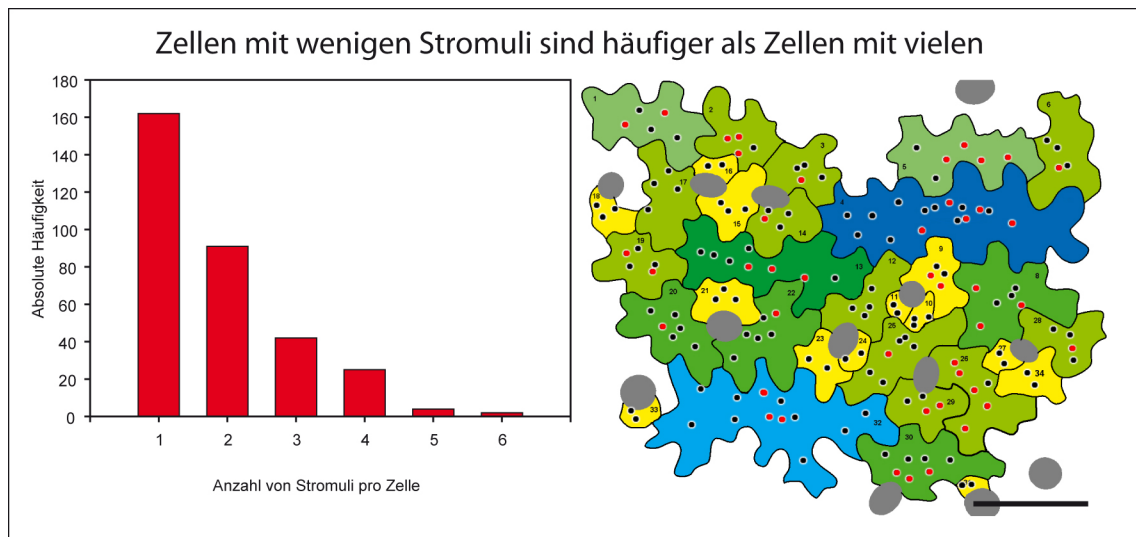


Abbildung 3.6.: Häufigkeitsverteilung bestimmter Stromulizahl pro Zelle - Links) Häufigkeitsverteilung von Zellen mit steigender Stromulizahl; die Anzahl von Zellen mit zunehmender Stromuli-Zahl wird exponentiell geringer; **Rechts)** Lage der stromulitragenden Plastiden (rote Punkte) und Plastiden ohne Stromulus (schwarze Punkte); Zellen mit steigender Stromulizahl sind auch hier immer seltener anzutreffen ($n_1=7$; $n_2=4$; $n_3=5$; $n_4=1$; $n_5=2$). Der Größenbalken entspricht $50 \mu\text{m}$.

die Epidermis von sehr kurzen Stromuli dominiert wird. Der Vergleich mit der mittleren Plastidenlänge von $3,8 \mu\text{m}$ (Stabw $\pm 0,8$; Verteilung nicht gezeigt) macht deutlich, dass die Länge der Stromuli meist die des Plastidenkörpers nicht übersteigt (Abb. 3.8 auf Seite 24). Die Epidermis wird dominiert von Stromuli, die kleiner als die mittlere Plastidenlänge ($3,8 \mu\text{m}$) sind (88 %).

Große Zellen besitzen nicht überdurchschnittlich viele lange Stromuli. Waters et al. (2004) diskutieren Stromuli als Möglichkeit für Plastiden ihren Abstand zueinander und ihre Dichte in Zellen zu registrieren. Dies könnte Ursache dafür sein, dass besonders größere Zellen zur Ausbildung längerer Stromuli tendieren. Um dies zu überprüfen, wurden die gemessenen Stromulilängen den einzelnen Zellgrößen- und Plastidenzahlkategorien zugeordnet und die jeweilige mittlere Stromulilänge bestimmt (Abb. 3.8 auf Seite 24 B und C). Die errechneten Mediane zeigen, dass keine der einzelnen Größenklassen, egal ob in Bezug auf die Plastidenzahl oder die Zellgröße, durch besonders lange oder kleine Stromuli dominiert wird. Tatsächlich sind sehr lange Stromuli (über $10 \mu\text{m}$) auch in kleinen und mittleren Größenklassen anzutreffen ($1491 \mu\text{m}^2$ und $1988 \mu\text{m}^2$ sowie 3 und 4 und 5 und 6). Dennoch scheinen, wie die einzelnen Datenpunkte in Abbildung 3.8 zeigen, die Dimensionen *sehr kleiner* und *kleiner* Zellen ($497 \mu\text{m}^2$ und 1 und 2) der Stromulus-Länge eine natürliche Grenze zu setzen (in diesen Zellen keine Stromuli über $5 \mu\text{m}$). Die Stromulilänge, die in einer Zelle gefunden wird, ist weitestgehend unabhängig von deren Größe. Demnach ist mehr Raum in größeren Zellen kein Grund für eine Zelle ausschließlich längere Stromuli zu bilden.

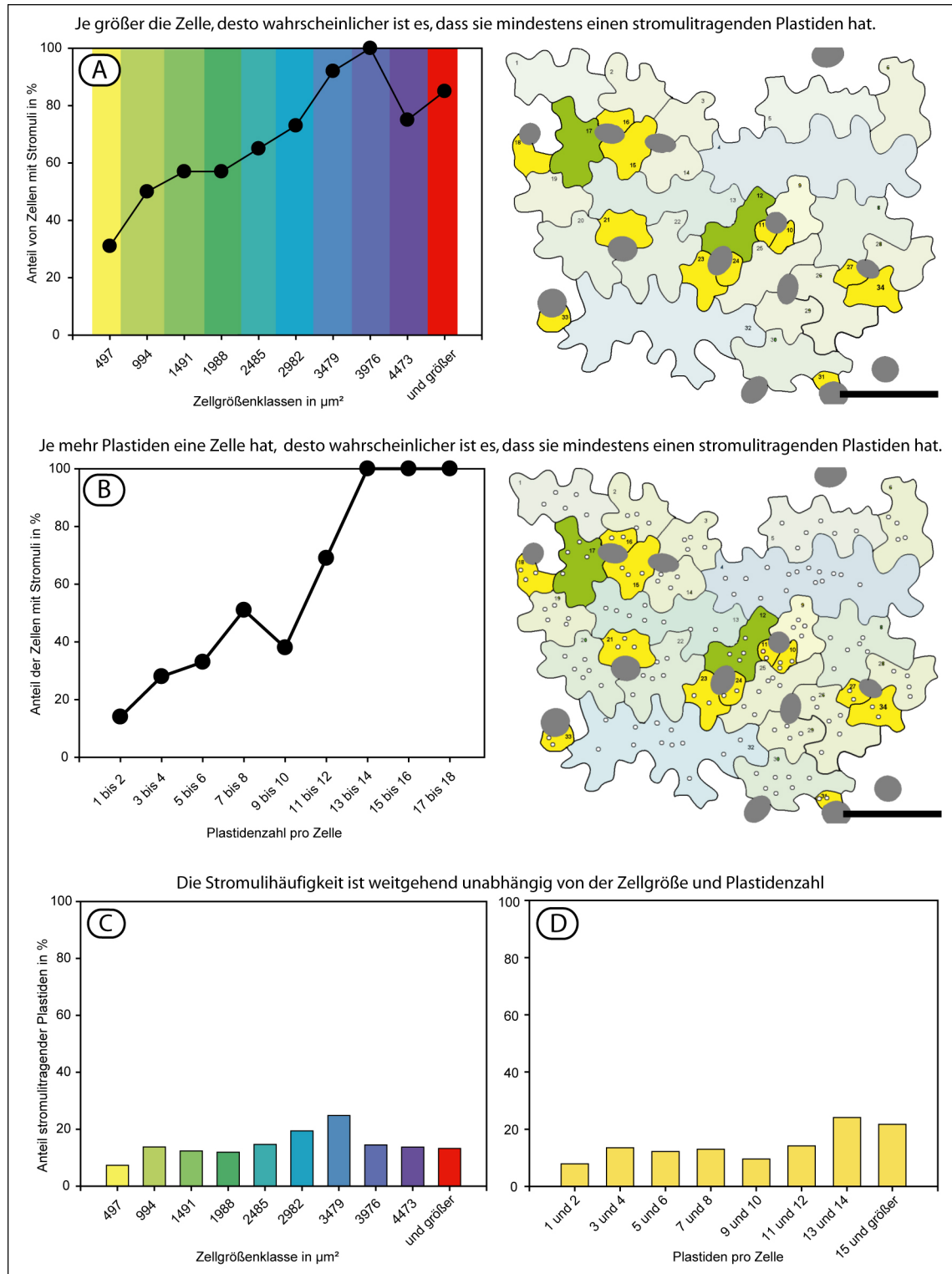


Abbildung 3.7.: Anteil stromulitragender Zellen abhängig von Plastidenzahl und Zellengröße - A und B) Zeigen den Anteil von Zellen mit Stromuli innerhalb der festgelegten Zellgrößenklassen (A Zelloberfläche; B Plastidenzahl) in %. Der Anteil von Zellen mit Stromuli steigt mit zunehmender Größenklasse stetig. **Die hervorgehobene Silhouetten** markieren Zellen ohne Stromuli. Dadurch wird deutlich, dass nur Zellen aus den kleineren Größenklassen in diesem z-Stapel ohne Stromuli sind. Dies entspricht den Trends der Diagramme. In B sind zusätzlich die Plastidenhäufigkeit in Zellen verschiedener Größe und Plastidenzahl. Eine Stromulihäufigkeit von 100% würde bedeuten, dass jeder Plastid in der entsprechenden Klasse einen Stromulus trägt.

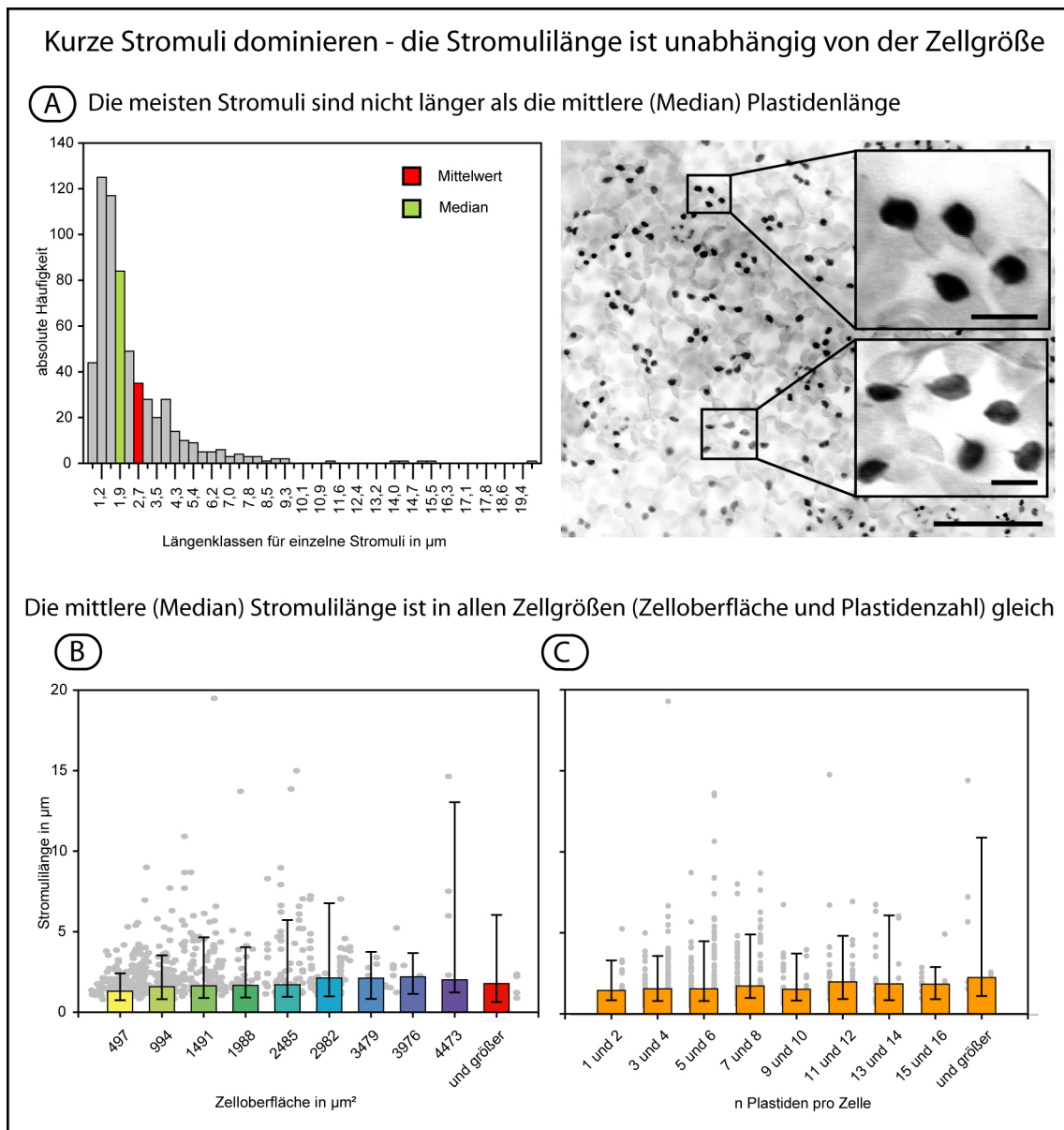


Abbildung 3.8.: Stromulilängen in verschiedenen Größenklassen - A) Zeigt die Häufigkeitsverteilung aller beobachteter Stromulilängen. Der Mittelwert (MW = 2,2 µm) und besonders der Median (MD = 1,6 µm) weisen darauf hin, dass die Mehrheit der beobachteten Stromuli trotz einer großen Längendiversität (Max 19,4 µm; Min 0,4 µm) eher kurz sind und unterhalb der durchschnittlichen Plastidenlänge (3,8 µm; Stabw 0,8) liegen. **A rechts** negativiertes Graustufenfluoreszenzbild des Beispiel-z-Stapels. Der Größenbalken entspricht im z-Stapel 50 µm und im den Ausschnitten 6,25 µm. - **B und C)** mittlere (Median) Stromulilänge in Zellen verschiedener Zellfläche (B) und Plastidenzahl (C); Fehlerbalken entsprechen der 10 % sowie 90 % Percentile, diese bedeuten, dass zwischen den Fehlerbalken 80% aller Messwerte liegen und dass der Median (Balkenoberkante) diese 80 % in der Mitte teilt. Zwischen dem Median und den Fehlerbalken liegen jeweils 40 % aller Messwerte.

3.2.4. Lage der Plastiden und Stromuli in Relation zum Zellkern

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden Plastiden und Stromuli in manchen Geweben in sehr engem Kontakt mit dem Zellkern beobachtet. Wie ausgeprägt die Zellkernassoziation von Plastiden und Stromuli ist scheint sehr stark vom entsprechenden Gewebe und vom physiologischen Zustand abzuhängen. So liegen zum Beispiel in Flüssigkulturzellen von *N. tabacum* fast alle und in Hypokotylzellen etiolierter *N. tabacum* Keimlinge nur wenige Plastiden am Zellkern (Kwok and Hanson, 2004c). Da es nahe liegt eine Funktion der Zellkernassoziation zu vermuten, wurde hinterfragt, wie sich die Situation im gewählten Modellgewebe darstellt. Aus diesem Grund wurden die zur Charakterisierung verwendeten z-Stapel erneut, aber diesmal zusammen mit dem jeweiligen DAPI-Fluoreszenzkanal (Zellkernfärbung), ausgewertet (Abb. 3.9 auf der nächsten Seite C). Den 5432 Plastiden wurde jeweils eine entsprechende Plastiden-Stromulus-Lageklasse zugewiesen (Abb. 3.9 B).

Lage der Plastiden relativ zum Zellkern

In 99 % aller Zellen liegen Plastiden direkt am Zellkern. Es zeigte sich, dass in 99 % aller Zellen mindestens ein Plastid in unmittelbarer Nähe⁵ des Zellkerns liegt und nur 12 von 1212 Zellen keine *Zellkernplastiden* aufwiesen. Die Anzahl der am Zellkern liegenden Plastiden steigt in den ersten Größenkategorien allmählich von durchschnittlich 1,8 (*1 und 2* Plastiden) auf 4,3 (*9 und 10* Plastiden). In größeren Zellen mit mehr Plastiden steigt die Anzahl an *Zellkernplastiden* nicht weiter, sondern bleibt bei ca. 4 Plastiden konstant. Inwieweit die zellkernassoziierten Plastiden an ihre Lage gebunden sind oder ob es einen “Wechsel” zwischen ihnen und den weiter weg liegenden Plastiden gibt, bleibt noch zu überprüfen. In fast allen Epidermiszellen gibt es eine Population von Plastiden die mit dem Zellkern assoziiert ist und deren Zahl zumindest in größeren Zellen von der Zellgröße unabhängig ist.

Lage der Stromuli relativ zum Zellkern

Neben der beobachteten Population von *Zellkernplastiden* fiel die Ausrichtung vieler Stromuli zum Zellkern hin auf. Um zu hinterfragen, ob es sich dabei um Zufälle handelt oder die Regel wurde zusätzlich die Lagebeziehung der Stromuli zum Zellkernen quantitativ untersucht. Dazu wurden die stromulitragenden Plastiden der einzelnen Zellgrößenklassen in eine der in Abbildung 3.9 B gezeigten Lageklassen gruppiert. Da der Datenumfang an größeren Zellen stark abnimmt, wurde entschieden in diesem Fall größere Größenklassen zu bilden (*1 bis 4* = 700 Zellen, *5 bis 11* = 469 Zellen und *12 bis 18* = 44 Zellen).

Über 70% aller Stromuli können in Beziehung zum Zellkern gesehen werden. In allen gebildeten Größenklassen stehen zwischen 57 % und 64 % aller beobachteten Stromuli direkt im Kontakt mit dem Zellkern (Abb. 3.9). In kleinen Zellen mag das wegen des begrenzten Raumes nicht verwundern, aber in größeren Zellen, wo mehr Raum und mehr Plastiden über die Zelle verteilt zur Verfügung stehen, erscheint der hohe Anteil zellkernassoziiierter

⁵Das Fluoreszenzsignal des Plastiden überschneidet sich mit dem des Zellkerns, oder liegt direkt an diesem an.

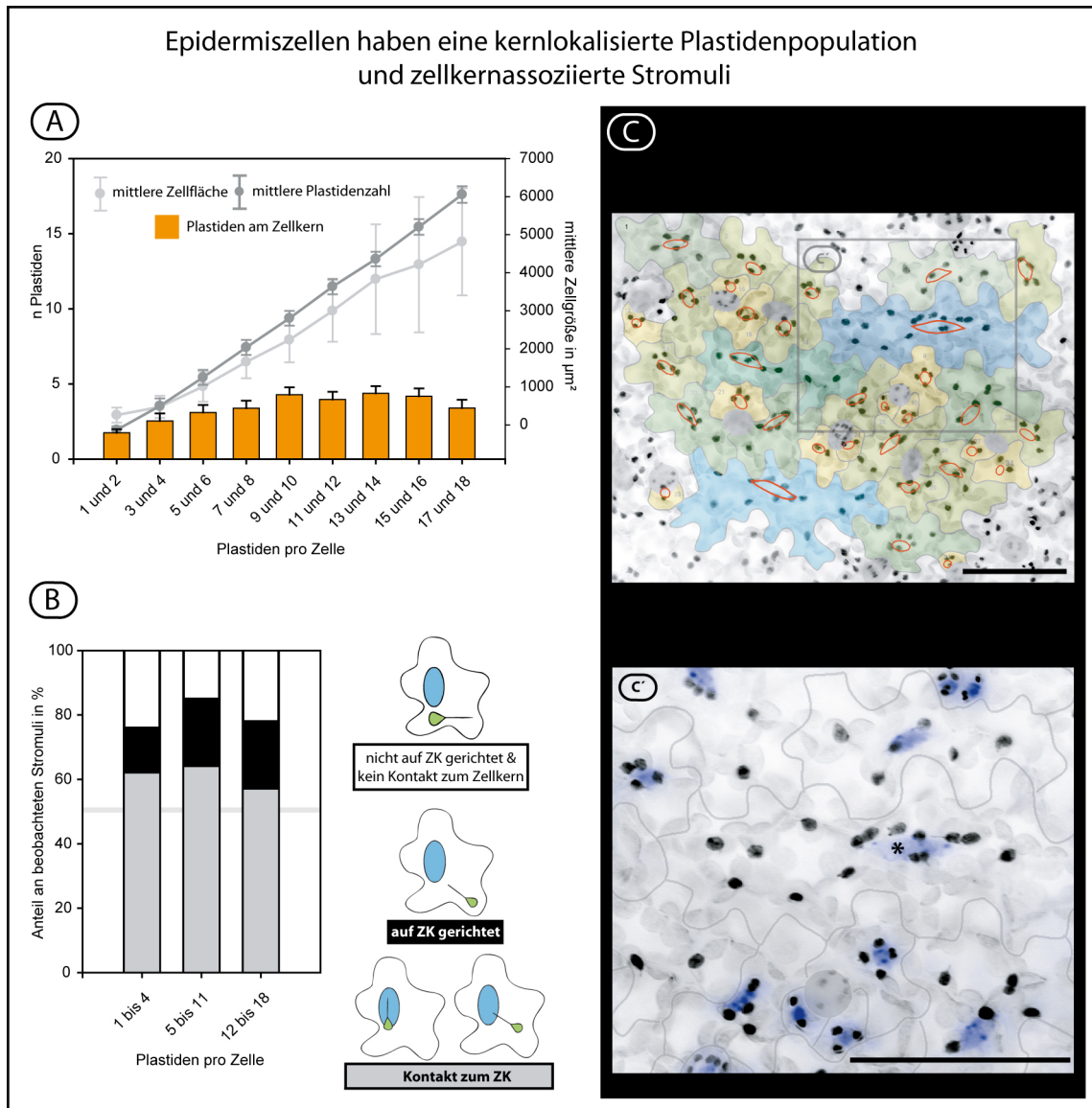


Abbildung 3.9.: Relative Lage von Plastiden und Stromuli zum Zellkern - A) Zeigt die mittlere Anzahl von Zellkernplastiden (Balkendiagramm) in Zellen verschiedener Größe. Die Zunahme der Zellgröße wird durch die mittlere Plastidenzahl und die mittlere Zellfläche wieder gegeben. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. **B)** Zeigt den Anteil von Stromuli ohne Zellkernkontext (weiß), mit Kontakt zum Zellkern (grau) oder mit zusätzlicher Ausrichtung auf den Zellkern (schwarz). Ca. 80% aller Stromuli stehen mit dem Zellkern in Kontakt oder sind auf diesen ausgerichtet. Die Piktogramme verdeutlichen die Lage der Stromuli und Plastiden relativ zum Zellkern. **C)** Zeigt das negativierte Graustufenbildfluoreszenzbild des Beispiel-z-Stapels mit markierten Zellkonturen und eingezeichneten Zellkernen (rote Konturen Stomata). C' ist der vergrößerte grau eingerahmte Abschnitt und zeigt zellkernassoziierte Plastiden. Die Zellkerne sind durch die blau eingefärbte negativierte Graustufen-DAPI-Fluoreszenz zu erkennen (ein Zellkern beispielhaft mit "*" markiert). Der Größenbalken entspricht 50 μm . **Plastiden im Kontakt mit dem Zellkern:** 1 bis 4 = 62 %, 5 bis 11 = 64 %, 12 bis 18 = 57 %; **Stromuli im Zellkernkontext:** 1 bis 4 = 76 %, 5 bis 11 = 85 %, 12 bis 18 = 75 %; graue Linie markiert 50 %; Größenbalken entspricht 50 μm .

Stromuli durch Zufall nicht mehr erklärbar zu sein. Zählt man zu den Stromuli mit direktem Zellkernkontakt diejenigen hinzu, die zwar nicht im direkten Kontakt zum Zellkern stehen, aber auf ihn ausgerichtet sind, steigt der Anteil von Stromuli mit Zellkernkontext in allen Zellgrößen auf deutlich über 70 % an (1 bis 4 = 76 %, 5 bis 11 = 85 %, 12 bis 18 = 75 %). Da die Plastidenlageklassen keine Aussage über den Abstand der Plastiden zum Zellkern zulassen, dies aber einen wesentlichen Einfluss auf die Stromulibildung haben könnte, wurde der Abstand der stromulitragenden Plastiden zum Zellkern gemessen. Für die Auswertung wurden die für 575 stromulitragenden Plastiden (320 Zellen) gemessenen Entfernungen zum Zellkern in einer Häufigkeitsverteilung dar gestellt. Dies wurde für alle drei Größenklassen (1 bis 4 = 192 Plastiden, 5 bis 11 = 311 Plastiden und 12 bis 18 = 72 Plastiden) separat durchgeführt (Abb. 3.10). Der Umfang der Größenklassen wurde mit 4 µm so gewählt, dass er der mittleren Plastidenlänge (3,8 µm; Stabw 0,8) entspricht. Die Verteilungen zeigen, dass Stromuli äußerst selten von Plastiden gebildet werden, die weiter als 8 µm (zwei Plastidenlängen) entfernt vom Zellkern liegen. Der überwiegende Teil stromulitragender Plastiden (1 bis 4 = 96 %, 5 bis 11 = 90 % und 12 bis 18 = 82 %) befindet sich innerhalb dieses Bereiches. Bei kleinen Zellen (1 bis 4 Plastiden) scheint dies wiederum durch die physischen Grenzen nicht verwunderlich zu sein, aber bei größeren Zellen (mit 5 und mehr Plastiden) erscheint der hohe Anteil von Stromuli, die von Plastiden nahe des Zellkerns wieder nicht mit Zufall begründbar zu sein. Auch der Abstand stromulitragender Plastiden scheint nicht von der Zellgröße und Plastidenzahl (5 und mehr Plastiden) beeinflusst zu sein. Demnach scheint für die Bildung eines Stromulus in der Epidermis der Abstand der Plastiden zum Zellkern von Bedeutung zu sein, was die Hypothese eines funktionellen Zusammenhangs zwischen Stromuli und Zellkern unterstützt.

In der Epidermis gibt es eine deutliche Beziehung der Plastiden und Stromuli zum Zellkern. Hierfür spricht nicht nur, dass in 99 % aller Zellen zellkernassoziierte Plastiden zu finden waren, sondern auch, dass unabhängig von der Zellgröße besonders Plastiden (über 90 %) in der Nähe des Zellkerns (bis zwei Plastidenlängen entfernt) Stromuli bilden und der überwiegende Teil dieser Stromuli im Kontakt mit dem Zellkern steht oder zumindest auf diesen hin ausgerichtet ist.

3.3. Diskussion

Wie stellt sich das Modellsystem dem Betrachter dar? Die obere Epidermis von *A. thaliana* wird auf die Anzahl und die Fläche bezogen durch kleine Zellen dominiert. Zwischen diese sind wenige sehr große Zellen mit entsprechend größerer Plastidenzahl eingebettet. Die in den rund einem Drittel (32 %) aller Epidermiszellen gefundenen Stromuli sind unabhängig vom Entwicklungsstand des Blattes zu über 90 % filamentösen Charakters und sind bevorzugt in der Nähe des Zellkerns zu finden. Auf den ersten Blick scheinen Stromuli bevorzugt in großen Zellen gebildet zu werden und in diesen besonders lang zu sein. Doch die gleiche Stromulihäufigkeit und die gleiche mittlere Stromulilänge aller Zellgrößenklassen widerlegt dies. Statt dessen legen die Daten nahe, dass die Stromulihäufigkeit durch die Zellgröße und Plastidenzahl weitestgehend unbeeinflusst bleibt.

3. Modellsystem

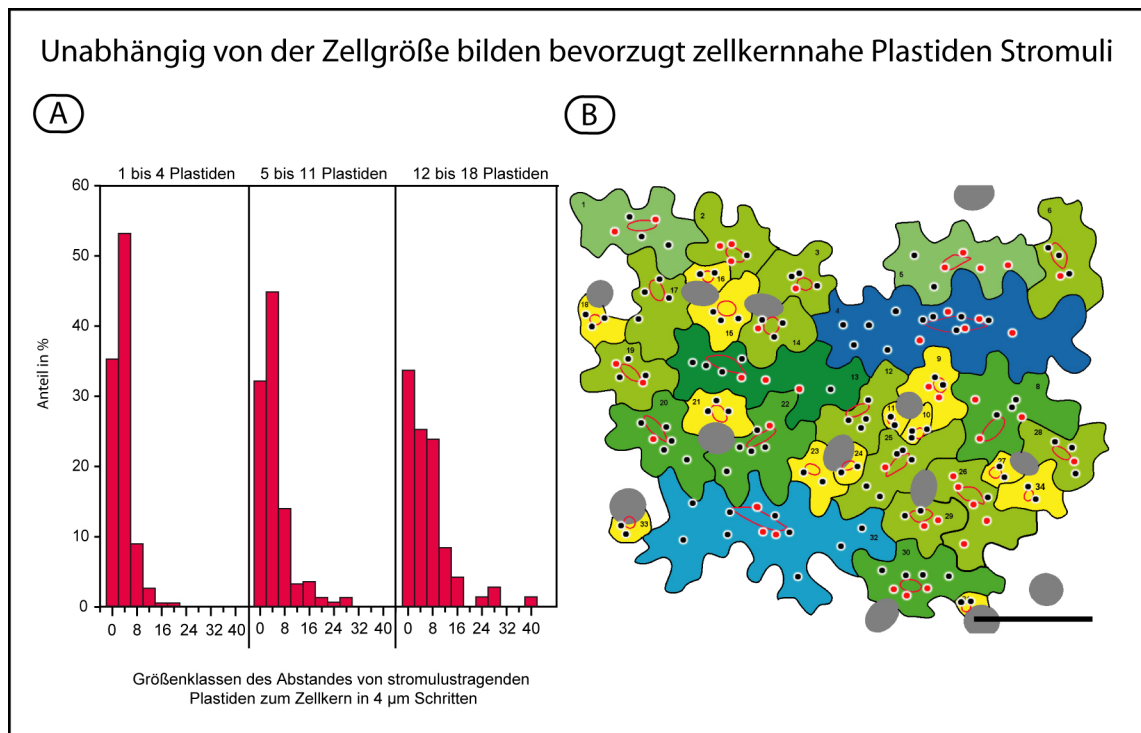


Abbildung 3.10.: Entfernung stromulitragender Plastiden vom Zellkern - A) Anteil stromulitragender Plastiden in einer bestimmten Entfernung vom Zellkern in Zellen verschiedener Größe; Umfang der Größenklassen entspricht mit $4\ \mu\text{m}$ ca. der mittleren Plastidenlänge ($3,8\ \mu\text{m}$; Stabw $0,8$); in allen Zellgrößen liegen über 80% aller stromulitragender Plastiden ($1\ \text{bis}\ 4 = 96\%$, $5\ \text{bis}\ 11 = 90\%$ und $12\ \text{bis}\ 18 = 82\%$) im Abstand von zwei Plastidenlängen vom Zellkern; **B)** markierte Lage der stromulitragenden (rote Punkte) und stromulilos (schwarze Punkte) Plastiden in den eingefärbten Zellsilhouetten des Beispiel-z-Stapels; Größenbalken entspricht $50\ \mu\text{m}$

Welche Bedeutung ergibt sich daraus für folgenden Experimente? Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit war das primäre Ziel einen Parameter zu finden, mit dem basierend auf den epifluoreszenzmikroskopisch erzeugten z-Stapeln die Reaktion der Plastiden in späteren Experimenten einfach beschrieben werden kann. Der am einfachsten zu bestimmende Parameter, der die Zellen hinsichtlich der Stromuli charakterisiert, ist deren Häufigkeit. Wie in dieser Arbeit gezeigt, hat die Zellgröße keinen bedeutenden Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit eines Plastiden einen Stromulus zu besitzen. Diese Unabhängigkeit der Stromulihäufigkeit von zellbezogenen Parametern macht eine Erfassung des Zellbezuges in späteren Experimenten nicht notwendig. Dies wirkt sich deutlich positiv auf den Aufwand und somit die Geschwindigkeit der Auswertung aus. Es war in den folgenden Versuchen nicht notwendig die Zellkonturen zu markieren und die Plastiden sowie Stromuli für jede Zelle einzeln zu registrieren. Um die Reaktion des Gewebes zu beschreiben ist die Zählung aller Plastiden und Stromuli ausreichend. Die Registrierung der Stromulilänge ist im Rahmen der Stromulibiologie ebenfalls von Interesse, stellt aber einen sehr aufwendig zu messenden Parameter dar. Aus diesem Grund wurde die Stromulilänge im Folgenden nicht mit in die Analysen einbezogen. Die beschriebene Vorgehensweise machte mit den vorhandenen Mitteln auch eine teilweise computergestützte Auswertung möglich (siehe Material und Methoden).

Im Rahmen der Charakterisierung zeigte sich, dass mit der entwickelten Methode (siehe Material und Methoden) auch ohne aufwendige Technik (kein LSM notwendig) sich das Gewebe gut und schnell dokumentieren lässt. Die so erhaltenen z-Stapel können später ohne Zeitdruck

des Experiments analysiert werden und erfassen alle Plastiden im entsprechenden Bereich. Tatsächlich bietet die Verwendung von Epifluoreszenzmikroskopen mit CCD-Kameras einen deutlichen Vorteil gegenüber herkömmlichen LSM-Systemen. Das verwendete Setup ist in der Lage in wenigen Sekunden einen z-Stapel mit hoher Auflösung aufzunehmen. Das zur Verfügung stehende LSM würde zwar einen stärkeren Kontrast bringen und echte 3D-Rekonstruktionen erlauben, aber für die selbe Aufgabe mehrere Minuten bis zu einer Viertelstunde benötigen. Da die Priorität auf hoher Auflösung und Geschwindigkeit lag, war die Epifluoreszenz die bessere Lösung.

Die Aufnahme von z-Stapeln vermeidet Fehlinterpretationen. Das Aufnehmen von jeweils einer Bildebene pro Blattabschnitt war für die Bildung der morphologischen Klassen und die Wahl der Epidermiskategorie ausreichend. In Einzelbildern können Strukturen, die in der Zelle übereinander liegen (x/y-Position gleich und nur die z-Position verschieden) nicht von miteinander verbundenen Strukturen unterschieden werden. Durch die fehlenden Tiefeninformationen in Einzelbildern besteht deshalb die Gefahr, die Lage von Stromuli und Plastiden zueinander, falsch einzuschätzen. So lässt sich erklären, dass im Gegensatz zur Voruntersuchung in der genaueren Charakterisierung keine Stromuli der Klasse B beobachtet wurden (0 von 602). Die in der Voruntersuchung als Klasse B eingestuften 2,3 % der Stromuli (49 von 2096 Beobachtungen) beinhalten deshalb sehr wahrscheinlich Fehleingruppierungen. Der Anteil von Klasse B Stromuli liegt dem zur Folge bedeutend unter 2,3 %.

Im Rahmen aller weiteren Versuche wurden z-Stapel zur Dokumentation der Epidermis eingesetzt.

4. Zucker

Zucker stellen die primäre Kohlenstoff- und Energiequelle für die meisten pro- und eukaryotischen Zellen dar. Früh in der Evolution, entwickelten sich deshalb Kontrollmechanismen, die den Zellstoffwechsel auf die Verfügbarkeit von Zuckern abstimmen. Um die Regulation zu bewerkstelligen nahmen Zucker im Laufe der Zeit die Rolle wichtiger Signalmoleküle ein. So greifen durch Zucker erzeugte Signale, heute in den Metabolismus, die Stresstoleranz, das Wachstum und die Entwicklung von Bakterien, Hefen, Tieren und Pflanzen ein (Rolland et al., 2006). Auf Grund der zentralen Rolle, die Plastiden als Produktions- und Speicherort von Kohlehydraten, einnehmen liegt es nahe zu hinterfragen ob Kohlehydrate in der Lage sind Einfluss auf die Plastidenmorphologie zu nehmen. Dazu wurden die Epidermiszellen extrazellulären Kohlehydraten ausgesetzt (die Strukturformeln der verwendeten Zucker sind in Abb. 4.1 auf der nächsten Seite gezeigt).

4.1. Experimentelle Prozedur

Um zu gewährleisten, dass die zu testenden Kohlehydrate die Blattzellen auch wirklich erreichen, mussten die Blätter zur Umgehung der Diffusionsbarriere (Kutikula) statt betropft, vakuuminfiltriert werden. In Abbildung 4.2 auf Seite 33 ist beschrieben, wie die Zuckerlösungen in das Blattgewebe infiltriert und die Blätter zur Mikroskopie präpariert wurden. Die gesamte Prozedur macht es notwendig verschiedene experimentelle Kontrollen durchzuführen. Diese wurden den eigentlichen Versuchen vorangestellt, um deren Einfluss auf die Stromulihäufigkeit zu prüfen. Zur Beschreibung von Veränderungen, welche die Plastiden während der Inkubationszeit erfahren, hat sich wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben die Stromulihäufigkeit als geeignet erwiesen. Da nicht klar war in welchen Zeiträumen eine Reaktion der Plastiden eintritt, wurde die Stromulihäufigkeit im Abstand von 60 min über 3 h bestimmt. Während der ersten Versuche zeigte sich, dass es sinnvoll ist weitere Parameter zur Beschreibung der Reaktion mit einzubeziehen. Deshalb wurde zusätzlich der *relative Anteil der Stromuliklassen* und die *Induktionskompetenz* bestimmt. Zum Verständnis der Diagramme, welche die Reaktion der Plastiden beschreiben, erfolgt kurz die Erläuterung der Parameter.

Entwicklung der Stromulihäufigkeit über die Zeit (Abb. 4.3 auf Seite 35 A) Da die Stromulihäufigkeit zum Zeitpunkt 0 min von Pflanze zu Pflanze variiert (Abbildung 4.2 auf Seite 33), wurde die Stromulihäufigkeit späterer Zeitpunkte auf den jeweiligen Startwert bezogen. Auf diese Weise können die einzelnen Experimente einfacher mit einander verglichen werden. Die Werte der Experimentwiederholungen wurden arithmetisch gemittelt und mit ihrer Standardabweichung dargestellt. Wichtig für die Interpretation ist, dass hier und in der Induktionskompetenz die Differenz zwischen zwei relativen Häufigkeiten betrachtet wird. Bei

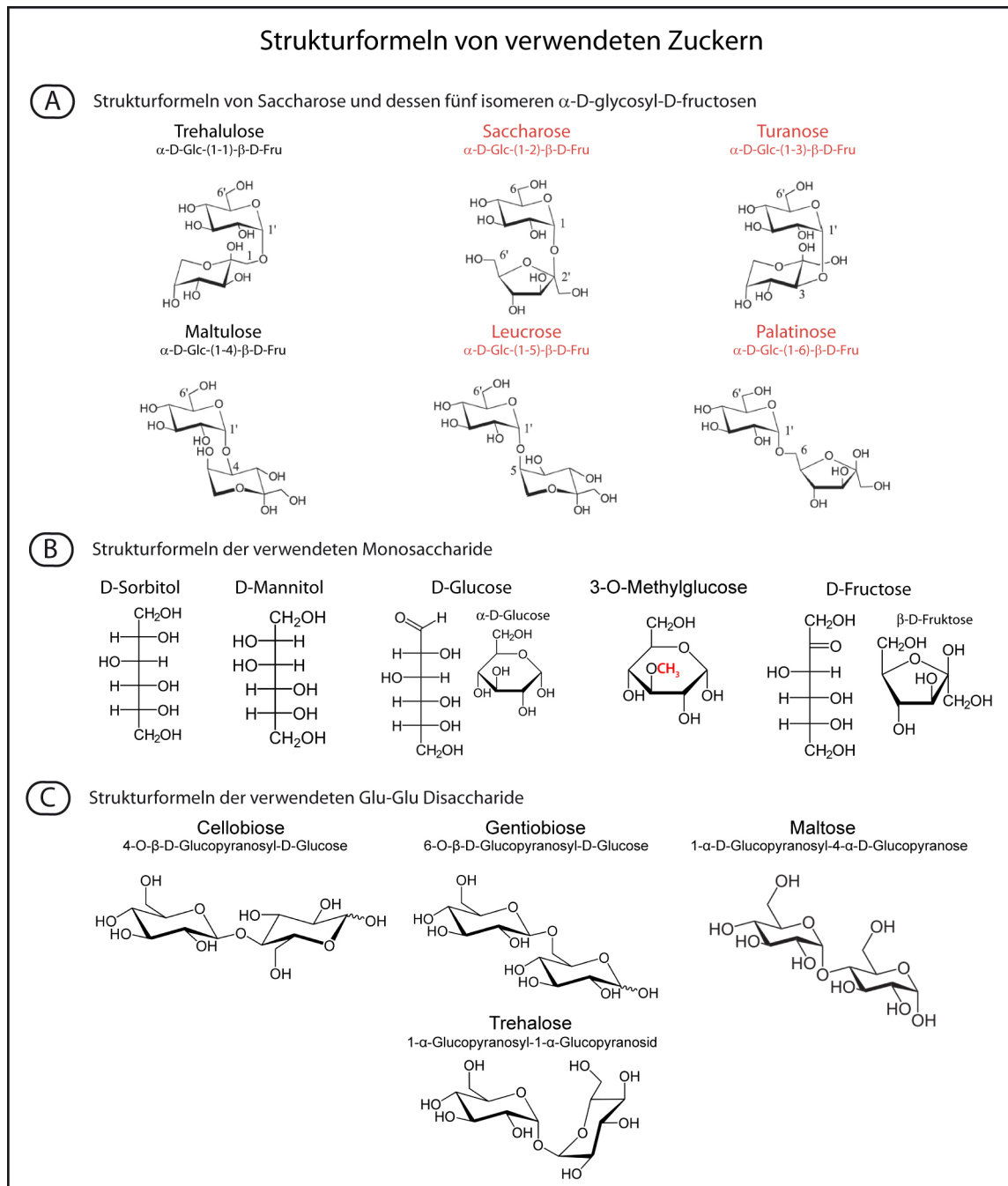


Abbildung 4.1.: Formeln der zu Induktionsversuchen eingesetzten Zucker - A) gezeigt sind Saccharose und dessen fünf Isomere. Zu beachten ist, dass bei den Isomeren die Fructose nicht über das zweite C-Atom mit dem ersten C-Atom der Glucose verknüpft ist, sondern jeweils mit einem anderen. B) Gezeigt sind eingesetzte Monosaccharide. C) gezeigt sind die eingesetzten Glukose-Glukose-Disaccharide, Trehalose ist als einziges hier gezeigtes Disaccharid nicht-reduzierend.

4. Zucker

einem Startwert von 10 % Stromuli und einem Wert von 40 % zu einem Zeitpunkt x, ergeben sich 30 % Differenz. Das bedeutet, dass die Stromulihäufigkeit um 30 %-Punkte zugenommen hat.

Relativer Anteil der Stromuliklassen (Abb. 4.3 auf Seite 35 B) Wie bereits beschrieben, haben Plastiden der Epidermis meistens nur einen Stromulus, können aber in manchen Fällen mehrere Stromuli haben. Um zu verfolgen, ob unter den experimentellen Bedingungen nicht nur mehr oder weniger stromulitragende Plastiden zu beobachten sind sondern auch der Anteil von Plastiden mit mehreren Stromuli zunimmt, wird der relative Anteil der einzelnen Plastidenklassen (A1-A4) unter allen stromulitragenden Plastiden bestimmt. Da die überwiegende Teil der Klasse A1 angehört und nur unter 10% zu A2-A4 gezählt werden, müssen die Werte in den Diagrammen auf zwei getrennten y-Achsen dargestellt werden.

Induktionskompetenz (Abb. 4.3 auf Seite 35 C) Wie sich zeigt, ist der Anstieg der Stromulihäufigkeit einem gewissen zeitlichen Verlauf unterworfen (zu verschiedenen Zeitpunkten wird das Maximum an Stromulihäufigkeit erreicht). Um die Reaktion der Pflanze auf die einzelnen Behandlungen besser mit einander vergleichen zu können und einen einfachen Wert dafür zu erhalten, wurde die Induktionskompetenz eingeführt. In die Induktionskompetenz fließen die höchsten Stromulizuwächse, die durch eine Behandlung hervorgerufen wurden, ein. Um die Induktionskompetenz zu erhalten, wurde aus den einzelnen Werten der Wiederholungen der Mittelwert gebildet. So konnten die höchsten Stromulizuwächse der einzelnen Bedingungen mit einander verglichen werden.

4.1.1. Kontrollen

Verwundungskontrollen - Die Blätter wurden zur besseren Vakuuminfiltration und zum Aufteilen auf die verschiedenen Zeitpunkte zerschnitten. Solche Verwundungen, werden durch die Pflanze registriert und mit einer Vielzahl von Reaktionen beantwortet (Delessert et al., 2004; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). Aus diesem Grund wurden zur Kontrolle Blattquadrate präpariert und ohne Infiltration auf Wasser schwimmend inkubiert (Abb. 4.3 auf Seite 35 *nicht infiltriert*).

Mediumskontrollen - Als zweites musste der Einfluss des Infiltrationsmediums, in welchem die applizierten Substanzen gelöst wurden, geprüft werden. Als potenzielle Infiltrationsmedien wurden Leitungswasser, Destilliertes Wasser und ein Puffer getestet (Abb. 4.3). a) Leitungswasser wird häufig zur Beobachtung von lebendem pflanzlichen Gewebe verwendet. Leider ist dies lokal und saisonal in seiner Zusammensetzung größeren Schwankungen unterlegen, weshalb es als standardisiertes Lösungsmittel für diese Zwecke weniger geeignet erscheint. b) destilliertes Wasser ist in seiner Zusammensetzung sehr kontrollierbar, doch durch die fehlenden Puffersubstanzen kann der pH-Wert schwanken. c) Puffer stellen sehr kontrollierbare Bedingungen und der hier verwendete sollte, dem sonst verwendeten Leitungswasser ähnliche Bedingungen bieten. Yamada et al. (2003) beschreiben das von ihnen zur Kultivierung von *Spirogyra* eingesetzte *artificial pond water (APW)*, welches in der Ionenkonzentration dem lokalen Leitungswasser sehr nahe kommt.

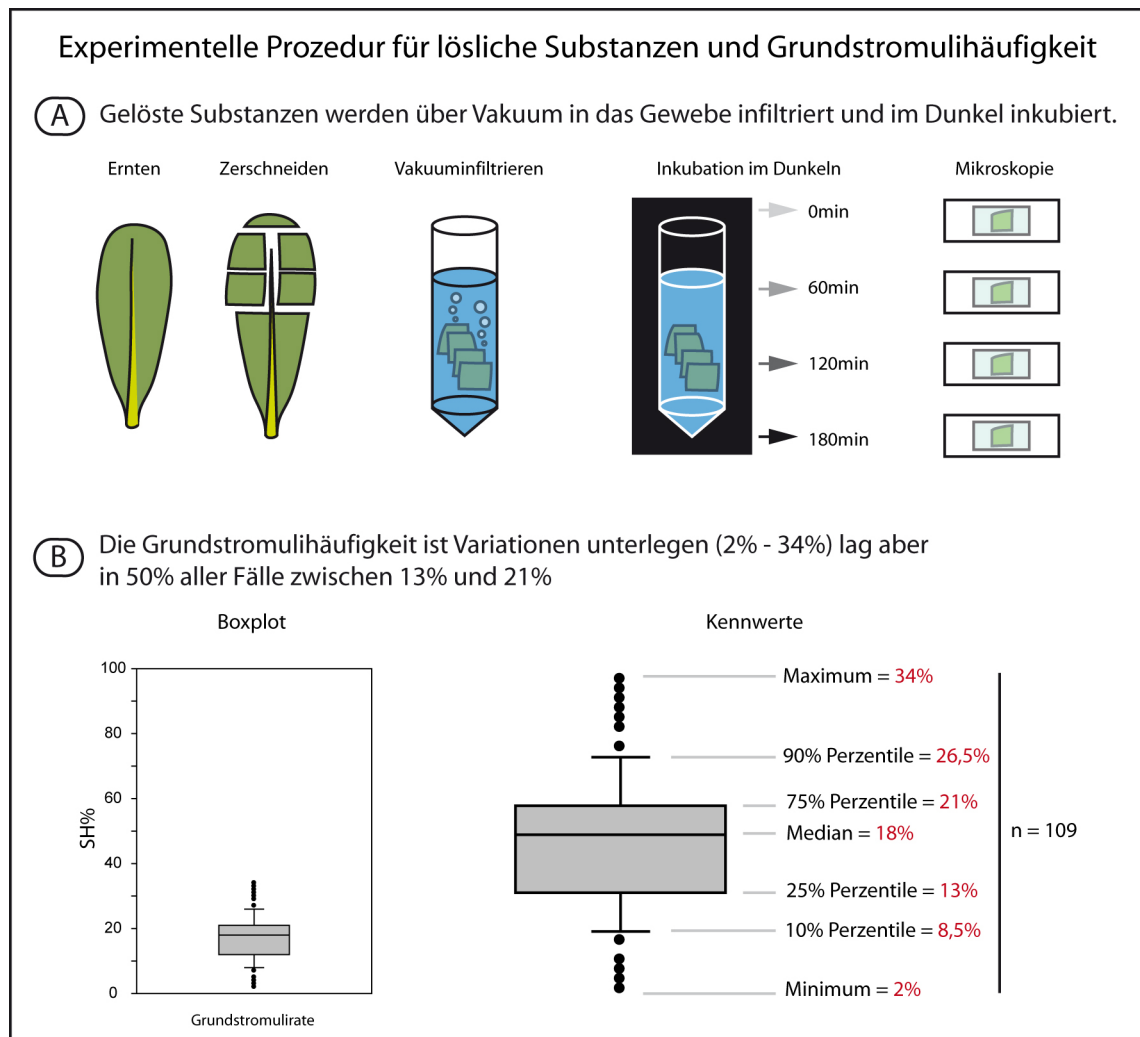


Abbildung 4.2.: Durchführung der Induktionsexperimente und Grundstromulihäufigkeit **A**) Durchführung der Induktionsexperimente: ERNTEN - wählen eines einheitlichen Blattentwicklungsstadiums durch Bestimmen von Blattbreite und Länge in Relation zu den größten Blättern der Rosette; ZERSCHNEIDEN - Zerteilung der Blätter in vier Stücke, Spitze und Blattgrund werden wegen des Entwicklungsgradienten von Arabidopsis-Blättern gemieden; VAKUUMINFILTRIEREN; INKUBATION IM DUNKELN - bei Raumtemperatur (21°C); MIKROSKOPIE - Zeitpunkte nach Vakuuminfiltration 000 min, 060 min, 120 min, 180 min; **B**) Um einen Eindruck der natürlichen Variabilität der Stromulihäufigkeit zu bekommen, wurde von allen Experimenten, in denen als Kontrolle die Stromulihäufigkeit zu einem Zeitpunkt *Null* bestimmt wurde, zusammengefasst und in einem Boxplot dargestellt (n = 109). Jeder Zeitpunkt enthält durchschnittlich 800 Plastiden, bei 109 Zeitpunkten fließen ca. 87200 Plastiden in den Boxplot ein. Die graue Box enthält 50 % aller Messwerte und wird durch den Median geteilt. Der Median teilt die Messwerte genau in ihrer Mitte (oberhalb und unterhalb des Medians liegen jeweils 50 % der Messwerte).

4.1.2. Ergebnisse und Diskussion

Betrachtet man die Reaktionen der gewählten Parameter fällt auf, dass nur bei den nicht infiltrierten Blättern die Stromulihäufigkeit unbeeinflusst bleibt (Abb. 4.3 A auf Seite 35) und die infiltrierten Medien alle eine leichte Zunahme der Stromulihäufigkeit verursachen. Dass diese Reaktion nur begrenzt mit einer Zunahme an Plastiden mit mehr als einem Stromuli einhergeht, zeigt das unveränderte Verhältnis der Stromuliklassen zueinander. Lediglich in den mit Leitungswasser infiltrierten Blättern war eine Zunahme von Plastiden mit zwei Stromuli (A2) zu beobachten (Abb 4.3 B). Die Gegenüberstellung der Induktionskompetenz (mittlere maximale Zunahme der Stromulihäufigkeit) macht den Unterschied zwischen den einzelnen

4. Zucker

Behandlungen gut vergleichbar und zeigt, dass APW der Kontrolle *nicht infiltriert* am nächsten kommt. Wie die Kontrolle *nicht infiltriert* zeigt, hat das Zerschneiden und die Inkubation im Dunkeln keinen Einfluss auf die Stromulihäufigkeit im Gewebe¹. Im Gegensatz dazu scheint das Fluten des Mesophylls mit wässrigem Medium einen leicht induktiven Effekt auf die Stromuli zu haben. Da der Effekt bei APW im Beobachtungszeitraum am geringsten und als einziger als nicht signifikant einzustufen war², wurde es im Folgenden als Lösungsmittel verwendet.

4.2. Saccharoseabhängige Induktion

Saccharose ist der prominenteste Transportzucker der meisten Pflanzen (auch in *A. thaliana*) in dessen Form fixierter Kohlenstoff und gebundene Energie aus Assimilationsgeweben (*Source*) hin zu Organen der Speicherung und des Verbrauches (*Sink*) transportiert wird. Da Saccharose in *Sink*-Gewebe nach appoplastischer Entladung des Phloems extrazellulär vorliegt und sich typische *Sink*-Gewebe, wie reifende Tomatenfrüchte und wachsende Gewebe, durch einen hohen Stromuligehalt auszeichnen wurde, zunächst Saccharose auf seine Fähigkeit, Stromuli zu induzieren, überprüft (Waters et al., 2004; Köhler and Hanson, 2000).

4.2.1. Saccharose, Sorbitol und Mannitol

Als Anhaltspunkt für die eingesetzte Konzentration von Saccharose diente das MS-Medium, welches zur Anzucht von *A. thaliana* eingesetzt wird. Saccharose ist ein wichtiger Bestandteil des MS-Mediums (Salinas J, 2006) und wird dort in einer Konzentration von 40 mM eingesetzt. Da 40 mM nur eine Zehnerpotenz unter der Konzentration des Zellsaftes liegt wurden Kontrollen mit Zuckern geliecher Konzentration durchgeführt. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass beobachtete Effekte durch die osmotische Wirkung der Saccharoselösung ausgelöst wurden. Als Kontrollen wurde 40 mM Sorbitol und 40 mM Mannitol eingesetzt. Für jeden verwendeten Zucker und die Pufferkontrolle (APW) wurden drei Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte die Grundlage für die Diagramme in Abbildung 4.4 darstellen.

Saccharose ist ein Disaccharid aus Glukose und Fruktose (Abb. 4.1 auf Seite 31 A). Durch die Bindung über das anomere C-Atom ist die recht reaktive Glukose (reduzierender Zucker) in einem nichtreduzierenden Zucker gebunden, der für den Transport zu hohen Konzentrationen akkumuliert und nur von bestimmten Enzymen umgesetzt werden kann. Durch gezielte Saccharosesynthese im Zytosol des liefernden Gewebes (durch die Saccharosephosphat-Synthase) und Abbau am Bestimmungsort (durch Invertase oder die rückwärtige Reaktion der Saccharosesynthase) kann in Form von Saccharose Glukose *gefahrlos* transportiert werden.

Sorbitol - ist ein Zuckeralkohol und kann als reduzierte Form der Glukose angesehen werden. Obwohl es in vielen Pflanzen zu finden ist, spielt es im Stoffwechsel eine untergeordnete Rolle. Ausnahme sind Spezies wie die Vertreter der Rosaceae, die Sorbitol als einen ihrer

¹Dennoch wurde zur Vermeidung von Wundeffekten nicht direkt an den Rändern beobachtet, sondern möglichst in der Mitte des Blattstückes.

²ungepaarter t-Test ergibt für *nicht infiltriert* zu H_2O_{Leit} p-Wert=0,048 und zu H_2O_{destp} p-Wert=0,0179; ungepaarter t-Test ergibt für *nicht infiltriert* zu APW p-Wert=0,129

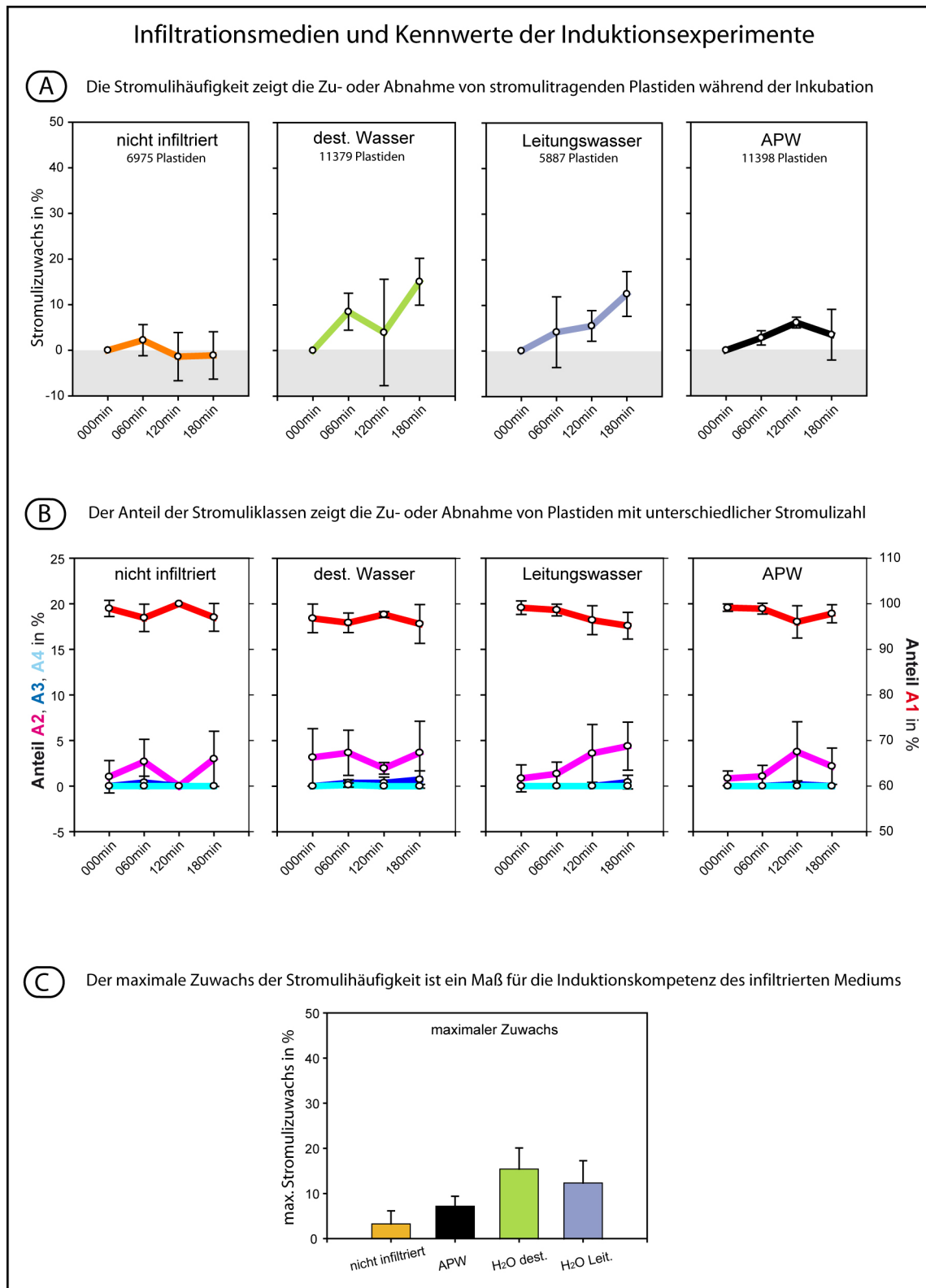


Abbildung 4.3.: Einfluss der Probenpräparation und des Infiltrationsmediums: auf die Plastiden der Epidermis, gemessen an **A**) der Stromulihäufigkeit, **B**) dem relativen Anteil an Stromuliklassen und **C**) der Induktionskompetenz. A1, A2, A3 und A4 entsprechen den Stromuliklassen, wie sie unter 3.2 auf Seite 17 eingeführt wurden. Abkürzungen: *H₂O_{Leit}* entspricht Leitungswasser; APW entspricht "artificial pond water"; *H₂O_{dest}* entspricht destilliertes Wasser

4. Zucker

Haupttransportzucker verwenden. Da es in den meisten Pflanzen keine große physiologische Bedeutung hat, wird es häufig als Osmolytikum in Gewebeaufschlußmedien verwendet um die Zellkompartimente (Z.Bsp. Mitochondrien oder Chloroplasten) nach dem Aufschluss zu stabilisieren (Rödiger et al., 2009).

Mannitol - ist ein von der Mannose abgeleiteter Zuckeralkohol, der sich hauptsächlich in halophilen Pflanzen finden lässt, aber auch in anderen Pflanzen akkumuliert wird. Mannitol wird häufig eingesetzt um in höheren Konzentrationen Trockenstress (osmotisch) zu simulieren (Kodama et al., 2009).

Ergebnisse und Diskussion

Stromuli werden durch 40 mM Saccharose induziert. Aus den Diagrammen der Abbildung 4.4 auf Seite 39 geht hervor, dass nur die Behandlung mit Saccharose zu einer deutlichen Zunahme der Stromulihäufigkeit in der Epidermis führte. Bemerkenswert ist, dass die Stromulibildung bereits innerhalb der ersten 60min einsetzte. Obwohl die Zunahme in der zweiten Stunde weiter anhielt, ist der Anstieg wesentlich geringer. Eine Zunahme der Stromulihäufigkeit, wie sie bei der Saccharose beobachtet wurde, ist bereits ohne Quantifizierung zu erkennen (Abb. 4.5 B auf Seite 40). Sorbitol und Mannitol verursachten keine Zunahme der Stromulihäufigkeit. Der durch Saccharose hervorgerufene Stromulizuwachs ist demnach ein spezifischer Effekt und nicht auf das osmotische Potential der infiltrierten Lösung zurückzuführen. Ein rückläufiger Trend während der dritten Stunde, ist unabhängig von einer vorherigen Induktion, in allen Behandlungen zu erkennen.

Während der Saccharosebehandlung nimmt analog zu der Stromulihäufigkeit auch der Anteil von Plastiden mit mehr als einem Stromuli deutlich zu. Eine ähnliche Verschiebung findet sich auch bei Mannitol und sehr abgeschwächt bei APW. In mit Sorbitol behandeltem Gewebe änderte sich während der Inkubation der relative Anteil der Stromuliklassen gar nicht.

40 mM Saccharose ist eine physiologisch relevante Konzentration. Die zur Induktion verwendete Saccharosekonzentration von 40 mM scheint recht willkürlich gewählt und es stellt sich die Frage, ob diese Konzentration artifiziell ist oder ob Blattzellen natürlicherweise solchen Konzentrationen ausgesetzt sein können. Die Angaben aus der Literatur zur Saccharosekonzentration im Sym- und Apoplasten sind methodenbedingt immer auf einen internen Standard, wie das Frischgewicht (Antonio et al., 2007), einzelne Zellen (Jones et al., 1977; Outlaw and Vlieghere-He, 2001) oder Menge an Chlorophyll (Riens et al., 1991) bezogen und deshalb nicht ohne weiteres auf das hier verwendete System zu übertragen. Eine indirekte Bestimmung der Konzentration in mM von Outlaw and Vlieghere-He (2001) schätzt bei *Vicia faba* die Konzentration im Apoplasten des Blattes auf 0,5mM und unter Bedingungen großer Wasserverdunstung bis 150mM ein. 40mM liegen somit in einem Bereich der durchaus als physiologisch relevant an zu sehen ist.

4.2.2. Ist die saccharoseabhängigen Induktion von der Konzentration abhängig?

Saccharose hat sich als starker Induktor der Stromulibildung erwiesen. Es ist von verschiedenen durch Saccharose induzierten Reaktionen bekannt, dass sie in ihrer Ausprägung von der eingesetzten Saccharosekonzentration abhängig sind. Für eine Einschätzung wie viel Saccharose ausreichend ist, um eine Reaktion der Plastiden zu provozieren, und ob sich die Reaktion durch höhere Konzentrationen steigern lässt, wurden Induktionen mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen durchgeführt. In Anlehnung an Solfanelli et al. (2006) wurden 0 mM, 1 mM, 10 mM, 40 mM und 80 mM als zu testende Konzentrationen gewählt. Die Daten von 0 mM (APW) und 40 mM Saccharose stammen aus dem vorhergehenden Experiment (4.4 auf Seite 39). Für jede neue Konzentration wurden jeweils drei Induktionen durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Die induzierte Zunahme der Stromulihäufigkeit ist konzentrationsabhängig. Wie in Abbildung 4.5 auf Seite 40 A (links) zu sehen ist, liegen die Zuwächse aller Saccharoselösungen oberhalb der Kontrolle (APW) und es deutet sich aus den Zuwachsentwicklungen eine Abhängigkeit von der Konzentration an. Die Dichte der Graphen und die relativ großen Standardabweichungen erschweren die Interpretation. Ein deutlicheres Bild ergibt sich bei Vergleich der Induktionskompetenzen (Abb. 4.5 A rechts). Es zeigt sich, dass bereits mit 1 mM Saccharose Stromuli im Beobachtungszeitraum induziert werden. Der Effekt verstärkt sich über 10 mM bis 40 mM, wird aber bei 80 mM nicht noch größer.

Der konzentrationsabhängigen Zunahme der Stromulihäufigkeit liegt wahrscheinlich ein Dosisseffekt zu Grunde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Intensität mit der die Zellen reagierten abhängig von der verwendeten Saccharosekonzentration ist. Dennoch ist es schwierig an Hand der Ergebnisse Aussagen über die induzierte maximale Stromulihäufigkeit zu machen. Es wäre denkbar, dass nach entsprechender Zeit auch durch 1 mM, 10 mM und 20 mM ein Zuwachs der Stromulihäufigkeit vergleichbar zu 40 mM und 80 mM erreicht wird und die geringeren Zuwächse aus einem langsameren Anstieg resultieren. Das dies nicht der Fall zu sein scheint, zeigen die Untersuchungen von anderen, durch Saccharose induzierte, Reaktionen. So ist nach 24h Saccharosebehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen eine, auf gleiche Weise abgestufte, Anthocyanakkumulation in Keimlingen von *A. thaliana* (Solfanelli et al., 2006) und α -Amylase-Induktion in Gerstenkeimlingen (Loreti et al., 2000) zu beobachten. Die Anthocyanakkumulation erreicht bei einer ähnlichen Saccharosekonzentration (60 mM) wie die Stromulizuwächse ein Maximum, welches mit höheren Konzentrationen (90 mM) nicht übertroffen werden kann (Solfanelli et al., 2006). Das eine höhere Stromulihäufigkeit nicht dadurch verhindert wurde, dass bei 40 mM bereits alle Plastiden Stromuli trugen und somit eine Sättigung vorlag, zeigen die relativen Stromulizuwächse der Saccharoseinduktionen in Abbildung 4.5 C. Die Stromulihäufigkeit liegt nach 2 h in allen Fällen zwischen 50 % und 60 % (einzelne dokumentierte Bildabschnitte erreichen Werte von 70 % stellen aber eher Ausnahmen dar). Es verbleiben nach der Induktion immer noch Plastiden ohne Stromuli. Die hier gesammelten Hinweise lassen vermuten, dass die konzentrationsabhängige Reaktion der

4. Zucker

Plastiden keine verzögerte Kinetik zu Grunde liegt, sondern einen echten Dosiseffekt darstellt. Die Epidermisplastiden bilden demnach so viele Stromuli, wie für die extrazelluläre Saccharosekonzentration angebracht, warum sich das Gewebe mit höheren Saccharosekonzentrationen nicht weiter mit Stromuli sättigen lässt bleibt jedoch offen.

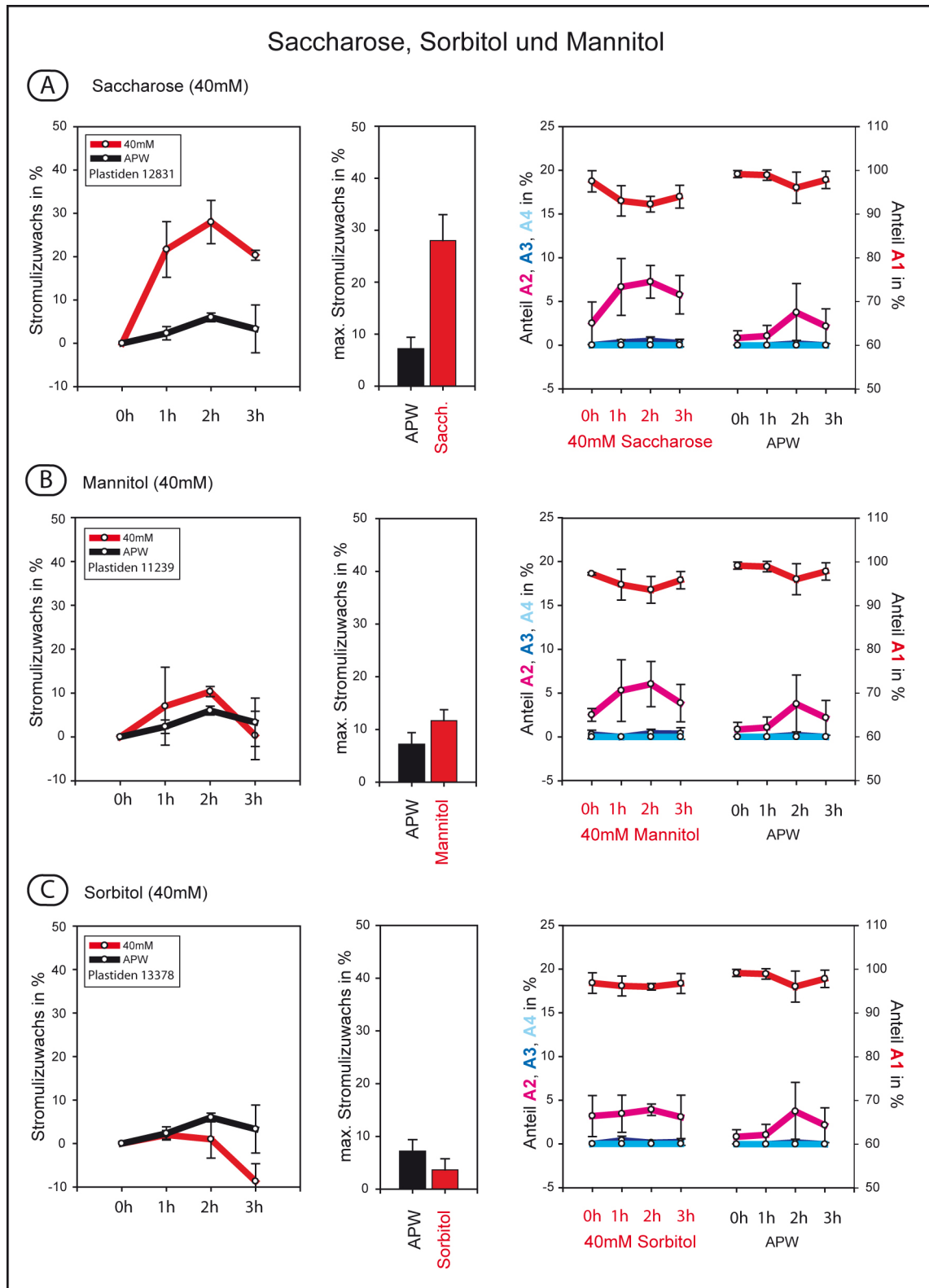


Abbildung 4.4.: Saccharose, Sorbitol und Mannitol - A, B und C zeigen die Induktionsversuche mit den genannten Zuckern, in angegebener Stoffmenge in APW gelöst; A1, A2, A3 und A4 entsprechen den Stromuliklassen, wie sie unter 3.2 auf Seite 17 eingeführt wurden. SH% bezeichnet die relative Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. Die Bedeutung der Diagramme ist unter 4.1 auf Seite 30 erläutert. Für mehr Details, siehe Text.

4. Zucker

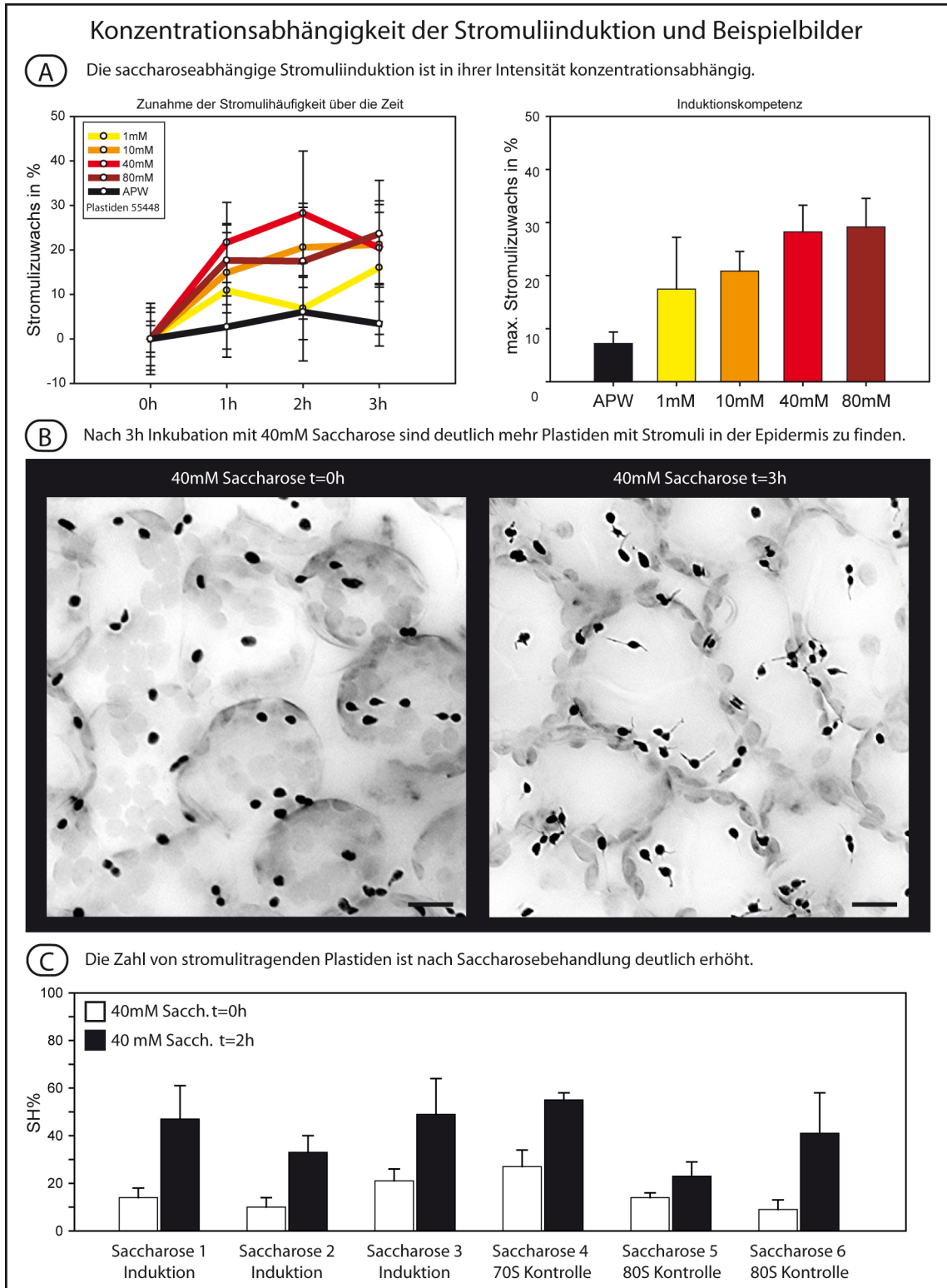


Abbildung 4.5.: Konzentrationsabhängigkeit der Stromuliinduktion - A) Zunahme der Stromulihäufigkeit und Induktionskompetenz verschieden konzentrierter Saccharoselösungen. Details siehe Text 4.2.2 auf Seite 37. **B)** invertierte Graustufenepifluoreszenzbilder mit erweiterter Tiefenschärfe der oberen Epidermis. Links, zu Beginn einer 40 mM Saccharosebehandlung und rechts nach 3 h Inkubation. Details siehe Text 4.2.1 auf Seite 34. Größenbalken entsprechen 12 μ m. **C)** Vergleich der relativen Stromulihäufigkeiten vor der Induktion mit 40 mM Saccharose und nach 2 h Inkubation. Die einzelnen Balkenpaare stammen aus verschiedenen Experimenten (siehe x-Achse), bei denen die Behandlung zum Teil als Kontrolle durchgeführt wurde. Die relativen Häufigkeiten, verdeutlichen wie gesättigt das Gewebe nach gewisser Zeit ist. Die 70S Kontrolle und 80S Kontrolle stammt aus den Experimenten zur Inhibition der 70S- und 80S-Translation auf Seite 114 und auf Seite 116.

4.3. Stromuliinduktion durch saccharoseähnliche Kohlehydrate

Auf Grund seiner großen physiologischen Relevanz ist, wie in der Einleitung zu diesem Kapitel angedeutet, der Weg auf dem die Saccharose registriert wird ein wesentlicher Bestandteil der Regulation des Kohlehydratstoffwechsels. Die Induzierbarkeit von Stromuli durch Saccharose liefert deutliche Hinweise darauf, dass Stromuli mit diesem Regulationsnetzwerk in Beziehung stehen. Um die saccharoseabhängige Stromuligenese und den Gang des vermittelnden Signalweges zu verstehen, ist es wichtig die Natur und den Entstehungsort des generierten Signals zu ergründen. Drei Prinzipien der Saccharoseerkennung sind nach Loreti et al. (2001) denkbar:

1. Die Saccharose wird wie ein Signalmolekül durch einen Rezeptor erkannt, der nach der Bindung oder dem Transport die Signalkaskade auslöst.
2. Die Saccharose wird verstoffwechselt und der sich in Konsequenz daraus ergebende verändernde Energiehaushalt der Zelle löst das Signal aus.
3. Saccharose wird gespalten und die beiden Spaltprodukte Fruktose und Glukose sind für die Generierung des Signals verantwortlich.

Da Saccharose durch die Zelle schnell in Glukose und Fruktose gespalten wird und diese wiederum weiter verstoffwechselt werden, ist es schwer zu unterscheiden, welche Reaktionen in der Pflanze von Saccharose selbst oder durch die Metabolisierung ausgelöst werden. Um zwischen der Metabolit- und der Signalfunktion von Saccharose zu unterscheiden, werden häufig so genannte Analoge eingesetzt (Loreti et al., 2001). Allen Saccharose-Analogen ist gemein, dass sie natürlicherweise in der Pflanze nicht synthetisiert und nicht metabolisiert werden, aber saccharosebezogene Reaktionen in den Pflanzenzellen induzieren können. Mit Turanose und Palatinose³ standen die wichtigsten Analogen, die bereits mehrfach in Studien zur saccharoseabhängigen Signalübertragung in Pflanzen eingesetzt wurden (Gonzali et al., 2005; Loreti et al., 2000), zur Verfügung. Zusätzlich wurde Leucrose mit in die Untersuchungen einbezogen. Obwohl auch wie Turanose und Palatinose ein Fru-Glu-Disaccharid, finden sich keine Berichte, dass Leucrose Saccharose funktionell ersetzen kann und fungiert daher als Kontrolle. Für Turanose sowie Leucrose flossen drei und für Palatinose fünf Versuche in die Diagramme der Abbildung 4.6 auf Seite 44 ein.

4.3.1. Ergebnisse

Palatinose und Turanose induzieren zu Saccharose vergleichbare Veränderungen. Genau wie bei Saccharose nimmt die Stromulihäufigkeit nach Turanose- und Palatinosebehandlung bereits in der ersten Stunde sprunghaft zu. Der maximale Zuwachs liegt bei beiden Zuckern um die 30 %-Punkte und ist damit sogar quantitativ im Bereich der mit Saccharose induzierten Reaktion. Die Zunahme an Plastiden mit mehreren Stromuli ist bei Behandlung mit Turanose und Palatinose deutlicher als bei Saccharose (Abb. 4.6 A und B). Die Reaktionen waren bei Behandlungen mit Turanose wie bei Saccharose gut reproduzierbar. Mit Palatinose war eine

³Sind beides Glukose-Fruktose Disaccharide in denen aber im Gegensatz zu Saccharose andere C-Atome der Untereinheiten miteinander verknüpft sind (siehe Abb. 4.1 auf Seite 31).

4. Zucker

größere Variabilität in der Heftigkeit der Reaktion zu beobachten, weshalb für diesen Zucker fünf statt der sonst drei durchgeführten Wiederholungen in die gezeigten Mittelwerte einfließen. Aus diesen unterschiedlich starken Reaktionen der Zellen auf Palatinose ergeben sich auch die großen Standardabweichungen. Im Gegensatz zu den anderen Saccharose-Analogen besitzt Leucrose nicht die Fähigkeit im beobachteten Zeitraum Stromulibildung in der Epidermis zu induzieren. Die drei Parameter verhalten sich wie die Pufferkontrolle (Abb. 4.6 C).

4.3.2. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass in Bezug auf die Stromuliinduktion Turanose und Palatinose, die Saccharose ersetzen können. Doch was sagt dies über die Erkennung des Induktors aus? Obwohl die Verwendung nicht-metabolisierbarer Zucker ein vielversprechendes Werkzeug ist, gestaltet sich die Interpretation der Ergebnisse nicht sehr einfach, denn obwohl Loreti et al. (2001) den Nutzen nicht-metabolisierbarer Zucker für die Untersuchung der Saccharose-Perzeption betonen, ist das Verhalten der Zucker gegenüber verschiedenen Spezies zum Teil unterschiedlich. Zu dem stammen die zur Verfügung stehenden Angaben in der Literatur über das Verhalten der Analogen aus verschiedenen Modellsystemen. Aus diesem Grund werden im Folgenden, bevor aus den Induktionen mit Turanose und Palatinose Rückschlüsse auf die Wirkungsweise von Saccharose gezogen werden, die Ergebnisse an dieser Stelle ausführlicher diskutiert.

Sind Turanose und Palatinose durch *A. thaliana* metabolisierbar? Im Allgemeinen gelten Turanose und Palatinose als durch Pflanzen nicht-metabolisierbar, da im Gegensatz zu Bakterien (Pikis et al., 2002) bisher keine Enzyme in Pflanzen beschrieben werden konnten, die Turanose oder Palatinose spalten. So konnte durch mehrstündige Inkubation Palatinose und Turanose in Tomatenzellkulturen (Sinha et al., 2002) und von Weizenembryonen (Loreti et al., 2000) nicht gespalten werden. Weiterhin konnten Fernie et al. (2001) durch Inkubation von Palatinose in Kartoffelknollenextrakten zeigen, dass die in diesem Extrakt enthaltenen Invertasen, ebenfalls nicht in der Lage sind diesen Zucker zu spalten. Ähnliches konnte Marx et al. (1997) für bestimmte fructanspaltende Enzyme aus Gräsern zeigen. Leider gibt es keine vergleichbaren Untersuchungen mit *A. thaliana* Protoplasten oder Zellextrakten. Dennoch kann durch die in der Literatur zahlreich zu findenden Experimente mit verschiedenen Spezies und Methoden davon ausgegangen werden, dass diese Zucker während der Inkubationszeit nicht gespalten wurden (obwohl der konkrete Beweis noch fehlt).

Für die Stromuliinduktionen bedeutet das Unvermögen von Pflanzen diese beiden Zucker für sich zugänglich zu machen, dass eine rein physische Interaktion mit einem Rezeptor oder einem entsprechenden Protein ausreicht die Signalkaskade anzustoßen und Stromulibildung zu induzieren. Wenn die Zellen Palatinose und Turanose über den gleichen Mechanismus registrieren wie Saccharose kann allgemein geschlussfolgert werden, dass eine Spaltung des *erkannten* Zuckers nicht zwingend für die Auslösung des Signals notwendig ist. Der Kreis möglicher Rezeptoren, lässt sich eingrenzen, wenn klar ist, ob die Zucker bereits auf der Oberfläche der Zellen erkannt werden, oder erst während oder nach ihrem Transport in das

Zelllumen.

Wirken Turanose und Palatinose extra- oder intrazellulär? Frühe Experimente zur Aufnahme von Palatinose und Turanose in Protoplasten von *Hevea* (Bouteau et al., 1999) und Soja (Schmitt et al., 1984) sowie die Versuche an Weizenembryonen durch Loreti et al. (2000) zeigen, dass diese Zucker im Gegensatz zu Saccharose in den entsprechenden Experimenten nicht aufgenommen werden konnten. Durch die Klonierung und die heterologe Expression von zwei Saccharosetransportern des Typs II (AtSUT2 und AtSUT9)⁴ aus *A. thaliana* und von Transportern des Typ I aus Zuckerrohr (ShSUT1) und Gerste (HvSUT1) konnte deren Substratspezifität genau untersucht werden (Chandran et al., 2003; Sivitz et al., 2005, 2007; Reinders et al., 2006). Die Typ I Transporter der monokotyledonen Pflanzen erwiesen sich als recht substratspezifisch und zeigten keine Affinität zu den hier untersuchten Saccharose-Analogen. Die beiden Typ II Transporter aus *A. thaliana* hingegen waren in der Lage mit geringer Rate Turanose zu transportieren. Sivitz et al. (2007) halten AtSUT9 auf Grund seiner hohen Affinität zu Saccharose und der ubiquitären Expression (auch in den Blättern) hauptverantwortlich für den Saccharoseimport in nicht vaskuläres Gewebe von *A. thaliana*. Für die durchgeführten Induktionen bedeutet dies, dass während der Inkubation der Blattstücken keine Palatinose und Turanose, wenn überhaupt nur mit geringer Rate, das Zellinnere erreichte. Da sowohl Palatinose als auch Turanose (innerhalb der ersten Stunde) Stromuli induzierten und nicht nur Turanose, ist trotz der Möglichkeit von Turanoseimport, eher ein extrazellulärer als ein intrazellulärer Erkennungsmechanismus zur Auslösung der Stromulibildung zu vermuten.

Wer erkennt die Disaccharide? Wie bereits diskutiert, ist es zumindest für Turanose und Palatinose sehr wahrscheinlich und für Saccharose nicht ausgeschlossen, dass deren Erkennung außerhalb der Zelle stattfindet. Damit sind saccharosebindende Proteine in der Plasmamembran Kandidaten für Rezeptoren. Leider sind außer den Saccharosetransportern nur wenige andere saccharosebindende Proteine beschrieben, doch Rolland et al. (2006) spekulieren mit Blick auf das Hefesystem, dass die auch in Pflanzen vorkommenden G-Protein gekoppelte Rezeptoren als Saccharose- und Glukosesensoren, analog zu dem Gpr1-Gpa2 System fungieren könnten. Eine zweite Möglichkeit sehen die Autoren in SUT2, der ein nicht funktionaler Saccharosetransporter mit einer sehr großen zytoplasmatischen Schleife ist. SUT2 erinnert mit dieser Domäne sehr stark an die zwei in Hefe zu findenden, zu Transportern ähnlichen Hexosesensoren Snf3 und Rgt2 und könnte deshalb als Saccharosesensor in *A. thaliana* dienen. Eine dritte Gruppe von Proteinen, welche Saccharose extrazellulär binden können und bisher am besten verstanden werden, sind die Zellwandinvertasen, die neben ihrer enzymatischen auch eine Signalfunktion zu übernehmen scheinen (Roitsch et al., 2003).

Damit stehen der Pflanzenzelle mindestens drei potentielle extrazelluläre Rezeptoren für die Saccharose zur Verfügung. In wie weit die genannten Proteine und Prteinkomplexe neben Saccharose auch mit Palatinose und Turanose interagieren, ist leider nicht untersucht. Lediglich für die Zellwandinvertasen in Hefe ist bekannt, dass Palatinose deren Aktivität *in vivo* effektiv

⁴In *Arabidopsis* finden sich neun Saccharosetransporter ähnliche Gene, die in drei Subklassen fallen. Nur sieben der Gene codieren für funktionelle Transporter (Sauer 2004)

4. Zucker

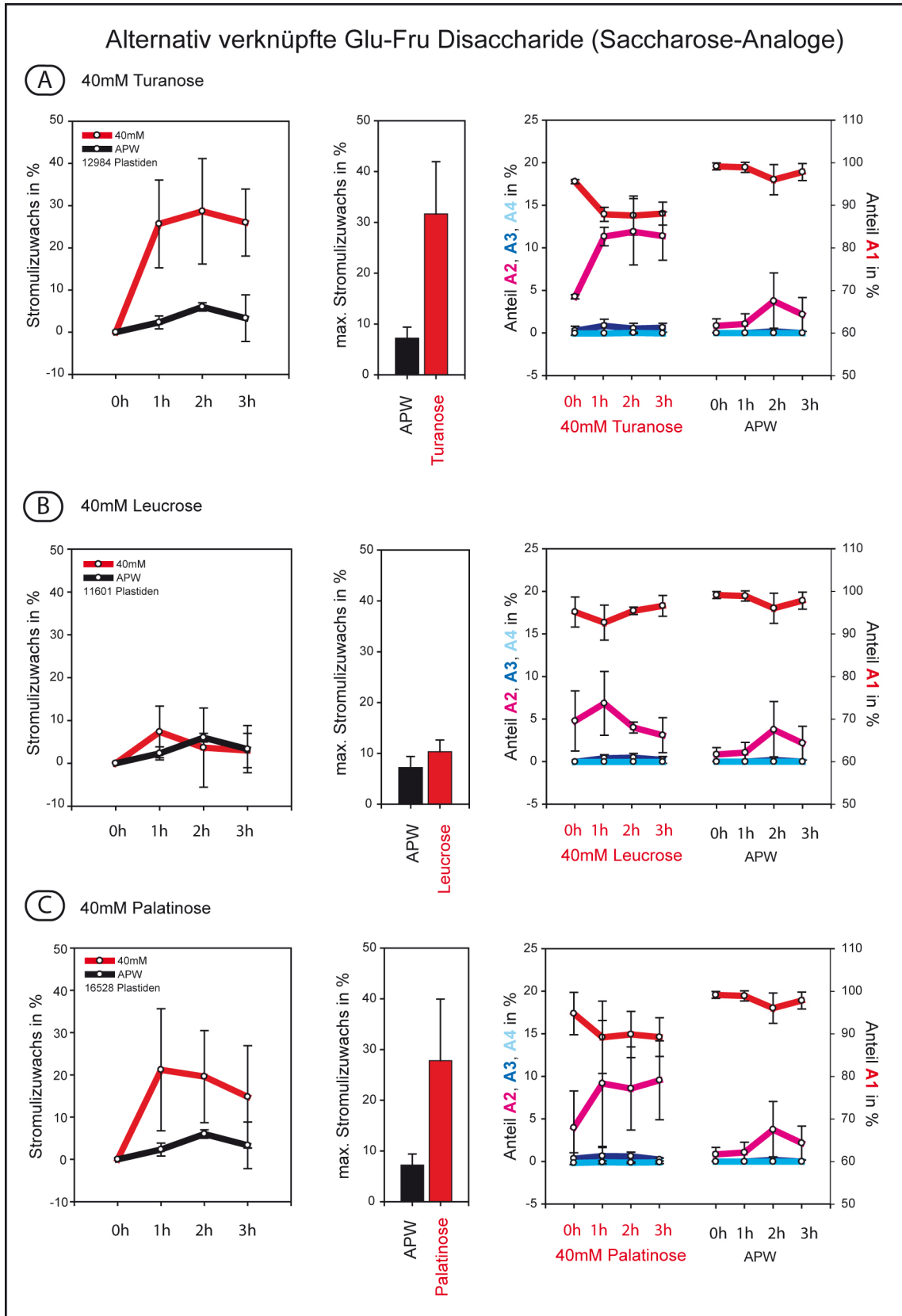


Abbildung 4.6.: Saccharose-Analoga (Fruktose-Glukose-Disaccharide) Palatinose, Turanose und Leucrose - Gezeigt sind die Induktionsversuche mit den genannten Zuckern, die in angegebener Stoffmenge in APW gelöst wurden. A1, A2, A3 und A4 entsprechen den Stromuliklassen, wie sie unter 3.2 auf Seite 17 eingeführt wurden. SH% bezeichnet die relative Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. Die Bedeutung der Diagramme ist unter 4.1 auf Seite 30 erläutert. Für mehr Details, siehe Text.

hemmt (Börnke et al., 2001), was auf eine Interaktion von Palatinose und den Invertasen schließen lässt. Inwieweit Palatinose die Aktivität pflanzlicher Invertasen beeinflusst wurde in den besagten Studien leider nicht untersucht.

Für die Stromuliinduktionen bedeutet dies, dass keine definitiven Aussagen über den oder die Rezeptor(en) der Disaccharide getroffen werden können. Es existieren aber für Saccharose etliche Hinweise auf Ausgangspunkte außerhalb der Zelle, von denen leider nicht bekannt ist, ob sie mit Palatinose oder Turanose interagieren.

Sind Turanose und Palatinose für die Zellen wirklich Saccharose-Analoga? Um zwischen der Metabolit- und der Signalfunktion zu unterscheiden wurden Saccharose-Analoga bereits früh eingesetzt (Schmitt et al., 1984), doch ist deren Aussagekraft über den Erkennungsmechanismus von Saccharose, wie die durch Roitsch et al. (2003) gesammelten Hinweise zeigen, begrenzt. In Tomatenzellkulturen konnten Turanose und Palatinose nur teilweise den Effekt von metabolisierbarer Saccharose imitieren. Beide Zucker führten zwar zur Transkriptionstaktivierung von CWI⁵ und PAL⁶, hatten aber keinen Einfluss auf die Transkription der kleinen Untereinheit der RUBISCO. Woraus die Autoren schlussfolgerten, dass sie weniger als Zuckersignale, sondern eher als stressbezogene Stimuli durch die Pflanze erkannt werden. Für diese Hypothese spricht, dass in den Tomatenzellkulturen, wie durch einen pilzlichen Elicitor, die Transkription von MAP-Kinasen induziert wird. Ein weiterer Bezug von Palatinose und Turanose zu biotischen Stress (Pathogene) findet sich in der Tatsache, dass diese Zucker durch manche pflanzenpathogene Bakterien als Energiespeicher produziert werden (Roitsch et al., 2003). Die für die Pflanze nicht zugängliche Energieresource der Bakterien (Börnke et al., 2001) könnte dem pflanzlichen Wirt als Elicitor für die Mobilisierung der Abwehr dienen. Die deutliche Abminderung des induktiven Effektes von Saccharose auf die Artemisin-Produktion in Keimlingen von *Artemisia annua* durch die Zufütterung von Palatinose spricht sogar für einen teils antagonistischen Effekt (Wang and Weathers, 2007).

Für die Stromuliinduktion bedeutet dies, dass nicht auszuschließen ist, dass die Stromuliinduktion durch Saccharose und die Analoga von unterschiedlichen Startpunkten (Rezeptoren) ausgeht und die Signalketten auf dem Weg zur Stromulibildung zusammenlaufen. Die Pflanze scheint die beiden Arten von Zuckern unterschiedlich zu interpretieren. In Bezug auf die Stromulibildung reagiert sie jedoch mit der gleichen Antwort. Die Bezeichnung Saccharose-Analoga ist demnach für Palatinose und Turanose im engeren Sinne nicht zulässig.

Welcher der drei vorgeschlagenen Mechanismen zur Saccharoseerkennung trifft nun zu?

Da nicht wirklich klar ist, ob Turanose und Palatinose wirklich als Analoga zu Saccharose gesehen werden können, kann über den Erkennungsmechanismus von Saccharose an dieser Stelle nichts Genaueres gesagt werden. Für Turanose und Palatinose jedoch ist eine extrazelluläre Erkennung am wahrscheinlichsten.

⁵CWI entspricht extrazelluläre *cell wall invertase*

⁶PAL entspricht Phenylalanin-Ammonium-Lyase

Über die biologische Aktivität von Leucrose ist wenig bekannt? Über die biologische Aktivität von Leucrose in pflanzlichen Geweben ist in der Literatur nur wenig zu finden und ist in den meisten Studien, in denen Turanose und Palatinose getestet werden, nicht mit einbezogen. Loreti et al. (2000) beschreiben jedoch, dass mit Leucrose gefütterte Gerstenkeimlinge mit Gewichts- und interner Zuckerzunahme reagieren. Leucrose hat somit in diesen Experimenten im Gegensatz zu Palatinose und Turanose die selbe Wirkung wie Saccharose. Daraus schlossen die Autoren, dass Leucrose im Gegensatz zu Palatinose und Turanose durch die Keimlinge metabolisiert werden konnte. In den hier durchgeführten Induktionen konnte Leucrose nicht wie die anderen Zucker eine Zunahme von Stromuli induzieren. Der von Loreti et al. (2000) eingesetzte Test ist leider sehr indirekt und die Ergebnisse passen nicht den von Marx et al. (1997), der aus verschiedenen Gräsern isolierte Fructosidasepräparationen auch mit Leucrose inkubierte und keine Spaltung messen konnte.

Die Tatsache, dass Stromuli nicht durch Leucrose induziert werden konnten zeigt zumindest sicher, dass eine Fruktoseeinheit in Kombination mit einer Glukoseeinheit nicht ausreicht um an den putativen Rezeptor signalauslösend zu binden. Weiterhin weist die ausgebliebene Stromuliinduktion darauf hin, dass die Glukoseeinheit des Disaccharides nicht freigesetzt werden konnte.

4.4. Stromuliinduktion durch Glukose und Fruktose

4.4.1. Glukose und Fruktose (Bausteine der Saccharose)

Wie in der Einleitung zur saccharoseabhängigen Induktion beschrieben, besteht ein Weg zur saccharoseabhängigen Stromuliinduktion darin, dass die Saccharose gespalten wird und deren Spaltprodukte eine Stromulibildung auslösen können. Besonders von Glukose ist bekannt, dass sie ebenfalls eine doppelte Funktion als Signalmolekül und Energiespeicher besitzt und extern angeboten, einen großen Einfluss auf die Genexpression und Entwicklung der Pflanze hat. Auf Grund seiner Wirkung auf die Keimlingsentwicklung, wird Glukose schon seit längerer Zeit als ein Morphogen eingestuft. Im Folgenden wurde überprüft, ob Glukose und Fruktose einen Einfluss auf die Stromuligenese haben. Die Induktionen wurden mit einer Konzentration von 40 mM für jeden Zucker dreimal durchgeführt.

Ergebnis Aus den Kennwerten für die Induktionsversuche mit 40 mM Glukose und 40 mM Fruktose wird deutlich, dass nur die Glukose eine stromuliinduzierende Wirkung hat (Abb. 4.7 auf Seite 50 A und B). Wie bereits für Saccharose, Turanose und Palatinose beschrieben, steigt auch hier die Stromulihäufigkeit im Beobachtungszeitraum zügig an. Die Induktionskompetenz liegt ebenfalls bei ca 30 %-Punkten und der Anteil von Plastiden mit mehr als einem Stromulus (hauptsächlich A2) steigt, wie für die Disaccharide beschrieben, im Verlauf des Experimentes an. Einziger Unterschied, der sich abzeichnet, ist die Kinetik mit dem die Stromulihäufigkeit zunimmt. Bei Saccharose, Turanose und Palatinose war eine rapide Zunahme innerhalb der ersten Stunde, gefolgt von einem deutlich flacheren Anstieg in der zweiten Stunde, zu beobachten. Im Fall der Glukose scheint die Zunahme von stromulitragenden Plastiden etwas

langsamer, dafür etwas stetiger zu sein. Dennoch fällt die Stromulihäufigkeit nach Erreichen eines Maximums bei 2 h während der 3_{ten} Stunde ab. 40 mM Fruktose verhält sich bezüglich der drei Kennwerte wie die Pufferkontrolle.

4.4.2. 3-Oxo-Methyl-Glukose ist ein physiologisch aktives Glukose-Derivat

Auch von Glukose existieren Derivate, die fähig sind zelluläre Reaktionen auszulösen, aber nicht in den Metabolismus eingeschleust werden können. Eines dieser Analogen, welches sehr häufig in tierischen und pflanzlichen Studien eingesetzt wird, ist 3-Oxo-Methyl-Glukose (3-OMG). Das Schicksal von 3OMG in Pflanzenzellen nach externer Applikation wurde eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 3-OMG importiert und wahrscheinlich durch Hexokinasen phosphoryliert wird. Nach der Phosphorylierung akkumuliert es als phosphorylierte Variante (3-OMG-6P) im Zytosol und wird praktisch nicht metabolisiert (Cortès et al., 2003). Cortès et al. (2003) konnten auf zwei verschiedenen Wegen zeigen, dass die Phosphorylierung von 3-OMG ca. 600 mal langsamer abläuft als von Glukose. Die Autoren errechneten, dass 3-OMG nach 48 h weniger als 0,1 % der respirierten Substrate ausmacht. Weiterhin zeigen Gewebe, die mit 3-OMG über längere Zeit (48 h) inkubiert wurden eine Umstellung des Stoffwechsels wie sie bei Zellen unter Glukose-Mangel beobachtet werden. Aus diesen Gründen kann im hier getesteten Zeitraum davon ausgegangen werden, dass der Beitrag von 3-OMG zur Respiration zu vernachlässigen ist. Die vier Induktionen wurden mit 40 mM durchgeführt.

Ergebnis

3-OMG induziert Stromuli. 3-OMG ist wie Glukose in der Lage innerhalb des Beobachtungszeitraumes eine deutliche Stromulibildung zu induzieren. Wie bei den anderen bisher beschriebenen, stromuliinduzierenden Zuckern nimmt die Stromulihäufigkeit über die Zeit zu. Der Maximale Stromulizuwachs liegt ebenfalls bei ca. 30 % und der Anteil von Plastiden mit mehr als einem Stromuli steigt ebenfalls sehr deutlich. Ein Unterschied der auffällt ist, dass die Zunahme der Stromulihäufigkeit im Vergleich zu den bisher untersuchten Zuckern langsamer und fast linear abläuft. Damit erreicht die Stromulihäufigkeit im Beobachtungszeitraum wie bisher beobachtet auch kein Maximum bei 2 h, sondern nimmt über diese Zeit hinaus weiter zu, weshalb die maximalen Stromulizuwächse bei 3-OMG erst nach 3 h erreicht werden. Genau so kontinuierlich wie die Stromulihäufigkeit zunimmt, verschiebt sich das Verhältnis der Stromuliklassen. Eine deutlichere Zunahme von Plastiden mit mehr als einem Stromulus (neben A2 nahm auch A3 deutlich zu) konnte bei keinem anderen Zucker beobachtet werden.

4.4.3. Diskussion - Glukose, Fruktose und 3-OMG

Wie passen die Ergebnisse von Turanose und Palatinose zu den Ergebnisse der Glukose? Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Versuchen sprechen für eine turanose- und palatinosespezifische Induktion, über einen extrazellulären Rezeptor. Da eine Spaltung von Turanose und Palatinose in Glukose und Fruktose nicht möglich ist, ist die Interferenz mit einem nach der Freisetzung von Glukose ausgelöstem Signal ausgeschlossen. Die von Glukose abhängige Stromuliinduktion lässt einen zweiten, von Turanose und Palatinose unabhängigen

4. Zucker

Ausgangspunkt der Signalkette postulieren. Das Glukose ebenfalls befähigt ist Stromuli zu induzieren bringt in die saccharoseabhängige Induktion einen neuen Aspekt. Da sich nun nicht ausschließen lässt, dass Saccharose zumindest einen Teil seiner Wirkung über die in ihr vorhandene Glukose bewirken kann. Diese kann durch zytosolische Invertasen und Saccharosesynthase aus Saccharose mobilisiert werden. Das unabhängig von einander verschiedene Systeme zum Erkennen von Glukose und Saccharose oder deren Analoge in der Pflanze bisher entdeckt wurden, fassen Rolland et al. (2006) zusammen und zählen das Hexokinasesystem, G-Protein-Gekoppelte-Rezeptoren und die nicht funktionale Hexosetransporter mit besonders großen zytosolische Domänen auf.

Was ist der Ausgangspunkt für eine stromuliinduzierende Signalkette? Obwohl, der Zelle die soeben aufgezählten Möglichkeiten zur Verfügung stehen Glukose als Molekül zu registrieren, besteht immer noch die Möglichkeit, dass die durch Glukose induzierte Stromulibildung erst durch Metabolisierung des Zuckers erfolgt. Dadurch, dass das Schicksal von 3-OMG in Pflanzenzellen sehr gut untersucht ist (Cortès et al., 2003) und gezeigt wurde, dass sie so gut wie nicht nach ihrer Phosphorylierung metabolisiert wird, kann diese Möglichkeit der Stromuliinduktion ohne Zweifel ausgeschlossen werden. Das 3-OMG ebenfalls Stromuli induziert, lässt schlussfolgern, dass Glukose analog zu Turanose und Palatinose selbst als Signal erkannt wird. Mit diesen Experimenten kann leider noch keiner der Glukosesensoren als der für Stromuli verantwortliche Sensor eindeutig identifiziert werden. Hinweise auf eine Verbindungen zu Plastiden gibt es für das Hexokinasesystem und den G-Protein Rezeptor. So besitzen zwei der zu Hexokinase ähnlichen Proteine aus *A. thaliana* ein Plastidentargetingsignal und in Tabak konnte die Hxk2 *in planta* und *in vitro* plastidenlokalisiert nachgewiesen werden (Giese et al., 2005). Für eine Verbindung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit den Plastiden spricht, die ebenfalls *in vivo* und *in vitro* nachgewiesene Interaktion des einzigen in *A. thaliana* codierten G α Proteins (GPA1) und dem in der Plastidenmembran lokalisierten *thylakoid formation 1*-Proteins (Huang et al., 2006). Eine generelle Bedeutung von GPA1 in der Glukoseperzeption zeigt sich durch die veränderte Empfindlichkeit der *knock-out* Mutanten gegenüber Glukose in verschiedenen Entwicklungsstadien (Rolland et al., 2006).

Für die Stromuliinduktion bedeutet die Induzierbarkeit durch 3-OMG, dass das Analog und wahrscheinlich auch die Glukose durch einen Rezeptor und nicht durch Metabolisierung erkannt werden. Über den Rezeptor kann zwar keine definitive Aussage getroffen werden, aber der Weg über eine Hexokinase ist am wahrscheinlichsten.

Die Bedeutung der Saccharose bleibt ungeklärt. Es sind keine experimentellen Daten zu finden, die zeigen ob Saccharose und seine Analogen über den gleichen Rezeptor erkannt werden. Weshalb offen bleiben muss, ob die Stromuliinduktion von Turanose, Palatinose und Saccharose auf dem gleichen Mechanismus beruht oder ob verschiedene Erkennungsprinzipien vorliegen die beide zur Stromulibildung führen. Die Tatsache das Glukose Stromuli induzieren kann stellt ebenfalls eine spezifische Saccharoseinduktion in Frage, da die in ihr enthaltene und leicht freigesetzte Glukose für die induzierende Wirkung verantwortlich sein kann. Die Wirkungsweise von Saccharose kann mit den vorliegenden Daten nicht weiter eingegrenzt

werden.

Fruktose hat keine stromuliinduzierende Wirkung. Es gibt einige Spekulationen, dass Hexosekinasen eine generelle Funktion in der Perzeption von Zuckern haben und so neben Hexokinase auch von Fruktokinasen (Pego and Smeekens, 2000) diese Funktion zukommen kann. Diese Ansicht stützt zum einen die regulative Funktion von Fruktokinasen in Säugern und zum anderen die Isolation einer mannoseinsensitiven *A. thaliana* Mutante, die keine Fruktokinaseaktivität mehr aufwies (Pego et al., 2000) und deshalb *frk2* genannt wurde. Leider ist keine Literatur über eine nähere Charakterisierung dieser Mutante oder dem entsprechenden Protein zu finden.

Da Fruktose keine Induktion von Stromuli auslöst sind die Fruktokinasen kein Startsignal für Stromuligenese. Da Fruktosen in die Glykolyse eingespeist werden und sich somit der Weg von Glukose und Fruktose im Stoffwechsel treffen, muss das Glukose Signal außerhalb dieses gemeinsamen Weges liegen.

4.5. Weitere Glukose enthaltende Disaccharide

Glukose ist nicht nur ein wichtiger Metabolit und Teil des Transportzuckers Saccharose, sondern kommt im pflanzlichen Organismus in vielfältiger Form, verbunden mit sich selbst oder mit anderen Kohlehydraten, vor. Diese Verbindungen dienen dabei zum Beispiel auch als strukturgebende Komponenten (Zellulose). Rolland et al. (2006) führen aus, dass durch verschiedene Stressbedingungen es zum Beispiel zum Abbau der Zellwände kommen kann und auf diese Weise im Apoplasten Zuckersignale erzeugt werden können. Zu diesen auftretenden Zuckern zählt zum Beispiel Zellobiose.

Um zu hinterfragen, ob weitere Glukose-beinhaltende Disaccharide, als Quelle für ein stromuliinduzierendes Signal dienen können, wurden beispielhaft drei Disaccharide der Glukose auf ihre Induktionskompetenz getestet. Basierend auf Tests der Substratspezifität verschiedener Saccharosetransporter, wurde Zellobiose, Gentiobiose und Maltose ausgewählt (Chandran et al., 2003; Sivitz et al., 2005; Reinders et al., 2006; Sivitz et al., 2007).

Zellobiose Bei Zellobiose sind die Glukose-Einheiten an dem ersten und vierten C-Atom betaglycosidisch mit einander verknüpft (Abb. 4.1 auf Seite 31 C). Zellobiose entsteht als Zwischenprodukt des durch Zellulasen katalysierten, enzymatischen Abbaus von Zellulose. Keiner der bisher auf die Transportspezifität hin untersuchten Saccharosetransporter (*AtSUC2*, *AtSUC9*, *HvSUT1* und *ShSUT1*) transportiert Zellobiose. Dennoch kann nach Loreti et al. (2000) Zellobiose durch Gerstenembryonen metabolisiert werden. Die Induktionsversuche wurden dreimal durchgeführt.

Gentiobiose Gentiobiose ist die betaglycosidische Verbindung von zwei Glukosemolekülen über das C1 und das C6-Atom. Dieser Zucker kommt in Pflanzen natürlicher Weise vor und ist Bestandteil des Crocinmoleküls, welches sich in Safran finden lässt und für dessen Farbe

4. Zucker

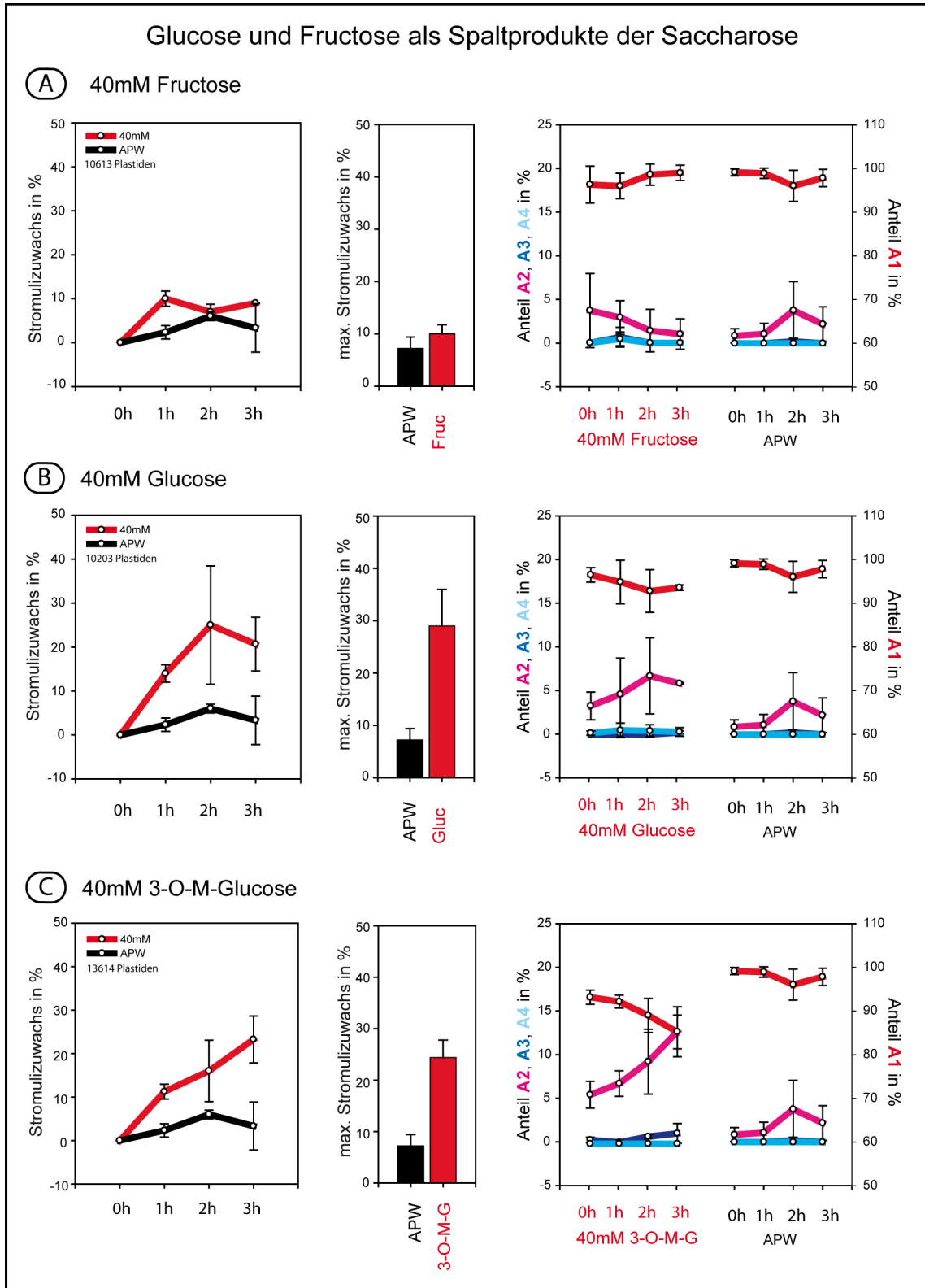


Abbildung 4.7.: Fructose und Glucose sowie das Glukoseanalog 3-O-Methyl-Glucose - Gezeigt sind die Induktionsversuche mit den genannten Zuckern, die in angegebener Stoffmenge in APW gelöst wurden. A1, A2, A3 und A4 entsprechen den Stromuliklassen, wie sie unter 3.2 auf Seite 17 eingeführt wurden. SH% bezeichnet die relative Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. Die Bedeutung der Diagramme ist unter 4.1 auf Seite 30 erläutert. Für mehr Details, siehe Text.

verantwortlich ist. Auch für Gentiobiose gilt, dass keiner der untersuchten Saccharosetransporter (AtSUC2, AtSUC9, HvSUT1 und ShSUT1) Gentiobiose transportiert und wie Zellobiose können Gerstenkeimlinge auch Gentiobiose metabolisieren. Die Induktionsversuche wurden viermal durchgeführt (Abb. 4.1 auf Seite 31 C).

Maltose Maltose ist das alphasglycosidische Pendant zu Zellobiose und entsteht in den Plastiden als Zwischenprodukt während des Stärkeabbaus durch die Wirkung von β -Amylasen und kann durch Maltosetransporter ins Zytosol gelangen. Der weitere Abbau zu phosphorylierter Glukose erfolgt durch Phosphorylasen im Stroma oder dem Zytosol. Maltose wird im Gegensatz zu den beiden anderen Disacchariden von allen daraufhin untersuchten Saccharosetransportern (AtSUC2, AtSUC9, HvSUT1 und ShSUT1) als Substrat erkannt und fast so gut transportiert wie Saccharose. Die Induktionsversuche wurden viermal durchgeführt (Abb. 4.1 auf Seite 31 C).

4.5.1. Ergebnisse

Maltose induziert als einziger der drei Disaccharide eine Zunahme der Stromulihäufigkeit Zellobiose und Gentiobiose verhalten sich bezüglich der drei Kennwerte wie die Pufferkontrolle. Dabei liegen die Werte für die Zunahme der Stromulihäufigkeit und der maximale Zuwachs nur wenige Prozentwerte über der Kontrolle. Alle drei ausgewerteten Experimente für Zellobiose und Gentiobiose verhielten sich sehr ähnlich, was sich in den kleinen Standardabweichungen widerspiegelt (Abb. 4.8 B und C).

Nicht ganz so gleichmäßig verhielten sich Maltose, weshalb auch vier Experimente ausgewertet wurden. Im Gegensatz zu Zellobiose und Gentiobiose, hat sich Maltose in allen vier Experimenten als deutlich stromuliinduzierend erwiesen. Die Anzahl der Stromuli nimmt deutlich über die Zeit zu und die Induktionskompetenz liegt wie bei den anderen stromuliinduzierenden Zuckern um die 30 %-Punkte. Des Weiteren verschiebt sich, wie bei anderen Zuckern, das Verhältnis der Stromuliklassen hin zu Plastiden mit mehr als einem Stromulus.

Sofort fallen die großen Standardabweichungen auf, die sich auf zwei verschiedene Kinetiken der Induktion zurückführen lassen. Bei zwei Experimenten war, wie bei den anderen stromuliinduzierenden Zuckern bereits beschrieben, eine sofortige Zunahme der Stromulihäufigkeit in den ersten 60min zu beobachten. In den beiden anderen Experimenten kam es zu einer verzögerten Reaktion, bei der es in den ersten 60min zu einem leichten Rückgang der Stromulihäufigkeit kam. Die Bildung von Stromuli setzte erst im Laufe der zweiten Stunde ein. Diese Verzögerung wird auch in der Verteilung der Stromuliklassen, hier aber mit geringerer Abweichung sehr deutlich.

4.5.2. Diskussion

Gentiobiose und Zellobiose werden nicht transportiert und metabolisiert. Von beiden Zuckern ist keine Signalwirkung bekannt. Um eine Wirkung hervorrufen zu können, müsste aller Wahrscheinlichkeit nach die Glukose freigesetzt werden. Beide Disaccharide werden aber von den bereits erwähnten Transportern nicht transportiert das heisst eine Spaltung

4. Zucker

wäre nur extrazellulär möglich. Dass sie durch Gerstenembryonen metabolisiert werden können, lässt vermuten, dass die Embryonen diese Zucker spalten können, was aber nicht bedeuten muss, dass sie innerhalb der Beobachtungszeit (wenige Stunden) von *A. thaliana* abgebaut werden können. Die fehlende Induktionskompetenz der beiden betaglycosidisch verknüpften Disaccharide lässt den Schluss zu, dass sie zum einen nicht extrazellulär wie Turanose und Palatinose rezeptorbasiert erkannt werden und dass sie zum anderen innerhalb des Beobachtungszeitraumes nicht in die Glukoseeinheiten zerlegt wurden.

Maltose wird transportiert und in Glukose gespalten. Dadurch dass Maltose mit ähnlicher Effizienz wie Saccharose durch die entsprechenden Transporter transportiert wird, ist davon auszugehen, dass sie während der Experimente das Zelllumen erreicht. Zytoplasmatische Maltose, die sonst aus dem Abbau der transitorischen Stärke stammt, wird schnell durch Glycosyltransferasen oder Glucosidasen zu einzelnen Glukoseeinheiten abgebaut. Dabei entstehen nach dem durch Chia et al. (2004) vorgeschlagenen zytoplasmatischen Maltosemetabolismus Glukose-1-Phosphat und Glukose. Glukose-1-Phosphat wird über UDP-Glukose in Saccharose eingebaut. Die Glukose wird hingegen über Hexokinase aktiviert und über Fruktose-6-Phosphat ebenfalls hauptsächlich für Saccharoseproduktion verwendet.

Nach dem für die Maltose durch Chia et al. (2004) vorgeschlagenen Abbau, geht mindestens eine Hälfte der Glukoseeinheiten den selben Weg, wie er von der in den Induktionsexperimenten eingesetzten Glukose beschrieben wird und kommt somit mit der Hexokinase in Kontakt. Nach dem vorgeschlagenen Modell lässt sich die durch Maltose verursachte Stromuliinduktion durch die frei werdenden Glukoseeinheiten und deren anschließenden Aktivierung durch Hexokinasen erklären und passt so zu den Ergebnissen der Glukose und 3-OMG Induktionen. Der für die Freisetzung der Glukoseeinheiten notwendige Umbau gibt einen Erklärungsansatz für die ca. einstündige Verzögerung der Reaktion. Doch es wird weniger die rein enzymatische Reaktion für die Verzögerung verantwortlich sein, als die Tatsache, dass während des Tages nur wenig Maltose im Zytoplasma zu finden ist und die Zelle auf ein so hohes Maltoseangebot nicht vorbereitet zu sein scheint. Die Maltose abbauenden Enzyme werden wohl, wie zu Beginn der Nacht, erst exprimiert (Chia et al., 2004).

4.6. Trehalose, ein Glukose-Disaccharid mit besonderer Bedeutung

Ein Glukose-Disaccharid, dem aber eine besondere Bedeutung zukommt ist die Trehalose. Bei Trehalose sind die Glukose Moleküle über ihre beiden ersten C-Atome miteinander verbunden. Da in Trehalose beide anomere C-Atome der Glukoseeinheiten miteinander verbunden sind, handelt es sich wie bei der Saccharose um einen nicht-reduzierenden Zucker. Im Gegensatz zu reduzierenden Zuckern, wie es die anderen verwendeten Glu-Disaccharide waren, sind nicht-reduzierende Zucker chemisch stabiler. Aus diesem Grund können sie zu höheren Konzentrationen akkumuliert und für Ferntransport eingesetzt werden. In allen lebenden Organismen kann entweder Saccharose oder Trehalose als nicht-reduzierender Zucker gefunden werden. Pflanzen jedoch sind die einzigen, die beide Zucker synthetisieren können. In Mikroorganismen und Invertebraten stellt Trehalose einen wichtigen Energiespeicher dar und wird als Teil verschie-

4.6. Trehalose, ein Glukose-Disaccharid mit besonderer Bedeutung

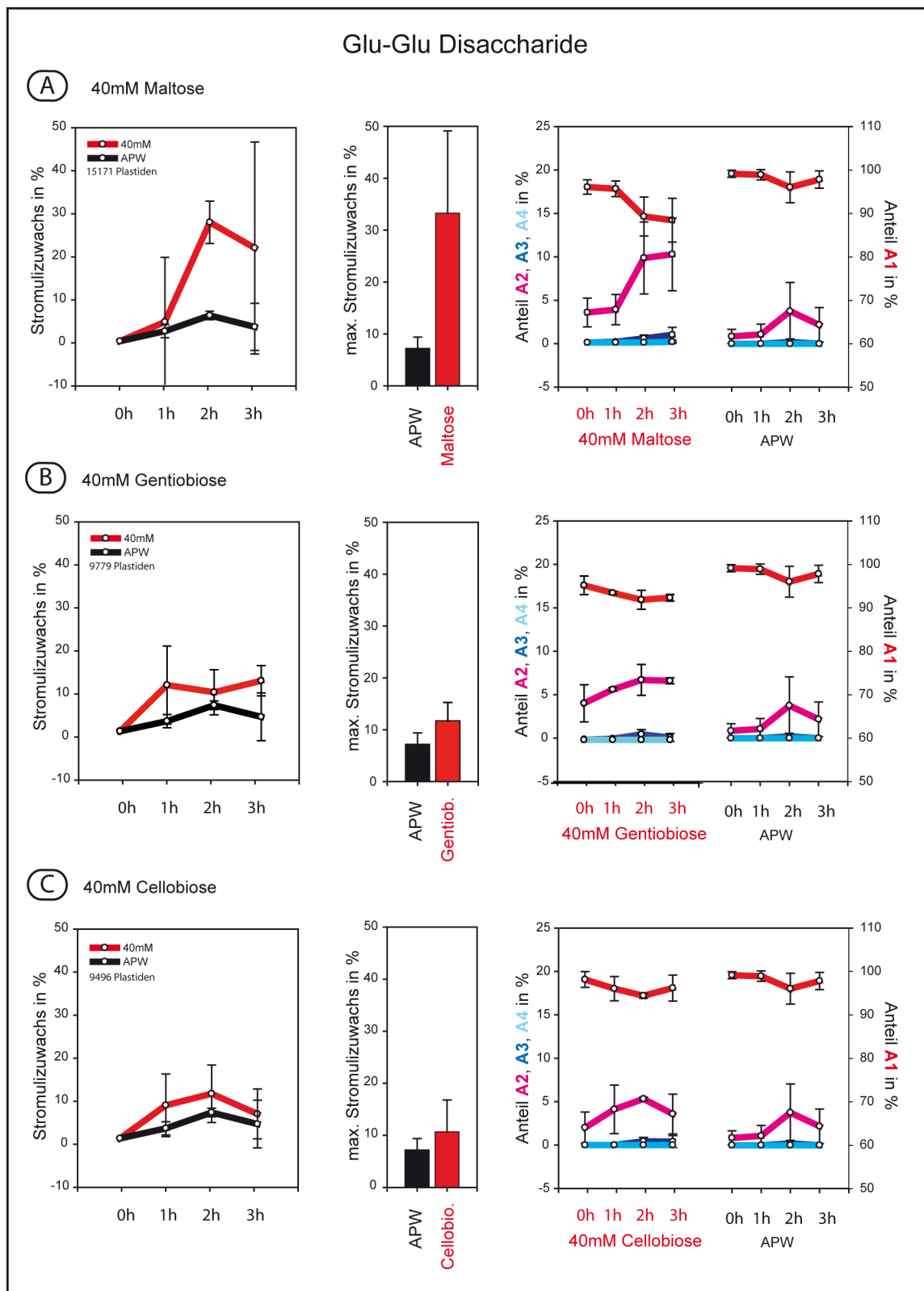


Abbildung 4.8.: Disaccharide der Glukose - Gezeigt sind die Induktionsversuche mit den genannten Zuckern, die in angegebener Stoffmenge in APW gelöst wurden. A1, A2, A3 und A4 entsprechen den Stromuliklassen, wie sie unter 3.2 auf Seite 17 eingeführt wurden. SH% bezeichnet die relative Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. Die Bedeutung der Diagramme ist unter 4.1 auf Seite 30 erläutert. Für mehr Details, siehe Text.

4. Zucker

dener Abwehrmechanismen zur Überwindung von Stress akkumuliert. Es stabilisiert dabei Proteine und Biomembranen, die bei erhöhten Temperaturen, hydrostatischem Druck, bei Austrocknung, Nährstoffmangel, osmotischem oder oxidativem Stress sowie bei der Exposition von verschiedenen toxischen Substanzen geschädigt werden können (Schluepmann et al., 2004).

In den meisten Pflanzen findet sich abhängig von Gewebe und Spezies, Trehalose in sehr geringen Konzentrationen (weniger als ein mg/g Trockengewicht) (Schluepmann et al., 2004). Aus diesem Grund wird es in Pflanzen wahrscheinlich nicht als Schutzstoff fungieren, sondern diese Rolle nur in spezialisierten, besonders gegen Austrocknung toleranten Spezies erfüllen. Es häufen sich aber die Hinweise darauf, dass die phosphorylierte Form der Trehalose (Trehalose-6-Phosphat), wie sie als Zwischenprodukt der Trehalosesynthese in Pflanzen entsteht, ein wichtiges Signal darstellt, welches den Metabolismus und die Entwicklungsprozesse aufeinander abstimmt und hilft auf verschiedene Stress auslösende Bedingungen zu reagieren. Da die Effekte, welche durch veränderte Saccharose-6-Phosphat- und Trehalose-6-Phosphat- Level in den Zellen zu beobachten sind sich unterscheiden, werden unterschiedliche Aufgaben für die beiden Zuckerphosphate diskutiert. Dennoch scheint es wichtige Interaktionen zwischen den beiden Zuckern zu geben. So lässt sich durch Applikation von Saccharose in Keimlingen von *A. thaliana* bereits nach 30 min Inkubation eine deutliche Akkumulation von Trehalosephosphatsynthase5-(AtTPS5)-Transkripten und im späteren Verlauf von T-6-P beobachten (Schluepmann et al., 2004). Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von T-6-P ergibt sich durch den hohen Grad der Regulierung ihrer Synthese- und Abbauenzyme (TPS und TPP) durch Stimuli, wie Licht, weitere Zucker, Hunger, diurnalen Rhythmus und Cytokinin.

Auf Grund der integrativen Funktion von Trehalose auf den Stoffwechsel wurde die Wirkung dieser auf die Stromulihäufigkeit untersucht. Die drei Induktionen wurden mit 40 mM des Zuckers durchgeführt.

4.6.1. Ergebnis

Trehalose induziert keine Zunahme der Stromulihäufigkeit 40 mM Trehalose waren im Beobachtungszeitraum von 3 h nicht in der Lage Stromulibildung zu induzieren (Abb. 4.9). Es konnten weder bedeutend mehr Plastiden mit Stromuli gefunden werden, noch verschob sich das Verhältnis zwischen den einzelnen Stromuliklassen.

4.6.2. Diskussion

Trehalose könnte über die Inhibierung von Hexokinase die gluckoseabhängie Stromuliinduktion hemmen. Obwohl Trehalose eine bedeutende Rolle in der Regulation des Zellstoffwechsels zugesprochen wird kann Trehalose keine Stromulibildung induzieren. Leider liegen über Trehalose keine Transporterdaten vor, weshalb nicht gesagt werden kann, ob und wenn ja auf welchem Weg sie in die Zelle gelangt. Das extrazellulär angebotene Trehalose fähig ist, Wirkung auf die Zelle zu entfalten und wahrscheinlich in die Zelle gelangt zeigt die gehemmte Entwicklung von *A. thaliana*-Keimlingen durch trehalosehaltiges Medium. Außerdem hat extrazelluläre Trehalose einen Einfluss auf die Transkription bestimmter Gene (Wingler et al., 2000; Schluepmann et al., 2003). Weiterhin ist durch die Trehalose-Exposition von Keimlingen

4.6. Trehalose, ein Glukose-Disaccharid mit besonderer Bedeutung

ein Anstieg der zellulären Trehalose-6-Phosphat-Konzentration zu beobachten (Schluepmann et al., 2004).

Obwohl *A. thaliana* über eine Trehalose spaltende Trehalase mit extrazellulärer katalytischer Domäne verfügt, legt das Ausbleiben, der Induktion die Vermutung nahe, dass eine Spaltung der Trehalose in die Glukoseeinheiten, im Beobachtungszeitraum nicht vorgekommen. Ein Grund dafür könnte die spezifische Expression der Trehalase in Blüten und Samen sein (Paul et al., 2008). Trotz der ausbleibenden Induktion ist nicht auszuschließen, dass Trehalose mit der Stromulibildung interferieren kann. Als Regulator des Kohlehydratmetabolismus (Paul et al., 2008) könnte sie einen Einfluss auf die Stromuliinduktion anderer Zucker haben. Wie Schluepmann et al. (2004) diskutieren, ist der Trehalosemetabolismus und dessen regulierende Wirkung in Pflanzen ähnlich zu Hefe. Aus diesem System ist bekannt, dass Trehalose ein effektiver allosterischer Inhibitor der Hexokinase (Rolland et al., 2006) ist und in Hefe den Einstrom von Glukose in die Glykolyse reguliert (Schluepmann et al., 2004). Für eine ähnliche zentrale Rolle in Pflanzen sprechen die Erkenntnisse, dass Pflanzen mit verändertem Trehalosemetabolismus verändert auf Zucker zugreifen (Schluepmann et al., 2003). Inwieweit Trehalose in der Lage ist Glukose- oder saccharoseabhängige Stromuliinduktion zu beeinflussen bleibt zu untersuchen. Ein nachweisbarer Einfluss würde weitere Hinweise über die Integration der Stromuli in den Zellstoffwechsel und zu dem über den Wirkmechanismus von Trehalose auf den Zuckerhaushalt liefern.

Von anderen Zuckern, die ebenfalls keine Induktion hervorgerufen haben (Zello- und Gentiobiose), könnte man ähnliches nicht vermuten, da ihnen nicht wie der Trehalose eine regulative Bedeutung zu kommt.

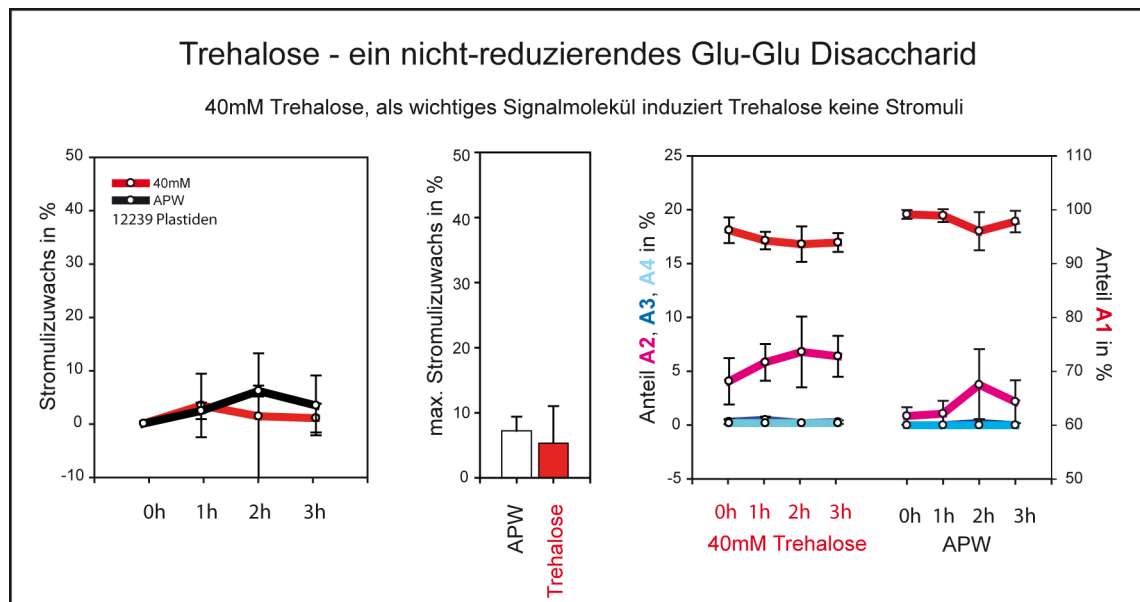


Abbildung 4.9.: Trehalose, ein Glu-Disaccharid mit besonderer Bedeutung - Gezeigt sind die Induktionsversuche mit Trehalose, die in angegebener Stoffmenge in APW gelöst wurde. A1, A2, A3 und A4 entsprechen den Stromuliklassen, wie sie unter 3.2 auf Seite 17 eingeführt wurden. SH% bezeichnet die relative Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. Die Bedeutung der Diagramme ist unter 4.1 auf Seite 30 erläutert. Für mehr Details, siehe Text.

4.7. Wirkung ausgewählter Zucker auf Chloroplasten von *A. thaliana*

Wie die Induktionsversuche mit den verschiedenen Zuckern zeigen, scheinen die Stromuli in das Netzwerk des Zuckermetabolismus eingebettet zu sein. Aus den Eingangs genannten Gründen diente die Epidermis als Modellsystem für die Induktionen. Dies erleichterte zwar die Datenaufnahme doch es erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Grund ist die Tatsache, dass der Zuckerhaushalt der Zelle sich zwischen photosynthetisch aktiven und heterotrophen Geweben unterscheidet (Rolland et al., 2006). Auf diese Weise kann das umfangreiche Wissen aus chloroplasten tragenden Geweben nicht einfach auf die Epidermis übertragen werden. Für die Interpretation der Induktionsdaten war es deshalb wichtig einzuschätzen, wie ähnlich sich die Plastiden der Epidermis und des Paranchyms sind. Neben der Ultrastruktur stand im Vordergrund, ob Chloroplasten auf ähnliche Weise auf die Zucker reagieren, wie es die Epidermisplastiden taten.

4.7.1. Einordnung von Epidermisplastiden

Morphologisch ist die Zuordnung der Epidermisplastiden zu den verschiedenen Plastidenformen bei *A. thaliana* nicht eindeutig möglich, höchstwahrscheinlich handelt es sich bei ihnen um eine Mischform aus Leuko- und Chloroplasten. So zeigen sie mit einem LSM nachweisbar rote Autofluoreszenz, was auf Chlorophylle hinweist. Solche Autofluoreszenz der Epidermisplastiden findet sich auch in anderen Spezies, wie *Vicia faba* (Omasa et al., 2009). Das dieses Chlorophyll in ein Photosystem eingebaut sein muss und fähig ist Elektronen an einen Akzeptor weiter zu geben konnte in *Vicia faba* durch die Messung der Quantenausbeute des PSII einzelner Epidermisplastiden gezeigt werden (Omasa et al., 2009). Weiterhin verfügen die Epidermisplastiden, genau wie Chloroplasten über ein lamellares Endomembransystem, welches zwar bei Weitem nicht so ausgeprägt ist⁷, aber dennoch eine Membranstapelung erkennen lässt (Abb. 4.13) und sicher Proteinkomponenten der Photosynthesekette beherbergen könnte. Es ist somit anzunehmen, dass Epidermisplastiden fähig sind Photosynthese zu betreiben.

4.7.2. Reaktion auf verschiedene Zucker

Obwohl die Epidermisplastiden diese den Chloroplasten ähnliche Morphologie haben, ist nicht klar in wie weit ihre physiologische Aktivität vergleichbar ist. Um dennoch eine Idee zu bekommen, ob die Chloroplasten auf ähnliche Weise wie die Plastiden der Epidermis auf Saccharose, Glukose und Sorbitol reagieren⁸, wurde auf die ausgewerteten z-Stapel der bereits durchgeführten Induktionen zurückgegriffen. In diesen Aufnahmen, sind neben der Epidermis auch die oberen Chloroplasten und die mit ihnen assoziierten Stromuli des Palisadenparenchymes abgebildet. Zur Einschätzung der Reaktion des Parenchymes, wurde die Stromulihäufigkeit bestimmt. Dabei wurden nur Chloroplasten einbezogen, die gänzlich

⁷Es ist keine klare Teilung in Grana- und Stromathylakoide möglich.

⁸Es wurde jeweils nur ein Experiment pro Behandlung ausgewertet, die Wiederholungsexperimente zeigen ein vergleichbares Verhalten.

abgebildet waren, so dass keine Fehlzuordnung erfolgen konnte. Die Anzahl Chloroplasten, die in die Zählung einbezogen werden konnten schwankte zwischen den einzelnen Experimenten und Zeitpunkten stark (Abb. 4.10 A'). Die erhaltenen Ergebnisse werden auch hier als relative Stromulihäufigkeit (SH%) angegeben, die aber nicht wie bei der Epidermis alle Plastiden des Gewebes, sondern nur die zu dem Zeitpunkt sichtbaren enthält (Abb. 4.10). Da Chloroplasten enthaltendes Gewebe im allgemeinen als arm an Stromuli gilt (Hanson and Sattarzadeh, 2008) wurde zunächst die Grundstromulihäufigkeit der Epidermis mit den Werten aus dem Mesophyll verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Das Mesophyll hat keine wesentlich geringere Stromulihäufigkeit als die Epidermis. Von den ganz abgebildeten Chloroplasten in vier untersuchten Blättern lag der Anteil stromuliträger Chloroplasten im Parenchym unbehandelter Blätter zwischen 7% und 15%⁹. Beim Vergleich dieser durchschnittlich 10% aus dem Palisadenparenchym mit dem Mittelwert von 17% (*Stabw* = 7%) aus der Epidermis wird deutlich, dass der Unterschied zwischen den beiden Geweben nicht so groß ist, wie aus den Angaben in der Literatur anzunehmen wäre. Bringt man dies zusammen mit den Ähnlichkeiten der Ultrastruktur und der Ausstattung mit Chlorophyll und dessen Fähigkeit Elektronentransport zu bewerkstelligen gleichen sich die Plastiden der Epidermis und des Parenchym auf erstaunliche Weise.

Chloroplasten reagieren auf Glucose, Saccharose und Sorbitol wie die Plastiden der Epidermis. Die Chloroplasten reagieren auf die gebotenen Zucker und die Kontrollbedingungen wie die Epidermisplastiden. Glukose und Saccharose induzieren Stromuli, Sorbitol und APW haben hingegen keinen Effekt (Abb. 4.10 A). Die bestimmte Stromulihäufigkeit erreicht bei Glukose und bei Saccharose einen ähnlichen maximalen Wert (zwischen 40 %- und 60 %-Punkten), wie bei den Epidermisplastiden. Dass diese Zunahme bereits ohne Quantifizierung sichtbar wird, ist in den in Abbildung 4.10 B gezeigten Bildausschnitten zu erkennen. Auch wenn in die Graphen der Abbildung 4.10 A nur eines der mindestens dreimal durchgeführten Experimente einfluss, zeigten auch die Wiederholungen der entsprechenden Behandlungen nach 2 h Inkubation mit Glukose und Saccharose mehr Stromuli als zu Beginn (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse lassen deutlich werden, dass die ausgewählten Zucker befähigt sind auch im Parenchym Stromulibildung zu induzieren. Die Chloroplasten verhalten sich demnach wie die Plastiden der Epidermis. Die Physiologie der beiden Gewebe scheint in Bezug auf extrazellulär gebotene Zucker nicht so verschieden, weshalb es sinnvoll erscheint das Wissen über den Stoffwechsel der Mesophyllzellen zur Interpretation der aus der Epidermis heranzuziehen.

Der physiologische Zustand der Zelle und nicht die Art des Plastiden bestimmen die Stromulihäufigkeit Waters et al. (2004) gehen von Beobachtungen an Tomatenfrüchten davon aus, dass die Art des Plastiden und nicht die Art der Zelle die Abundanz von Stromuli bestimmt und das für Chloroplasten spezifische Faktoren auf eine noch unbekannte Weise

⁹(*MW* = 10%; *Stabw* = 3%; entspricht bei 2181 Plastiden 228 mit Stromulus)

4. Zucker

die Bildung von Stromuli verhindern. Dies suggeriert auf gewisse Weise ein Unvermögen von Chloroplasten Stromuli zu bilden, dass dies nicht der Fall ist, zeigen die saccharoseabhängigen Induktionen der Mesophyllchloroplasten in Abschnitt 4.7 auf Seite 56. Die Fähigkeit von Chloroplasten des Mesophylls nach Saccharose- und Glukosegabe massiv Stromuli zu bilden macht deutlich, dass der Stoffwechselhintergrund in einer Zelle doch für die Stromuliabundanz bedeutender ist als die Art der Plastide. Da aber im natürlichen Zustand der Plastid zum einen Spiegel des Stoffwechsels ist und zum anderen selbst im wesentlichen den Stoffwechsel beeinflusst, kann Ursache und Wirkung nur durch kurzfristige Manipulation, wie es mit den externen Zuckern möglich war, unterschieden werden. Demnach müssen Chloroplasten im Palisadenparenchym und die Plastiden in der Epidermis eine Stoffwechselsituation vorfinden, die nur sehr wenige Stromuli erforderlich macht. Wenn sich diese Situation ändert, sind sie entsprechend fähig Stromuli zu bilden.

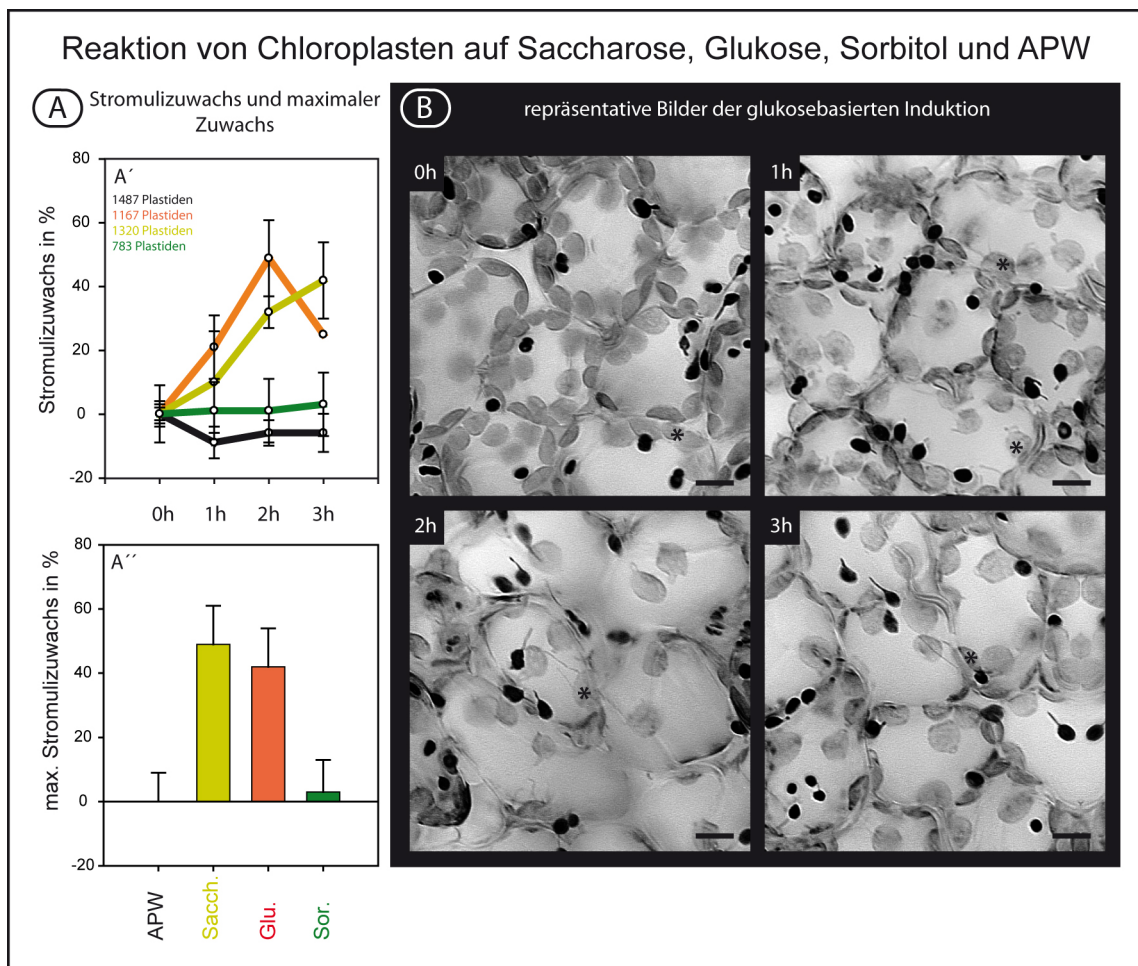


Abbildung 4.10.: Wirkung von Saccharose, Glukose, Sorbitol und APW auf Chloroplasten von *A. thaliana*
 - **A** - Stromulizuwachs über die Zeit (A') und maximaler Stromulizuwachs (A'') der ausgewählten Stromuliinduktionen. Pro Behandlung fließt ein Experiment in die Diagramme ein. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei ausgewerteten Bildabschnitten pro Zeitpunkt. **B**) Zu sehen sind von der glukoseabhängigen Induktion ausgewählten Bildabschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Chloroplasten des Palisadenparenchyms sind im negativierten Graustufenfluoreszenz deutlich heller als die Epidermisplastiden. "*" Chloroplasten mit einem Stromuli.

4.8. Wirkung von Saccharose auf Chloroplasten anderer Spezies

Bisher ist die stromuliinduzierende Wirkung von Zuckern, wie Saccharose, an *A. thaliana* untersucht worden. Es stellt sich die Frage, ob dies ein generelles Phänomen ist, oder ob sich auch in anderen Spezies mittels Saccharose Stromuli induzieren lassen?

Aus diesem Grund wurden Induktionsversuche mit Saccharose an *N. benthamiana* durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit standen noch keine transgenen Linien zur Verfügung, weshalb das Stroma transient durch die Expression von FNR-EGFP markiert werden musste. Da die Bakteriensuspension von unten in die Interzellularen des Blattes gespritzt wird, werden vornehmlich die untere Epidermis und das Schwammparenchym sowie vereinzelt Zellen des Palisadenparenchyms, transformiert. Die obere Epidermis wird durch die dicht stehenden Palisadenzellen kaum von Bakterien erreicht¹⁰. Durch die ausbleibende Transformation der oberen Epidermis, können Chloroplasten im Parenchym gut beobachtet werden ohne dass sie von den helleren Plastiden der Epidermis verdeckt und überstrahlt werden¹¹. Auf diese Weise kann gleichzeitig die Spezies- und die Gewebespezifität der saccharoseabhängigen Stromuliinduktion hinterfragt werden.

4.8.1. Durchführung

Die Induktionen erfolgten mit 40mM Saccharose über 3 h an mit GV3101::pMP90 (pGreenII0129 FNR-EGFP) infiltrierten Blättern (OD 0,4), 2 Tage nach der Infiltration. Aus drei Infiltrationen wurden insgesamt neun Blattscheiben gewonnen, davon wurden drei sofort aufgenommen und die restlichen 3h in APW oder APW mit 40mM Saccharose im Dunkeln inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die transformierten Zellen des Palisadenparenchyms in 5 bis 6 Bildabschnitten durch z-Stapel aufgenommen (Abb. 4.11).

Zur Quantifizierung wurden in den Bildabschnitten alle komplett abgebildeten Chloroplasten mit und ohne Stromulus gezählt und so die Stromulihäufigkeit der sichtbaren Plastiden in den jeweils drei Blattscheiben pro Zeitpunkt und Behandlung bestimmt (Abb. 4.11). Der Mittelwert aus diesen Stromulihäufigkeiten ist im Diagramm der Abbildung 4.11 dargestellt.

4.8.2. Ergebnisse und Diskussion

Mit Saccharose lassen sich im Palisadenparenchyms von *N. benthamiana* Stromuli induzieren. Zwei Tage nach Infiltration der Blätter tragen ca. 4% der sichtbaren Chloroplasten im Palisadenparenchym einen Stromulus. Die Vakuuminfiltration der Blattscheiben mit APW und deren dreistündige Lagerung im Puffer haben den Anteil von stromulitragenden Chloroplasten nicht deutlich ansteigen lassen. Im Gegensatz dazu konnte in den der Saccharose ausgesetzten Blattscheiben eine sehr deutliche Steigerung des Anteils der Chloroplasten mit Stromuli beobachtet werden. Die erreichte Stromulihäufigkeit von ca. 50 % lag im Bereich der Saccharoseinduktionen der oberen Epidermis von *A. thaliana* (vergl. 4.5 C).

¹⁰Im Bereich der Atemhöhle unter den Stomata ist kein Parenchym zu finden, weshalb auch an diesen Stellen Bakterien bis zur oberen Epidermis gelangen.

¹¹Dies ist bei stabil transgene Pflanzen mit 35S getriebenen Konstrukten der Fall.

4. Zucker

Die Ergebnisse zeigen, dass die saccharoseabhängige Stromuliinduktion nicht auf *A. thaliana* begrenzt ist. Um die Bedeutung der Induktion von Stromuli mit Zuckern für die Zelle besser zu verstehen würde sich anbieten, die Wirkung von Zuckern in einem evolutionären Kontext zu analysieren. Dazu müssten Vertreter weiter entfernt stehender Phyla (Monokotyledone, Moose, Farne und Grünalgen) untersucht werden. Eine saccharoseabhängige Induktion von Stromuli in anderen Phyla würde bedeuten, dass die Stromulibildung als Reaktion auf Zucker von Grundlegender Bedeutung für die Pflanzenzelle ist.

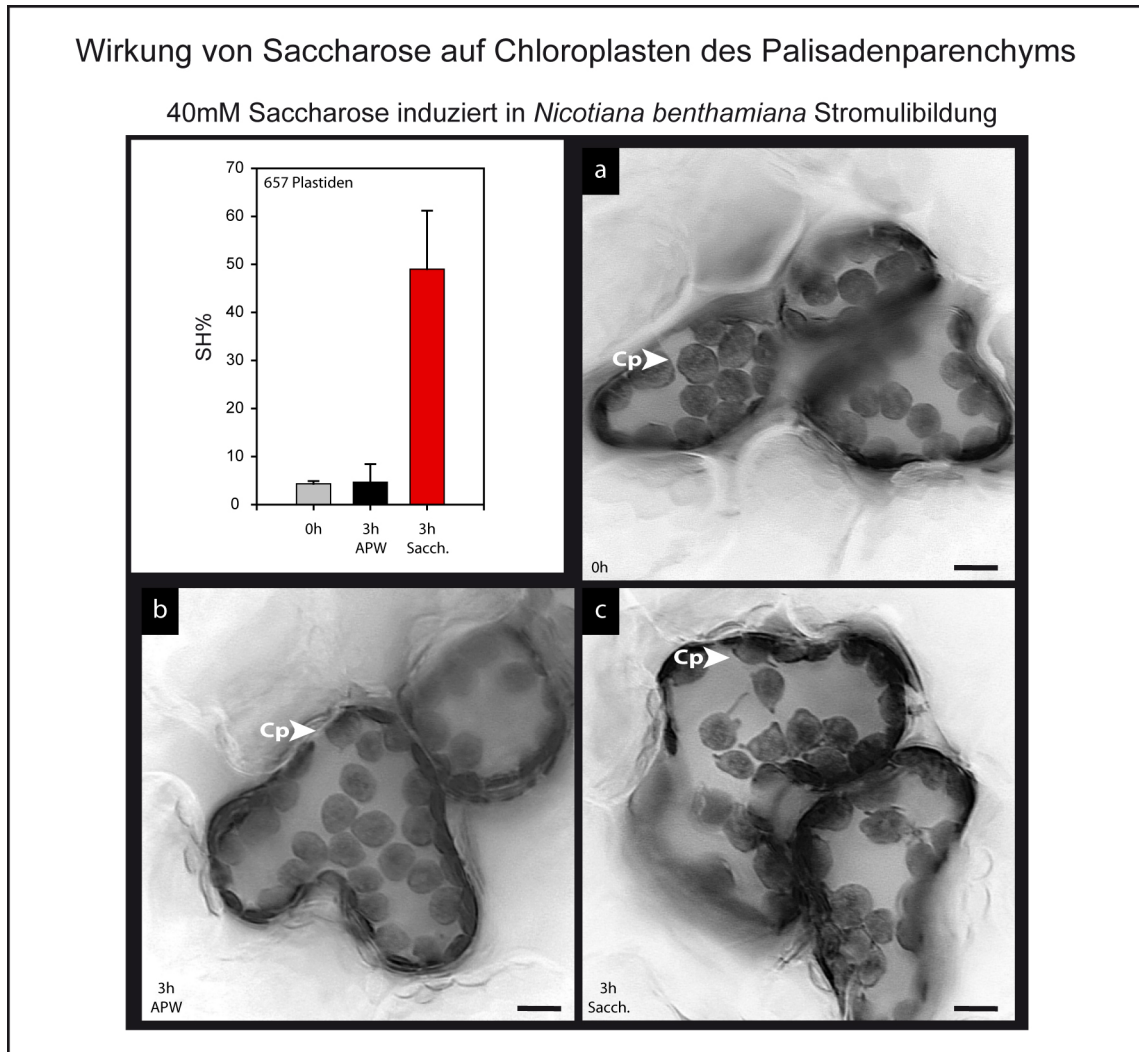


Abbildung 4.11.: Wirkung von Saccharose auf Chloroplasten des Parenchyms von *N. benthamiana* - Gezeigt sind die gemittelten Stromulihäufigkeiten (SH%) der einzelnen Behandlungen. a-c zeigen zu den Zeitpunkten und Behandlungen repräsentative Bildausschnitte. Cp markiert in b und c Chloroplasten mit und in a ohne Stromulus. SH% bezeichnet die relative Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. (Sacch. entspricht Saccharose); Größenbalken entsprechen 8 μ m.

4.9. Wirkung von Turanose auf die Ultrastruktur von Chloroplasten in *A. thaliana*

In der Vergangenheit wurden Stromuli immer wieder als Überexpressionsartefakte von GFP Konstrukten diskutiert und als natürlich vorkommende Strukturen angezweifelt. Diese beden-

ken sind nicht völlig abwegig, besonders da gezeigt worden ist, dass die Überexpression von GFP-Fusionen mit Membranproteinen der äußeren und inneren Hüllmembran zu Membranstacking und enormen Membranprotuberanzen führen kann (persönliche Mitteilung Prof. A. Weber¹² und Prof. J. Joyard¹³). Durch die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) von Ultradünnschnitten sollte geklärt werden, ob die Expression des *FNR-EGFP* in den verwendeten *A. thaliana*-Pflanzenlinien und eine auf Zucker basierende Induktion einen Einfluss auf die Ultrastruktur der Plastiden hatten.

4.9.1. Durchführung

Für diesen Zweck wurden WT und *FNR-EGFP-7-4* Blattquadrate mit 40 mM Turanose und zur Kontrolle mit APW für 2 h inkubiert und danach mit PFA fixiert. Zusammen mit einer 0 h Referenzprobe wurden die Präparate nach Einbettung mittels TEM durch Herrn Dr. Hause (Biozentrum, Halle) analysiert. Da es einige Berichte über die Instabilität von Stromuli während der chemischen Fixierung für TEM gibt (Bourett et al., 1999), wurde vor der Einbettung in den *FNR-EGFP* Proben überprüft, ob die Stromuli durch das PFA fixiert werden konnten. Es zeigte sich, dass das gewählte Fixativ die Stromuli sehr gut konserviert und es keinen offensichtlichen Unterschied zwischen fixiertem und frischem Gewebe zu geben scheint (Daten nicht gezeigt). Als Zucker wurde Turanose verwendet.

4.9.2. Ergebnis und Diskussion

Turanose induziert im WT Stromuli und *chloroplast protrusions*. Durch die ausgeprägten Granathylakoide, lassen sich die Chloroplasten des Parenchyms gut identifizieren. Es zeigte sich, dass die Chloroplasten, wie erwartet im nicht-induzierten Zustand fast keine Stromuli zeigen (Abb. 4.13). Nach der Inkubation mit Turanose können im Parenchym Stromuli als tubuläre Ausstülpungen der beiden Chloroplastenhüllmembranen deutlich häufiger gefunden werden (Abb. 4.13). Neben den filamentähnlichen Stromuli sind an den Plastiden von Wildtyp (WT) und *FNR-EGFP-7-4* größere, mit Stroma gefüllte und Bereiche, frei von Thylakoiden, zu erkennen (Abb. 4.13). Diese äußerlich häufig amorphen Chloroplastenprotuberanzen (*chloroplast protrusions*) wurden von Holzinger et al. (2007a) bei Temperatur gestressten Chloroplasten beschrieben und von Stromuli durch einen Formenindex unterschieden. Auch diese Protuberanzen wurden bedeutend häufiger in Turanose behandeltem Gewebe, als in der unbehandelten Kontrolle gefunden. Die auch im Wildtyp häufiger angetroffenen Stromuli und Protuberanzen liefert einen zweiten Hinweis darauf, dass die auf Zucker basierte Stromuliinduktion, hier durch Turanose ausgelöst, nicht durch das Transgen verursacht wurde.

Vor und nach der Induktion, konnte kein Unterschied in der Ultrastruktur zwischen Plastiden der transgenen und der WT Pflanze gefunden werden. Die Expression des Transgenes und die Behandlung mit Turanose hat demnach keinen Einfluss auf die Ultrastruktur des Chloroplasten. Die in *FNR-EGFP-7-4* beobachteten Stromuli sollten somit der Situation im WT entsprechen

¹²Heinrich Heine Universität Düsseldorf

¹³Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Grenoble

und stellen keine Expressionsartefakte wie die durch Prof. Weber und Prof. Joyard beobachteten Protuberanzen dar.

4.10. Modell zur Induktion von Stromuli durch Zucker

Die vorgestellten mit Zucker durchgeführten Induktionen zeigen, dass die Bildung von Stromuli an das regulative Netzwerk des Zuckermetabolismus angebunden ist. Die erhaltenen Daten lassen sich einem Modell zusammenfassen (Abb. 4.12).

Modell Turanose und Palatinose, interagieren wahrscheinlich mit einem noch unbekanntem Rezeptor auf der Zelloberfläche (5). Die Weiterleitung des von ihnen ausgelösten Signals erfolgt ohne metabolische Zwischenstufen der erkannten Zucker und führt zur Stromulibildung (blauer Pfeil). Für den Rezeptor sind die zellwandständigen Invertasen viel versprechende Kandidaten. Das Saccharose auf der Zelloberfläche von Invertasen gebunden und gespalten wird (nicht dargestellt) ist sicher, doch ob dies das Signal ist oder ob eine Bindung an einen anderen Rezeptor, der auch Turanose und Palatinose erkennt, dafür verantwortlich ist, ist noch unklar (?).

Unabhängig von einer eventuellen Erkennung auf der Zelloberfläche wird Saccharose über Saccharosetransporter (1) effizient importiert und durch die zytoplasmatischen Invertasen (2) gespalten die frei werdende Fruktose und deren nächsten Metabolite, die nach der Aktivierung durch Fruktokinase (8) entstehen scheint kein Signal für die Stromulibildung zu sein. Die ebenfalls entstehende Glukose hingegen ist fähig ein Signal auszulösen. Wie die I3-OMG zeigte geht das Signal dabei von einer Hexokinase (4) aus. Nachgeschaltete Reaktionen des Glukoseab bzw. -umbaues (7) sind dafür nicht notwendig (roter Pfeil). Die Induktionskompetenz von Maltose beruht höchst wahrscheinlich auf den, durch die Spaltung mittels Glycosyltransferasen oder Glucosidasen (3) frei werdenden Glukoseeinheiten. Trehalose, Mannitol und Sorbitol hatten keinen Effekt. Die sich aus den Induktionen ergebenden grundlegenden Informationen sind:

1. Die Stromuliinduktion erfolgt wahrscheinlich nach einem Liganden-Rezeptor-Prinzip.
2. Die Weiterleitung des Signals bedarf keiner Metabolite des Signalauslösers.
3. Für die Induktion von Stromuli gibt es mindestens zwei getrennte Ausgangspunkte.
 - a) Einer der von Turanose sowie Palatinose ausgeht und auf der Zelloberfläche liegt und dessen Proteinkomponente noch nicht näher identifiziert werden kann.
 - b) Ein zweiter davon unabhängiger Weg geht über Glukose, wobei die Hexokinase als Proteinkomponente von Bedeutung zu sein scheint.
4. Auf Glukose und Saccharose reagieren sowohl die Epidermisplastiden als auch die Chloroplasten aus dem Parenchym.

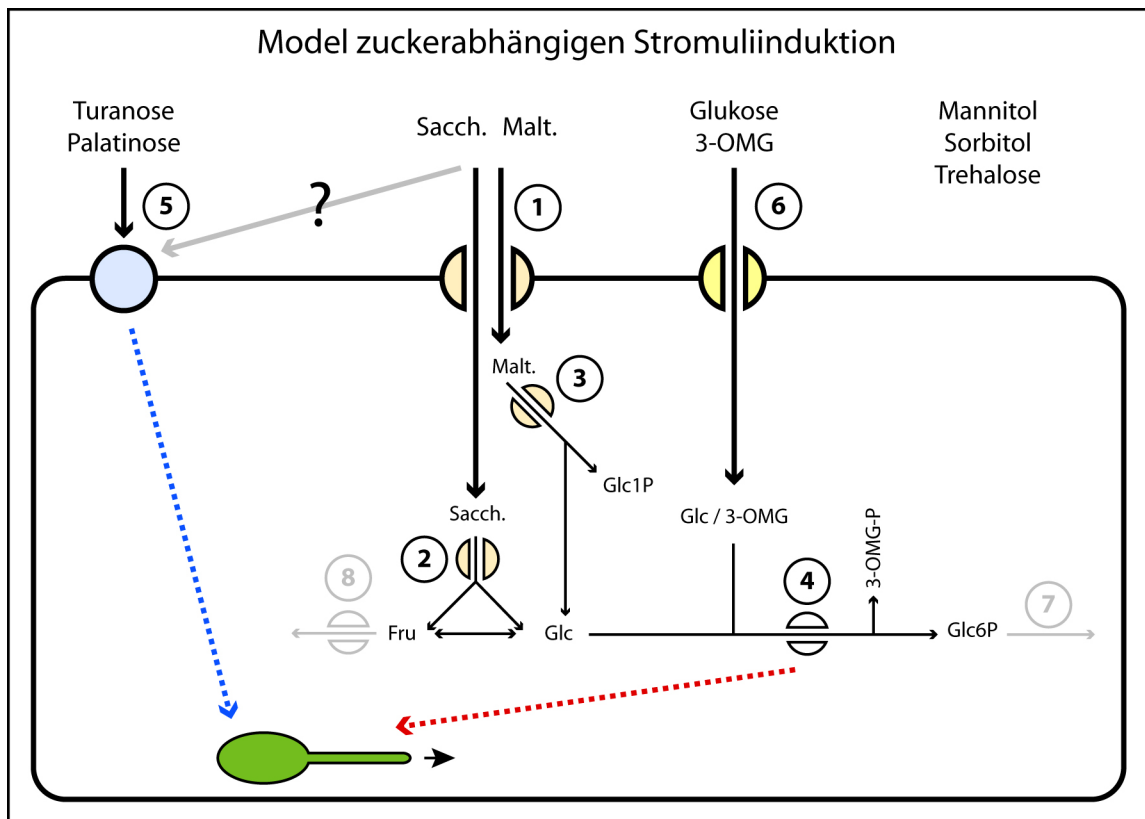


Abbildung 4.12.: Modell zur zuckerabhängigen Stromuliinduktion - Details siehe Text.

Epidermisplastiden im Vergleich mit Chloroplasten des Palisadenparenchyms

Epidermisplastiden zeigen ultrastrukturelle Ähnlichkeiten zu Chloroplasten (a-c)
 Durch Turanose lassen sich in WT Chloroplasten Stromuli und Envelopprotrusionen induzieren (d-f)

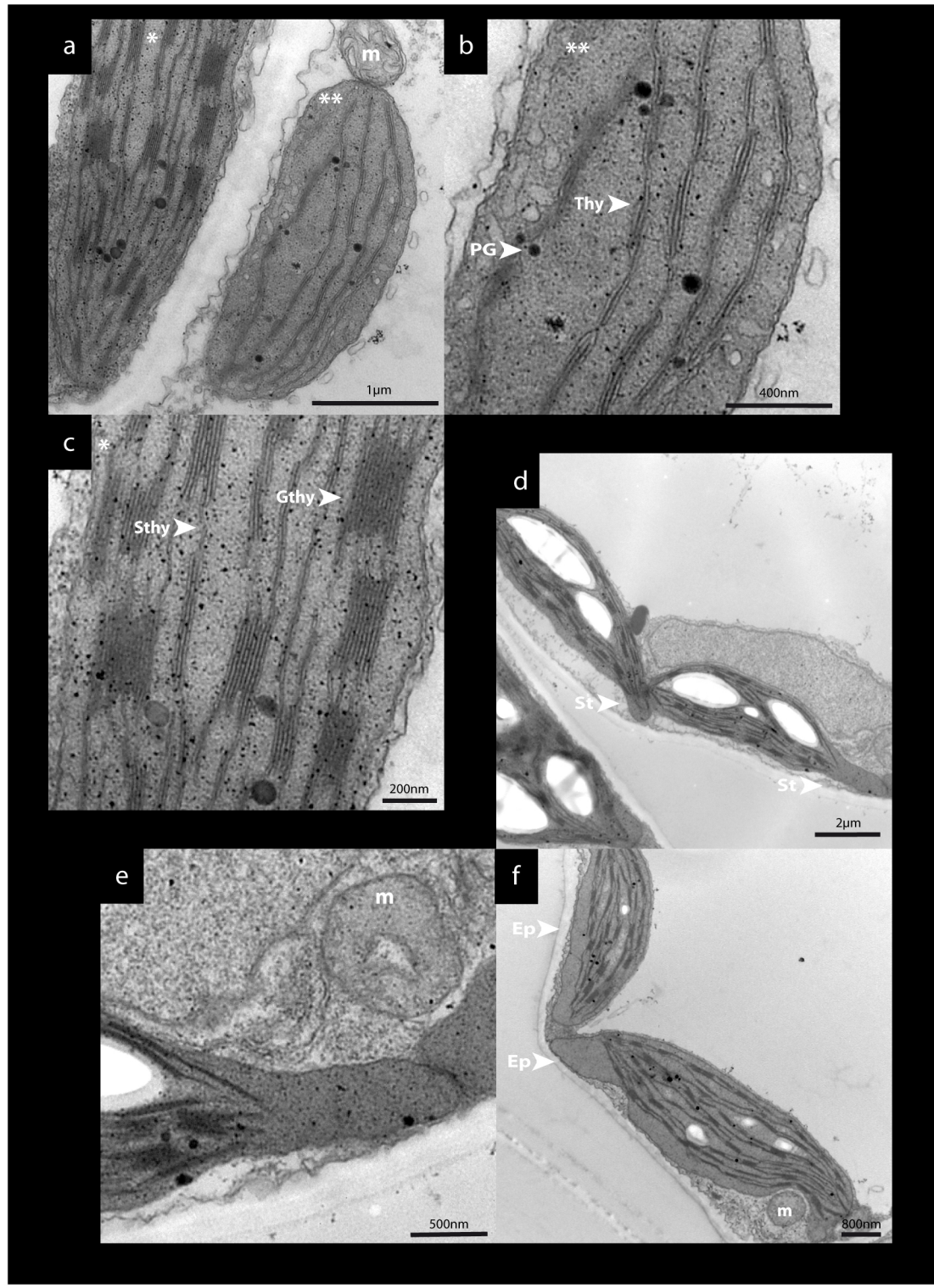


Abbildung 4.13.: TEM Bilder von Ultradünnschnitten durch Laubblätter - a-c) Plastiden aus der Epidermis (***) und dem Parenchym (*) von WT Arabidopsis Pflanzen. m markiert ein Mitochondrium in der Nähe eines Chloroplasten. Deutlich sind in den Plastiden die Plastoglobuli (PG) zu erkennen. Das Endomembransystem der Chloroplasten zeigt die typischen Granathylakoide (Gthy) und Stromathylakoide (Sthy). e-f) nach 2h Inkubation mit Turanose ist in den Wildtyp Pflanzen (d,e) und der *FNR-EGFP-7-4* Probe (f) eine deutliche Zunahme an Stromuli (St) und chloroplastidäre Protrusionen (auch envelope protrusions, Ep) zu verzeichnen.

5. Diurnaler Lichtrhythmus

“Die einzige Konstante im Universum ist die Veränderung”, dieses Zitat von Heraklit beschreibt ganz gut das Phänomen, der sich regelmäßig ändernden Umweltbedingungen im Verlaufe von Tag und Nacht. Diesen sich aus der Drehung der Erde um ihre eigene Achse ergebenden Veränderungen sind die meisten Organismen unterworfen und haben sich daran abgepasst. Ein Spiegel der sich wiederholenden Änderungen findet sich deshalb in ihrer Physiologie und ihrem Verhalten. In Pflanzen werden durch den diurnalen Lichtrhythmus viele Stoffwechselaktivitäten, Organstellungen, Wachstums- und Differenzierungsprozesse beeinflusst. Als photoautotrophe Organismen sind Pflanzen ganz besonders darauf angewiesen sich auf die diurnalen Lichtrhythmus einzustellen. Plastiden als Ort der Photosynthese und als Teil des Kohlehydratstoffwechsels müssen und sind deshalb in die diurnalen physiologischen und biochemischen Änderungen eingebunden. In wieweit sich die Morphologie (Stromuli) im Rahmen der Stoffwechselveränderungen von Tag zu Nacht verhält ist bisher unbekannt und wurde im Folgenden an der oberen Epidermis von *Arabidopsis* untersucht.

5.1. Stromuli im Tagesverlauf (12h Tag / 12h Nacht)

A. thaliana wurden im Kurztag (8 h Tag / 16 h Nacht) 12-14 Wochen angezogen um sie eine ausgeprägte Rosette entwickeln zu lassen. Nötig war dies, um für die Proben zu den verschiedenen Zeitpunkten mindestens neun Blätter, eines vergleichbaren Entwicklungsstadiums an einer Pflanze zur Verfügung zu haben. Anschließend wurden die Pflanzen in Anlehnung an Schaffer et al. (2001) in einem Klimaschrank mit 12 h-Lichtrhythmus gestellt. Nach sieben Tagen, in denen die Pflanzen sich an den geänderten Lichtrhythmus adaptieren konnten, wurde in einem Abstand von 3 h jeweils ein Blatt geerntet und darin die Stromulihäufigkeit der Epidermis bestimmt. Die Messungen begannen zum Zeitpunkt 0 h, wenige Minuten vor Beginn des Tages. Die Ernte, Präparation und Mikroskopie zu den Zeitpunkten während der Nacht erfolgte unter gedimmter grüner Beleuchtung.

Die Stromulihäufigkeit verändert sich im Laufe des Tag-Nacht-Rhythmus. Am Ende der *normalen Nacht* (zum Zeitpunkt 0 h) hat mit deutlich unter 10 % nur ein geringer Anteil der Plastiden Stromuli 5.1 A. Bereits nach 3 h Belichtung steigt die Stromulihäufigkeit deutlich an und erreicht mit ca. 25 % einen Wert, der im Bereich der bestimmten Grundstromulihäufigkeit liegt (Abb. 4.2 B). Dieses Niveau (ca. 20 %) bleibt über den *normalen Tag* bis kurz nach Einbruch der *normalen Nacht* erhalten. Im Verlaufe der *normalen Nacht* nimmt die Stromulihäufigkeit stetig ab und erreicht am Ende der *normalen Nacht* mit ca. 10% ein ähnlich niedriges Niveau wie zu Beginn des Versuches. Dieses zyklische Verhalten wurde auch in

5. Diurnaler Lichtrhythmus

den anderen parallel dokumentierten Pflanzen beobachtet. Die Beispielbilder zeigen, dass der Unterschied zwischen belichtetem Gewebe und jenem am Ende der Nacht deutlich zu sehen ist (Abb. 5.1 F). Die Abundanz von Stromuli in der Epidermis unterliegt demnach einem deutlichen diurnalen Rhythmus.

5.2. Stromuli im Verlauf eines veränderten Lichtrhythmus

Unter den diurnal oszillierenden Prozessen werden viele von einer inneren Uhr (*circadian clock*) gesteuert. Eine innere Uhr ist ein oszillierender Zeitgeber, der eine Wellenlänge von ca. 24 h einhält und durch externe Stimuli (*trigger* oder *Zeitgeber*) auf die aktuelle Länge des Tages- und der Nacht eingestellt wird (Harmer, 2009). Prozesse die von einer inneren Uhr gesteuert werden oszillieren im Tag-Nacht-Rhythmus und behalten diesen Zyklus bei, auch wenn sie aus der sich ändernden Umgebung (Licht an/aus) herausgenommen und in eine konstante Umgebung verbracht werden (konstantes Licht oder konstante Dunkelheit). Durch den fehlenden Zeitgeber kommt es unter konstanten Bedingungen häufig zu einer Wellenlängenveränderung und in einigen Fällen zu einer allmählichen Abnahme der Amplitude, der durch die innere Uhr gesteuerten Prozesse (*output*) (Harmer, 2009).

Durch eine innere Uhr geregelte Prozesse lassen sich durch einen veränderten Tag-Nacht-Rhythmus identifizieren. Durch die Eigenheit, an die innere Uhr gekoppelter Prozesse, auch ohne den Tag-Nacht-Rhythmus zu oszillieren, ist es möglich diese von Prozessen, die einfach den Einflüssen sich täglich ändernder Parameter unterliegen, zu unterscheiden (Harmer, 2009). Dazu wird der Tag-Nacht-Rhythmus verändert und das Verhalten des entsprechenden Prozesses beobachtet. Schwingt der beobachtete Prozess unter veränderten Belichtungsblängen weiterhin im normalen Rhythmus, ist dieser von einer inneren Uhr gesteuert. Um zu untersuchen, ob die Stromulihäufigkeit ein durch die innere Uhr gesteuerter Prozess ist, wurden erneut Pflanzen unter Kurztagsbedingungen angezogen. Nach einer Gewöhnung von sieben Tagen im 12 h/12 h Rhythmus wurde nach einem *normalen Tag* das Licht nicht ausgeschaltet (*verlängerter Tag*) und nach einer *normalen Nacht* das Licht nicht angeschaltet (*verlängerte Nacht*). Da nur ein begrenztes Kontingent von Blättern der untersuchten Entwicklungsstufe an den Pflanzen zur Verfügung stand, konnten keine längeren Experimente als die beobachteten 24 h durchgeführt werden.

Die Stromulihäufigkeit während des verlängerten Tages bleibt gleich hoch. Die Messungen zum *verlängerten Tag* begannen am Ende einer *normalen Nacht*. Wie bereits für den normalen Tag-Nacht-Rhythmus beschrieben, war am Ende der *normalen Nacht* die Stromulihäufigkeit sehr gering (unter 5 %) und stieg nach Anbruch des *normalen Tages* schnell auf einen höheren Wert, der im Bereich der Grundstromulihäufigkeit lag (Abb. 5.1 B). Im weiteren Verlauf des *normalen Tages* blieb die Stromulihäufigkeit auf dem erreichten Niveau. Dieses Niveau ändert sich auch nicht während des *verlängerten Tages*. Parallel dokumentierte Pflanzen zeigten ein vergleichbares Verhalten.

Die Stromulihäufigkeit während der verlängerten Nacht bleibt gleich niedrig. Die Messungen zur *verlängerten Nacht* begannen am Ende eines *normalen Tages*. Wie zuvor im normalen Tag-Nacht-Rhythmus beschrieben sank die Stromulihäufigkeit im Laufe der *normalen Nacht* allmählich bis auf einen Wert von unter 5 % (Abb. 5.1 C). Während der *verlängerten Nacht*, kam es zu keinem Anstieg der Stromulihäufigkeit, sie blieb auf dem Niveau, welches sie am Ende der *normalen Nacht* erreicht hatte.

Um zu sehen, ob sich die Pflanze nach einer anschließenden weiteren Nacht (insgesamt 36 h Dunkel), gefolgt von einem *normalen Tag* (12 h Hell) wieder normal verhält, wurde nach dem entsprechenden Lichtrhythmus zum Ende des *normalen Tages* (48 h nach Beginn des Experimentes) eine weitere Probe genommen. Es zeigte sich, dass zu diesem Zeitpunkt wieder eine normale Stromulihäufigkeit wie zu Beginn des Experimentes in der Pflanze zu finden war.

Die Veränderungen der Stromulihäufigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus sind unabhängig von der inneren Uhr. Prozesse, die an eine innere Uhr gekoppelt sind, müssen drei Eigenschaften aufweisen.

1. Die Outputs (hier Stromulihäufigkeit) schwingen auch nach umsetzen in eine gleich bleibende Umgebung weiter mit einer Wellenlänge von ca. 24h.
2. Der Beginn der Rhythmik kann durch einen externen Stimuli (*trigger*) beeinflusst werden um so auf verschiedene Tageslängen zu adaptieren.
3. Die Rhythmik ist temperaturkompensiert, was bedeutet, dass die Wellenlänge der Schwingung bei unterschiedlichen Temperaturen bei ca. 24h bleibt.

Diese Eigenschaften unterscheiden sie von Rhythmiken, welche direkt von Umweltbedingungen abhängig sind und sich dann mit den im Tagesverlauf ändernden Parametern parallel mit verändern. Die Verlängerung des Tages und der Nacht haben dazu geführt, dass die Stromulihäufigkeit auf dem jeweiligen hohem bzw. niedrigen Niveau verblieb. Bei Abhängigkeit der Stromulihäufigkeit von einer inneren Uhr wäre ein Verhalten wie unter dem normalen Lichtrhythmus beobachtet auch während der verlängerten Nacht und dem verlängerten Tag zu erwarten gewesen, was aber nicht der Fall war. Die im Nacht/Tages-Verlauf sich verändernde Stromulihäufigkeit unterliegt demnach keiner Kopplung an eine innere Uhr, sondern an einen anderen Prozess, der direkt oder indirekt vom Licht abhängig ist.

5.3. Zusätzliche und ergänzende Experimente

Um die Vorgänge während des Tag-Nacht-Rhythmus genauer zu hinterfragen, wurden begleitend zusätzliche Experimente durchgeführt.

Können am Ende der Nacht Stromuli mit Zucker induziert werden? Am Ende der *normalen Nacht* und während der *verlängerten Nacht* erreicht die Stromulihäufigkeit ihre geringsten Werte. Der Grund für diese niedrige Abundanz kann entweder im Ausbleiben des Signals, oder in der aktiven Unterdrückung der Stromulibildung liegen. Wenn es sich um ein aktives

5. Diurnaler Lichtrhythmus

Unterdrücken handelt, stellt sich die Frage, ob dieser putative Block auch die saccharose-abhängige Induktion blocken kann. Aus diesem Grund wurde eine Pflanze am Ende der Nacht, noch vor Anbruch des Tages aus dem Klimaschrank genommen und unter gedimmtem Grünlicht von dieser Blattproben geerntet. Diese wurde unter Standardbedingungen in 40 mM Saccharose und in APW über drei Stunden inkubiert. In Abbildung 5.1 D ist zu erkennen, dass unter den Standardinduktionsbedingungen, der Anteil von stromulitragenden Plastiden über die Zeit bedeutend zunimmt und Werte erreicht, wie sie für die anderen Zuckerversuche auch beobachtet wurden (siehe Abb. 4.5 auf Seite 40). In der Kontrolle mit APW bleibt die Stromulihäufigkeit unverändert.

Die Induzierbarkeit von Stromuli in den dunkeladaptierten Pflanzen weist darauf hin, dass wenn eine aktive Unterdrückung der Stromulibildung im Dunkeln vorliegt dieser entweder mit Saccharose gebrochen werden kann, oder das im Dunkeln der Stimulus zur Stromulibildung fehlt und dieser durch Saccharose imitiert werden kann.

Überprüfen der vom Licht abhängigen Induktion nach einer 12h Nacht. Auf Grund des nicht unerheblichen experimentellen Aufwandes wurden die jeweiligen 24h-Experimente nur einmal mit einer Pflanzencharge durchgeführt. Da in den drei Tageslauf-Varianten¹ sich der *normale Tag* und die *normale Nacht* zweimal abgebildet findet kann der beobachtete Verlauf für diesen Zeitraum als gesichert gelten. Was sich jedoch nur einmal abgebildet findet, ist der Übergang zwischen der *normalen* und der *verlängerten Nacht*. Aus diesem Grund wurde der Übergang zwischen *normaler* und *verlängerter Nacht* mit zwei Kontrollpflanzen noch einmal unabhängig von einem kompletten 24h-Versuches überprüft (Abb. 5.1 E). Dazu wurde die selbe Pflanze, die für die saccharoseabhängige Induktion am Ende der normalen Nacht (nach der Probenahme) als Kontrolle in einen beleuchteten Anzuchttraum gestellt. Dies bedeutete für sie den Beginn des *normalen Tages*. Nach drei Stunden im Licht wurde ein weiteres Blatt geerntet und auf seinen Stromuligehalt untersucht. Eine zweite Pflanze wurde wie die Kontrolle am Ende der Nacht im Dunkeln beprobt und nach drei Stunden weiterer Dunkelheit erneut.

Wie in Abbildung 5.1 E zu sehen ist, steigt nach dem Tagesanbruch die Stromulihäufigkeit der Kontrolle von etwas unter 10 % auf ca. 15 % an, obwohl der Wert im Bereich der Grundstromulirate liegt, ist der Zuwachs nicht so deutlich, wie in den zuvor durchgeführten 24h-Versuchen (vergleiche A und B der selben Abbildung). Ein t-Test ergibt einen p-Wert von 0,063, was knapp zum Ablehnen einer Signifikanz des Zuwachses führen würde. Die Probe hingegen hat in den selben drei Stunden Dunkelinkubation keinen Zuwachs an stromulitragenden Plastiden erfahren, was den Beobachtungen aus der *verlängerten Nacht* entspricht (C der selben Abbildung). Die Unterschiede zwischen der Probe und der Kontrolle nach drei Stunden ist auch ohne t-Test als signifikant zu erkennen. Die Ergebnisse bestätigen, dass der Stromuligehalt am Ende der Nacht nicht ohne Belichtung wieder steigt, sondern gering bleibt.

¹*normaler Tag, verlängerter Tag, verlängerte Nacht*

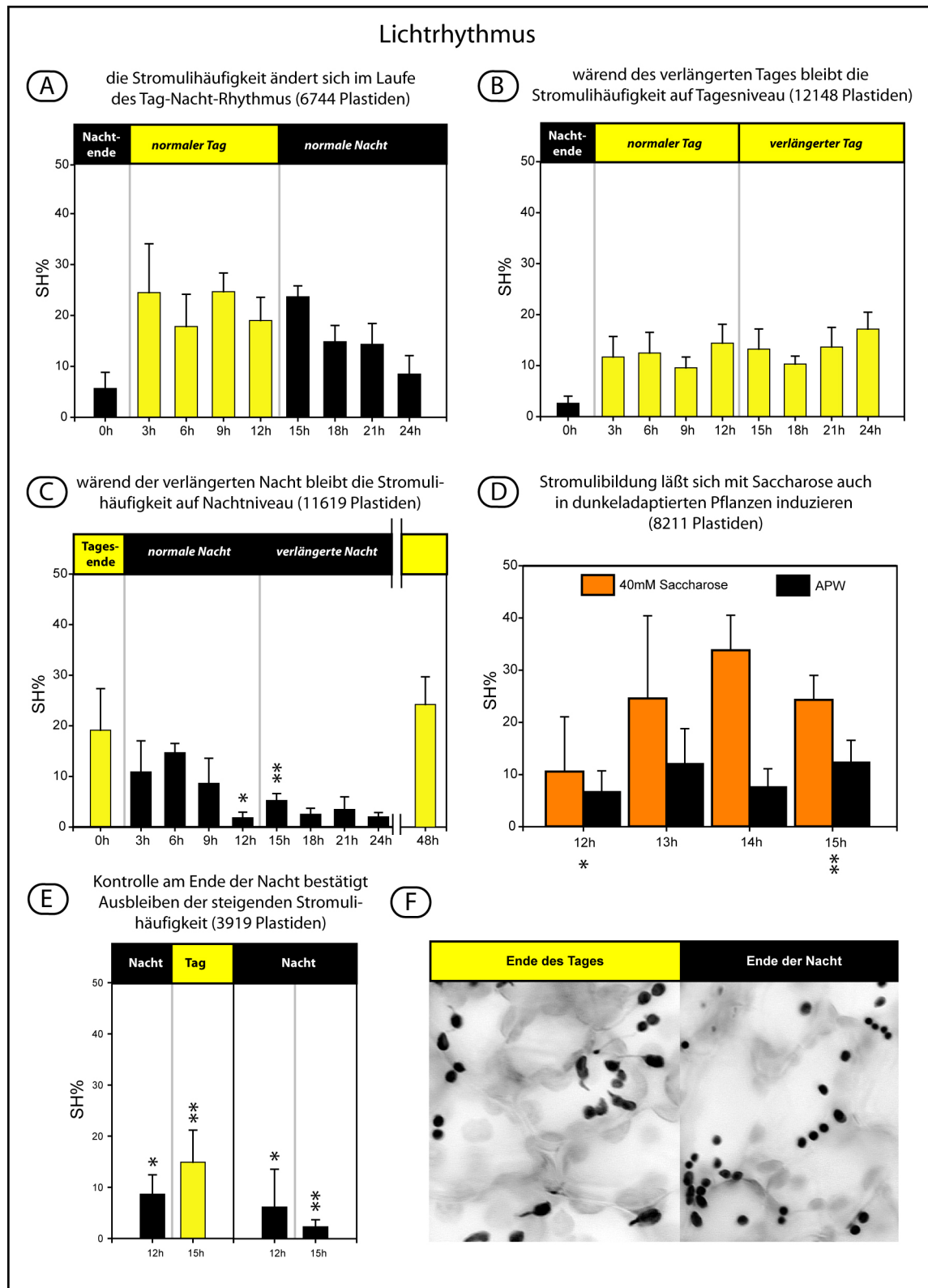


Abbildung 5.1.: Einfluss des Lichtrhythmus auf die Stromulihäufigkeit - relative Stromulihäufigkeiten in der oberen Epidermis einer Pflanze im Tagesverlauf mit **A)** 12 h Tag und 12 h Nacht **B)** 24 h Tag und **C)** 24 h Nacht. “*“ und “**“ bezeichnet Zeitpunkte aus der verlängerten Nacht, an denen zwei ergänzende Versuche zur von Zucker abhängigen Induktion am Ende der Nacht **(D)** und zur vom Licht abhängigen Stromulibildung **(E)**, durchgeführt wurden. **F)** zeigt zwei Beispielbildabschnitte des 12h Tag / 12h Nacht Versuches. SH% bezeichnet die relative Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. Jede Säule der Diagramme steht für den Mittelwert aus 6 unabhängigen Bildabschnitten mit seiner Standardabweichung. Für weitere Details sei auf den Text verwiesen.

5.4. Diskussion Lichtrhythmus

Die Ergebnisse zeigen, dass Stromuli direkt oder über einen Umweg von der Belichtung der Pflanzen abhängen und nicht von einer inneren Uhr zum Schwingen gebracht werden. Die Entwicklung der Stromulihäufigkeit über den Tag macht es möglich die Parameter mit denen sie verbunden ist genauer zu charakterisieren. So legt das allmähliche absinken der Stromulihäufigkeit während der *normalen Nacht* nahe, dass der Parameter nach dem sich die Stromulihäufigkeit richtet wahrscheinlich ebenso linear abnimmt wie die Stromulihäufigkeit selbst. Die Abnahme erinnert dabei an ein Depot, welches während der Dunkelheit allmählich geleert und nach Tagesanbruch schnell wieder aufgefüllt wird. Aus diesem Grund ist eine indirekte Abhängigkeit von der Belichtung wahrscheinlicher als eine direkte, da im Fall einer direkten Abhängigkeit ein abruptes Absinken der Stromulihäufigkeit nach dem Anbruch der Nacht zu beobachten wäre.

Saccharose- und Glukosekonzentration verändern sich über den Tag wie die Stromulihäufigkeit Leider finden sich bedeutend mehr Angaben in der Literatur über Prozesse, die von der inneren Uhr abhängen als solche, die ein ähnliches Verhalten wie die Stromuli zeigen. Ein Parameter, der auf die erläuterte Weise indirekt abhängig vom Licht ist und eine ähnliche Dynamik wie die Stromulihäufigkeit zeigt, ist die Konzentration verschiedener Kohlehydrate in Laubblättern von *A. thaliana*.

Die mit verschiedenen Methoden vorgenommenen Quantifizierungen von Bläsing et al. (2005) und Antonio et al. (2007) zeigen eine relativ konstante Konzentration von Saccharose und Glukose über den Tag hinweg. Das Niveau der Zucker wird innerhalb der ersten Stunden des Tages von einem niedrigen Wert (am Ende der letzten Nacht) ausgehend erreicht. Nach Anbruch der Nacht, sinken die Konzentrationen von Glukose und Saccharose linear wieder ab und erreichen eine Konzentration, wie sie am Ende der letzten Nacht ermittelt wurde. Der geschilderte Verlauf der Zuckerkonzentration ist somit dem der Stromuli sehr ähnlich.

Bläsing et al. (2005) bestimmten zu dem noch die Menge an Stärke und konnten zeigen, dass sich deren Konzentration ebenfalls im Laufe des Tages verändert. Die Kinetik ist jedoch eine andere. Wie die anderen Zucker zu Beginn des Tages ist Stärke im Blatt fast nicht nachzuweisen. Im Laufe des Tages nimmt der Gehalt an Stärke linear zu und erreicht am Ende des Tages ein Maximum. Nach Anbruch der Nacht sinkt der Gehalt an Stärke, wie bei Glukose und Saccharose bereits beschrieben, kontinuierlich und erreicht am Ende der Nacht seinen tiefsten Punkt. Das Profil gleicht einer Pyramide mit ihrer Spitze am Tag-Nacht-Übergang. Die Stärkekonzentration gleicht somit nur in der Nacht dem Lauf der Stromulihäufigkeit. Andere Zucker, die von den Autoren ebenfalls gemessen wurden, wie Fruktose und Glukose-6-P, zeigten blieben über den Tagesverlauf betrachtet weitgehend konstant.

Dass die Konzentrationsänderungen der Zucker nicht an eine innere Uhr gekoppelt sind, zeigen die Messungen von Usadel et al. (2008). Die Autoren bestimmten die Konzentrationen von Saccharose, Glukose-6-Phosphat und Stärke in Arabidopsis Pflanzen in einer *verlängerten Nacht*. Die Konzentrationen aller drei Zucker brachen innerhalb weniger Stunden völlig ein und nahmen wie die Stromulihäufigkeit, zu Beginn und im weiteren Verlauf der *verlängerten Nacht*,

nicht wieder zu.

Stromulihäufigkeit als Maß für den Zuckerspiegel? Zusammen mit den Ergebnissen aus den Zuckerinduktionen², legen die Parallelen zwischen der Konzentration von Glukose sowie Saccharose und der Stromulihäufigkeit im Verlaufe des Tages einen Zusammenhang zwischen ihnen nahe. Hinterlegt man den beobachteten Verlauf der Stromulihäufigkeit mit den Vorgängen in photosynthetischem Gewebe wie sie Buchanan et al. (2000) beschreibt, lassen sich die Beobachtungen gut erklären.

Nach Tagesanbruch produziert der Chloroplast (höchstwahrscheinlich auch im gewissen Maße der Epidermisplastid) während der Belichtung hauptsächlich Triosephosphate, die er an das Zytosol abgibt. Dort werden sie nach Umwandlung in den Hexosephosphatpool, eingespeist. Aus dem Hexosephosphatpool werden neben vielen anderen Synthesen, die überschüssigen Hexosephosphate hauptsächlich der Synthese von Saccharose zu zugeführt, deren Konzentration ebenfalls schnell nach Tagesanbruch steigt. Aus den Geweben der Photosynthese wird die überschüssige Saccharose abtransportiert. Im Laufe der Belichtung steht der Pflanzelle mehr Triosephosphate zur Verfügung als sie über Saccharose abtransportieren kann. Durch die Akkumulation der Saccharose, wird die Saccharosesynthese gedrosselt und die Triosephosphate verbleiben im Chloroplasten und fließen in die Synthese von Stärke. Auf diese Weise baut sich das Stärkedepot bei gleich bleibendem Saccharose- und Hexosephosphatpoollevel auf. Nach Anbruch der Nacht, kommt der Nachschub von Triosephosphaten zum Erliegen, durch den weiterlaufenden Bedarf an Hexosephosphaten für Synthesen und Energie bedarf bedingt durch das kontinuierliche Wachstum (Smith and Stitt, 2007), droht ein Mangel an Hexosephosphaten. Die Stärkesynthese wird gestoppt und um den Hexosephosphatpool aufrecht zu erhalten werden nun die Stärke- und Saccharosespeicher der Zelle abgebaut. Im Verlaufe der Nacht kommt es so zu einem linearen Abbau der Stärke und der Saccharose. Der Abfluss der Kohlehydrate und die weiterlaufenden Stoffwechselprozesse sind, auf noch unbekannt Weise, so aufeinander abgestimmt. Genau zum Ende einer Nacht ist der Stärkevorat und der Saccharosevorat weitestgehend aufgebraucht und die Pflanze ist auf einen neuen Tag angewiesen. Bei einer für die Pflanze außerplanmäßigen Verlängerung der Nacht können die Stoffwechselvorgänge nach Smith and Stitt (2007) nur wenige Stunden aus den letzten Reserven aufrecht erhalten werden und führen letztendlich zum Zusammenbruch des Hexosephosphatpools und zum Stopp des Wachstums. Wie erwähnt unterliegt die freie Glukose ebenfalls einem Rhythmus, der dem Verhalten der Saccharose ähnelt. Der Ursprung Ursprung nicht-aktivierten Glukose wird von den Autoren nicht diskutiert. Die Aktivität zytosolischer Invertasen könnte aber für die Konzentrationsentwicklung der nicht-aktivierten Glukose verantwortlich sein und so auch die Verbindung zur Saccharose herstellen. Außerdem ist, wie Fischer and Weber (2002) zusammenfassen, Glukose ein Produkt des Abbaus transitorischer Stärke und wird über einen glukosespezifischen Transporter (*pGlcT*), in der Chloroplastenhülle, exportiert.

Dass die freie nicht-aktivierte Glukose für die Regulation der Stromuli eine bedeutende Rolle spielen könnte ergibt sich aus den Versuchen mit 3-OMG, welche die Hexokinase als einen Auslöser für die Stromulibildung wahrscheinlich macht. Da die Signalwirkung von

²in denen sich Saccharose und Glukose als starke Induktoren von Stromuligenese erwiesen haben

5. Diurnaler Lichtrhythmus

Hexokinase von ihrem Umsatz der Glukose zu Glukose-6-Phosphat abhängt (Rosa et al., 2009), ist wahrscheinlich der Fluss aus dem Glukosepool zum Hexosephosphatpool für die Intensität des Stromulsignals wichtig und würde bei sinkendem Glukosespiegel während der Nacht auch die sinkende Stromulhäufigkeit erklären.

Wie bereits ausgeführt, stimmt mit diesen Vorgängen der von verschiedenen Autoren experimentell bestimmte Zuckerspiegel über den Tag und der Verlauf der Stromulhäufigkeit überein. Ob die Stromulhäufigkeit im Verlaufe des Tages von der zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Konzentration an Glukose und Saccharose wirklich direkt oder auch nur indirekt abhängig ist bleibt weiterhin zu spekulieren, aber eine Verbindung scheint nicht von der Hand zu weisen. Eine Möglichkeit eine Abhängigkeit zu überprüfen bietet die Manipulation der freien in der Zelle vorhandenen Zucker. Einen Weg dies zu tun, außer sie von außen anzubieten, bieten Mutanten des Kohlehydratstoffwechsels, von denen einige die verschiedenen löslichen Zucker zu höheren Konzentrationen akkumulieren als der Wildtyp. Die Phosphoglucomutase-Mutante *pgm* ist eine solche Mutante. Die fehlende Phosphoglucomutase führt dazu, dass die Pflanze keine Stärke mehr bildet und alle Assimilate als freie lösliche Zucker vorliegen. Antonio et al. (2007) und Bläsing et al. (2005) konnten zeigen, dass in *pgm*-Mutanten die löslichen Zucker Saccharose, Glukose, Fruktose und einige phosphorylierte Hexosen während des *normalen Tages* bedeutend höhere Konzentrationen erreichen als im Wildtyp. Nach Einbruch der Nacht bricht auf Grund des fehlenden Stärkepuffers, in den Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp die Konzentration rapide ein. Durch eine Analyse der Stromulhäufigkeit in *pgm*-Mutanten ließe sich so ein Zusammenhang zwischen Stromulhäufigkeit und freier Zuckerkonzentration hinterfragen ohne von außen Zucker zu füttern.

Auch wenn die Verwendung von Mutanten viel versprechend ist, bleiben die Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren, da ein aus der Balance gebrachter Zuckerhaushalt einen großen Einfluss auf die Physiologie der Zelle erwarten läßt. Weiterhin, würde auf diese Weise nicht geklärt werden können, welcher der erhöhten Zucker für die Stromulhäufigkeit verantwortlich ist und ob nicht zwischen den Zuckern und den Stromuli eine weitere Instanz liegt, die durch Zucker beeinflusst wird und nach der sich die Stromulhäufigkeit dann richtet. So würde die Verwendung verschiedener Mutanten und anderer Methoden klarere Einblicke liefern.

Zusammenfassend Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sehr wahrscheinlich ist, dass der sich durch die Belichtung ändernde Gehalt an freien Zuckern (Glukose und/oder Saccharose) in der Zelle für die sich ändernde Stromulhäufigkeit verantwortlich ist, der letztendliche Beweis aber noch aussteht.

6. Trockenstress

Eine Form des Stresses, denen sich die meisten Landpflanzen in ihrem Leben gegenübersehen ist zeitweiser Wassermangel. Pflanzen als sessile Lebewesen, die kurzfristig kein Wasser suchen gehen können, betrifft Trockenstress in besonderem Maße.

6.1. Durchführung

Um den Einfluss von Trockenstress auf die Stromulihäufigkeit zu untersuchen, wurden Arabidopsis Pflanzen einer allmählichen Austrocknung bis hin zum Erschlaffen der Blätter ausgesetzt. Von sechs Töpfen mit 10 Wochen alten Arabidopsis Pflanzen wurde zum Zeitpunkt *Null* die Stromulihäufigkeit in der oberen Epidermis bestimmt, anschließend bewässert und die Töpfe gewogen. Ab diesem Zeitpunkt wurden drei dieser Töpfe nicht mehr bewässert und bildeten die Proben P1, P2 und P3. Die anderen drei Töpfe wurden zur Kontrolle in regelmäßigem Abstand wie zuvor mit Wasser versorgt (K1, K2 und K3). Der Wasserverlust in den Töpfen über die Tage wurde durch wiegen verfolgt und ist in den Diagrammen der Abbildung 6.1 als schwarze Linie dargestellt.

Nach neun Tagen, war die Erde in den Töpfen der Probepflanzen oberflächlich sicht- und fühlbar trocken. Die zweiten Blattproben wurden genommen und die Stromulihäufigkeit bestimmt. Die Pflanzen zeigten zu diesem Zeitpunkt noch keine sichtbaren Turgorverlust. Drei bis vier Tage danach waren die Probepflanzen komplett erschlafft. Zu diesem Zeitpunkt wurden die dritten Proben zur Bestimmung der Stromulihäufigkeit genommen. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Blätter in diesem Fall mit Percoll vakuumfiltriert um die Beeinflussung der Proben durch zu schnelle Aufnahme von Wasser in die Zellen möglichst gering zu halten. Nach der Entnahme der Proben wurden die Pflanzen bewässert und am nächsten Tag auf ihren Stromuligehalt hin untersucht. Alle Probepflanzen waren zu diesem Zeitpunkt wieder voll turgeszent (Abb. 6.1 C).

6.2. Ergebnisse

In Pflanzen mit Turgorverlust sinkt die Stromulihäufigkeit. Obwohl die Stromulihäufigkeit in den Pflanzen dieser Charge sehr schwankte lassen die Experimente in den Proben (Abb. 6.1 A) und Kontrollen (Abb. 6.1 B) deutliche Trends erkennen. In den Kontrollpflanzen ist bis auf die erwähnte Schwankung kein deutlicher Anstieg oder Absinken der Stromulihäufigkeit zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist ein Einbruch der Stromulihäufigkeit zu erkennen wenn die Pflanzen den Verlust des Turgors erleiden. 24h nach der Bewässerung der erschlafften Pflanzen sind diese wieder voll Turgeszent und haben ihre Ausgangstromulihäufigkeit erreicht.

6. Trockenstress

Vergleicht man die Pflanzen, welche Trockenstress hatten mit den Kontrollen, fällt die teils zurückgebliebene Entwicklung der Blätter (kleinere Rosette) und die Anthocyanakkumulation in den Blattstielen der Proben auf (Abb. 6.1 D). Beides sind deutliche Zeichen dafür, dass die Pflanzen unter Trockenstress standen.

Die Ergebnisse zeigen, dass im Verlauf der Austrocknung des Substrates die Stromulihäufigkeit, selbst wenn dieses bereits fühlbar trocken ist, konstant bleibt. Erst wenn die Pflanzen den Turgor nicht mehr aufrecht erhalten können, geht der Anteil von Plastiden mit Stromuli deutlich zurück. Die zeitliche Auflösung der Austrocknung in den Experimenten ist nicht sehr hoch und lässt keine Aussagen über die Vorgänge in den Tagen und Stunden kurz vor dem Turgorverlust zu.

6.3. Diskussion

Die Vorgänge in einer trockengestressten Pflanze sind komplex. Durch Trockenstress sieht sich die Pflanzenzelle hauptsächlich einem negativen Turgor, einer höheren Konzentration von gelösten Substanzen und geänderten Membranpotentialen sowie einer gefährdeten Protein- und Membranintegrität gegenüber. Austrocknung verursacht auf diesen Wegen eine Vielzahl von Schäden auf deren Vermeidung und Überwindung sich die Pflanze einstellen muss um die Stressphase zu überleben. Aus diesem Grund kommt es zu einer komplexen Stressantwort. Die während des Stresses in den Pflanzen auftretenden Prozesse dienen zum einen der direkten Behebung und Eindämmung von Schäden (kurz- bis mittelfristige Antworten) und zum anderen der Etablierung von präventiv Maßnahmen (langfristige adaptive Antworten) (Beck et al., 2007).

Ist der Rückgang der Stromulihäufigkeit Teil der kurzfristigen oder der adaptiven Stressantworten? Obwohl die Trockenstressantwort sehr komplex ist, besteht abgeleitet vom Hefesystem eine konkrete Vorstellung wie Trockenstress spezifisch erkannt werden kann und welche anderen Signalwege mit der Signalkaskade interagieren. Beck et al., 2007 fassen zusammen, dass in der frühen Antwort auf osmotischen Stress eine membrangebundene Kinase eine, verschiedene *second messenger* enthaltende, Signalkaskade anstößt und diese wiederum unter anderem zur von Kalzium abhängigen Aktivierung weitere Proteinkinasen und -phosphatasen führt. Letztendlich erfolgt eine Transkriptionsaktivierung vieler Gene mit charakteristischen *cis-acting-elements* in der Promotorsequenz. Zu den gebildeten Proteinen gehören unter anderem Enzyme, die osmotisch wirksame Moleküle zum Schutz der Membranen und Proteine synthetisieren und somit in der langfristigen Antwort zur Adaption der Pflanze führen. Auf Grund von Homologie vergleichen gibt es fundierte Hinweise, dass die Situation in Pflanzen ähnlich ist. In Pflanzen kommt jedoch hinzu, dass ABA in der Regulation und Aktivierung der Komponenten eine bedeutende Rolle spielt (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).

Da im hier durchgeführten Trockenstressexperiment die Austrocknung allmählich erfolgte und der Turgorverlust recht lange wirkte, ist nicht klar zu unterscheiden, ob sich das Signal zur Unterdrückung der Stromulibildung aus den Signalwegen der frühen Antwort oder aus dem veränderten Metabolismus der langfristigen Antwort ableitet. Eine rapide Auslösung des

Turgorverlustes könnte dazu dienen die Bedeutung der kurzfristigen Antwort getrennt von der adaptiven zu untersuchen. Induktionsversuche mit Mannitol oder Sorbitol in Konzentrationen, die dem Zellsaft nahe kommen und diesen übertreffen oder Austrocknungsversuche an abgeschnittenen Blättern, sollten geeignet sein den Einfluss der frühen osmotischen Stressantwort auf die Stromulihäufigkeit zu hinterfragen.

Welche durch Trockenstress beeinflussten Vorgänge könnten einen Einfluss auf die Stromuli haben? Flexas et al., 2004 sprechen davon, dass sich die gesamte Pflanze mit ihrer Physiologie auf den Wassermangel einstellen muss und deshalb eher von einer Umprogrammierung der Pflanze gesprochen werden kann. Auf Grund der komplexen Antwort ist es schwer eine konkrete Verbindung zwischen einzelnen Aspekten des Trockenstresses und der Stromuli herzustellen. Eine wie Flexas et al. (2004) zusammenfassende Auswirkung von Trockenstress ist die Behinderung der Photosynthese durch verschiedene den Trockenstress begleitende Umstände, wie geringen CO_2 -Gehalt in den Blättern¹ und höherem oxidativen Stress². Wie Flexas et al. (2004) zusammen fassen bleibt die biochemische Kapazität der Photosynthese bei leichtem und moderatem Trockenstress (gemessen an der Durchlässigkeit der Stomata) unbeeinflusst. Die Autoren sehen aber die Möglichkeit, dass der auf Grund geschlossener Stomata, sinkende CO_2 -Gehalt, den damit zusammenhängenden Metabolismus indirekt beeinflusst. So kann eine Verringerung der Photosynthese Rate auf Grund eines geringen CO_2 -Gehaltes unter Trockenstress beobachtet werden (Mahajan and Tuteja, 2005). Erst bei einem sehr akuten Trockenstress, wie es wahrscheinlich bei den erschlafenen Blättern der Fall war, kommt es zu einer Repression der biochemischen Kapazität der Photosynthesemaschinerie. So ist unter diesen drastischen Bedingungen ein simultanes Absinken der *maximalen photochemischen Ausbeute*, der Rubisco- und Nitratreduktaseaktivität sowie der ATP-Konzentration zu beobachten (Flexas et al., 2004). Es ist sehr wahrscheinlich, dass als Konsequenz daraus sich dehydrierte Zellen in einem Zustand befinden in dem wenig Kohlenhydrate umgesetzt werden. Die Vorgänge wie sie im Kapitel über den Lichtrhythmus, als verantwortlich für den Stromuligehalt über den Tag, beschrieben wurden, scheinen demnach in Zellen unter extremen Trockenstress nicht abzulaufen. Stromuli scheinen unter solchen Bedingungen nicht notwendig zu sein und deshalb nicht gebildet zu werden.

¹auf Grund geschlossener Stomata

²auf Grund von gestörtem Abfluss der Elektronen aus der Lichtreaktion

6. Trockenstress

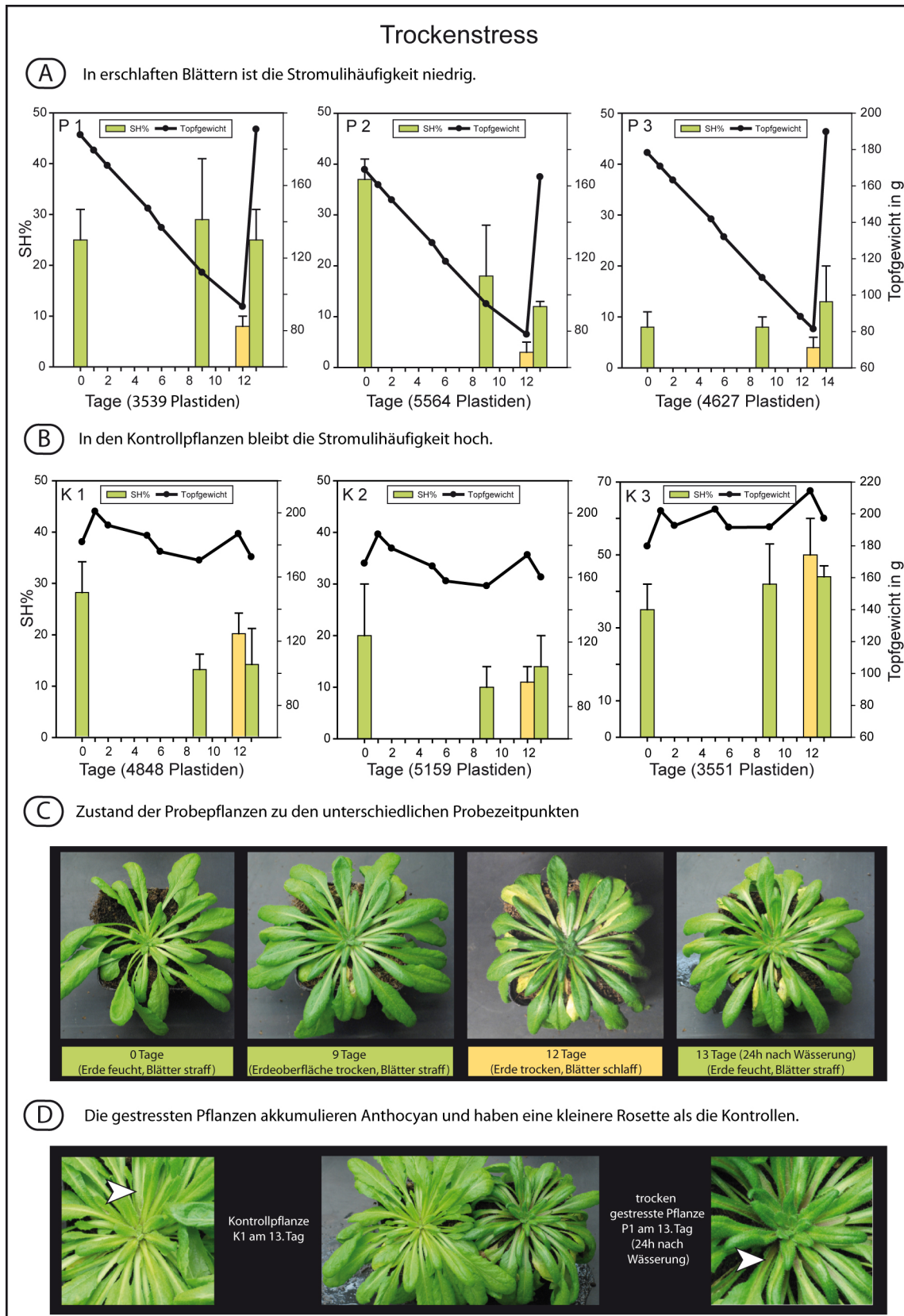


Abbildung 6.1.: Wirkung von Trockenstress auf die Stromulihäufigkeit - A) Stromulihäufigkeiten in den Blattepidermen der Pflanzen, die nicht weiter gegossen wurden (Proben). B) Stromulihäufigkeiten in den Blattepidermen der Pflanzen, die weiter gegossen wurden (Kontrollen). C) Bilder einer Proben-Pflanze, die den Austrocknungsprozess dokumentieren. D) Zeichen für den Stress, den die Proben-Pflanzen ausgesetzt waren sind Anthocyanakkumulation und im Vergleich zur Kontrolle ein Entwicklungsdefizit. SH% bezeichnet die relative Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. Jede Säule der Diagramme steht für den Mittelwert aus 6 unabhängigen Bildabschnitten mit seiner Standardabweichung.

7. Pathogene

Pflanzen sehen sich fortwährend den Angriffen verschiedenster Pathogene ausgesetzt. Die Epidermis als Abschlußgewebe dient der Pflanze als erste Barriere gegen die meisten Pathogene. Durch sie erfolgt in der Regel die Erkennung des Pathogens und die ersten Abwehrreaktionen. Ziel der im folgenden präsentierten Experimente war es zu hinterfragen, wie die Plastiden auf die Konfrontation der Epidermis mit verschiedenen Pathogenen und pathogenbezogenen Stimuli reagieren. Als Wirtspflanze wurde neben *A. thaliana* auch *N. benthamiana* eingesetzt.

7.1. Pathogeninteraktion mit *Arabidopsis thaliana*

7.1.1. *Phytophthora infestans*

P. infestans ist der Erreger der *Kraut- und Knollenfäule* und gehört zu den Oomyceten. Als Stramenopile sind sie sehr nahe mit den Braunalgen und nur entfernt mit den echten Pilzen verwandt (Fry, 2008). *P. infestans* ist ein hemibiotrophes Pathogen. Es wächst in seiner ersten Lebensphase biotroph und ist abhängig von der Ernährung durch lebende Wirtszellen. Diese biotrophe Phase wird von einer nekrotrophen Phase abgelöst in der das Pathogen das Wirtsgewebe tötet und sich davon ernährt. Auf seinen primären Wirten (Tomate und Kartoffel) durchläuft *P. infestans* den kompletten Lebenszyklus (Abb. 7.1 A). Wirtspflanzen, die sich durch Resistenz gegen den Erreger auszeichnen reagieren auf den Oomyceten sehr früh mit einem komplexen Gemisch aus spezifischen und unspezifischen zellulären Antworten. Die spezifischen führen zu einem schnellen gezielten Zelltod (*hypersensitive response* = HR) (Huitema et al., 2003), der dem Pilz die Nahrungsgrundlage in der biotrophen Lebensphase raubt und ihn absterben lässt (Abb. 7.1 B und C). Grundlage für die wirtsspezifische Abwehr ist die Interaktion eines pflanzlichen Resistenz- und eines pathogenspezifischen Avirulenzproteines (Cohn et al., 2001).

A. thaliana eco. columbia ist kein natürlicher Wirt von *P. infestans* und ist allein durch seine *Nichtwirtsresistenz* gegen das Pathogen geschützt. Diese Form der Resistenz beschreibt die Unfähigkeit einer gesamten Pathogen-Spezies eine bestimmte Pflanzen-Spezies zu kolonisieren. Die Nichtwirtsresistenz stellt die vorherrschende Form der Resistenz dar und führt dazu, dass Pflanzen nur in Ausnahmen durch ein Pathogen besiedelt werden können (Heath, 2000). Grundlage dieser Basalresistenz, ist die Aktivierung allgemeiner Abwehrmechanismen durch die Erkennung von mit dem Pathogen assoziierter molekularer Muster (*pathogen associated molecular patterns*; PAMPs). PAMPs, die auch als generelle Elicitoren bezeichnet werden, können zum Beispiel (Glyko)proteine, Glykolipide, Peptide oder Lipopolysacchride sein (Garcia-Brugger et al., 2006). PAMPs sind typischerweise charakteristisch für eine ganze Klasse

7. Pathogene

mikrobieller Pathogene, wie z. B. die pilzlichen Zellwandbestandteile Chitin oder das bakterielle Flagellin.

Die *Nichtwirt*-Interaktion zwischen *P. infestans* und *A. thaliana eco. columbia* ist ein gut charakterisiertes Modellsystem um die Mechanismen dieser Interaktionen zu studieren (Landtag, 2006; Huitema et al., 2003). In Zusammenarbeit mit Dr. L. Westphal aus der Abteilung von Prof. D. Scheel, vom Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale), wurden Infektionsversuche von *A. thaliana* mit *P. infestans* unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Eine Besonderheit bei der Interaktion von *A. thaliana eco. col.* und dem hier eingesetzten Isolat von *P. infestans* (CRA208) ist, dass es, im Gegensatz zu den von Vleeshouwers et al. (2000) beschriebenen Interaktionen, nur bei hohen Inokulumkonzentrationen zu einer HR kommt (Landtag 2006). Die HR scheint bei der Abwehr von CRA208 eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies bietet für die zellbiologische Untersuchung einen deutlichen Vorteil. Durch den ausbleibenden Zelltod, können die zellulären Reaktionen über mehrere Tage verfolgt werden. Bei einer HR wären die betreffenden Zellen nach 24h bis 48h Tod.

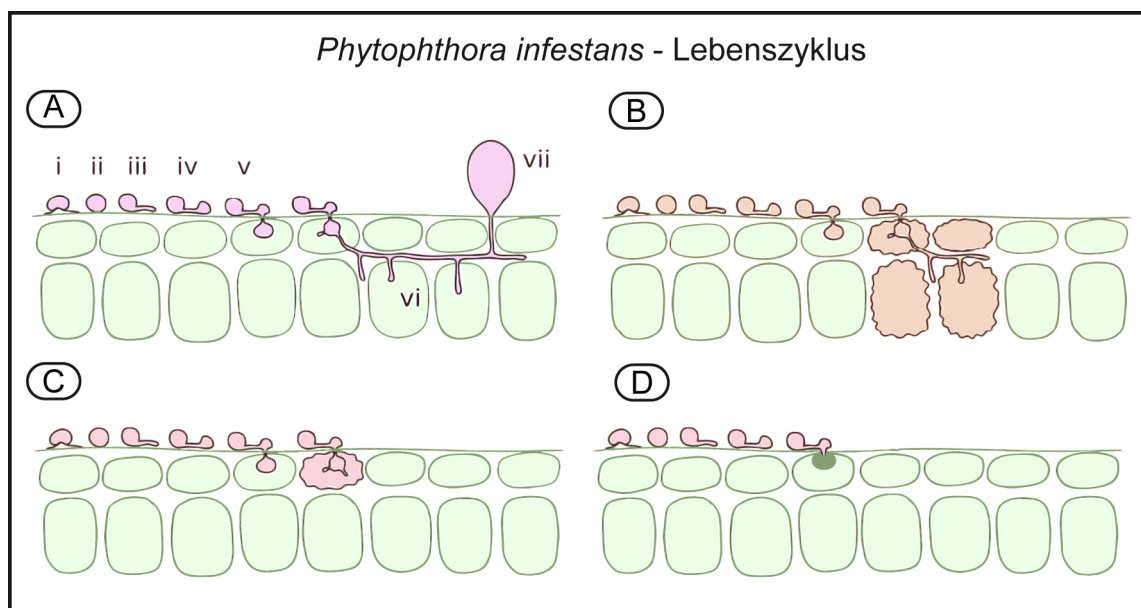


Abbildung 7.1.: Asexueller Lebenszyklus von *Phytophthora infestans* auf einer suszeptiblen (A) und auf resistenten Pflanzen (B-C). Die Infektion geht von mobilen und zellwandlosen Zoosporen (i) aus, die aus Sporangien (vii) schlüpfen. Die Zoosporen setzen sich auf der Wirtsoberfläche ab, kapseln sich ein (ii) und keimen (iii). Bei höheren Temperaturen (über 20°C) können die Sporangien auch selbst keimen. Die sich bildenden Keimschläuche bilden an ihrer Spitze Appressorien (iv) aus. Durch die Appressorien gelingt es dem Oomyceten die entsprechende Epidermiszelle zu penetrieren und in die lebende Zelle einzudringen (v). Die anschließend gebildete haustorienähnliche Struktur (vi) dient dem Austausch von Effektoren und der Ernährung des Pathogens. Das sich im weiteren Verlauf bildende Geflecht aus Hyphen wächst verzweigt in den Interzellularen und bildet in kleinen Abständen fingerähnliche Haustorien (vi). *P. infestans* schaltet im weiteren Verlauf seines Lebens auf Nekrotrophie um und tötet das befallene Gewebe (hier nicht dargestellt). Die gebildeten Sporangioophoren, die aus den Stomata ragen bilden eine große Menge Sporangien (vii). Nach Verbreitung der Sporangien schwärmen aus ihnen, unter kühlen und feuchten Bedingungen, die neuen Zoosporen aus. Bei resistenten Pflanzen kommt es meist zu einem gezielten Absterben (HR) von entweder einzelnen Zellen (C) oder Zellgruppen (B), die mit dem Pathogen in Kontakt waren. Bei der Interaktion von *P. infestans* (CRA208) mit *A. thaliana eco. columbia* kommt es bei moderaten Inokulumkonzentrationen zur Papillenbildung der infizierten Zellen und nur selten zu einer HR (D) (Landtag, 2006). Abbildung abgeändert nach Kamoun and Smart, 2005.

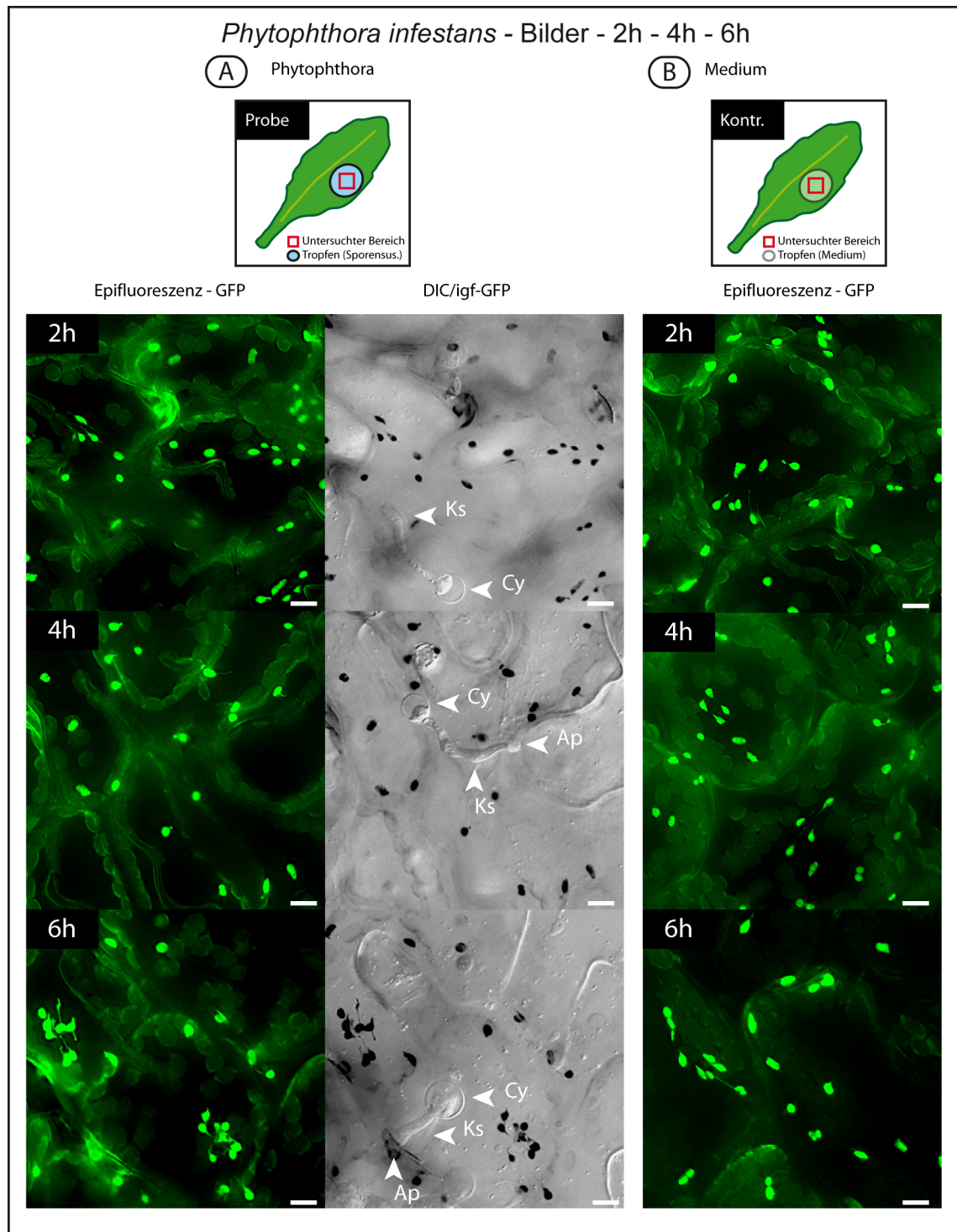


Abbildung 7.2.: Die Epidermis nach 2 h, 4 h und 6 h einer Infektion mit *P. infestans* - gezeigt sind repräsentative Bildabschnitte der einzelnen Zeitpunkte **A**) einer Probe (Sporensuspension) und **B**) der Pufferkontrolle. Die Epidermiszellen außerhalb behandelter Bereiche gleichen denen der Pufferkontrolle, weshalb hier auf die Abbildung verzichtet wurde. In der Überlagerung des Differenziellen-Interferenz-Kontrastes mit der invertierten Graustufenfluoreszenz (DIC/igf-GFP) wird die Lage der keimenden Zysten (**Cy**), der Keimschläuche (**Ks**) und der sich bildenden Appressorien (**Ap**) relativ zu den Plastiden erkenntlich. Bereits nach 6 h wird eine Zunahme von Stromuli deutlich. Für weitere Details siehe 7.1.1 auf Seite 83. Der Größenbalken entspricht 10 μ m.

Durchführung

Proben - Zur Infektion wurde das Inokulum, bestehend aus einer Suspension von Sporen und Sporangien, auf die Rosetten getropft (Landtag, 2006). Zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h sowie 96 h nach dem Auftropfen, wurden jeweils 3 Blätter geerntet und die dem Inokulum ausgesetzten Bereiche mit jeweils 6 z-Stacks dokumentiert. Die Infektion wurde unabhängig von einander an zwei unterschiedlichen Pflanzenchargen durchgeführt. Kontrollen - Auf Grund der Prozedur wie die Sporensuspension gewonnen wird (Landtag, 2006), besteht die Möglichkeit, dass das Inokulum Saccharose enthält. Da Stromuli sich durch Saccharose auch in geringen Konzentrationen induzieren lassen, wurde zur Kontrolle Inokulum von einer Petrischale mit Kulturmedium ohne Pilz gewonnen¹ und auf Arabidopsisblätter getropft. Zur internen Kontrolle wurde zusätzlich für jede Behandlung pro Zeitpunkt ein Bereich, außerhalb der Tropfen dokumentiert (Abb. 7.4 auf Seite 82).

Ergebnisse

Keimung und Entwicklung der Sporen Bereits 2h nach dem Auftropfen sind die ersten gekeimten Sporen zu finden (Abb. 7.2 auf der vorherigen Seite). An einigen der Keimschläuche ist zu erkennen, wie sich deren Enden verdicken und sich die ersten Appressorien bilden. Die keimenden Sporen, zeigen deutliche GFP-Fluoreszenz in deren Zytosol (nicht gezeigt). Das im Oomycetengenom integrierte GFP-Genkonstrukt dient als Vitalitätsmarker und hilft lebende Pathogenstrukturen durch deren Fluoreszenz zu identifizieren. Nach 4h ist der Überwiegende Teil der Sporen gekeimt und hat Appressorien gebildet. Unter den Appressorien einiger früh gekeimter Sporen sind bereits sich bildende Papillen zu erkennen. Dies zeigt, dass die Zellen Abwehrreaktionen eingeleitet haben. Obwohl der Überwiegende Teil der Sporen noch Lebend ist, weisen einige bereits keine GFP-Fluoreszenz mehr auf. Nach 24 h sind die Sporen alle gekeimt und Appressorien wurden von den meisten Keimhyphen gebildet. Unter den gebildeten Appressorien sind die von der Zelle gebildeten Papillen zwar noch klein, aber dennoch gut zu erkennen (Abb. 7.3 auf der nächsten Seite). Bei Infektionen mit sehr hoher Sporendichte wurden zu diesem Zeitpunkt vereinzelt tote Zellen, die durch HR starben, gefunden. Ebenfalls vereinzelt finden sich Keimhyphen, die noch kein Appressorien gebildet haben, in ihnen ist wie in den meisten Oomycetenstrukturen zu diesem Zeitpunkt die zytosolische GFP-Fluoreszenz zu sehen (nicht gezeigt). Nach 48h sind die meisten der gebildeten Papillen bräunlich verfärbt. Dabei handelt es sich nach Vleeshouwers et al. (2000) um phenolische Substanzen, welche die Pflanze zur Unterstützung der Pathogenabwehr in die Papillen einlagert. Die meisten Keimschläuche und Appressorien sind zu diesem Zeitpunkt zusammengefallen und die fehlende GFP-Fluoreszenz zeigt, dass der größte Teil der Infektionsstrukturen tot ist. In den letzten zwei Tagen der Beobachtung (72 h - 96 h) wurden die gebildeten Papillen durch die Zellen weiter vergrößert und mit phenolischen Substanzen inkrustiert. Einige der Papillen verfärbten sich in Folge dessen dunkelbraun. Keine lebenden Oomycetenstrukturen sind auf den Blättern befinden. Die Kontrollbereiche ohne Sporensuspension und die Kontrolle mit Medium zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Veränderungen.

¹Diese Medium-Kontrolle ist auch frei von durch den Oomyceten abgegebene Elicitoren.

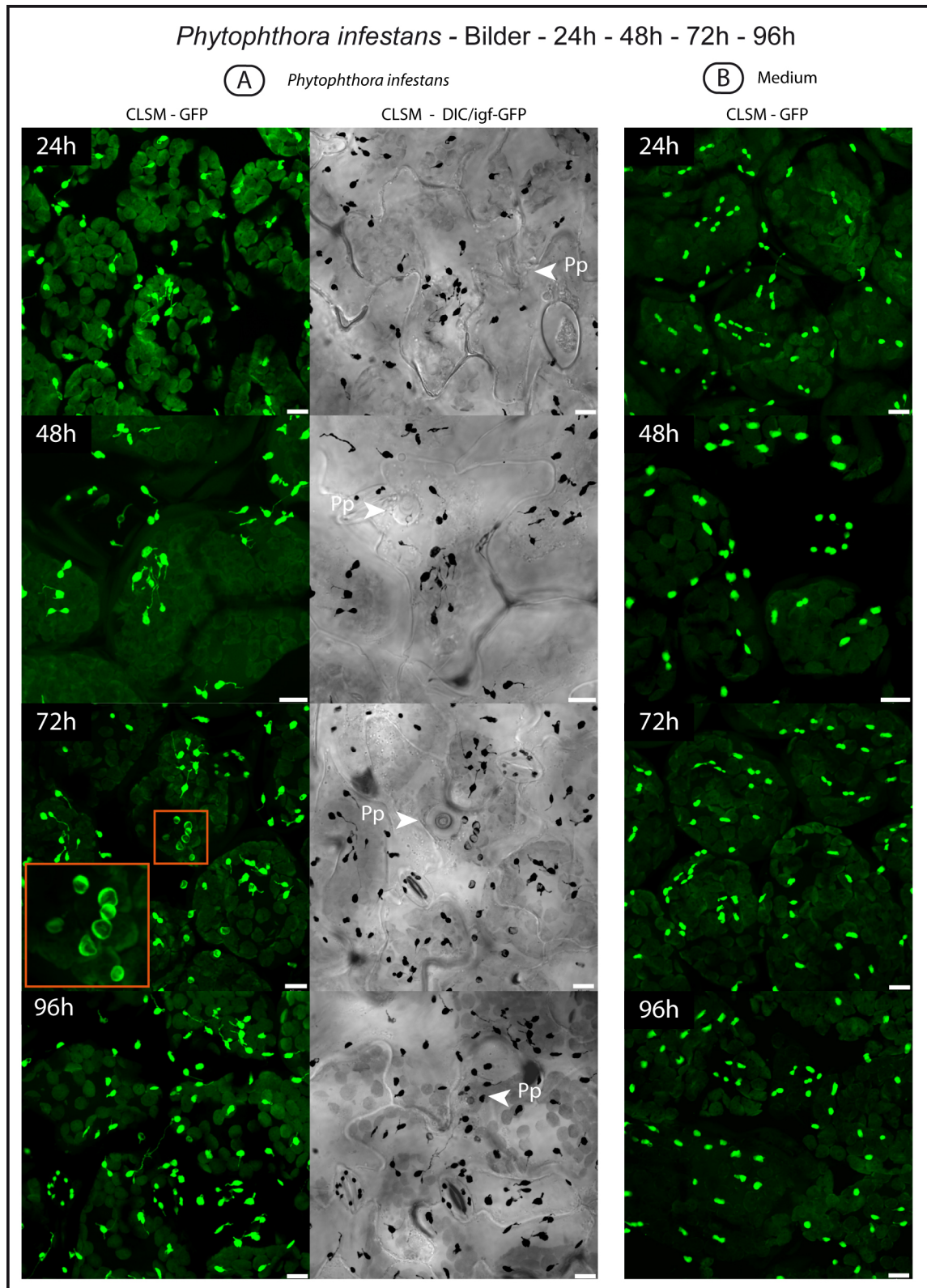
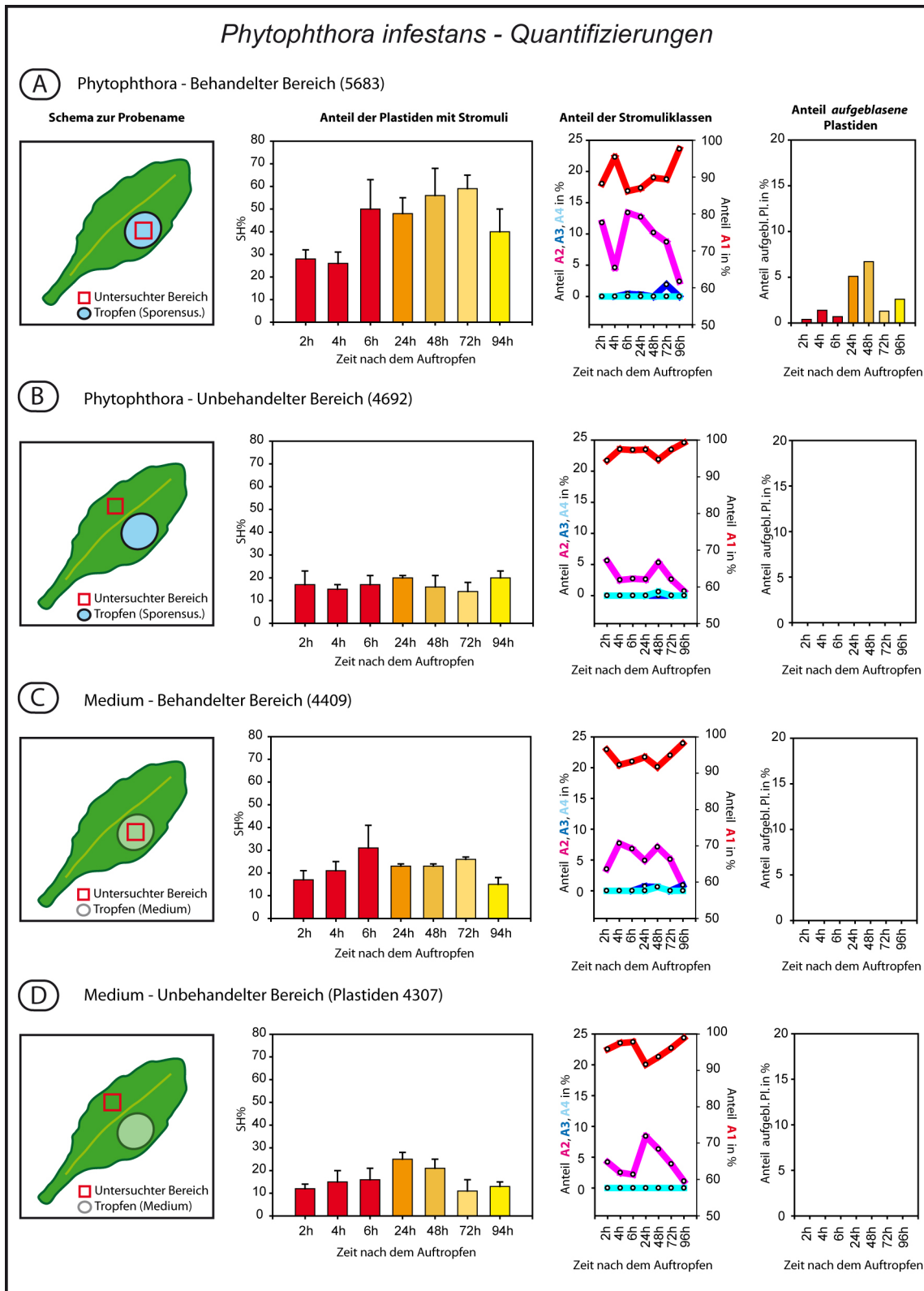


Abbildung 7.3.: Die Epidermis nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h einer Infektion mit *P. infestans* - gezeigt sind repräsentative Bildabschnitte (PFA fixierten Materials) der einzelnen Zeitpunkte **A**) einer Probe (Sporensuspension) und **B**) der Pufferkontrolle. Die Epidermiszellen außerhalb behandelter Bereiche gleichen denen der Pufferkontrolle, weshalb hier auf die Abbildung verzichtet wurde. In der Überlagerung des Differenziellen-Interferenz-Kontrastes mit der invertierten und Graustufenfluoreszenz des GFPs (DIC/iswGFP) sind deutlich die sich bildenden Papillen (Pp) zu sehen, die im Laufe der Zeit in ihrer Mitte sich dunkel färben (vergl. 48h mit 72h). Deutlich sind die *aufgeblasenen* Plastiden mit den fluoreszenzfreien Stellen zu erkennen (72h). Der Unterschied in der Stromulihäufigkeit zwischen behandelten Bereichen und der Kontrolle ist sehr deutlich zu erkennen. Für weitere Details siehe 7.1.1 auf Seite 83. Die Größenbalken entsprechen 10 μm .



Reaktion der Plastiden Trotz bereits keimender Sporen ist in den ersten 4 h kein Unterschied zwischen den betropften und den Kontrollbereichen zu beobachten. Erste Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Bereichen werden 6 h nach der Infektion sichtbar. Die Stromulihäufigkeit steigt in den mit Inokulum betropften Bereichen um 20 %-Punkte auf über 50 %. Zum gleichen Zeitpunkt, nimmt der Anteil von Plastiden mit mehr als einem Stromulus deutlich zu (Abb. 7.4 auf der vorherigen Seite). Die Stromulihäufigkeit bleibt bis 72 h nach der Inokulation auf gleichem Niveau. Nach 6 h sind in den mit Inokulum betropften Bereichen Plastiden zu finden, die im Gegensatz zu Plastiden aus den Kontrollbereichen, nicht fluoreszente Bereiche im Plastidenkörper aufweisen (Abb. 7.3 auf Seite 81 72 h). Diese GFP-freien Bereiche scheinen über die Tage größer zu werden, was die Plastiden *aufgeblasen* erscheinen lässt. Die Zahl betroffener Plastiden nimmt über die Zeit zu und erreichen ihre maximale Häufigkeit nach 24h-48h. In den Kontrollen ist kein solcher Plastid zu finden. Auffällig ist, dass meist alle Plastiden der betroffenen Zelle eine solche Form haben. Zwischen 72 h und 96 h sinkt die Stromulihäufigkeit und die *aufgeblasenen* Plastiden werden ebenfalls seltener. Die Zellen scheinen sich auf den *Normalzustand* zurück zu begeben. Dennoch sind nach 96 h, im Vergleich zum Ausgangspunkt des Experimentes, deutlich mehr Stromuli und *aufgeblasene* Plastiden zu verzeichnen.

7.1.2. *Erysiphe cruciferarum*

Im Gegensatz zu *P. infestans* sind *Erysiphe*-Arten echte Pilze und werden zum Phylum der Ascomycota gezählt. Phylogenetisch stehen sie somit recht entfernt von den Oomyceten (Baldauf et al., 2000; Sogin and Silberman, 1998) und besitzen eine chitinisierte Zellwand. *E. cruciferarum* und *E. cichoracearum* sind Vertreter der *Erysiphe*-Arten mit einem breiteren Wirtsspektrum und befallen unter anderem auch verschiedene *Arabidopsis* Akzessionen (Adam et al., 1999). Bei solchen, auch als kompatibel bezeichneten Interaktion, gelingt es dem Pathogen die Basalresistenz bestimmter Pflanzen zu überwinden bzw. zu unterdrücken und sich erfolgreich auf den anfälligen Wirtspflanzen zu etablieren. Der Ökotyp Columbia, welcher häufig als genetischer Hintergrund für Mutanten und transgene Linien verwendet wird, ist für beide Spezies anfällig (Adam et al., 1999).

Durchführung

Die verwendete Spezies wurde als *E. cruciferarum* identifiziert (siehe Material und Methoden). Die Infektion mit *E. cruciferarum* (Übertragung von Conidiosporen) erfolgte durch betupfen von Blättern nicht infizierter Pflanzen mit *mehligem* Blättern (conidiosporenhaltig) infizierter Pflanzen. Nach einigen Tagen wiesen die Blätter einen Besiedlungsgradienten, vom Ausgangspunkt der Infektion hin zur Peripherie, auf. Entlang dieses Gradienten wurden Bilder aufgenommen (Abbildung 7.5 A).

Ergebnisse

In Bereichen mit etablierten Hyphen finden sich mehr Stromuli. In den Bereichen, die noch nicht durch die Hyphen erreicht wurden sind keine Unterschiede zu den unbehandelten

7. Pathogene

Blättern zu erkennen (zum Vergleich siehe *Phytophthora-Kontrollen* und die *Beschreibung des Modellsystems*). In Bereichen beginnender Besiedlung sind unter den sich bildeten Appressorien keine Papillen zu erkennen, wie es bei *P. infestans* CRA208 der Fall war. Es war keine Zunahme an Stromuli zu erkennen (Abb. 7.5 Mitte). Die Appressorien sind gebildet, aber die Penetration hat noch nicht begonnen. In den stark besiedelten Bereichen, ist fast jede Zelle durch ein Appressorium penetriert und der Pilz durch Haustorien etabliert. Auf Grund der ruffeligen Struktur der Haustorien müssten diese älter als 24h sein und befinden sich nach dem System von Koh et al. (2005) im vierten und letzten durch die Autoren beschriebenen Stadium. Die Pflanze reagiert mit einer nur schwachen Papillenbildung und an einigen Penetrationsstellen scheint gar keine Papillenbildung erfolgt zu sein, was mit der Beschreibung von Koh et al. (2005) übereinstimmt. Auf der Oberfläche ist eine große Zahl an verzweigten Hyphen mit Conidiophoren zu finden. Bezüglich der Plastiden bietet sich ein ähnliches Bild wie bei den Infektionen mit *P. infestans*, es sind deutlich mehr Stromuli zu erkennen als in nicht infizierten Bereichen, weder Plastidenkörper noch Stromuli richten sich auf die Penetrationsstelle aus und es sind in manchen Zellen Plastiden mit GFP-freien Bereichen zu finden. Die Reaktion scheint nicht so stark auszufallen wie bei *P. infestans*, Genaueres lässt sich aber ohne Quantifizierung nicht sagen.

7.1.3. Diskussion - *P. infestans* und *E. cruciferarum*

Das signal zur Stromulibildung erfolgt bei erkennung des Pathogens. Bei den Infektionsversuchen mit *P. infestans* CRA208 fällt die sprunghafte Zunahme der Stromulihäufigkeit zwischen 4 h und 6 h auf. In diesem Zeitraum hatte der überwiegende Teil der Hyphen Appressorien gebildet und versuchte in das Wirtsgewebe einzudringen. Somit fällt der Anstieg der Stromulihäufigkeit in einen Zeitraum in dem das Pathogen, durch die Penetration der Zellwand und dem Wachstum auf das Plasmalemma zu, einen ersten direkten Kontakt zur Wirtszelle sucht. Das dieser Zeitpunkt wichtig für die wirtsunspezifische Abwehr gegen *Phytophthora* Spezies ist zeigt, dass in allen von Huitema et al. (2003) getesteten *Nicht-wirt*-Interaktionen diese Phase erreicht wird. Durch die zu diesem Zeitpunkt einsetzende Abwehr werden die Pathogene gestoppt und es kommt über diesen Punkt hinaus zu keiner weiteren Zunahme der Biomasse von *P. infestans* auf *A. thaliana* (Huitema et al., 2003). Für *E. cruciferarum* liegt leider keine so genaue zeitliche Auflösung der Infektion vor, basierend auf den Beobachtungen (Abb. 7.5 auf der nächsten Seite) kann aber davon ausgegangen werden, dass die Stromuliinduktion ebenfalls nach der Etablierung der Appressorien, während der Penetration erfolgt. Das stromuliinduzierende Signal wird dem zur Folge in beiden Fällen gleichzeitig mit der Induktion der Abwehr generiert. Aus diesem Grund stellen die Abwehr induzierende Signale viel versprechende Kandidaten für Auslöser der Stromuliinduktion dar. Wie bereits erwähnt dient der Pflanzenzelle zum Erkennen des Angriffs die durch das Pathogen sekretierten Effektoren oder PAMPs (Kamoun, 2006). Die Penetration der Epidermis mit Hilfe von Appressorien wird von filamentösen Pathogenen wie *P. infestans* und *E. cruciferarum* durch die Sekretion von verschiedenen, die Zellwand abbauenden Enzymen und anderen Effektoren, unterstützt (Hückelhoven, 2005; Kamoun, 2007). Bei diesem Vorgang werden

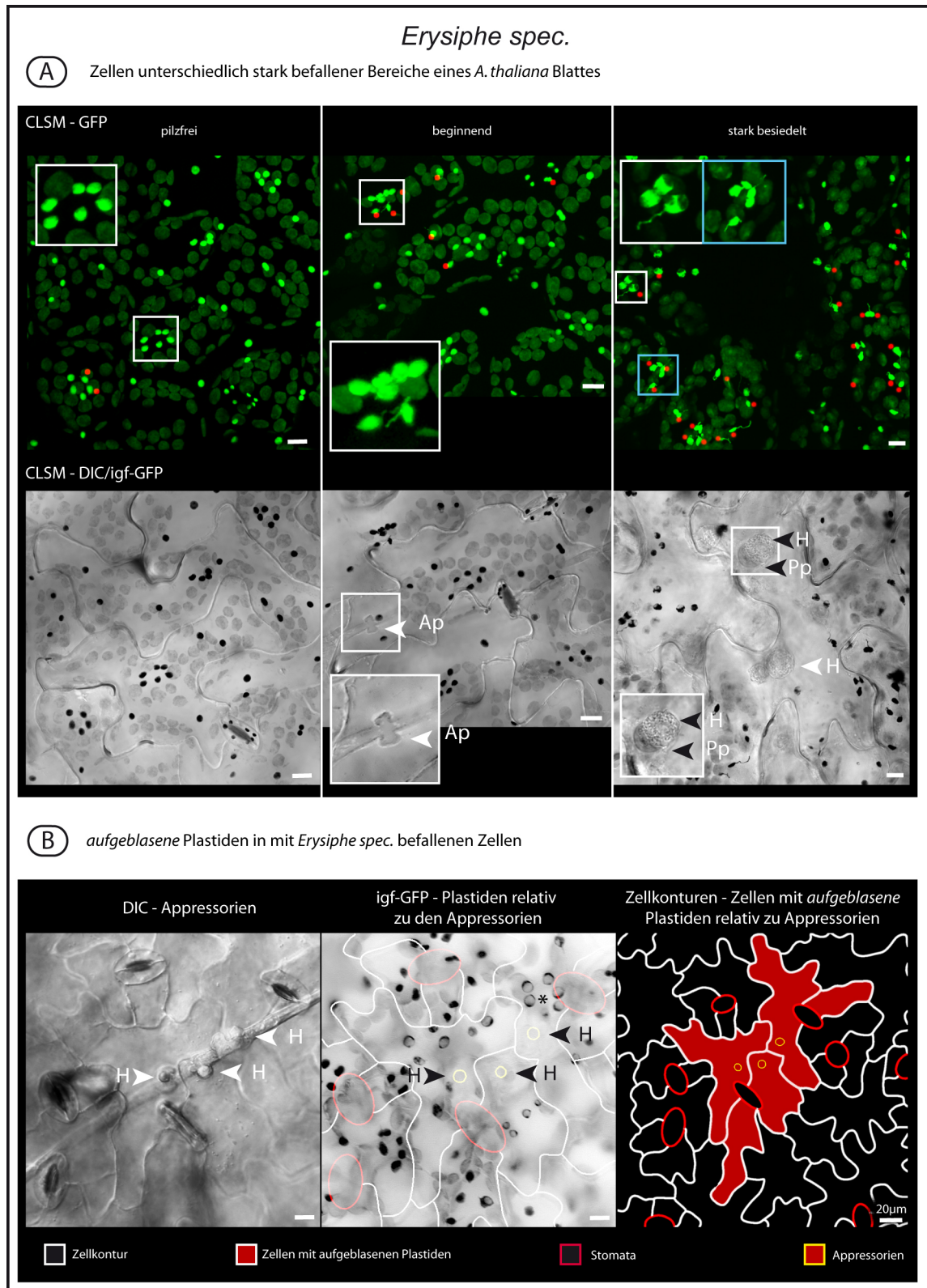


Abbildung 7.5.: Stromuli während *E. cruciferarum*-Besiedelung - **A**) CLSM Aufnahmen (*pilzfrei*, *beginnend* und *stark besiedelt*) obere Epidermis von *Arabidopsis thaliana* *eco. columbia* (PFA fixiert). Die stromulitragenden Plastiden wurden mit einem roten Punkt markiert. Besondere Appressorienform (**Ap**) von *E. cruciferarum* (*beginnend*), die sich nach Koh et al. (2005) im Übergang zum zweiten Infektionsstadium befinden. In *stark besiedelten* Bereichen, sind die etablierten Haustorien zu erkennen (**H**) sowie nur schwache Papillenbildung (**Pp**). **B**) *Insel* befallener Zellen mit *aufgeblasenen* Plastiden. Solche Inseln zeigen, dass die *aufgeblasenen* Plastiden auf infizierte Zellen und Zellen in deren unmittelbarer Umgebung beschränkt sind. Die Überlagerung der invertierten Graustufen-CLSM-Fluoreszenz und dem Differenziellen-Interferenz-Kontrast (*DIC/igf-GFP*) zeigt die relative Lage von Plastiden und der Pathogenstruktur. Größenbalken entsprechen wenn nicht anders angegeben 10 µm.

7. Pathogene

somit eine Vielzahl potentieller Signalmoleküle erzeugt. Obwohl von Effektoren in *P. infestans* angenommen wird, dass sie erst durch das Haustorium sekretiert werden², ist Transkription mancher Effektoren in *P. infestans* bereits 6h nach Inokulation zu beobachten³. Diese Aktivität fällt somit genau in das Zeitfenster der gestiegenen Stromulihäufigkeit und die Erkennung von sekretierten Effektoren durch die Pflanze wäre denkbar.

Das stromuliinduzierende Signal ist nicht für eines der filamentösen Pathogene spezifisch.

Da beide Pathogene Stromuli induzieren, ist zu vermuten das es sich bei dem auslösenden Signal nicht um ein für *P. infestans* spezifisches Signal handelt, sondern um Signal was durch beide Pathogene verursacht werden kann. Ein Beispiel für ein solches Signal wären pflanzliche Zellwandbestandteile, die während der Penetration durch pathogene Enzyme erzeugt werden. Das extrazelluläre Zucker als Stresssignale durch die Zelle interpretiert werden und die Expression pathogenbezogener Gene induzieren können, wurde im Rahmen der Zuckerexperimente bereits diskutiert. Die Wirkung von Chitin aus der pilzlichen Zellwand als PAMP ist auszuschließen, da *P. infestans* als Oomycet kaum über solches verfügt.

Neben der effektorbasierten Erkennung, verfügen die Epidermiszellen von *A. thaliana* über die Fähigkeit sehr lokal begrenzten mechanischen Stress, wie er an Penetrationsstellen von *P. infestans* auftritt, zu erkennen. Als Reaktion auf eine mechanische Stimulation kommt es nicht nur zu einer Umorganisation des Zytoskeletts und der Konzentration von ER und Golgi-Vesikeln (Hardham et al., 2008) an der Druckstelle, sondern auch zu veränderter Transkription (Lee et al., 2005). In wie weit diese Vorgänge auch die Stromulihäufigkeit beeinflussen können bleibt noch zu überprüfen. Das eine mechanische Stimulation ausreichend ist die Stromulihäufigkeit über den ganzen Beobachtungszeitraum (6h bis 96h) aufrecht zu erhalten bleibt fraglich, besonders da nach 48h keine lebenden Appressorien mehr vorgefunden wurden. Darüber hinaus konnte somit kein Druckreiz erfolgen. Elicitoren wie PAMPS stellen im Gegensatz dazu persistenterere Signale dar.

Die Komplexität organismischer Interaktionen erschwert die Interpretation. Auf Grund der großen Komplexität von organismischen Interaktionen und den vorhandenen Indizien für potentiell verschiedene Startpunkte der Stromulisignalkette, ist es sehr schwierig den Auslöser der Stromuliinduktion in den Pathogeninteraktionen zu identifizieren. Ein spezifischerer Ansatz ist die Inkubation der Zellen mit gereinigten Elicitoren.

Zellen in Pathogenkontakt, haben einen erhöhten Bedarf von Energieäquivalenten und Vorstufen für Synthesen.

Besonders für die beobachteten massiven Ablagerungen von Zellwandmaterial an den Penetrationsstellen von *P. infestans*, ist eine Große Menge an Glukose, als Grundbaustein für Zellwandpolymere notwendig (Buchanan et al., 2000; Chen and Kim, 2009; Schmelzer, 2002). Da alle Zellwandpolymere im ER und Golgi-System oder an der Zellperipherie synthetisiert werden(Buchanan et al., 2000), führt der Weg der Glukosegrund-

²Haustorien werden in einer Wirtspflanze erst viel später (24h) gebildet und in Arabidopsis gar nicht.

³persönliche Mitteilung Dr. S. Schornack, Sainsbury Laboratory, John Innes Centre (JIC) in Norwich, Norfolk, England

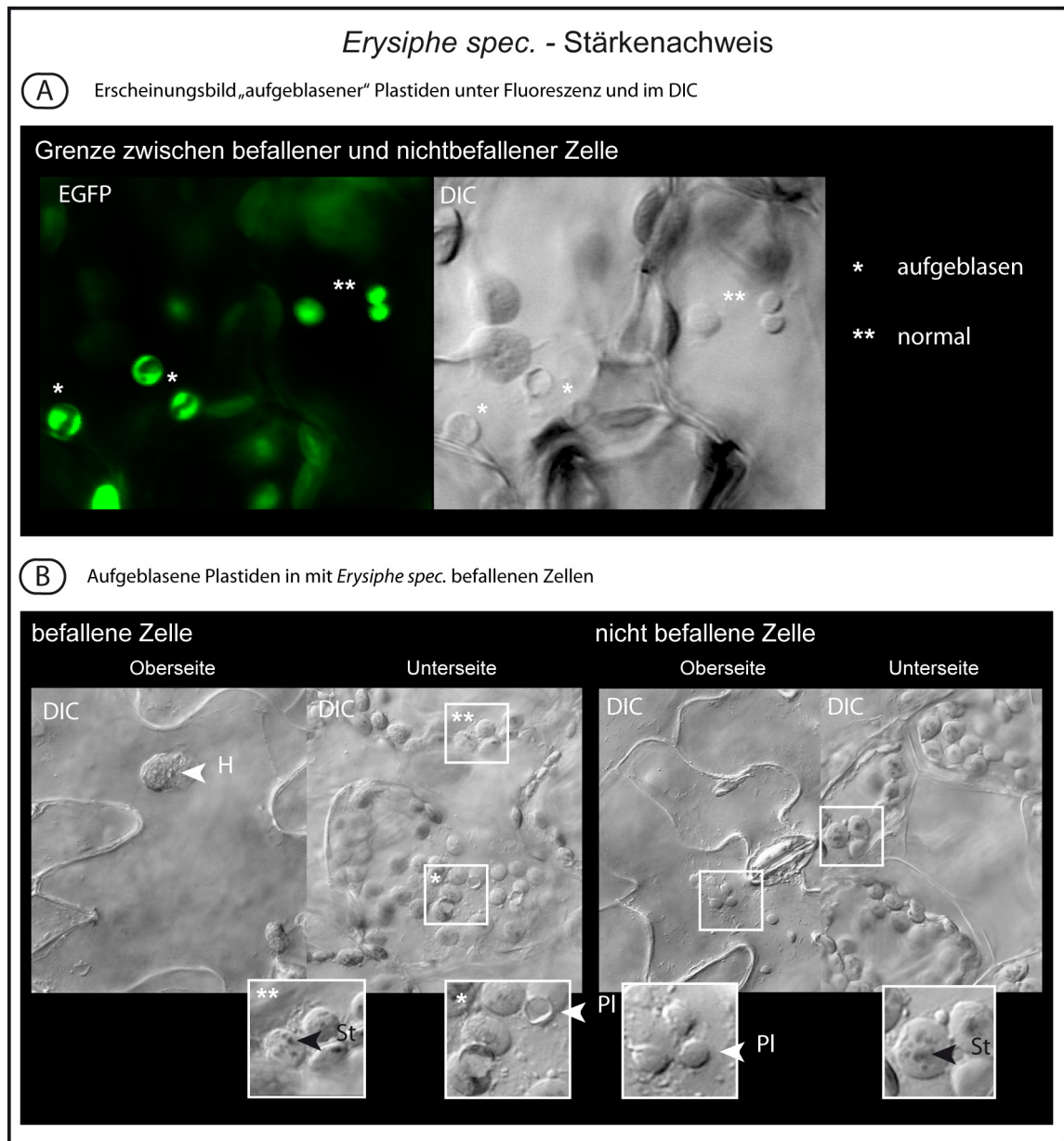


Abbildung 7.6.: Stärkenachweis in *E. cruciferarum* befallenen Blättern - gezeigt ist **(A)** das Erscheinungsbild *aufgeblasener* Plastiden unter EGFP-Fluoreszenz und Differenzieller-Interferenz-Kontrast (DIC) in frischem durch *E. cruciferarum* befallenen Gewebe. Die Plastiden einer nicht befallenen Zelle sind deutlich kleiner als die *aufgeblasenen* Plastiden der befallenen Nachbarzelle. Im DIC ist ebenfalls ein Unterschied zwischen den beiden Plastidentypen sichtbar. Die Plastiden der nicht befallenen Zelle erscheinen als Erhebung, die Plastiden der befallenen Zelle erscheinen an der Stelle der fehlenden Plastidenfluoreszenz *ausgehöhlt*. Es sei hier ausdrücklich darauf hingewiesen, dass es sich dabei um keinen Hinweis auf das Fehlen von Substanz handelt! Die Natur dieses Kontrastverfahrens lässt vielmehr die Schlussfolgerung zu, dass es sich in dem EGFP-freien Bereich der Plastiden um Material einer anderen optischen Dichte als das Stroma handelt, welches als erhobener Rand der besagten Plastiden zu erkennen ist. In mit Ethanol fixierten und rehydriertem Gewebe (**B**), wurde durch Lugolsche Lösung die enthaltene Stärke (*St*) gefärbt. Unter der befallenen Zellen mit Haustorien (*H*) ist in den Chloroplasten des Parenchyms deutlich die transitorische Stärke als kleine dunkle Körner zu erkennen. Die Einschlüsse der Plastiden in der Epidermis färben sich hingegen nicht. Die Kontrolle in den nicht befallenen Bereichen zeigt ein ähnliches Verhalten (Stärke in den Chloroplasten, keine Stärke in den Epidermisplastiden).

7. Pathogene

bausteine immer über das Zytosol, unabhängig davon ob sie aus der Stärke mobilisiert oder über Ferntransport angeliefert werden. Zu dem Aufbau der Zellwand kommt die Produktion und Inkrustierung von antimikrobiellen Substanzen (Phytoalexinen), deren Vorstufen⁴ im Plastiden synthetisiert werden (dunkle Verfärbungen der Papillen direkt unter der Penetrationsstelle von *P. infestans*). Die Stromuliinduktion könnte somit auf einen erhöhten bedarf an Stoffaustausch zwischen Zytosol und Plastiden bedingt sein. Unter der Annahme das Stromuli diesen Austausch verbessern helfen (Hanson and Sattarzadeh, 2008) lässt sich spekulieren, dass eine vermehrte Stromulibildung zu einer Optimierung des Metabolitflusses führt und die Abwehrreaktion unterstützt.

Dieser Erklärungsansatz ist auf *E. cruciferarum* nicht ganz zutreffend, da in der entsprechenden Interaktion, keine so massiven Papillen abgelagert wurden und die Inkrustierung fehlte. Dadurch, dass aber *E. cruciferarum* erfolgreich sich etablieren kann, ist davon auszugehen, dass er massiv von der Pflanzenzelle mit Metaboliten, wie Saccharose oder direkt Glukose versorgt wird und so die befallenen Epidermiszellen *Sink*-Status bekommen und sich deshalb durch eine hohe Stromulihäufigkeit auszeichnen. Beide Hypothesen ließen sich durch Metabolitanalyse (Allwood et al., 2008), oder mit Pflanzen, die FRET-basierte Zuckersensoren exprimieren (Deuschle et al., 2006; Lager et al., 2006).

Es kann sicher davon ausgegangen werden, dass Zellen, die sich gegen ein Pathogen wehren oder durch dieses manipuliert werden, einen erhöhten Bedarf von Energieäquivalenten und Vorstufen für Synthesen benötigen.

Erfolg oder Misserfolg eines Pathogens wird nicht durch die Stromuli bestimmt. Das Stromuli durch eine kompatible (*E. cruciferarum*) und eine nicht-kompatible (*P. infestans*) Interaktion induziert werden zeigt, dass der Erfolg eines Pathogens nicht von der Stromuliinduktion *per se* abhängig ist. Dies schließt aber nicht aus, dass Stromuli doch eine unterstützende Funktion für die Pathogenabwehr haben. Welche Rolle, Stromuli im Rahmen von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen spielen ist noch unklar, besonders da nicht unterschieden werden kann ob die Stromuliinduktion ein Teil der pflanzlichen Abwehr darstellt oder ob sie eine Konsequenz der Manipulation durch das Pathogen sind.

Die Plastiden, Stromuli und Zellkerne reagieren auf die filamentösen Pathogen nicht mit einer Positionsveränderung. Im Zuge der Pathogenabwehr, werden nicht nur Abwehrgene angeschaltet und sekundäre Metabolite produziert, sondern auch häufig Zellkompartimente, wie der Zellkern, Komponenten des Zytoskeletts und Teile des Endomembransystems umgelagert (Koh et al., 2005; Takemoto et al., 2003; Matthewson, 1977). Während der Mycorrhizierung von Mais- und Tabakwurzeln ist eine Lageveränderung von Plastiden zur pilzlichen Struktur beschrieben wurden (Hans et al., 2004; Fester et al., 2001). In den hier untersuchten Interaktionen reagieren die Plastiden und ihre assoziierten Stromuli nicht mit einer Lageveränderung auf den Besiedlungsversuch von *P. infestans* und *E. cruciferarum*. Gleiches gilt für die Position der Zellkerne, welche trotz fehlender Zellkern-Färbung durch die

⁴Phytoalexine leiten sich von Flavonoiden, Terpenoiden, Alkaloiden, Stilbenoiden, Polyacetylenen und Isoflavonon ab.

um sie liegenden Plastiden zu lokalisieren sind. Welche Funktion Stromuli im Rahmen der Interaktionen auch spielen mögen, dafür ist keine Lageveränderung notwendig.

Die aufgeblasen Plastiden enthalten keine Stärke und wahrscheinlich auch keine Lipide.

Während der Interaktion von *P. infestans* und *E. cruciferarum* mit der Epidermis sind Plastiden zu beobachten, die GFP-freie (stromafreie) Bereiche entwickeln. Bei den GFP-freien Bereichen handelt es sich wahrscheinlich um eingeschlossene Substanzen. Diese verdrängen das GFP-markierte Stroma. Es resultiert daraus die beobachtete Plastidenmorphologie (Abb. 7.6 A). Stromale Einschlüsse (z.Bsp. Plastoglobuli, Carotinkristalle oder Stärkekörner) sind häufig Zeichen der metabolischen Vorgänge innerhalb der Zelle und des Plastiden, weshalb die Natur dieser Einschlüsse von Interesse ist. Häufig wird in Plastiden Stärke akkumuliert, die sich mit *Lugolscher* Lösung einfach nachweisen lässt. Wie Abbildung 7.6 B zeigt lassen sich die Einschlüsse nicht mit *Lugolscher* Lösung färben. Dass die verwendete Färbelösung funktioniert hat, ist deutlich an den Stärkekörnern der Chloroplasten in der selben Abbildung zu sehen. Zu dem wird deutlich, dass die Form der Einschlüsse nicht der Form von Stärkekörnern in *A. thaliana* entspricht. Eine kreisrunde Form, wie sie beobachtet wurde spricht eher für liquide Substanzen. Unter der Annahme das es kein Festkörper ist, muss es sich entweder um eine hydrophobe Substanz handeln, oder um ein membranumgrenztes Kompartiment. Andernfalls ist nicht zu erklären, weshalb das hydrophile GFP des Stromas sich damit nicht vermischt. Das es sich um gespeicherte Lipide in einer Form handelt, wie sie in Elaioplasten angetroffen werden, ist unwahrscheinlich, da diese meist in einer Vielzahl kleinerer Tropfen im Stroma vorzufinden sind (Hsieh and Huang, 2007). Bei den beobachteten Plastiden handelt es sich um ein bis zwei Einschlüsse (Abb 7.5 A rechts).

Die aufgeblasenen Plastiden lassen sich durch plastidäre Vakuolen erklären. Die beobachtete Morphologie lässt sich am besten mit einer Ultrastruktur erklären, wie sie in Mutanten eines TatC-Homologen (*apg2*) (Motohashi et al., 2001) und der Phytoendesaturase (*PDS3*) (Qin et al., 2007) in *A. thaliana* gefunden wurden. Die Autoren beschreiben unabhängig von einander in den Plastiden der Mutanten vakuoläre Strukturen, die nach den TEM Bildern zu schlussfolgern von einer Membran umgeben sind. Diese plastidäre Vakuolen nehmen den größten Teil des Plastidenlumens einnehmen und sind nicht sehr zahlreich (nicht mehr als drei). Das sich ergebende Bild passt gut zu den Beobachtungen, doch ob es sich tatsächlich um vergleichbare Ultrastrukturen handelt kann nur durch eine TEM-Analyse der Pathogen befallenen Pflanzen beantwortet werden. Im Rahmen dieser würde sich zu dem klären lassen, ob es sich um Lipide handelt, da sie wie in den Elaioplasten typischer Weise stark kontrastierend würden (Hsieh and Huang, 2007). Motohashi et al. (2001) und Qin et al. (2007) schlussfolgern aus ihren Beobachtungen, dass die entsprechenden Genprodukte wichtig für die Entwicklung der Plastiden sind und wichtig für die Ausbildung eines normalen Endomembransystems. Da die Phänotypen beider Pflanzen sehr extrem sind und sich in Albinismus, Zwergenwuchs und Verlust der Lebensfähigkeit auf Erde äußert, wird es sich bei den vakuolären Strukturen eher um pleiotrope Effekte handeln, die keine eindeutige Interpretation zulassen. Vergleicht man den Phänotypen der Mutanten mit der Situation einer Besiedelung durch *P. infestans*

7. Pathogene

oder *E. cruciferarum* fällt jedoch auf, dass in beiden Situationen die Zellen eine extreme Umstellung in ihrer Physiologie erfahren. So lassen sich die aufgeblasenen Plastiden eher als eine Konsequenz einer Stresssituation interpretieren und nicht als ein Teil der Pathogenabwehr.

7.1.4. flg22

Wie so eben erleutert, ist ein vielversprechender Ansatz, um eine eindeutige Beziehung zwischen Pathogenen und Stromuliinduktion zu hinterfragen, der Einsatz reiner PAMPs. Typisch für PAMPs ist das Auslösen einer Signalkette nach der Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor. Diese Interaktion löst eine nachgeschaltete Signalkette aus, die zur Aktivierung der basalen Pathogenabwehr führt (Ingle et al., 2006). Auf diese Weise lassen sich zelluläre Reaktionen auf ein konkretes Ereignis zurückführen. Da kein PAMP, welches bei der Interaktion von *P. infestans* oder *E. cruciferarum* eine Rolle spielt, zur Verfügung stand, wurde ein anderes PAMP getestet. Das wohl am besten in Pflanzen charakterisierte PAMP ist das Flagellin, welches den Hauptteil des Flagellums der Eubakterien ausmacht. Der korrespondierende Rezeptor für Flagellin in *A. thaliana* ist FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) und gehört zu den *leucinerich repeat receptorlike kinases* (LRR-RLK). LRR-RLKs sind Membranproteine mit einer LRR-Domäne auf der Außenseite der Plasmamembran, einer Transmembrandomäne und einer zytosolische Ser/Thr-Protein-Kinase-Domäne. FLS2 bindet direkt an das Flagellin und vermittelt somit die spezifische Erkennung und Signalweiterleitung in das Zellinnere (Zipfel, 2008). Ausreichend für die Bindung und das Auslösen von Reaktionen ist ein 22 Aminosäuren langes Peptid aus dem N-Terminus des Flagellins (flg22). Nach der Bindung des fls22 an den Rezeptor FLS2 wird von diesem ausgehend unter anderem eine Kinasekaskade angestoßen, die schließlich zur Transkriptionsaktivierung von pathogenbezogenen Genen führt (Bethke et al., 2009; Galletti et al., 2009). Die durch flg22 angestoßenen Vorgänge lassen sich nach ihrer zeitlichen Abfolge wie folgt einteilen und gruppieren (Boller and Felix, 2009):

- **kurzfristig** (innerhalb der ersten 5min) - Bereits wenige Minuten nach der flg22 Exposition kommt es zu Ionenströmen (Ca^{2+} , K^+ und H^+) über die Plasmamembran, zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*oxidative burst*) sowie der Aktivierung von MAP-Kinasen (*MAPK*). Letzteres führt zur Aktivierung WRKY-ähnlicher Transkriptionsfaktoren und stößt längerfristige Reaktionen an.
- **mittelfristig** (5 bis 30min) - In diesem Zeitrahmen kommt es zu einer vermehrten Bildung von Ethylen und dem Recycling des Rezeptor mittels Endozytose, wobei die Autoren eine weitere interne Signalfunktion der an die Vesikel gebundenen Rezeptoren diskutieren. Nach ungefähr 30min kommt es zu nachweisbaren umfangreichen Änderungen im Transkriptom.
- **langfristig** (in Stunden bis Tagen) - Nach 16 Stunden kann massive Akkumulation von Kallose in mit flg22 behandelten Keimlingen nachgewiesen werden. Keimlinge, die längere Zeit auf flg22 haltigen Medium wachsen sind in ihrer Entwicklung gehemmt.

Da flg22 ein gut untersuchtes PAMP ist und somit eine gut kontrollierbare Möglichkeit bietet die Reaktion der Pflanze auf Bakterien im allgemeinen zu untersuchen, wurde synthetisch

hergestelltes flg22 in Induktionsversuchen eingesetzt. Das Peptid wurde freundlicher Weise von Dr. J. Lee⁵ zur Verfügung gestellt.

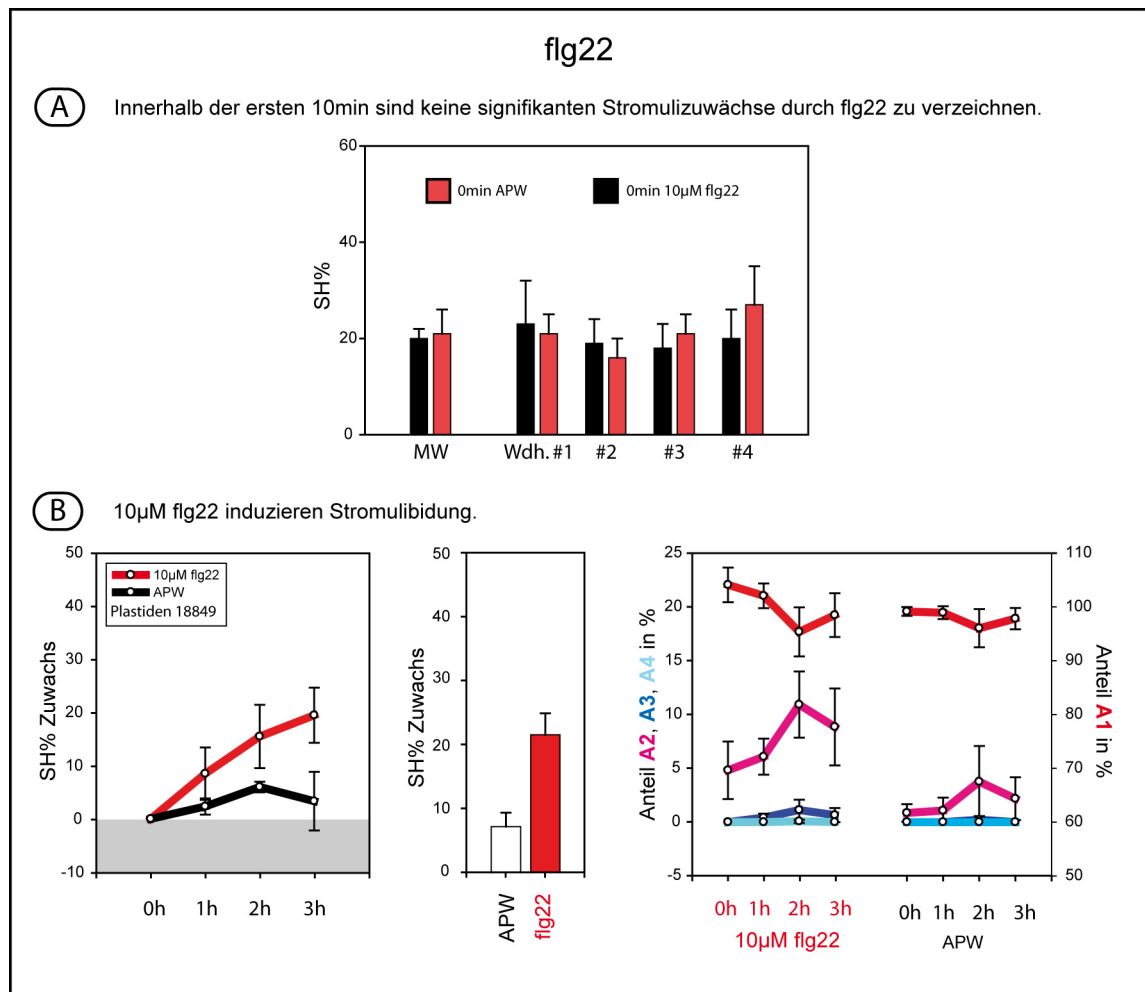


Abbildung 7.7.: Induktionen mit flg22 - Gezeigt sind die Induktionsversuche mit 10µM flg22 in APW gelöst. A) Um den Effekt des Elicitors in den ersten 10min zu erfassen, wurde der Zeitpunkt *0min* einmal in APW und einmal in flg22 Lösung aufgenommen. B) Mit Bezug auf den Startwert, der in flg22-Lösung aufgenommen wurde sind die Kennwerte der Induktion dargestellt. A1, A2, A3 und A4 entsprechen den Stromuliklassen, wie sie unter 3.2 auf Seite 17 eingeführt wurden. SH% bezeichnet die relative Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde.

Durchführung

In Anlehnung an die Literatur (Bethke et al., 2009; Chinchilla et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007) und die Empfehlungen von Dr. Lee wurden 10 µM des synthetisch hergestellten flg22 in APW gelöst und in 4 parallelen Ansätzen zur Induktion eingesetzt. Da bekannt ist, dass binnen weniger Minuten erste Reaktionen (Einstrom von Calcium und anderen Ionen sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies) durch flg22 ausgelöst werden (Ingle et al., 2006), wurde um eine eventuelle kurze Reaktion zu erfassen das Standardprotokoll abgeändert. Durch die Aufnahme der Daten bedingt entsprechen die Stromulihäufigkeiten zu einem Zeitpunkt x einem Zeitfenster von ca. 10 min. Auf diese Weise deckt der Zeitpunkt 0 min der Induktion die

⁵Stress- und Entwicklungsbiologie, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)

7. Pathogene

ersten 10 min der Inkubation ab. Wenn bereits in dieser Zeit bedeutende Stromulizuwächse durch flg22 induziert würden, sollten sie im Vergleich zur der APW Kontrolle sichtbar werden.

Ergebnisse

flg22 induziert Stromuli. Wie Abbildung 7.7 A zeigt, besteht kein signifikanter Unterschied in der Stromulihäufigkeit zum Zeitpunkt 0 min der APW und der 10 μ M flg22 Proben. Dem zur Folge findet in den ersten 10 min durch flg22 induziert kein signifikanter Zuwachs an Stromuli statt.

Auf dem bisher verwendeten Induktionsprotokoll aufbauend, wurden die Änderungen der Stromulihäufigkeit über die längeren Zeiträume auf den Zeitpunkt 0 min der Flagellin-Proben bezogen. Die Kennwerte der Induktionen (Abb. 7.7 B) zeigen zu den stromuliinduzierenden Zuckern vergleichbare Reaktionen. Die Stromulihäufigkeit und der Anteil von Plastiden mit mehr als einem Stromulus nimmt im Lauf der drei Stunden zu. Im Gegensatz zu den Induktionen von Saccharose und deren Analogen, steigt die Stromulihäufigkeit in den ersten 60 min nicht so sprunghaft an. Die Stromulihäufigkeit nimmt mit einem flacheren Anstieg zu und erreicht im Beobachtungszeitraum keinen Maximum. Die Induktionskompetenz in den drei Stunden lag mit etwas über 20 %-Punkten unterhalb der Zuckerinduktionen (ca. 30 %-Punkte).

Diskussion

flg22 zeigt die Verbindung zwischen Stromuli und pathogenen Strukturen. Bei den bisher gezeigten durch Pathogene hervorgerufenen Stromuliinduktionen konnte kein direkter Zusammenhang zu pathogenspezifischen Signalen sicher gezeigt werden. Die Induktionskompetenz von flg22 lässt im Gegensatz zu den organismischen Interaktionen zweifelsfrei eine Verbindung einer Pathogenstruktur und der Induktion von Stromuli zu. Darüber hinaus, ist es eine Bestätigung, dass die Bindung eines Signalmoleküls an einen Rezeptor (hier der extrazelluläre FLS2) ausreichend und vielleicht sogar notwendig ist um Stromuliinduktion auszulösen.

Die gestiegene Stromulihäufigkeit ist Teil der mittel bis langfristigen Zellantwort. Wie die versuche zu kurzfristiger Induktion zeigen, spielen für die flg22-abhängige Stromuliinduktion die kurzfristigen Ereignisse wie *oxidative burst* und Ionenströme keine direkte Rolle. Demzufolge muss die zunehmende Stromulihäufigkeit Teil der mittel- bis längerfristigen Prozess sein. Diesen Prozessen geht meist eine meist eine Transkriptaktivierung am Zellkern voraus. Unter den nach flg22 Exposition angestoßenen Prozesse finden sich auch Verbindungen zum Kohlenhydratstoffwechsel. So ist ein Prozess, der sich mittel bis langfristig auf diese Weise auswirkt, die in *A. thaliana* nachweisbare differentielle Phosphorylierung von Untereinheiten der Zellulosesynthase, die auf eine Aktivierung des Enzyms hinweist (van Bentem and Hirt, 2007). Weiterhin, ist die nach 16 h beobachtete akkumulierte Kallose ebenfalls ein Zeichen für stattgefundenen Kohlehydratumsatz (Gómez-Gómez et al., 1999).

Zu den Vorgängen, die innerhalb weniger Minuten auftreten, aber mittel bis längerfristige Reaktionen anstoßen gehören die durch flg22 angestoßenen Kinasekaskaden, die zu einer differenziellen Phosphorylierung vieler Proteine führt (van Bentem and Hirt, 2007). Um jedoch Aussagen über eine Verbindung, des durch Bethke et al. (2009) aufgestellten MAP-Kinase-Netzwerkes und der Stromuliinduktion zu treffen, fehlen die notwendigen experimentellen Hinweise. Mutanten einzelner Komponenten, wie MAPK 4 (Petersen et al., 2000) könnten aber zukünftig wertvolle Hinweise liefern.

Über die Stoffwechselfvorgänge, die durch flg22 angestoßen werden, existieren weige Angaben, weshalb darüber nur spekuliert werden kann. Hinweise über ablaufende Prozesse sollten sich aber aus der Auswertung, der in öffentlich zugänglichen Datenbanken, zur Verfügung stehenden Transkriptionsdaten ergeben. Diese sind bisher in der Literatur primär im Hinblick auf den Vergleich der durch verschiedene PAMPs ausgelösten Transkriptionsaktivität ausgewertet wurden (Zipfel et al., 2004; Navarro et al., 2004; Zipfel et al., 2006).

7.2. Pathogeninteraktion mit *Nicotiana benthamiana*

7.2.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Eine Wirt-Pathogen-Interaktion, die sich mittlerweile zu einem häufig verwendeten Laborhilfsmittel entwickelt hat, ist die Interaktion verschiedener Pflanzenspezies mit *Agrobacterium tumefaciens*. Für transiente Expressionen hat sich als besonders geeignet die Kombination mit *Nicotiana benthamiana*, erwiesen. Für diese Kombination wurden bis heute verschiedenste Applikationen, wie das *silencing on the spot* (Johansen and Carrington, 2001), das *virus induced gene silencing* (VIGS; Burch-Smith et al., 2004), die Überexpression im präparativen Maßstab für Proteinproduktion (Gils et al., 2005) sowie die subzelluläre Lokalisierung mittels Fluoreszenzproteininfusionen (Cutler et al., 2000), entwickelt. Doch neben den vielen Möglichkeiten die transiente Expression mittels *Agrobacterium* bietet, werden die Bakterien durch die meisten Pflanzenspezies als Pathogene erkannt und reagieren auf sie mit verschiedenen zellulären Antworten, die zum Teil mit dem Untersuchten Phänomen interferieren können (Escobar and Dandekar, 2003; Pruss et al., 2008). Wie aus den Versuchen an *A. thaliana* hervorging können verschiedenste Pathogene Einfluss auf die Stromulihäufigkeit in Geweben haben. Da die genannten Methoden vielversprechende Werkzeuge zur Analyse von Stromuli darstellen, musste vor ihrem Einsatz, die Auswirkung dieser Wirt-Pathogen-Interaktion auf die Stromulihäufigkeit untersucht.

Durchführung

Für die Arbeiten werden LBA4404 und GV3101::pMP90 eingesetzt. Für die Arbeiten mit *A. tumefaciens* werden verschiedene Bakterienstämme verwendet, die sich in der Struktur des Ti-Plasmides und im Chromosomalen Hintergrund unterscheiden können (Hellens et al., 2000a). Auf Grund ihrer großen Bedeutung in der Laborpraxis, wurden im Rahmen dieser Arbeit GV3101::pMP90 und LBA4404 getestet. Beide unterscheiden sich sowohl im Ti-Plasmid, als auch in ihrem Chromosomalen Hintergrund.

7. Pathogene

Um eine Kontrolle für das Wirken der Agrobakterien zu haben, wurden beide Stämme mit dem Plasmid pCP60::dsRed⁶ transformiert. Dieser Plasmid vermittelt die Expression von nicht fusioniertem dsRed2. Für die Visualisierung der Stromuli wurde eine transgene, ein *FNR-EGFP*-Konstrukt exprimierende *Nicotiana benthamiana* Linie⁷ eingesetzt. Um Positionseffekte durch die T-DNA in den transgenen Pflanzen ausschließen, wurden die Experimente an 3 verschiedene transgenen Pflanzenlinien (Linie #3, #6 und #7), welche auf unabhängige Primärtransformanten zurück gehen, durchgeführt. Untersucht wurde die untere Epidermis, die das Standardgewebe der Analyse nach transients Expression ist.

Ergebnisse

GV3101::pMP90 induziert Stromulibildung Unter den gewählten Wachstumsbedingungen, liegen in nicht infiltrierten Blättern die Plastiden gleichmäßig in der Zelle verteilt vor und Plastiden mit Stromuli sind eher selten (Abb. 7.8 A). 48 h nach GV3101::pMP90 (dsRed) Infiltration, steigt die Stromulihäufigkeit bedeutend an (Abb. 7.8 A). Dazu kommt ein großer Anteil von Plastiden mit mehr als einem Stromulus (Daten nicht gezeigt). Es fällt auf, dass einige Plastiden und Stromuli um den Zellkern (markiert durch akkumuliertes dsRed) gruppiert vorliegen. Viele der in der Nähe des Zellkerns befindlichen Stromuli sind zu dem auf diesen ausgerichtet und scheinen den Zellkern beim Erreichen zu *umarmen* (Abb. 7.8 A). Der Unterschied in der Stromulihäufigkeit, wird nach der Quantifizierung noch deutlicher (Abb. 7.8 B). Um zu untersuchen, ob diese Reaktion allgemein durch *Agrobacterium* hervorgerufen wird, oder spezifisch für GV3101::pMP90 (dsRed) ist, wurde LBA4404 für Infiltrationen eingesetzt. Als positiv Kontrolle wurde GV3101::pMP90 (dsRed) mitgeführt. Die Quantifizierung der Stromulihäufigkeit nach 48 h und die Fluoreszenzbilder (Abb. 7.10 C) zeigen, dass LBA4404 (dsRed) keinen Stromulizuwachs induziert. Außerdem bleibt die Akkumulation von Plastiden um den Zellkern aus (Abb. 7.9). Die positiv Kontrolle GV3101::pMP90 (dsRed) induzierte in allen drei Proben einen deutlichen Stromulizuwachs⁸.

Das Infiltrationsmedium hat keinen Einfluss. Damit ein großer Teil der Vir-Gene, die für die Ausbildung des Typ-IV-Sekretionssystems und den T-DNA-Transfer verantwortlich sind, in den Bakterien exprimiert werden, ist eine Aktivierung notwendig. Diese wird hauptsächlich durch phenolische Substanzen, die normalerweise aus verwundeten Pflanzenteilen ausströmen, ausgelöst (McCullen and Binns, 2006). In dem für transiente Expression verwendeten *Agrobacterium*-Infiltration-Medium (AIM) ist für die Aktivierung der Vir-Gene als phenolische Substanz Acetosyringon enthalten. Da eine Wirkung des Acetosyringons auf die Pflanzenzellen nicht auszuschließen war und die Reaktion beeinflussen könnte, wurden Infiltrationen mit nur AIM durchgeführt und die Reaktion der Plastiden quantifiziert. Als positiv Kontrolle wurde GV3101::pMP90 (pCP60) mitgeführt. Abbildung 7.10 A zeigt dass AIM nicht fähig ist den Effekt der GV3101::pMP90 (pCP60) Infiltrationen hervorzurufen. AIM hat demnach keinen

⁶Cornelia Papst zu diesem Zeitpunkt, Pflanzengenetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle

⁷Pflanzenlinie in Zusammenarbeit mit Annett Strauß, zu diesem Zeitpunkt Pflanzengenetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle erstellt.

⁸T-Test MW - pWert 0,1058 - #3 - pWert 0,7958 - #6 - pWert 0,3720 - #7 - pWert 0,1129

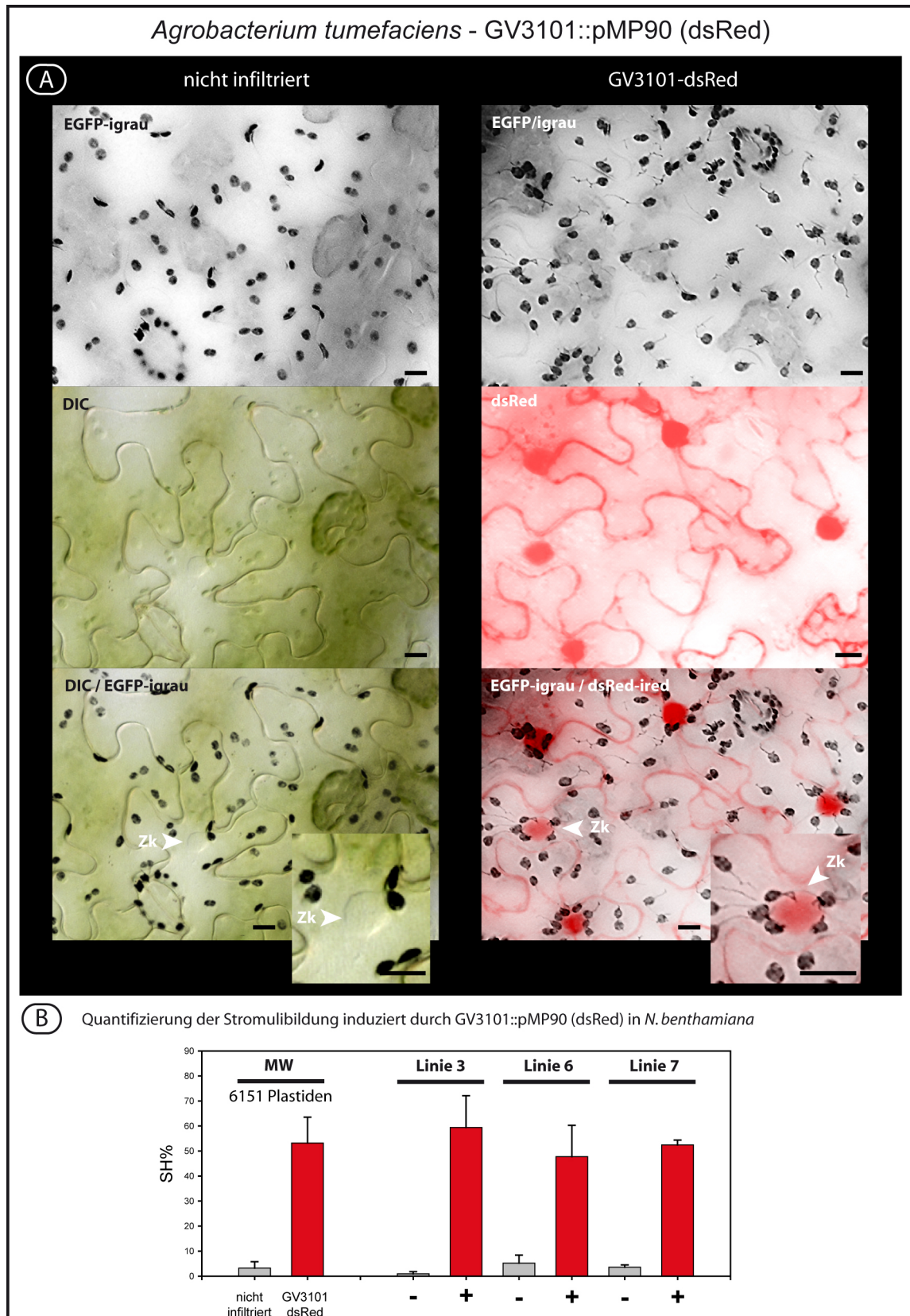


Abbildung 7.8: Vergleich von mit *Agrobacterien* infiltrierten und unbehandelten Bereichen - Vergleich infiltrierter und nicht-infiltrierter Bereiche nach 48h; **A**) invertierten Graustufenbilder der EGFP-Fluoreszenz (*EGFP/igrau*) infiltrierter (GV3101::pMP90) und nicht infiltrierter Bereiche. Zellkerne (**Zk**) werden in infiltrierten Bereichen durch akkumulierendes dsRed sichtbar (ired entspricht, invertierter und rot eingefärbter Graustufenfluoreszenz). **B**) Quantifizierung der Stromulihäufigkeit (SH%); (+ entspricht behandelten Bereichen und - entspricht nicht behandelten Bereichen). Die Linien #3, #6 und #7 gehen auf unabhängige Primärtransformanten zurück und exprimieren zur Markierung des Stomas alle 35S::FNR-EGFP. Größenbalken entsprechen 10 µm.

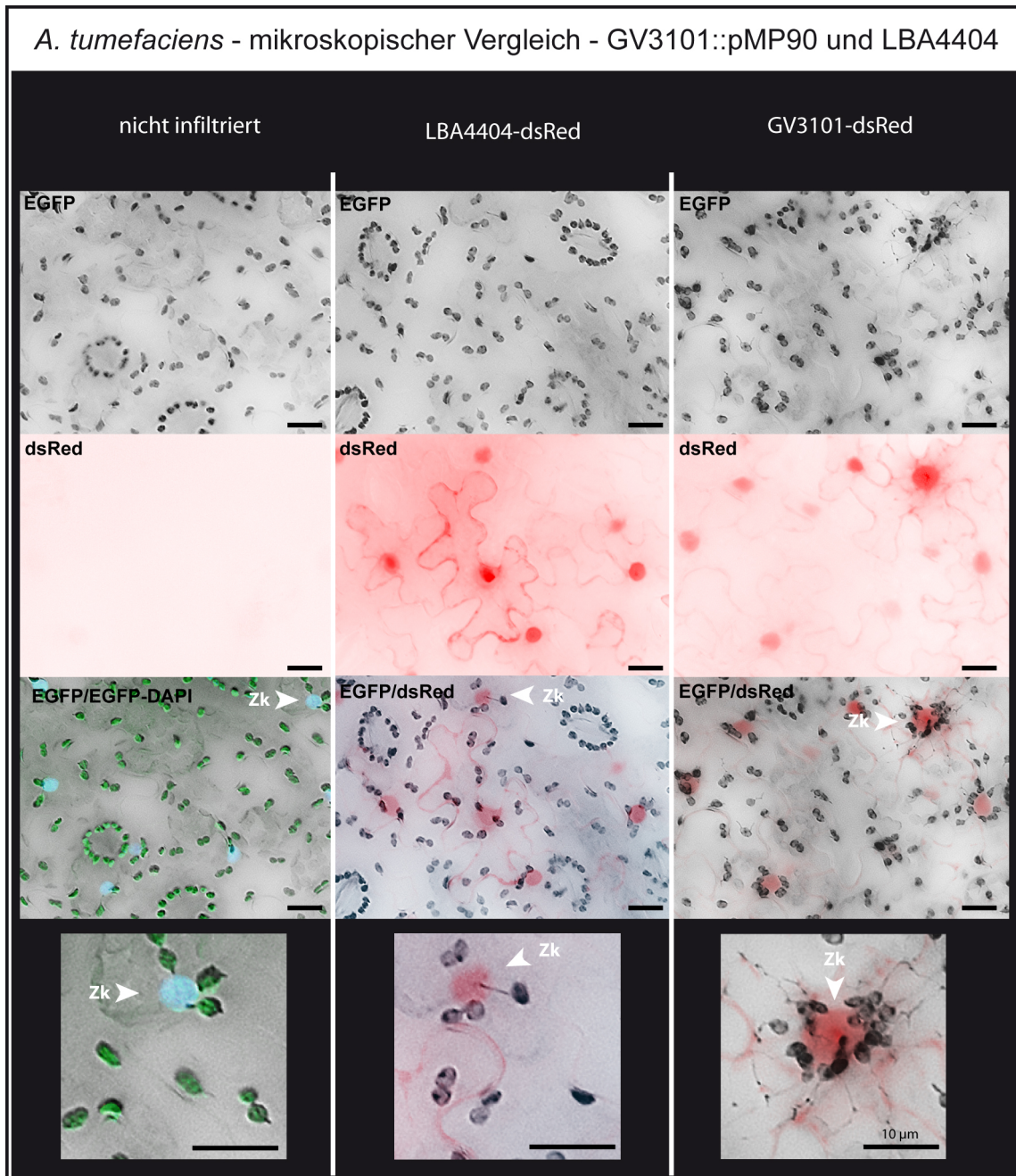


Abbildung 7.9.: *Agrobacterium* induziert abhängig vom Stamm eine Zunahme der Stromulihäufigkeit - Bilder - Zum mikroskopischen Vergleich, beidener verwendeter Bakterienstämme GV3101::pMP90 und LBA4404, sind repräsentative Bildausschnitte neben einander aufgeführt (nach 48h). Durch die dsRed-Expression (pCB60::dsRed) sind die Zellkerne (Zk) markiert (invertierte und rot eingefärbte Graustufenfluoreszenz). Im nicht behandelten Bereich, wurde DAPI zur DNA-Färbung eingesetzt und markiert die Zellkerne hellblau, bedingt durch den verwendeten Fluoreszenzfilter sind die Plastiden hier grün gefärbt. Größenbalken entsprechen, wenn nicht anders angegeben, 20 µm.

Einfluss auf die Stromulihäufigkeit.

Der Effekt der Bakterien ist unabhängig vom T-DNA-Plasmid und -Transfer. Die bisher gezeigten Experimente weisen darauf hin, dass stammspezifisch *Agrobacterium* Stromulibildung induzieren. Obwohl der Unterschied zwischen LBA4404 und GV3101::pMP90 sehr deutlich ist, ist noch unklar welche Rolle der von beiden Stämmen in den Experimenten getragene T-DNA-Plasmid und die transiente Überexpression des dsRed hat. Um dies zu hinterfragen, wurden die *leeren* Bakterienstämme auf ihren Einfluss untersucht. Dazu wurden LBA4404 und GV3101::pMP90 mit AIM induziert und in Blätter infiltriert. Auch hier wurde GV3101::pMP90 (dsRed) als positiv Kontrolle mitgeführt. Die Quantifizierungen der Stromulihäufigkeit zeigen, dass keinen Unterschied zwischen den Stämmen mit und ohne T-DNA-Plasmid gibt (Abb. 7.10 B). Alle drei Pflanzenlinien zeigen vergleichbare Reaktionen. Die einzige Ausnahme stellt das verwendete Blatt der Pflanzenlinie #7 auf dem GV3101::pMP90 getestet wurde dar. In diesem Blatt waren alle bestimmten Werte gleich groß und es gab keinen Unterschied zwischen nicht infiltrierten und infiltrierten Bereichen. Da es sich aber in den parallel untersuchten Blättern der anderen Pflanzenlinien und in den davor durchgeführten Infiltrationen anders verhielt, ist die beobachtete Abweichung wohl eher eine Ausnahme.

GV3101::pMP90 induziert Stärkeakkumulation. In den mit GV3101::pMP90 (dsRed) infiltrierten Bereichen fallen GFP-freien Einschlüsse in den Plastiden auf, die sich bei LBA4404 nicht beobachten ließen. In den Epifluoreszenzbildern wie sie für die Quantifizierungen aufgenommen wurden, sind diese Aussparungen leider nicht sehr deutlich zu erkennen (siehe Abb. 7.8 und Abb. 7.9). Ein klareres Bild liefern LSM-Aufnahmen von fixiertem Blattgewebe (Abb. 7.12 A). Auf Grund ihrer Form und Anzahl handelt es sich bei den Einschlüssen mit großer Wahrscheinlichkeit um Stärke.

Um zu klären, ob es sich wirklich um Stärkekörner handelt, wurden die infiltrierten Blätter in 100% Ethanol fixiert, entfärbt und in Lugolscher-Lösung gefärbt. Bereits makroskopisch sind Unterschiede zwischen den Infiltrationsstellen der beiden Stämme zu erkennen (Abb. 7.11). In den Bereichen, der GV3101::pMP90-Infiltration, ist das Gewebe deutlich dunkler gefärbt als die nicht infiltrierten Bereiche des restlichen Blattes. Wie die Stromulihäufigkeit ist dies unabhängig von dem Vorhandensein des T-DNA-Plasmides. LBA4404 infiltrierte Bereiche sind im Vergleich zu den nicht infiltrierten Bereichen wenn überhaupt, nur schwach gefärbt. Um zu klären, ob sich die Stärkeakkumulation auch auf die zuvor untersuchte Epidermis erstreckt, wurden aus den mit Lugolscher-Lösung gefärbten Blättern Blattscheiben gestochen und mikroskopisch analysiert. Es zeigt sich, dass sich die GV3101::pMP90 spezifische induzierte Stärkeakkumulation auch auf die Epidermis bezieht. In den Plastiden des mit GV3101::pMP90 infiltrierten Gewebes sind mehrere große Stärkekörner zu erkennen (Abb. 7.12 B).

LBA4404 verursacht Nekrosen und GV3101::pMP90 verzögert Seneszenz. Mehrere Tage nach der Infiltration zeichnete sich ein weiterer Unterschied zwischen den Bakterienstämmen ab. Abbildung 7.13 zeigt Blätter 6 Wochen nach der Infiltration mit unterschiedlich dichten Suspensionen von GV3101::pMP90 (dsRed) und LBA4404 (dsRed) sowie AIM. Als positiv

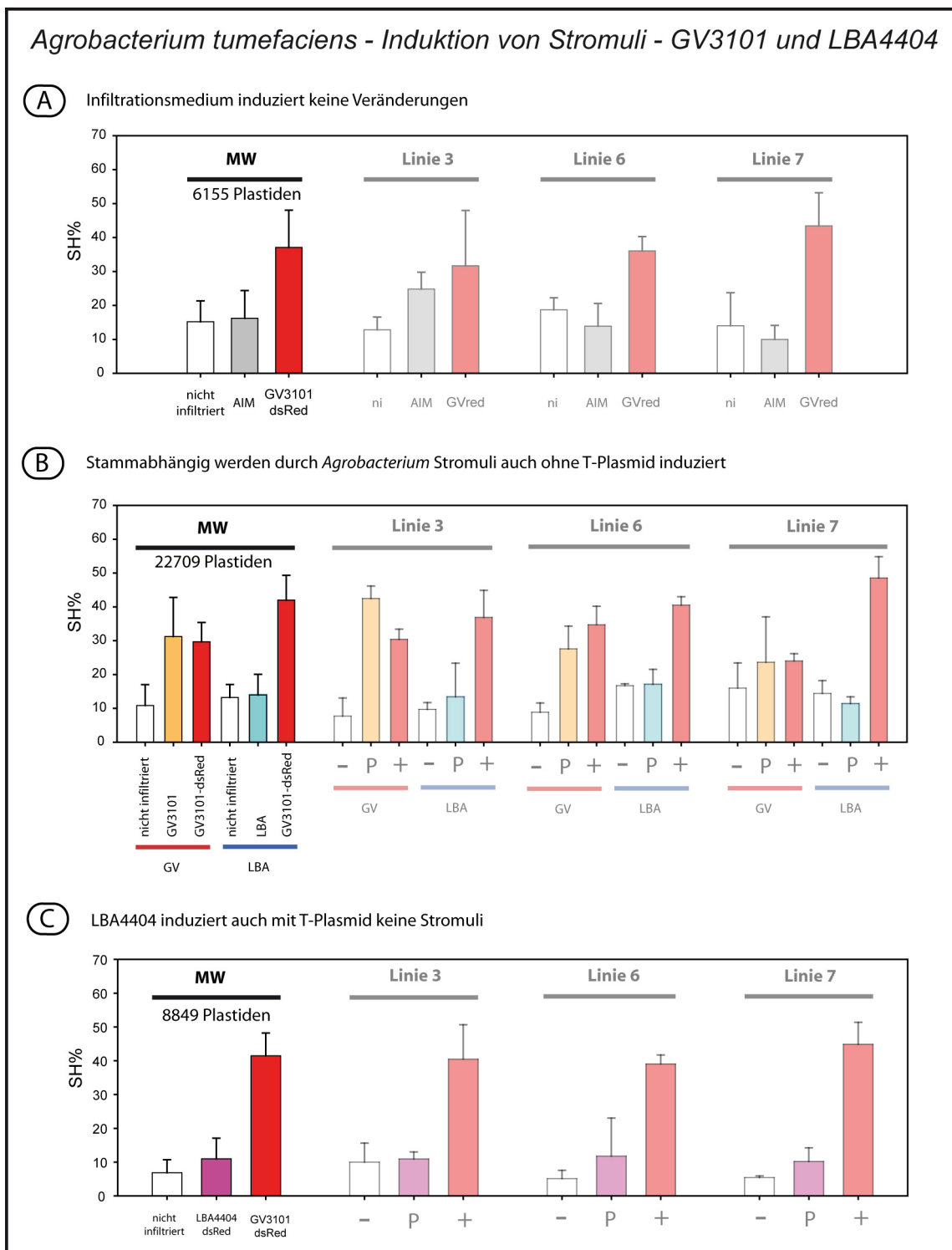


Abbildung 7.10.: Quantifizierung der bakterienstammabhängigen Stromuliinduktion mit und ohne T-DNA
 - Die Quantifizierungen zeigen, dass **A)** Kontrolleexperiment zum Einfluß des AIM; Das Acetosyringon haltige Infiltrationsmedium (AIM) hat keinen Einfluss auf die Stromulihäufigkeit hat. **B/C)** stammabhängige Stromuliinduktion mit und ohne T-DNA-Plasmid; Unabhängig vom Vorhandensein eines T-DNA-Plasmids GV3101::pMP90 Stromuli induziert, LBA4404 aber nicht. “-” entspricht unbehandelten Bereichen, “P” Probe und “+” der positiv Kontrolle, welche in allen Fällen GV3101::pMP90 (pCB60::dsRed) war. SH% bezeichnet die Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. Die *N. benthamiana* Linien #3, #6 und #7 exprimieren alle 35S::FNR-EGFP.

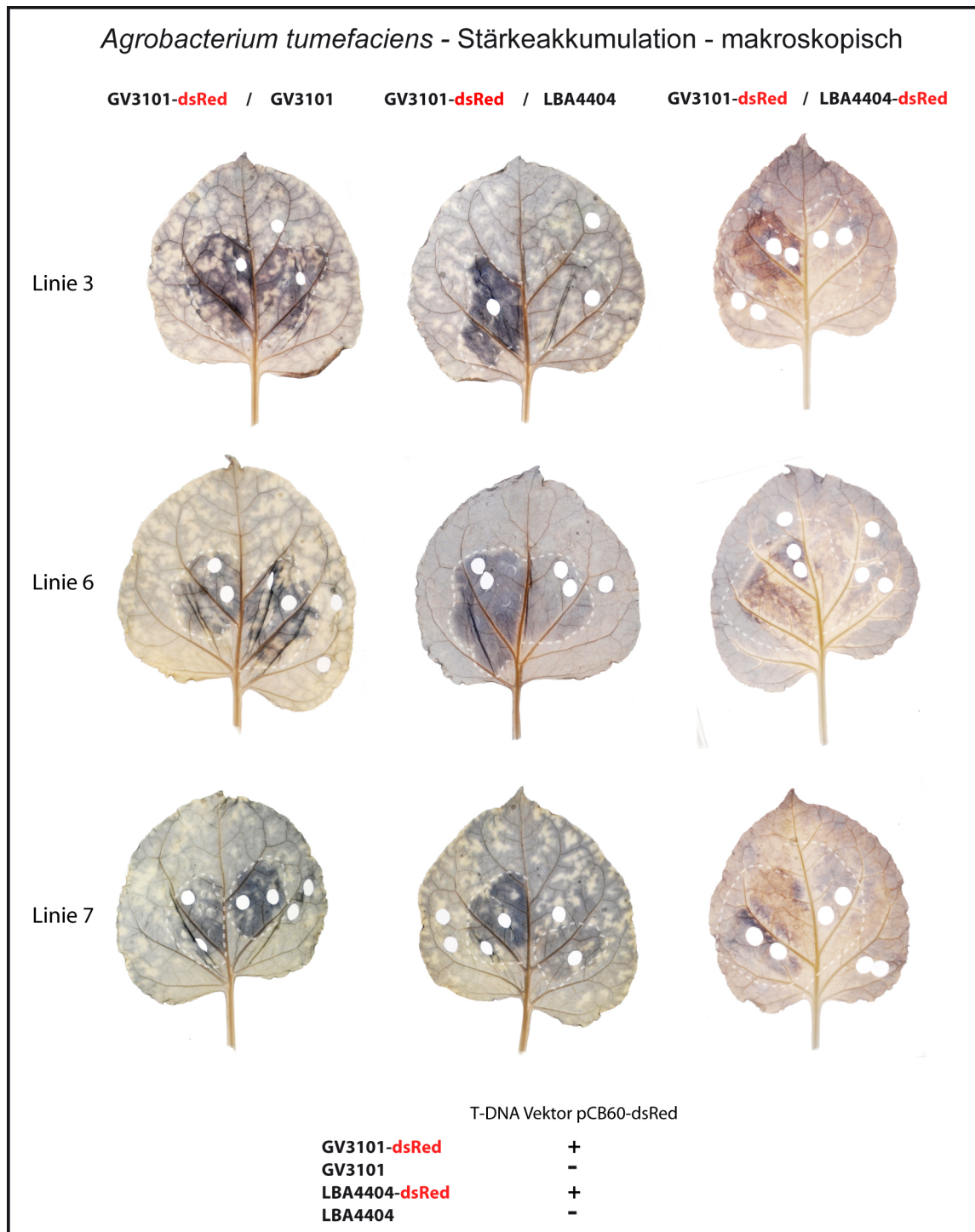


Abbildung 7.11.: *Agrobacterium* induzierte Stärkeakkumulation (makroskopisch) - Ethanol entfärbte und mit Lugolscher Lösung gefärbte Blätter von *N. benthamiana* 48h nach Infiltration mit GV3101::pMP90 und LBA4404; dunkel verfärbte Stellen zeigen Stärkeakkumulation; Zur Kontrolle wurde auf der linken Blatthälfte immer GV3101::pMP90 (pCB60::dsRed) infiltriert. Es wird deutlich, dass unabhängig von der Präsenz des T-DNA-Vektors GV3101::pMP90 Stärkeakkumulation auslöst und LBA4404 moderat bis gar nicht. Die Löcher in den Blattspreiten dienen zur Mikroskopie und Quantifizierung (Abb. 7.10, 7.9 und 7.12). Die *N. benthamiana* Linien #3, #6 und #7 gehen auf unabhängige Primärtransformanten zurück und exprimieren alle das 35S::FNR-EGFP.

7. Pathogene

Kontrolle wurde auf dem LBA4404-Blatt GV3101::pMP90 (dsRed) mit infiltriert. In den GV3101::pMP90 infiltrierten Bereichen sind kaum Veränderungen zu erkennen, außer einer sich andeutenden leichten gelblichen Verfärbung (siehe Linie #3, bei einer $OD_{600} = 1,6$). (Abb. 7.13). Die mit AIM infiltrierten Stellen unterscheiden sich nicht zum umgebenden Blattgewebe. Im Gegensatz zu GV3101::pMP90, sind an den Infiltrationsstellen mit LBA4404 deutliche Chlorosen zu erkennen. Von der Mitte der Infiltrationsstellen beginnen sich an manchen Stellen sogar Nekrosen zu bilden. Höhere ODs verursachen intensivere Symptome. Die Beobachtungen ließen sich in den anderen Pflanzenlinien reproduzieren.

Wie unterschiedlich die Pflanze auf die beiden Bakterienstämme reagiert, wird noch deutlicher in Blättern mit Zeichen deutlicher Seneszenz (vergilbte Blattspreite, zu sehen in Abb. 7.13 zum Beispiel Linie #6). An Stellen in denen GV3101::pMP90 (dsRed) infiltriert wurde ist der Vergilbungsprozess deutlich verzögert. Selbst bei einer geringeren OD verbleiben die Infiltrationsstellen noch Grün (*green islands*). Das die von LBA4404 und GV3101::pMP90 hervorgerufenen Reaktionen auf einem Blatt existieren können zeigt das LBA4404 (dsRed) Blatt der Linie #6 in der gleichen Abbildung. Auf diesem Blatt sind die Nekrosen durch LBA4404 (dsRed) und der *green-islands*-Effekt von GV3101::pMP90 (dsRed) zu sehen.

Diskussion

Die Infiltration von GV3101::pMP90 verändert den Zellstoffwechsel Im Gegensatz zu LBA4404 scheint GV3101::pMP90 bereits nach wenigen Tagen den Zellstoffwechsel in den infiltrierten Bereichen zu beeinflussen, was sich durch die extreme Stärkeakkumulation äußert und zeigt, dass der Kohlehydrathaushalt von der Veränderung im wesentlichen betroffen ist. Eine solch übermäßige lokale Akkumulation von Kohlehydraten spricht für eine Etablierung der infiltrierten Bereiche als *Sink*. Interessanterweise zeichnen sich Gewebe denen ein solcher Status zugesprochen wird durch einen hohen Stromuligehalt aus (Hanson and Sattarzadeh, 2008). Zusammen mit den Ergebnissen aus den Zuckerinduktionen kann eine Verbindung zwischen der Stromuliinduktion und der Etablierung des infiltrierten Bereiches als *Sink* postuliert werden. Die Stromuliinduktion wäre damit eine Konsequenz des veränderten Kohlehydrathaushaltes durch GV3101::pMP90.

PAMPs sind wahrscheinlich nicht für die Stromuliinduktion verantwortlich. Wie die Induktionen mit flg22 gezeigt haben, sind bakterielle PAMPs in der Lage zumindest über 3 h eine deutliche Zunahme der Stromulihäufigkeit zu induzieren. Es liegt deshalb nahe zu vermuten, dass PAMPs auch in den hier beschriebenen Infiltrationen eine Rolle spielen. Doch weder Flagellin noch der auch als PAMP beschriebene bakterielle EFTu scheinen für die beobachteten Unterschiede in Frage zu kommen. PAMPs zeichnen sich durch ihre Konservierung aus und sind wie bereits beschrieben charakteristische für eine ganze Organismengruppe. Da die LBA4404 und GV3101::pMP90 lediglich verschiedene Stämme des selben Genus darstellen, sollten sie die gleichen PAMPs aufweisen. Das Ausbleiben der Reaktion auf LBA4404 läßt vermuten, dass PAMPs wie Flagellin und EFTu nicht für den beobachteten Unterschied verantwortlich sind.

Stärkeakkumulation und *green islands* weisen auf die Wirkung von Cytokinin hin. Das Pathogene den von Ihnen befallenen Bereich zu einem *Sink* etablieren ist aus verschiedenen Pflanzen-Pathogen Interaktionen bekannt. Dabei spielt die induzierte Expression von extrazellulären Invertasen nach Roitsch et al. (2003) in allen Interaktionen eine wesentliche Rolle. Zur Induktion von Invertasen und damit zur Etablierung eines *Sink*, produzieren viele Pathogene Cytokinine (Wingler and Roitsch, 2008). Auf Grund dieser Pflanzenhormone kommt es an den befallenen Stellen zu einer verzögerten Seneszenz, wie sie auch bei GV3101::pMP90 beobachtet wurde. Die Formierung dieser so genannten *green islands* beruht auf der Manipulation des Cytokininhaushaltes durch die Pathogene, sei es durch die Transformation der Pflanze mit Synthesegenen oder durch die Produktion eigener Cytokinine. Das extrazelluläre Invertase unter der Kontrolle eines durch Seneszenz induzierten Promotors die Seneszenz ebenso verzögern kann wie applizierte Cytokinine dies tun zeigt, dass es eine direkte Beziehung zwischen Cytokinin und dem Kohlehydrathaushalt über die Invertasen gibt (Wingler and Roitsch, 2008).

Cytokinine stellen somit vielversprechende Kandidaten als Auslöser der beobachteten Effekte dar. Besteht tatsächlich eine Verbindung zwischen GV3101::pMP90, einer erhöhten Cytokininproduktion und der Stromuliinduktion, müsste sich LBA4404 durch fehlende Cytokininproduktion auszeichnen. Voraussetzung für diese Hypothese ist demnach, dass sich die entwaffneten GV3101::pMP90 und LBA4404 in der Produktion, oder Induktion von Cytokinin unterscheiden.

Trotz *Entwaffnung* können die verwendeten Bakterien Cytokinine produzieren. Allgemein bekannt ist die Fähigkeit von Wildtyp *Agrobacterium* mittels tumorinduzierender Plasmide (Ti-Plasmide) unter anderem Cytokininsynthesegene mit der T-DNA direkt in die Pflanzenzelle zu übertragen und diese zur Cytokininproduktion anzuregen. Die für transiente Expressionen eingesetzten Agrobakterienstämme tragen *entwaffnete* Ti-Plasmide, denen die Fähigkeit Tumore zu induzieren, durch die Deletion der T-DNA genommen wurde. Dies gilt sowohl für den Plasmid von GV3101::pMP90 (pMP90) als auch für den Plasmid von LBA4404 (pAL4404) (Ooms et al., 1982; Koncz and Schell, 1986). Keiner der Stämme ist demnach befähigt Cytokininsynthese in den Pflanzenzellen über diesen Weg zu induzieren. Das potentielle Cytokinin, muss von den Bakterien selbst kommen.

Isopentenyladenine - Nach Regier and Morris (1982) produzieren und sekretieren die chromosomalen Hintergründe von GV3101::pMP90 (C58) und LBA4404 (Ach5) auch in Abwesenheit der Ti-Plasmide Isopentenyladenine zu vergleichbaren Mengen (ca. 0,5 ng/ml). Dieses Abbauprodukt bestimmter tRNAs wirkt in Pflanzen als Cytokinin und ist häufig in Bakterien (auch in *E.coli* Gray et al., 1996) in ähnlichen Konzentrationen zu findenden. Die Fähigkeit von beiden Stämmen zur Isopentenyladenin-Produktion und die geringen Konzentrationen, die durch die Stämme abgegeben werden, können die beobachteten Effekte und vor allem den Unterschied zwischen ihnen nicht erklären und spielen vermutlich nicht die entscheidende Rolle.

trans-Zeatin - Ein bedeutender Unterschied zwischen den beiden verwendeten Stämmen sind deren Ti-Plasmide. GV3101::pMP90 enthält mit dem pMP90 einen Abkömmling des

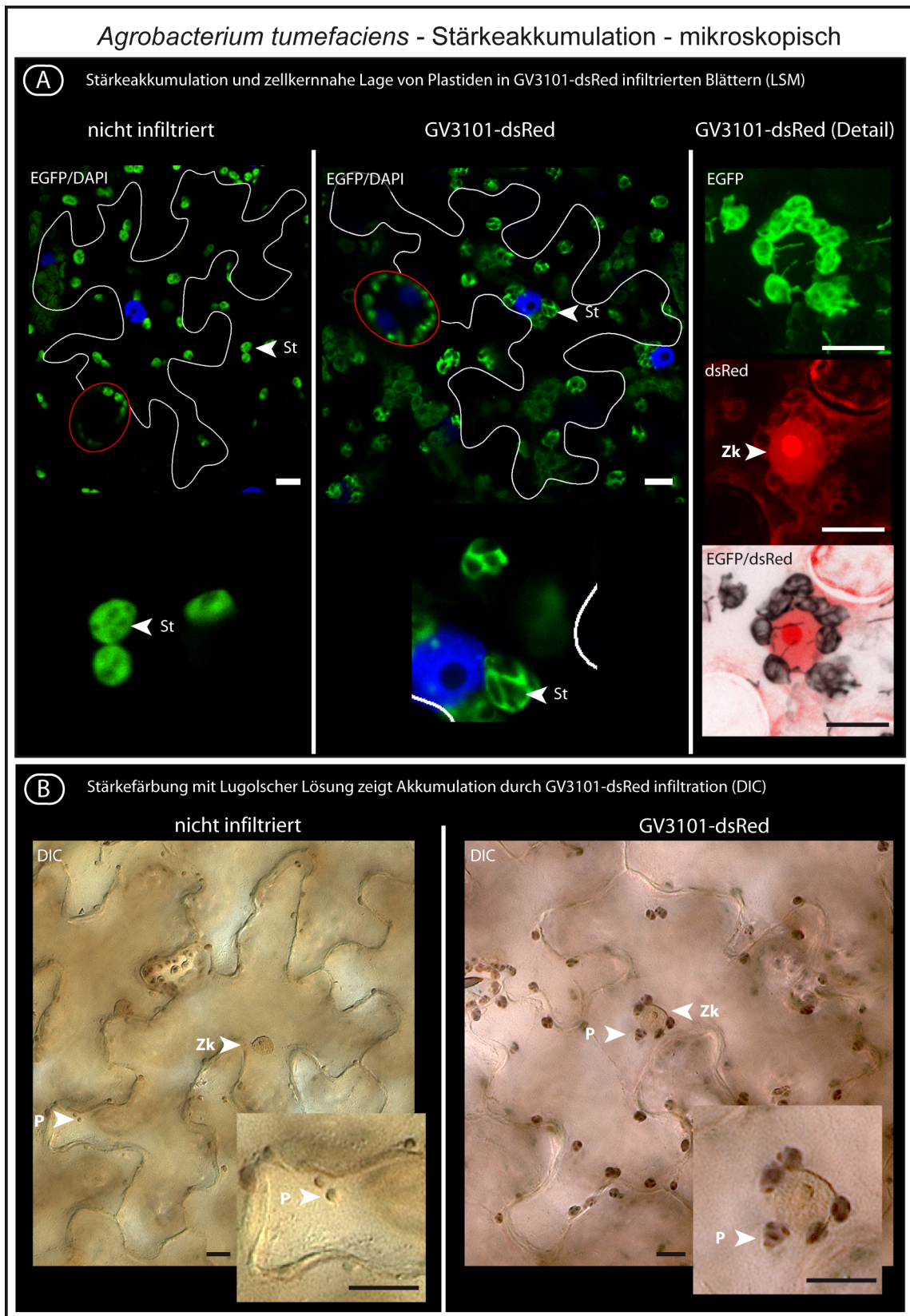


Abbildung 7.12.: Agrobacterium induzierte Stärkeakkumulation (mikroskopisch) - A) CLSM Aufnahmen von fixiertem Gewebe aus einem nicht infiltriertem und einem infiltriertem (GV3101::pMP90) Blattbereich von *N. benthamiana* Linie #6; die Stärke ist (St) an GFP-freien Bereichen in den Plastiden (P) zu erkennen; (Detail) Plastiden mit den Stromuli am Zellkern (Zk) sammeln. **B)** Stärkefärbungen mit Lugolscher Lösung; In Zellen aus den mit GV3101::pMP90 (pCP60::dsRed) infiltrierten Bereichen sind Stärkekorner in den Plastiden zu erkennen. Größenbalcken entspricht 10 µm

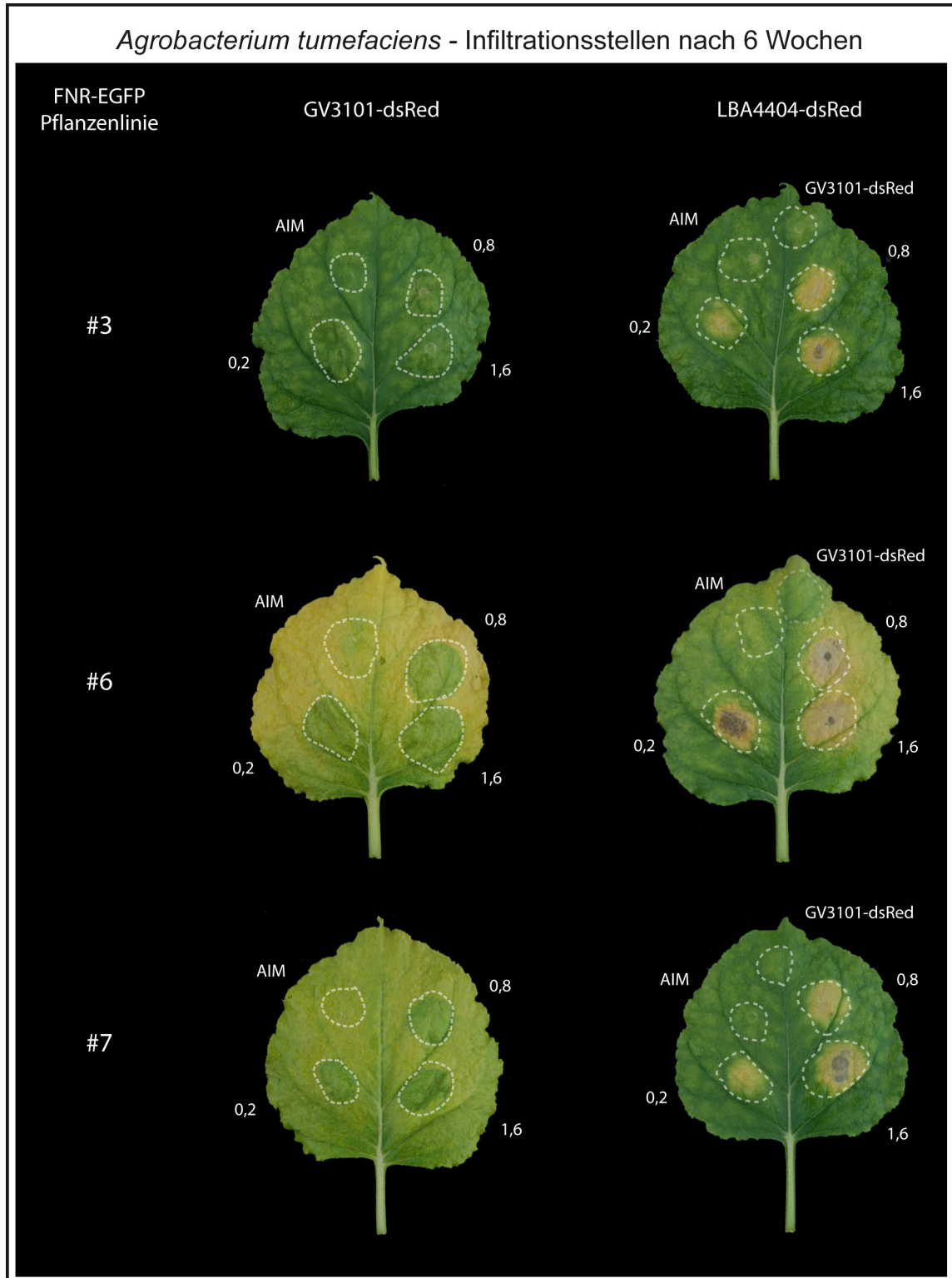


Abbildung 7.13.: Makroskopisch sichtbare Reaktion auf *Agrobacterium* - In verschiedenen optischen Dichten (0,2; 0,8; 1,6) wurden Blätter infiltriert und für 6 Wochen an den Pflanzen belassen. Zur Kontrolle wurde das Infiltrationsmedium (AIM) und der Bakterienstamm GV3101::pMP90 (pCB60::dsRed) verwendet. Die infiltrierten Bereiche sind durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. LBA404 verursacht in allen Blättern Nekrosen, GV3101::pMP90 (pCB60::dsRed) hingegen lässt sie Infiltrationsstellen nur etwas heller erscheinen. Zusätzlich ruft dieser Stamm in seneszenten Blättern Grüne-Inseln hervor. Die *N. benthamiana* Linien #3, #6 und #7 gehen auf unabhängige Primärtransformanten zurück und exprimieren alle das 35S::FNR-EGFP, welches zur Markierung des *Stromas* führt.

7. Pathogene

Nopalin-Plasmides pTiC58. LBA4404 beherbergt mit pAL4404 einen Abkömmling des Octopin-Plasmides pTiAch5 (Hellens et al., 2000a; Ooms et al., 1982; Koncz and Schell, 1986). Beaty et al. (1986) beschreiben an pTiC58 beispielhaft eine Besonderheit der Nopalin-Plasmide, die über ein zweites Cytokininsynthesegen (*tzs*) außerhalb der Wildtyp T-DNA verfügen. Bei der Klonierung des in GV3101::pMP90 enthaltenen pTiC58-Derivates pMP90 wurde zwar die T-DNA durch Koncz and Schell (1986) entfernt, aber das im Bereich der *Vir*-Gene des Ti-Plasmids liegende *tzs* im Plasmid belassen. Das *tzs* codiert für die *trans*-Zeatin-Synthase und befähigt die Nopalin-Plasmid-Stämme zur Synthese von *trans*-Zeatin. Nopalin-Plasmiden fehlt dieses Gen und können auch selbst kein *trans*-Zeatin produzieren (Beaty et al., 1986). Die Konzentrationen produzierten *trans*-Zeatins von Bakterien in Flüssigkultur, ohne Acetosyringon, liegen bei 2 bis 44 ng/ml, was eine Zehnerpotenz über der von Isopentenyladenin liegt (Akiyoshi et al., 1987). Das *tzs* Gen wird wie die meisten *Vir*-Gene durch Acetosyringon aktiviert. Auf diese Weise erfolgt bei der Vorinkubation der Agrobakterien im AIM (Acetosyringon) eine Aktivierung des *tzs*, so dass in den infiltrierten Bereichen bedeutend höhere *trans* Zeatin Konzentrationen über einen längeren Zeitraum zu erwarten sind. Das *entwaffnete* Agrobakterien mehrere Wochen nach Infiltration in *Nicotiana tabacum* Blättern lebensfähig sind und somit eine ständige Quelle von *trans*-Zeatin sein können, zeigen die Messungen von Pruss et al. (2008).

trans-Zeatin ist wahrscheinlich die Ursache für die Stromuliinduktion. Einer der Unterschiede zwischen den verwendeten Bakterienstämmen, ist die *trans*-Zeatin Produktion in GV3101::pMP90. Die beobachteten *green islands* und die Stärkeakkumulation lassen sich durch die Wirkung des *trans*-Zeatins erklären, weshalb es sehr wahrscheinlich Grund für die beobachteten physiologischen Veränderungen (*Sink*-Status) und die Stromuliinduktion ist. Die abgeschwächten Reaktionen von LBA4404 (teils geringe Stärkeakkumulation) lassen sich vermutlich auf die in diesem Stamm produzierten geringen Mengen von Isopentenyladenine zurückführen. Die Mengen scheinen aber nicht ausreichen zu sein um das Gewebe an der Seneszenz oder dem Absterben zu hindern. Obwohl es eine Reihe von Hinweisen auf die verstärkte Produktion von Cytokinen durch GV3101::pMP90 gibt und eine Verbindung zu den Stromuli als wahrscheinlich erscheint, steht der letztendliche Beweis noch aus. Eine Möglichkeit unbekannte Effekte der chromosomalen Hintergründe (verschiedene produzierte Exopolysaccharide) als Ursache für das verschiedene Verhalten von GV3101::pMP90 und LBA4404 auszuschließen, wäre der Austausch der Ti-Plasmide. Die Tatsache, dass sich Agrobakterien bei erhöhter Temperatur von ihren Ti-Plasmiden befreien, macht es möglich Ti-Plasmid freie Stämme zu erhalten und diese mit einem neuen zu transformieren (pMP90 aus GV3101::pMP90 in LBA4404). Nach einem Austausch sollte die *trans*-Zeatinproduktion für LBA4404::pMP90 möglich sein und sich die Phänotypen entsprechend anders verhalten. Regier and Morris (1982) zeigten, dass eine Übertragung der *trans*-Zeatin-Synthesefähigkeit durch Austausch der Ti-Plasmide zwischen Nopalin und Octopin Hintergründen generell möglich ist. Eine weitere einfache Möglichkeit die Rolle des zusätzlichen *trans*-Zeatins zu untersuchen ist die Infiltration der Agrobakterien ohne die vorherige Inkubation in Acetosyringon. Hier sollte keine Aktivierung von *tzs* erfolgen und bei zu treffen der Hypothese eine schwächere, wenn nicht sogar mit LBA4404 vergleichbare Reaktion ergeben. Weiterhin sollte sich der Effekt von

GV3101::pMP90 durch das Spritzen von reinem *trans*-Zeatin imitiert lassen.

Einfluss auf die Eignung als transientes Expressionssystem Die beschriebenen Effekte und die Diskussion zeigen dass GV3101::pMP90 einen großen Einfluss auf die Physiologie der Zelle hat. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, welchen Einfluss dies auf die Expressionsstudien, für die GV3101::pMP90 häufig verwendet wird, hat. Wenn es um Fragestellungen in Bezug auf die Stromulihäufigkeit, Stromuliform und Plastidenverteilung unter nicht induzierten Bedingungen geht, ist nach den Ergebnissen GV3101::pMP90 eher ungeeignet und LBA4404 vorzuziehen. Das LBA4404 bei der in transienten Expression eingesetzten hohen OD auf Dauer Vergilbung und Nekrosen verursacht zeigt, dass auch dieser Stamm Effekte in der Zelle hervorruft, die Einfluss auf Versuche haben können. Bei der gängigen Inkubationszeit im Rahmen transients Expression (48h) scheint dies für Stromuli aber eine untergeordnete Rolle zu spielen. Das durch GV3101::pMP90 ausgeschüttete Cytokinin hilft wahrscheinlich bei der Interaktion dieses frühzeitige Absterben des Gewebes zu verhindern. Welche Auswirkungen die Präsenz von LBA4404 oder von GV3101::pMP90 im Apoplasten auf das jeweilige durchzuführende Experiment hat, bleibt im einzelnen zu überprüfen. Das dies aber entscheidend für die Interpretation der Ergebnisse sein kann, zeigen die beschriebenen Experimente.

7.3. VIGS Screen

Die Fähigkeit des Agrobakterienstammes GV3101::pMP90 Stromulibildung zu induzieren bot einen Ansatz den genetischen Hintergrund der Stromulibildung mit Hilfe eines *Virus Induced Gene Silencing*-Screens (VIGS-Screens) zu hinterfragen. Die Idee dabei bestand darin Pflanzen, welche durch verschiedene VIGS-Klone⁹ an der Expression einzelner Endogene gehindert sind, mit GV3101::pMP90 zu konfrontieren. Silencingpflanzen, die nicht mit einer höheren Stromulihäufigkeit reagieren, sollten in der Erkennung des Pathogens (wahrscheinlich *trans*-Zeatin Wirkung) oder der Stromulibildung gehemmt sein. Durch Sequenzierung, der für Stromuli als relevant erkannten Silencingklone, können die korrespondierenden Endogene identifiziert werden. Primäres Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit, war es zu testen ob VIGS prinzipiell geeignet ist um für Stromuli relevante Gene auf diese Weise zu identifizieren.

Technik des *virus induced gene silencing* Bei VIGS wird das in Pflanzen durch dsRNA ausgelöste *Post Transcriptional Gene Silencing* (PTGS¹⁰) eingesetzt um die Expression bestimmter Gene systemisch in einer Pflanze zu unterdrücken. PTGS wird als antiviraler Mechanismus der Pflanzenzelle diskutiert, der durch dsRNA¹¹ ausgelöst mRNA degradiert. Teile der auslösenden dsRNA (23bp) dienen der Zelle dabei als Erkennungsmatrize für das zu degradierende Ziel (Burch-Smith et al., 2004). Auf diese Weise ist das PTGS sequenzspezifisch und betrifft nur eine bestimmte mRNA Population.

⁹Die einzelnen VIGS Klone entstammen einer Silencing-cDNA-Bibliothek, die sich in einem Virusgenom befindet.

¹⁰PTGS liegt ein ähnlicher Mechanismus zugrunde wie dem in Tieren beschriebenen RNAi.

¹¹dsRNA entsteht im Lebenszyklus von Viren als Zwischenstufe bei deren Replikation.

7. Pathogene

Bei VIGS wird die Entdeckung ausgenutzt, dass rekombinante Viren, welche die Sequenzmotive eines Endogens tragen¹², fähig sind PTGS auch auf die mRNA des Endogens zu richten und dessen Genexpression damit zu unterdrücken (Kumagai et al., 1995). Mit Hilfe geeigneter Viren ist es möglich das Silencing über die Infektionsstelle hinaus auf die gesamte Pflanze zu übertragen¹³. Auf diese Weise erhält man zur Analyse transiente Knock-down-Pflanzen ohne den Umweg über stabil transgene Pflanzen gehen zu müssen. Seit der Beschreibung des VIGS für funktionelle Genanalyse (Baulcombe, 1999) wurde eine Reihe von Virusvektoren entwickelt um diese Technik für einen Hochdurchsatzscreen einsatzbereit zu machen (Burch-Smith et al., 2004).

Durchführung Ein VIGS-Screen in *N. benthamiana* zur Suche nach Komponenten der Pathogenabwehr wurde und wird am Institut für Pflanzengenetik der MLU durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Dr. Sebastian Schornack¹⁴ erfolgte die Adaptierung des Screens zur Identifizierung von für Stromuli relevanten Komponenten.

Eigenschaften der cDNA Bank
Vollängen-cDNA
durchschnittliche Länge 1,5 bis 2,0kb
“normalisiert” zur Anreicherung von wenig abundanten cDNAs
Quelle der cDNA = mit <i>Xanthomonas campestris</i> infizierte Tomatenblätter
Virus = TRV (tomato rattle virus)
Vektoren = TRV1 und TRV2 (pYL279a)

Tabelle 7.1.: Eigenschaften der cDNA Bank, die für das Erstellen der Silencingbibliothek eingesetzt wurde (nach persönlicher Mitteilung von Dr. S. Schornack). pYL279a = Modifizierte Variante des TRV (tomato rattle virus), wie er durch Liu et al. (2002a,b) beschrieben wurde. In dem TRV-System liegt das Genom des bipartiten Virus (TRV1 und TRV2) durch 35S Promotoren getrieben, auf zwei separaten T-DNA Vektoren. In TRV2 sind zwei nicht strukturelle cDNAs durch eine Gateway Kasette ersetzt. Damit ist das Rekombinieren von Zielsequenzen in den Vektor möglich.

Der Ablauf des Silencing und der Analyse ist in Abbildung 7.14 auf Seite 108 dargestellt. Die Eigenschaften der eingesetzten Silencingbibliothek sind in Tabelle 7.1 zusammen gefasst. Anzucht der Pflanzen, Silencing und Sequenzierung erfolgten freundlicherweise durch Dr. Schornack. Nach zwei Wochen, in denen der Virus wirken konnte, wurden die behandelten Pflanzen mit GV3101::pMP90 (pGreenII0129::FNR-EGFP¹⁵) infiltriert und nach 48h auf ihren Stromuligehalt hin untersucht (Primärtest). An Hand der Aufnahmen (pro Pflanze 3 z-Stacks) wurde im Primärscreen nach Silencing-Pflanzen gesucht, die eine deutlich verminderte Stromulihäufigkeit aufwiesen¹⁶. Die identifizierten Silencingklone wurden sequenziert und erneut untersucht (Sekundärtest). Im Sekundärtest erfolgte das Silencing zur Kontrolle an drei Pflanzen pro Silencing-Klon. Zum besseren Vergleich des Effekts wurden im Sekundärtest

¹²Zum Beispiel die cDNA eines Zielgenes.

¹³Das Endogen unterliegt auch in den neu gebildeten Pflanzenteilen dem PTGS.

¹⁴zur Zeit: The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK

¹⁵Zur Markierung der Stromuli in den WT-VIGS-Pflanzen wurde durch die Agrobakterien vermittelt FNR-EGFP transient exprimiert.

¹⁶Die Beurteilung erfolgte optisch, nicht über eine Quantifizierung der Stromulihäufigkeit.

die Stromulihäufigkeiten bestimmt.

Ergebnisse - Kontrollen VIGS geht mit der Vermehrung und Ausbreitung des Virus einher, was sich auch in Virussympptomen auf den Silencingpflanzen äußert. Die viralen Symptome sind bei TRV im Gegensatz zu anderen Vektoren eher moderat (Burch-Smith et al., 2004), dennoch musste abgeklärt werden welche Auswirkung die Infektion auf die Prozedur und den Stromuligehalt hat. Aus diesem Grund wurden Pflanzen zur Kontrolle nur mit TRV1 infiziert. Wie in Abbildung auf Seite 109 zu sehen ist liegt die bestimmte Stromulihäufigkeit in den TRV1 infizierten Pflanzen mit 46% im Bereich der Stromulihäufigkeiten wie sie in den Agrobakterienversuchen mit GV3101::pMP90 auf unbehandelten Pflanzen erreicht wurden (Abschnitt 7.2). Die Transiente Expression von FNR-EGFP und die Infektion mit TRV1 haben keinen Einfluss auf die Stromuliinduktion durch GV3101::pMP90.

Ergebnisse - Proben Die meisten Silencingklone wiesen ähnliche Stromulihäufigkeiten wie die Viruskontrolle auf. Um dies besser zu verdeutlichen, wurden zusätzlich fünf Silencingklone zufällig ausgewählt und deren Stromulihäufigkeiten in den Silencingpflanzen quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass die ausgewählten Silencingklone im Vergleich zu den Kontrollen ähnliche Stromulihäufigkeiten (30% bis 50%) aufwiesen (Abb. 7.15). Unter den 425 untersuchten Silencingpflanzen¹⁷ zeichneten sich fünf durch eine bedeutend geringere Stromulihäufigkeit aus. Nach der Sequenzierung und der Homologiesuche (BLAST) (Ergebnisse siehe Tabelle 7.2) wurde der Sekundärtest aus zeitlichen Gründen mit vier Kandidaten durchgeführt. Die Stromulihäufigkeiten nach GV3101::pMP90 Infiltration (Abb. 7.15) zeigen, dass im Sekundärtest von den getesteten Kandidaten nur 17E6 und 13B9 bestätigt werden konnten. In den Silencingpflanzen dieser Silencingklone wurden Stromulihäufigkeiten von 12,15% (17E6) und 4,4% (13B9) bestimmt, was deutlich unter den Kontrollen liegt. Mit 34% (13B12) und 30% (17C6) wiesen die beiden anderen Kandidaten einen Stromuligehalt ähnlich der Kontrolle auf, der Effekt auf die Stromulihäufigkeit konnte in diesen Fällen nicht reproduziert werden.

#	Klon	Homologie	Sekundär test	Bestätigt
152	13 A 10	translation elongation factor 1 SU beta, ripening regulated protein	-	-
163	13 B 9	Cytochrom b6, SU2 / Rieske	+	+
166	13 B 12	nucleic acid binding (RNA binding?), G-Patch domain	+	-
352	17 C 6	transcriptional activator bZIP69, RF2a	+	-
364	17 E 6	ABA-responisve GRAM-domain containing protein (membrane associated proteins)	+	+

Tabelle 7.2.: Im Primärtest identifizierte cDNA-Klone und Ergebnisse der Re-Tests - Laufende Nummer im Stromuli-Screen (**#**), Bezeichnung (**Klon**) und durch einen BLAST erhaltene Homologie (**Homologie**) der im VIGS Primärscreen identifizierten cDNA Klone. Klone, die zur Evaluierung wiederholt getestet (**Sekundärtest**) wurden sind mit einem “+” gekennzeichnet. Wenn sich der Effekt aus dem Primärtest reproduzieren ließ, wurde dies durch ein weiteres “+” **bestätigt**.

¹⁷Diese Zahl kann bei weitem nicht als sättigend angesehen werden. Leider konnten aus zeitlichen Gründen nicht mehr Silencingklone in den Screen mit einbezogen werden.

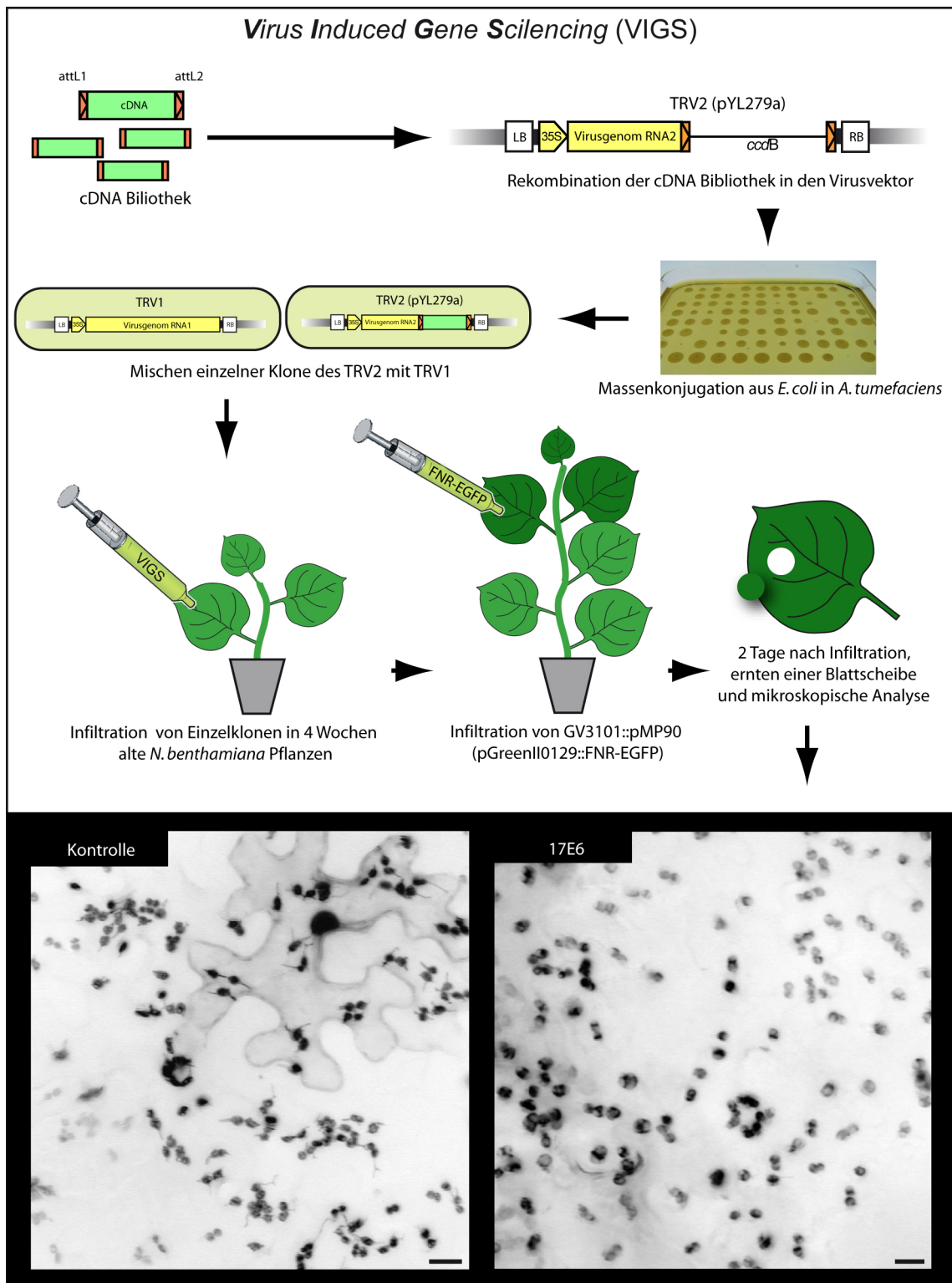


Abbildung 7.14.: Ablauf des *virus induced gene silencing* Screens - Zur genauen Erläuterung, sei auf den Text auf Seite 105. Die invertierten Grauwertfluoreszenzbilder zeigen Epidermen von Pflanzen mit die zum einen die TRV Kontrolle und zum anderen einen der im primär Screen identifizierten Silencing-Kandidaten als VIGS-Vektor infiltriert bekamen. Deutlich ist der Unterschied in den Stromulihäufigkeiten zu sehen. Bei transienter Expression von FNR-GFP kommt es in manchen Zellen zu einer Ansammlung von GFP im Zytosol und Zellkern. Größenbalken entsprechen 10 µm.

Diskussion - Eignung des Screens Die Arbeiten an diesem Screen, konnten aus zeitlichen Gründen nur bis zu dieser Stelle durchgeführt werden. Obwohl im Sekundärtest der Effekt der beiden Silencingklone reproduziert werden konnte, reichen die vorliegenden Daten nicht aus um Aussagen über die Relevanz der identifizierten Endogene (Rieske-Protein, ABA-reguliertes GRAM-Domänen-Protein) für die Stromuliinduktion und -bildung zu treffen. Weitere Analysen sind notwendig um deren Relevanz zu überprüfen. In welchem Zusammenhang die beiden identifizierten Sequenzen (cDNAs) mit der Stromulibildung stehen könnten, wird an anderer Stelle diskutiert.

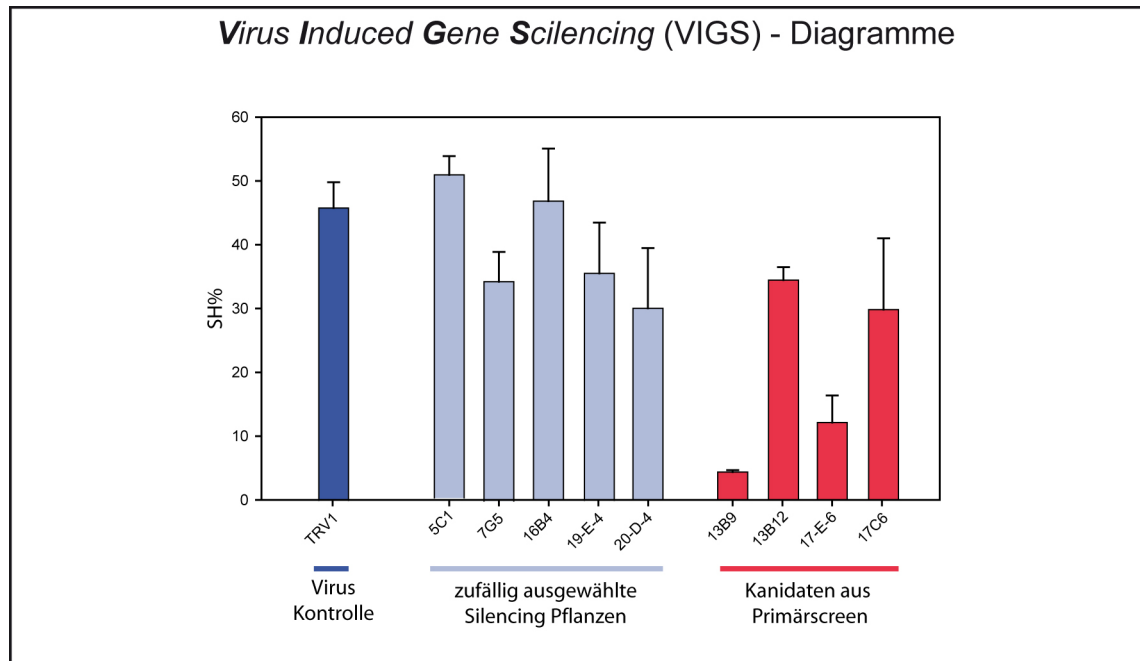


Abbildung 7.15.: Quantifizierung der Stromulihäufigkeit in Silencingpflanzen - TRV1 - Virus Kontrolle in der nur die TRV1 RNA mittels Agrobacterium übertragen wurde. Der Balken zeigt die Mittelwerte von drei Pflanzen. ZUFÄLLIG AUSGEWÄHLTE SILENCINGPFLANZEN - aus dem Primärscreen wurden zufällig Silencingpflanzen ausgewählt und deren Stromulihäufigkeit bestimmt. Die erhaltenen Balken repräsentieren Mittelwerte von drei Blattabschnitten einer Pflanze. KANDIDATEN AUS PRIMÄRSCREEN - die Balken repräsentieren Mittelwerte einzelner Abschnitte von drei Silencingpflanzen des selben Klons.

off targets - PTGS basierendes Silencing birgt immer die Gefahr, dass außer dem Zielgen auch so genannte Nebenziele (*off targets*) durch das Silencing stillgelegt werden. Da für eine solche Nebenreaktion theoretisch ein homologer Bereich von 23bp ausreicht, ist die Wahrscheinlichkeit von Nebenzielen bei größeren Silencing Fragmenten recht groß. Es hat sich gezeigt, das besonders die UTRs geeignet sind um spezifische Silencingkonstrukte zu erstellen. Aus diesem Grund sollte zu den nächsten Schritten gehören, die Struktur (ORF und UTRs) der zum Silencing eingesetzten cDNA und des identifizierten Endogens genauer zu untersuchen um spezifischere Silencingkonstrukte zu entwerfen (Hilson et al., 2004). **Agroeffekt?** - Wenn durch spezifischere Silencing-Klone der Effekt reproduziert werden kann, wäre wichtig zu klären, ob das Fehlen des Endogens sich auf die Präsenz der Agrobakterien (putative Produktion des Cytokinins) oder allgemein auf die Stromulibildung auswirkt. Dies könnte zum Beispiel durch Induktionsversuche mit Zucker in VIGS behandelten FNR-EGFP-Pflanzen hinterfragt werden. Eine weitere Möglichkeit bieten die anderen beobachteten Effekt, wie die akkumulierte

7. Pathogene

Stärke oder der *green island*-Effekt. Sind diese Symptome in den Silencing Pflanzen zu finden aber keine Stromuli, ist der Silencing Klon mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifisch für Stromuli und nicht auf den Ausfall der Cytokininwirkung verbunden. **Homologe** - durch die Identifizierung von Homologen in *A. thaliana* und anderen sequenzierten Pflanzen ließen sich über Datenbanken zahlreiche Informationen über die Regulation, Zugehörigkeit zu Proteinfamilien und eventuell Phylogenie des Endogens erfahren. Auf diese Weise ließe sich genauer über deren Relevanz spekulieren. Obwohl die Klone 13B9 und 17E6 im Rahmen der Arbeit noch nicht vollständig auf ihre Relevanz für die Stromulibildung getestet werden konnten, zeigen die erhaltenen Daten, dass der Screen das Potential zur Identifizierung von für Stromuli wichtigen Genen besitzt.

Diskussion - Optimierung des Screens In den Arbeiten wurde jedoch deutlich, dass um die Bedingungen besser auf einen mikroskopbasierenden Screen anzupassen noch Optimierung notwendig ist. Vorteile und Nachteile, die sich ihm Rahmen der praktischen Arbeit im Screen zeigten und Ansätze zur Optimierung sind im Folgenden kurz aufgeführt.

Vorteile - deutlicher Phänotyp - Für einen Screen ist ein einfach zu bestimmender, deutlicher Phänotyp von Bedeutung. Die Induktion von Stromuli durch die Infiltration des Blattgewebes mit GV3101::pMMP90 ist sehr deutlich, was einen Ausfall der Induktion bereits ohne Zählung sichtbar macht. Die relativ schwierig auszuwertenden Bildstapel¹⁸ lassen sich durch Programme zur Erweiterung der Tiefenschärfe auf jeweils ein Bild reduzieren [Zitat], was sie übersichtlicher und in Zukunft deutlich einfacher auszuwerten macht. Nach Optimierung der Bildqualität würde es sich lohnen über automatische Strukturerkennung nachzudenken. - VIGS in anderen Spezies - Ein weiterer Vorteil ist, dass identifizierte cDNAs (VIGS Klone) je nach Virus und Protokoll auf eine Bandbreite von Spezies und Geweben (zum Beispiel Wurzeln) angewendet werden können (Senthil-Kumar et al., 2007; Ryu et al., 2004). Auf diese Weise kann die Bedeutung der entsprechenden Gene in größerem Kontext und auch in nicht Modellpflanzen untersucht werden (Wege et al., 2007).

Nachteile - Manuell - Da Stromuli bisher nur mikroskopisch analysierbar sind, ist eine recht zeitaufwändige Präparation und Bildaufnahme nicht zu umgehen. Aus diesem Grund mussten im Rahmen des Screens viele Schritte manuell durchgeführt werden. Bei teilweiser Automatisierung des Prozesses, wie die Aufnahme der z-Stapel mithilfe von motorisierten Objektiven, könnte der Zeitaufwand weiter verringert werden. - Silencinginseln - Wie VIGS Versuche mit Phytoendesaturase (PDS) zeigen, wirkt sich das ausgelöste Silencing nicht immer flächendeckend aus. Im Bleichphänotyp der PDS-Silencing-Pflanzen tauchen immer wieder Bereiche in Blättern, Früchten und Blüten auf, die wie Wildtypgewebe aussehen (in Blättern zum Beispiel grüne Bereiche), dieses Muster ist mit verschiedenen Virusvektoren und auf verschiedenen Spezies zu beobachten (Kumagai et al., 1995; Liu et al., 2002a,b; Fu et al., 2006; Nethra et al., 2006). Bisher wurde der vorgestellte VIGS-Screen genutzt um nach makrosko-

¹⁸z-Stacks sind relativ unübersichtlich, da nicht alle Plastiden und Stromuli gleichzeitig zu sehen sind, sondern sich erst beim *scrollen* nacheinander zeigen.

pischen Phänotypen, wie einer HR zu suchen. Hierbei scheinen solche lokalen Ausfälle des Silencings nicht ins Gewicht zu fallen. Bei der mikroskopischen Analyse wird ein sehr kleiner Bereich betrachtet und es besteht die Gefahr, dass potentiell interessante cDNAs nicht erkannt werden, weil unwissentlich eine "Silencinginseln" untersucht wurde. In Validierungsversuchen sollten deshalb weiterhin mehrere Punkte pro Blatt auf verschiedenen Silencingpflanzen untersucht werden. - ungleichmäßige Expression - Im Screen wurde in den WT-Silencingpflanzen zur Markierung und Induktion der Stromuli GV3101::pMP90 (pGreenII0129::FNR-EGFP) eingesetzt. Die transiente Expression bedingt ein Mosaik unterschiedlich stark exprimierender Zellen (vergleiche Abb. 7.14 auf Seite 108), was eine Aufnahme von qualitativ hochwertigen Bildern¹⁹ für die Auswertung nur selten möglich macht. Die Verwendung der stabiltransgenen FNR-EGFP *N. benthamiana* Pflanzenlinien und GV3101::pMP90 (pCP60::dsRed) sollte sich positiv auf die Bildqualität auswirken. - Umwelteinflüsse - Stromuli unterliegen wie in dieser Arbeit und durch Holzinger et al. (2007a) gezeigt abiotischen Umweltfaktoren wie Temperatur und Licht. Eine Abhängigkeit von solchen Umweltparametern wurde auch für das VIGS in Tabak und Tomate beschrieben (Nethra et al. (2006); Fu et al. (2006)). Eine Optimierung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Lichtquantität und untersuchtem Pflanzenalter könnte die Reproduzierbarkeit der Silencingversuche deutlich verbessern.

Pathogene - Fazit

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass Stromulibildung während eines bestimmten Zeitpunktes der Besiedelung von *A. thaliana* durch filamentöse Pathogene (*P. infestans* und *E. cruciferarum*) induziert werden, dabei spielt wahrscheinlich die Erkennung von PAMPs eine wesentliche Rolle. Das eine direkte Beziehung zwischen Stromuliinduktion und einem Pathogen besteht konnte durch die Induktion mittels dem flg22 gezeigt werden. Die stammspezifische Stromuliinduktion durch *Agrobacterium* in *N. benthamiana* ist im Gegensatz dazu wahrscheinlich unabhängig von PAMPs, sondern ist voraussichtlich auf die Wirkung von Cytokinin bakteriellen Ursprungs zurückzuführen. Zusammen mit dem VIGS stellt die stammspezifische Stromuliinduktion einen vielversprechenden Ansatz zur systematischen Suche nach, für die Stromulibildung relevanten, Genen dar. Obwohl Stromuli für die Resistenz gegen ein Pathogen nicht essentiell zu sein scheinen, ist eine unterstützende Wirkung nicht ausgeschlossen.

¹⁹Eine gleichmäßige Belichtung ist fast unmöglich. Es gibt immer wieder Bereiche, die überstrahlt oder unterbelichtet sind.

8. Inhibieren der Translation und Myosinaktivität

8.1. Inhibieren der Translation

Häufig benötigt die Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen eine umfassende Umstrukturierung der zellulären Vorgänge, weshalb als Reaktion auf Umweltreize durch Transkriptionsaktivierung eine Rekrutierung neuer Genprodukte notwendig wird. Mit Hilfe von Microarray-Analysen lässt sich die veränderte Transkriptionsaktivität umfassend untersuchen und so auf die Prozesse schließen, mit denen die Zelle auf den gegebenen Reiz reagiert. Solche Analysen bieten sich an um die unter stromuliinduzierenden Bedingungen ablaufenden Prozesse zu analysieren.

Da jedoch nicht jede zelluläre Reizantwort Transkriptaktivierung und Proteinbiosynthese benötigt, muss vorher geprüft werden, ob dies unter den einzelnen Induktionsbedingungen der Fall ist. Weiterhin ist zu beachten, dass neben dem Genom das Plastom und Chondrom in die Reaktion der Zelle eingebunden sind. Mit Hilfe spezifischer Inhibitoren kann die Translation den 80S-Ribosomen des Zytoplasmas (Cycloheximid auch CHX) und den 70S-Ribosomen der Organellen (Spectinomycin und Streptomycin) gehemmt werden. Auf diese Weise kann zwischen nukleärer und organellärer Transkription unterschieden werden.

Die Induktionsexperimente, wie sie mit den verschiedenen Zuckern durchgeführt wurden, eignen sich durch die Infiltration des gelösten Induktors in die Interzellularen sehr gut für den Einsatz löslicher Inhibitoren. Aus diesem Grund wurde die saccharoseabhängige Stromuliinduktion verwendet, um die Bedeutung der organellären und zytosolischen Translation für die Stromulibildung zu untersuchen.

8.1.1. Durchführung

Zur Blockierung der Translation wurden die Blattstücke eine Stunde in den gelösten Inhibitoren ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) vorinkubiert. Innerhalb dieser Zeit sollte der Inhibitor den Wirkort erreichen und die Translation zum Erliegen kommen. Nach der Vorinkubation wurden die Blattstücke in die Induktionslösung gebracht, die sowohl 40 mM Saccharose als auch den Inhibitor enthielt, und anschließend für die Zeit von drei Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurden von der eingesetzten Pflanzencharge zwei Induktionen (40 mM Saccharose) ohne Inhibitor durchgeführt. Die Kennwerte dieser Kontrolle sind den Abbildungen der einzelnen Behandlungen mit den Inhibitoren zum Vergleich eingefügt (Abb. 8.1 A und B sowie 8.2 A). Da Cycloheximid als Stammlösung in DMSO gelöst vorlag, wurden als Kontrolle jeweils drei mal Saccharose-

und Pufferinduktionen mit der entsprechenden DMSO-Konzentration, wie sie sich nach dem Verdünnen in der Induktionslösung ergeben, durchgeführt (Abb. 8.2 B).

8.1.2. Ergebnisse

Inhibierung der 70S-Translation

Die saccharoseabhängige Stromuliinduktion blieb durch Spectinomycin und Streptomycin unbeeinflusst. Die zur Kontrolle durchgeführte saccharoseabhängige Induktion verhält sich nach der Vorinkubationszeit, in der keine Veränderungen eintraten, wie bereits in Abschnitt 4.2 auf Seite 34 beschrieben. Innerhalb der ersten 60min erfolgte eine heftige Zunahme der Stromulihäufigkeit, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes ein Maximum erreichte. Der maximale Zuwachs lag auch diesmal um die 30 %-Punkte und es kam zu einer deutlich Zunahme von Plastiden mit mehr als einem Stromulus.

Spectinomycin und Streptomycin waren nicht in der Lage, die saccharoseabhängigen Stromulireaktionen zu blockieren. Auch die behandelten Blattstücke zeigten eine sprunghafte Zunahme der Stromulihäufigkeit in den ersten 60 min. Die maximalen Zuwächse entsprechen denen der Induktionen ohne Inhibitor, ebenso wie die Zunahme an Plastiden mit mehr als einem Stromulus. Mittels Selektionsversuchen an *E. coli* ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Inhibitorstammlösungen funktionales Spectinomycin und Streptomycin enthielten. Durch die Infiltration der Inhibitoren direkt in die Interzellularen des Blattgewebes sind die Diffusionswege für die Inhibitoren kurz und es ist davon auszugehen, dass sie nach 1h Inkubation ihren Wirkort erreicht haben.

Inhibierung der 80S-Translation

DMSO hat keinen sichtbaren Einfluss auf die Stromuliinduktion. Die mit DMSO versetzten Induktionskontrollen (Saccharose und APW) verhalten sich so, wie es für die Induktionen ohne DMSO bereits in Abschnitt 4.2 auf Seite 34 beschrieben wurde (Abb. 8.2 auf Seite 116 B). Lediglich der maximal Stromulizuwachs ist etwas geringerer. Die Experimente zeigen, dass DMSO keinen signifikanten Einfluss auf die Stromulihäufigkeit unter Kontroll- und Induktionsbedingungen hat.

CHX hemmt die saccharoseabhängige Stromuliinduktion. Das Verhalten der Induktionsparameter während der Inkubation mit CHX zeigt, dass die Vorbehandlung mit diesem Inhibitor die saccharoseabhängige Stromuliinduktion verhindert. Dies wird sehr deutlich durch die im Vergleich zum Ausgangswert (vor und nach der Vorinkubation) unveränderte Stromulihäufigkeit, dem Ausbleiben der Zunahme von Plastiden mit mehr als einem Stromulus und dem äußerst geringen maximalen Stromulizuwachs. Das die ausbleibende Reaktion auf die Saccharose nicht auf ein induziertes Absterben der Zellen zurückzuführen ist, konnte an der Konstanz der Plastidenmorphologie und Zellintegrität geschlossen werden.

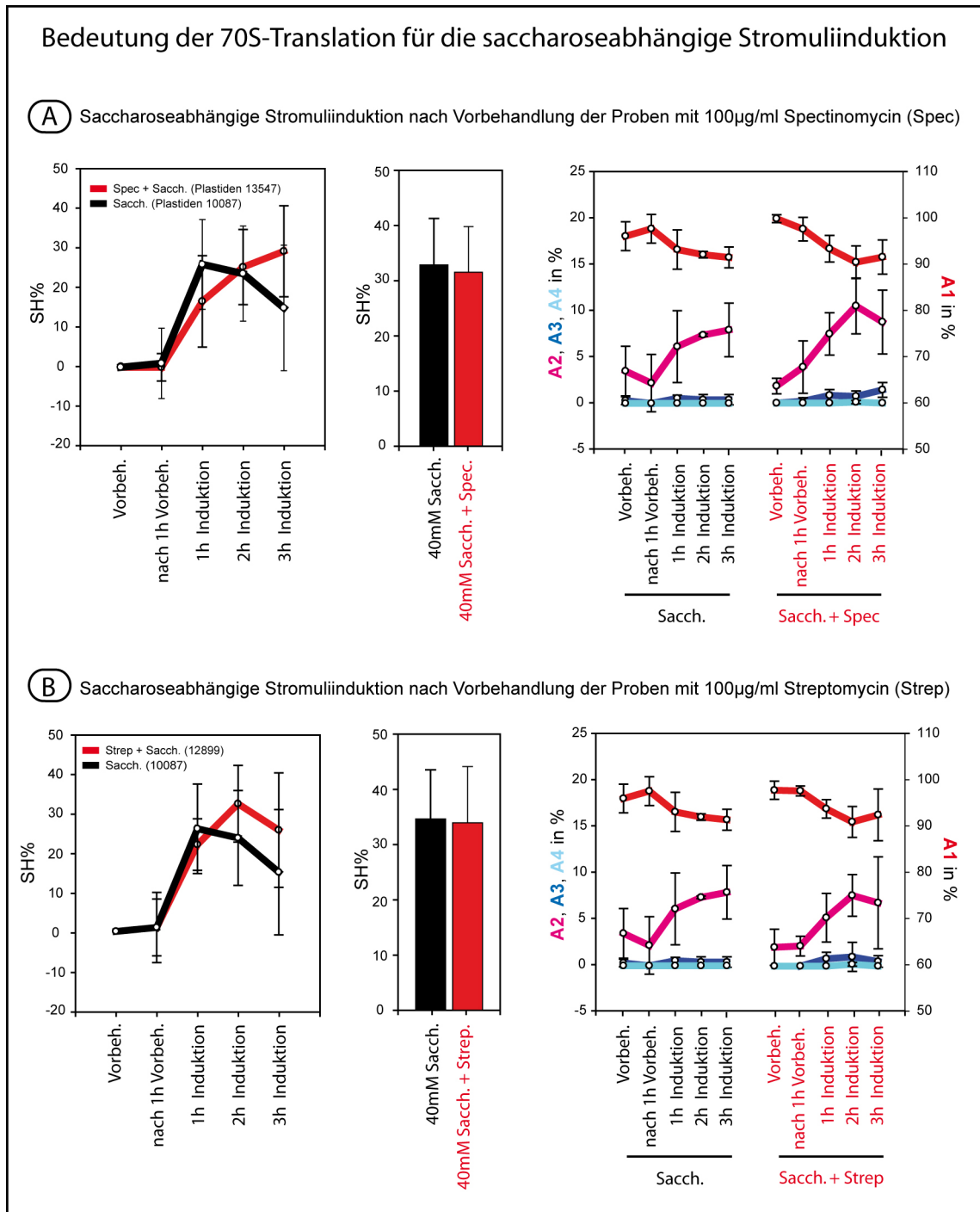


Abbildung 8.1.: Bedeutung der 70S-Translation für die saccharoseabhängige Stromuliinduktion - A) Saccharoseabhängige Stromuliinduktion nach vorheriger Inkubation in $100\mu\text{g ml}^{-1}$ Spectinomycin; **B)** Saccharoseabhängige Stromuliinduktion nach vorheriger Inkubation in $100\mu\text{g ml}^{-1}$ Streptomycin; Kontrolle in A und B ist das selbe Experiment. A1, A2, A3 und A4 entsprechen den Stromuliklassen, wie sie unter 3.2 auf Seite 17 eingeführt wurden. SH% bezeichnet die Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. Die Bedeutung der Diagramme ist unter ?? auf Seite ?? erläutert. Details siehe Text (8.1.2 auf der vorherigen Seite)

8.1.3. Diskussion

Transkriptionsanalysen sind für eine Analyse der Stromuliinduktion aussichtsreich. Die durchgeführten Inhibitorexperimente zeigen, dass für die Umsetzung des Zuckersignals bis hin zur Stromuliinduktion, Proteinbiosynthese an den 80S-Ribosomen des Zytosols notwendig ist. Da meist nicht auf einen vorhandenen mRNA-Pool zurückgegriffen wird, sondern einer Translation eine erhöhte Transkription vorausgeht, ist mit großer Wahrscheinlichkeit Transkriptionsaktivierung für die Umsetzung des Zuckersignals notwendig. Transkriptionsanalysen sind somit potentiell geeignet die Prozesse während einer Stromuliinduktion zu analysieren und stromulirelevante Gene zu identifizieren. Die Translationsaktivität in den Organellen scheint an der Umsetzung des Signals nicht oder nur unbedeutend beteiligt zu sein.

Wie spezifisch sind Spectinomycin und Streptomycin? Sind auch Mitochondrien betroffen? Obwohl Streptomycin und Spectinomycin häufig eingesetzt werden um die Translation der 70S Ribosomen in den Chloroplasten zu hemmen, fehlen in der entsprechenden Literatur Hinweise, welchen Einfluss die Antibiotika auf die Ribosomen der Mitochondrien haben (zum Beispiel Karcher and Bock, 1998; Fromm et al., 1987). Doch die Tatsache, dass Pflanzen (*A. thaliana*) trotz geschädigten Plastiden (albino Phänotypen¹) auf spectinomycinhaltigem Medium (mit Saccharose) wachsen (Zubko and Day, 1998), lässt vermuten, dass die Mitochondrien weiterhin funktionsfähig sind. Bei Ausfall beider Organellen wäre der Tod der Keimlinge zu erwarten. Ein anderer Hinweis, dass Mitochondrien durch Spectinomycin nicht betroffen sind, sind spectinomycinresistente Pflanzen. Diese wachsen normal und weisen eine Modifikationen der plastidären Ribosomen auf, die zusammen mit der Resistenz maternal vererbt wird. Dies sind deutliche Hinweise darauf, dass die Plastiden und nicht die Mitochondrien von diesem Antibiotikum betroffen werden (Fromm et al., 1987). Erythromycin und Lincomycin sind zwei weitere Antibiotika, die in den letzten Jahren häufiger zur Inhibierung der plastidären Translation eingesetzt wurden (Ruckle and Larkin, 2009) und könnten für Kontrollexperimente eingesetzt werden.

Weitere Kontrollen sind noch notwendig. Obwohl die eingesetzte Konzentration der Inhibitoren von $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ aus entsprechender Literatur entlehnt wurde, wäre zu überprüfen, ob die Vorinkubation ausreicht die Translation der Chloroplasten zu hemmen. Entsprechende Kontrollen sind noch zu entwickeln.

8.2. Inhibieren der Myosinaktivität

Am Ende einer jeden Signalkette steht der so genannte *Output*, welcher die Reaktion der Zelle auf das eingehende Signal darstellt. Im Fall der Stromuli werden am Ende der Signalkette ausführende Komponenten, welche die Membranausstülpungen aus dem Plastidenkörper herausziehen und somit die strukturelle Grundlage bilden, postuliert (Kwok and Hanson, 2003; Sattarzadeh et al., 2009; Natesan et al., 2009). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war

¹Pflanzen besitzen degradiert Plastiden und haben keine nachweisbare plastidäre ribosomale RNA.

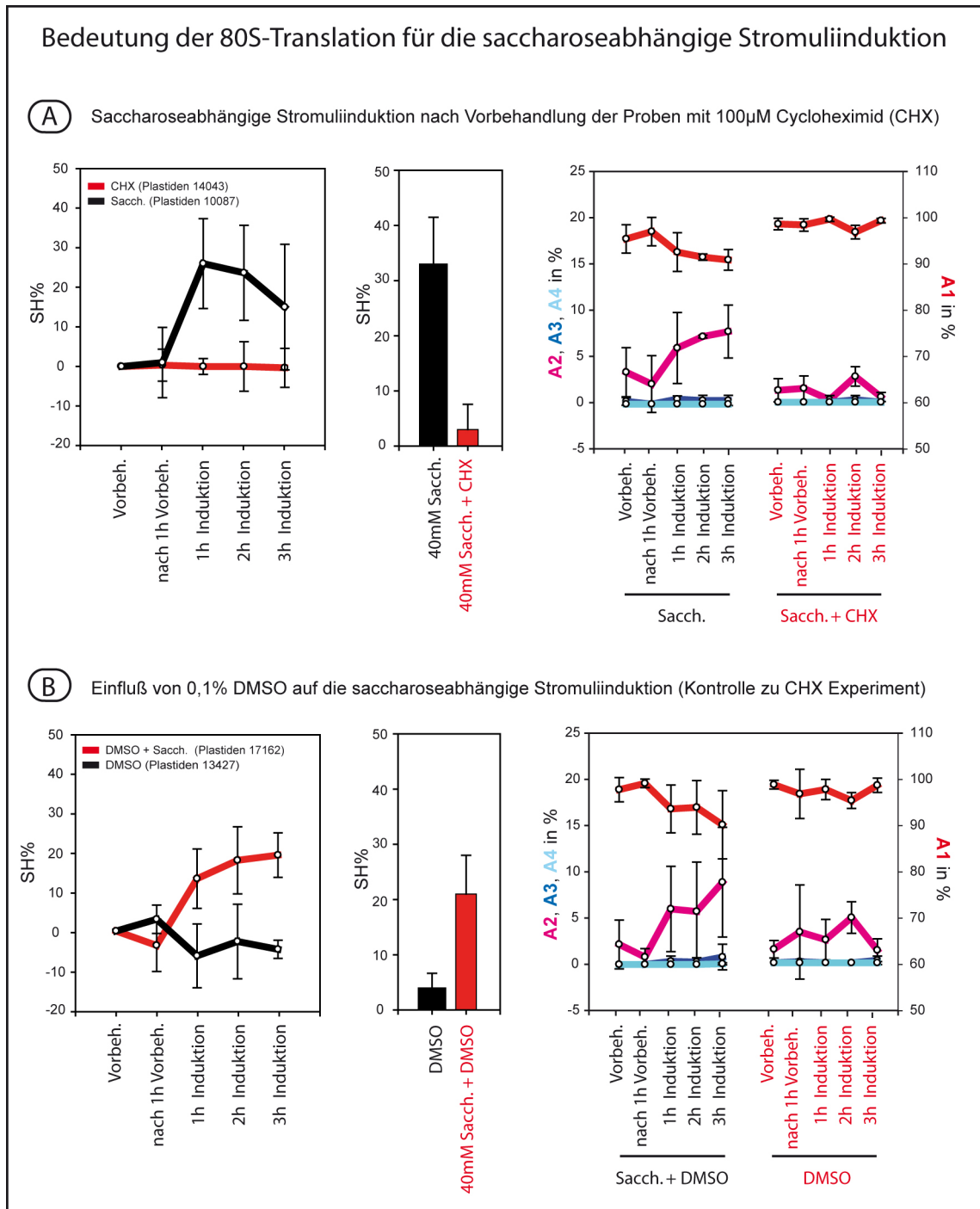


Abbildung 8.2.: Bedeutung der 80S-Translation für die saccharoseabhängige Stromuliinduktion - A) saccharoseabhängige Stromuliinduktion nach vorheriger Inkubation in $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Cycloheximid (CHX); **B)** Saccharoseabhängige Stromuliinduktion unter Einfluss der von DMSO; Kontrolle in A ist das selbe Experiment wie in A und B der Abbildung 8.1 auf Seite 114. **A-B)** A1, A2, A3 und A4 entsprechen den Stromuliklassen, wie sie unter 3.2 auf Seite 17 eingeführt wurden. SH% bezeichnet die Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde. Für mehr Details, siehe Text (8.1.2 auf Seite 113).

durch Inhibitorversuche bekannt, dass für die Bildung von Stromuli ein intaktes Aktinskelett notwendig ist (Kwok and Hanson, 2003). Da Stromuli häufig als sehr dynamische und mobile Strukturen beschrieben wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass an diesen Prozessen Motorproteine entsprechender Prozessivität beteiligt sind, die auf eine noch unbekannt Weise an die Hüllmembranen der Plastiden gebunden sind. Obwohl es nahe liegt, die aktinabhängigen Myosine für die motorische Kraft während der Stromulibildung verantwortlich zu machen, lagen bis dahin nur indirekte Hinweise, wie die besagte Abhängigkeit von intakten Aktinfasern, vor. Aus diesem Grund wurde versucht, der Natur der stromulibildenden Motorproteine und den Evidenzen zur Rolle von Myosinen mit Hilfe spezifischer Inhibierung nachzugehen.

8.2.1. Durchführung

Das bereits unter 8.1 auf Seite 112 beschriebene saccharoseabhängige Induktionsexperiment unter der Wirkung verschiedener Translationshemmer wurde zur Untersuchung dieser Fragestellung adaptiert. Um die Bedeutung von Myosinen für bestimmte Prozesse zu hinterfragen findet 2,3-Butanedion Monoxim (BDM) in Pflanzen breite Verwendung. Dieser Inhibitor interferiert reversibel mit der ATPase-Funktion der Motordomänen und verhindert so das sich das Myosin entlang von Aktinfilamenten bewegen kann. BDM soll auf diese Weise fähig sein myosinabhängige Prozesse, wie die Zytoplasmaströmung, zu blockieren (Samaj et al., 2000). In Anlehnung an Literaturdaten wurden zur Vorinkubation und während der Induktion verschiedene Konzentrationen von BDM (10 mM, 20 mM und 40 mM) eingesetzt (Sheahan et al., 2005; Frantzios et al., 2005; Panteris et al., 2004). Die Vorinkubation erfolgte wie in Abschnitt 8.1.1 auf Seite 112 beschrieben, mit der Änderung, dass die Inkubationszeit auf 30min verkürzt wurde.

8.2.2. Ergebnisse

Eine Behandlung mit 40 mM BDM verhindert, dass sich bei Anwesenheit von Saccharose die Stromulihäufigkeit erhöht. Die durchgeführten Kontrollexperimente mit 40 mM Saccharose und APW zeigen, dass die Pflanzen auf gewohnte Weise reagieren. APW verursacht keine Zunahme der Stromulihäufigkeit und das Verhältnis der Stromuliklassen bleibt ebenfalls unverändert. 40 mM Saccharose induziert sehr deutlich eine Zunahme von Stromulihäufigkeit und Plastiden mit mehr als einem Stromulus (Abb. 8.3 A ersten beiden Diagramme).

Wird der Induktionslösung (40 mM Saccharose) der Inhibitor in den Konzentrationen von 10 mM oder 20 mM zugesetzt, ist keine deutliche Veränderung zur Kontrolle zu sehen. Bei einer Konzentration von 40 mM BDM ist im Gegensatz dazu keine Zunahme der Stromulihäufigkeit und auch keine Veränderung im Verhältnis der Stromuliklassen zu beobachten. Die Entwicklung der Stromulihäufigkeit und der Anteil der Stromuliklassen verläuft unter der Einwirkung von 40 mM BDM ähnlich zur APW Kontrolle.

Die Unterschiedliche Wirkung der BDM-Behandlungen sind an Hand der Induktionskompetenz gut miteinander vergleichbar (Abb. 8.3 B).

8. Inhibieren der Translation und Myosinaktivität

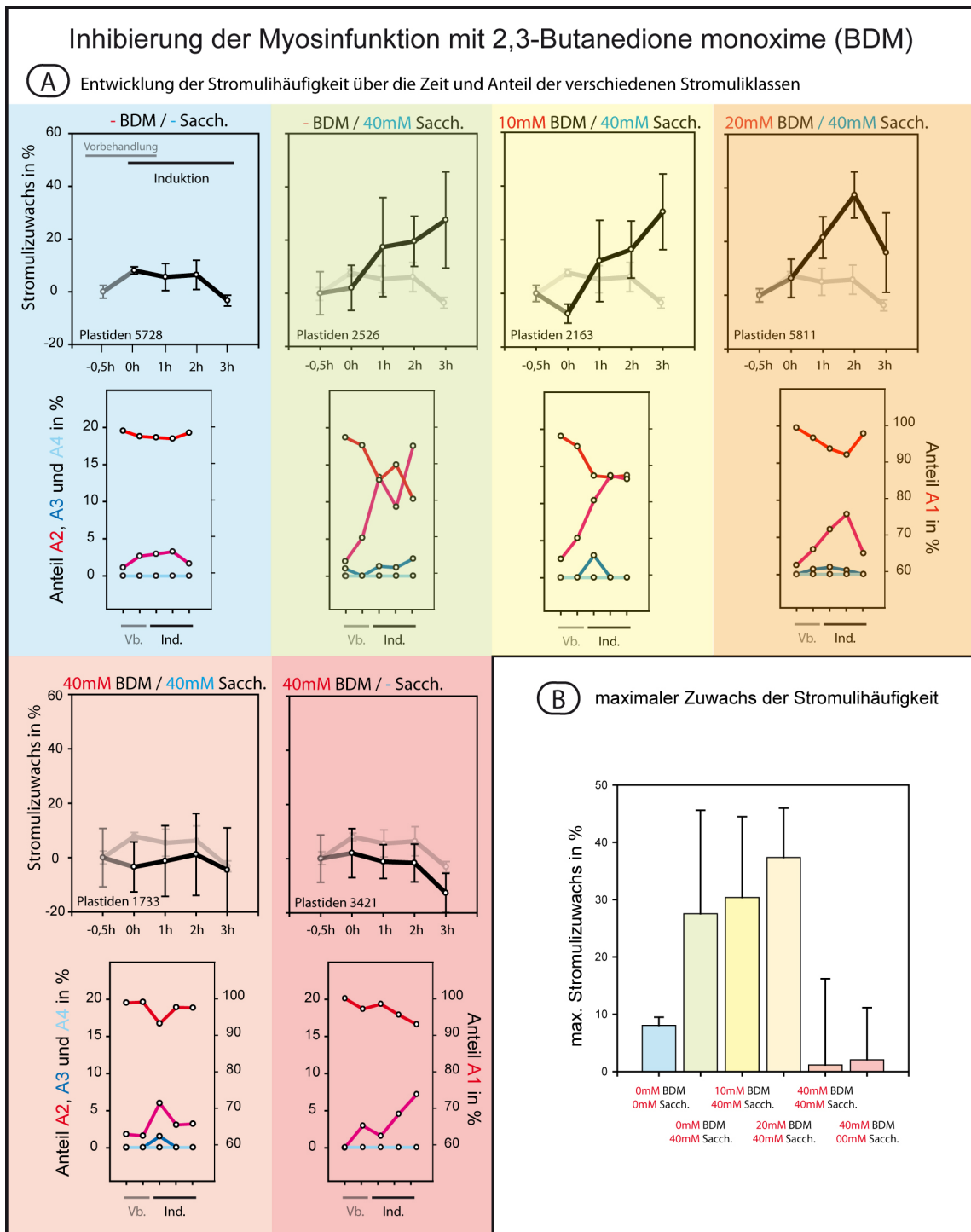


Abbildung 8.3.: Inhibierung der Myosinaktivität - A) Stromulihäufigkeit und Anteil der Stromuliklassen, der Experimente mit verschiedenen BDM Konzentrationen. **B)** Induktionskompetenzen der Experimente; Aus zeitlichen Gründen wurde von den durchgeführten Behandlungen, jeweils nur ein Experiment ausgewertet. Die Fehlerbalken ergeben sich aus den Mittelwerten der pro Zeitpunkt aufgenommenen sechs Bildabschnitte. A1, A2, A3 und A4 entsprechen den Stromuliklassen, wie sie unter 3.2 auf Seite 17 eingeführt wurden. SH% bezeichnet die Stromulihäufigkeit, wie sie unter 3.2 auf Seite 19 eingeführt wurde.

8.2.3. Diskussion

Für die Stromulibildung sind Myosine notwendig. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass saccharoseabhängige Induktion von Stromuli durch eine Konzentration von 40 mM BDM blockiert werden kann, was vermuten lässt, dass Myosine in diesen Vorgang eingebunden sind. Dies passt sehr gut zu den kürzlich veröffentlichten Arbeiten von Natesan et al. (2009) und Sattarzadeh et al. (2009). Die Autoren beobachteten in *N. benthamiana* nach der Behandlung mit BDM und transientem *Gene-Silencing* der Klasse XI Myosine einen deutlichen Rückgang der Stromulihäufigkeit. Konkrete Hinweise, welches der Klasse-XI-Myosine für die Bildung verantwortlich ist, ergaben sich aus der Expression von Fusionen der Myosin-Cargo-Bindedomäne und YFP. Natesan et al. (2009) zeigten eine Interaktion von Myosin XI-2 mit Plastiden und Sattarzadeh et al. (2009) konnten mit einem vergleichbaren Fusionsprotein eine Interaktion von Myosin-IX-F mit Plastiden und deren Stromuli nachweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die derzeitige Literaturlage lassen kaum an einer Verbindung zwischen Myosinen und Stromulibildung zweifeln. Die durch die erwähnten Autoren identifizierten Myosine stellen vielversprechende Ausgangspunkte dar, um spezifische Myosin-Kopplungs-Vermittler zum Stromuli zu identifizieren.

Stromuli, die von aktiven Myosinen abhängig sind, sind BDM sensitiv. BDM entfaltet seine inhibierende Wirkung über die Stabilisierung des Myosin-ADP-Pi Komplexes, der eine geringe Affinität zu den Aktinfasern besitzt. Auf diese Weise finden keine prozessiven Bewegungen der Myosine an der Aktinfaser statt (Herrmann et al., 1992). Auf Grund seiner Wirkungsweise wirkt BDM sich nur auf Prozesse aus, die einen funktionsfähigen Myosinzyklus mit ATP-Spaltung benötigen. Die inhibierende Wirkung von BDM sollte demnach nur Stromuli betreffen, die gerade durch ein Myosin aktiv verlängert, verkürzt oder initiiert werden. Durch die Stabilisierung des Komplexes mit geringer Aktinaffinität sollten solche Stromuli durch BDM ihren Kontakt zu Aktin verlieren und sich in den Plastidenkörper zurückziehen. Da Stromuli in der Literatur als sehr dynamische Strukturen beschrieben werden, die sich ständig in Bildung und Rückzug befinden (Hanson and Sattarzadeh, 2008), ist eine ständige Aktivität der an der Bildung beteiligten Myosine zu vermuten. Behandlung mit BDM sollte demnach zu einem schnellen Verschwinden der Stromuli führen.

Myosinebewegungen sind nicht wichtig für die Persistenz von Stromuli Die absoluten Werte der Stromulihäufigkeit zeigen im Gegensatz zu diesen Vermutungen, dass die Anzahl von Plastiden mit Stromuli in mit 40 mM BDM behandeltem Gewebe über einen sehr langen Zeitraum (2,5 h) nicht abnimmt, sondern stabil bleibt (Abb. 8.4). Dass diese gleichbleibende Stromulihäufigkeit nicht auf ein Gleichgewicht aus Stromulibildung und -zerstörung zurückzuführen ist, zeigt, dass 40 mM BDM in der Lage sind die massive Stromulibildung, wie sie bei Inkubation mit Saccharose sonst zu beobachten ist, verhindert. Die Anzahl sich neu bildender Stromuli unter nicht induzierenden Bedingungen sollten durch die 40 mM BDM effektiv unterdrückt werden. Die gleichbleibende Stromulihäufigkeit ist wahrscheinlich damit zu begründen, dass zum einen keine neuen Stromuli gebildet werden können und zum anderen

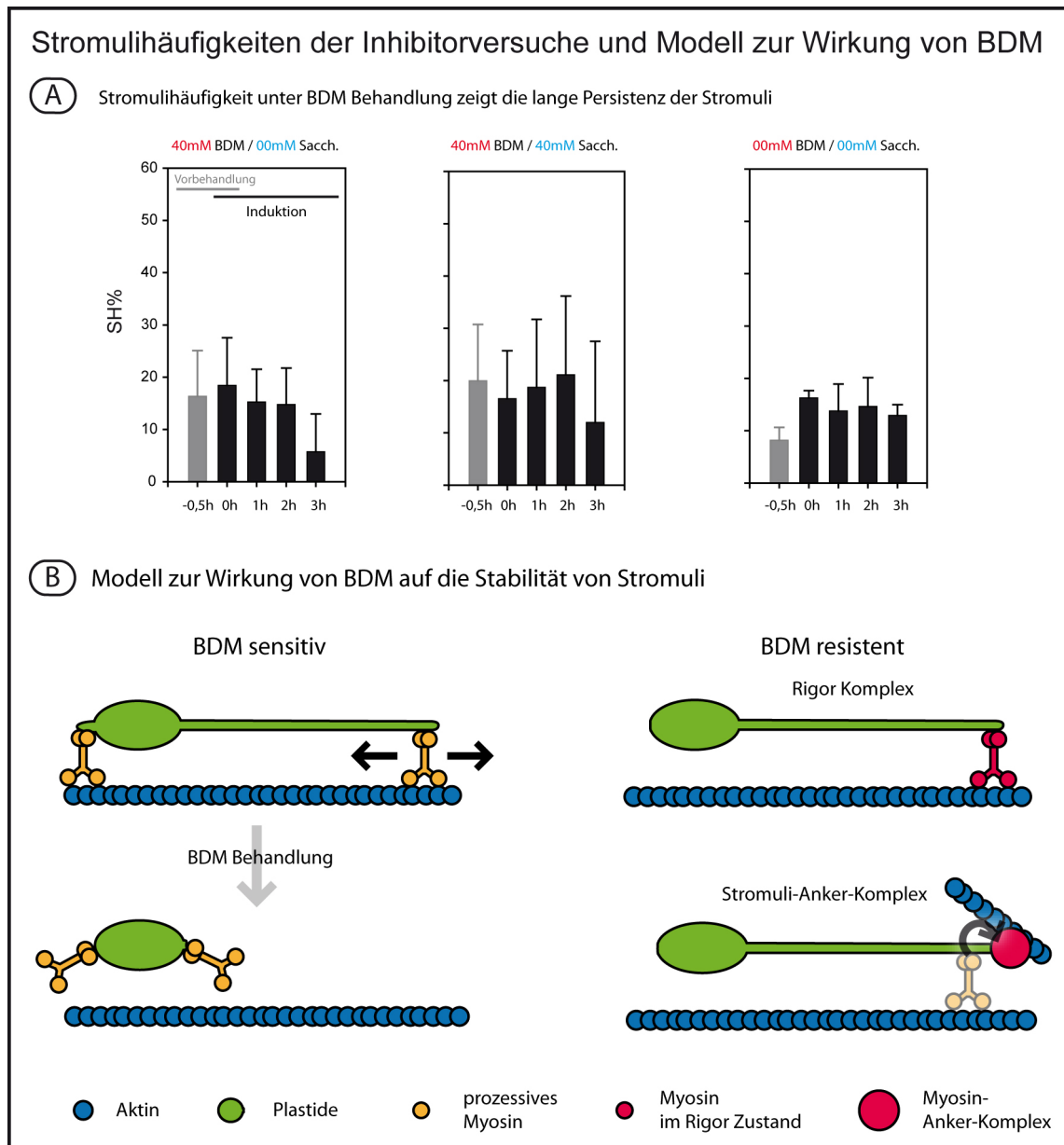


Abbildung 8.4.: Stromulihäufigkeit während BDM Behandlung und Modell zur Stabilität von Stromuli
 - **A)** Stromuli unter BDM-Behandlung; SH% entspricht dem Anteil von Plastiden mit mindestens einem Stromulus; Sacch. entspricht Saccharose, Details, siehe Text. - **B)** Modell zur Stabilität von Stromuli; aus den Experimenten geht hervor, dass es BDM-sensitiven und BDM-resistenten Stromuli gibt. **BDM-sensitiv:** Durch die Stabilisierung des Myosinzustandes mit geringer Aktinaffinität finden die aktiven Myosine keinen Halt mehr auf den Aktinfasern, die Stromuli werden zurückgebildet. Durch die geringe Myosin-Aktin-Interaktion können keine Stromuli neu gebildet werden. **BDM-resistent:** Da die bestehenden Stromuli durch BDM nicht zerstört werden können, müssen diese auf eine Weise stabilisiert sein, die unabhängig vom ATPase-Zyklus der Motordomäne ist. Gezeigt sind zwei mögliche Szenarien - **Rigor Komplex** - Die Myosine könnten auf unbekannte Weise im Zustand hoher Aktinaffinität verharren. - **Stromuli-Anker-Komplex** - Die Myosine übergeben die Stromuli an einen fest an das Zytoskelett (voraussichtlich Aktin) gebundenen Proteinkomplex.

die bereits bestehenden durch BDM nicht zerstört werden (Abb. 8.4).

Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass Stromuli weitaus persistenter sind als bisher angenommen. In den hier gezeigten Experimenten muss ein Großteil der Stromuli über mehrere Stunden stabil geblieben sein. Eine Beschreibung persistenter Stromuli lieferte bisher nur Gunning (2005), der einen Stromulus über eine Stunde beobachtete. Die Inhibitorexperimente zeigen, dass die Beständigkeit nicht nur für vereinzelte Stromuli gilt. In der oberen Epidermis scheint dies für den Großteil der im nicht-induzierten Zustand vorhandenen Stromuli zu gelten.

Stromuli werden über einen von aktiven Myosinen unabhängigen Weg aufrechterhalten.

Die Resistenz der Stromuli gegen BDM lässt vermuten, dass Stromuli nach ihrer Bildung auf eine myosinunabhängige Weise stabilisiert werden. Als stützendes Element dient sehr wahrscheinlich das Aktinnetzwerk (Natesan et al., 2009; Kwok and Hanson, 2003). Für die Verankerung der Stromuli auf diesem lassen sich verschiedene Szenarien entwickeln.

a) Der Stromulus wird über die ihn bildenden Myosine fest am Aktin gebunden. Die Myosine befinden sich dabei in einem Zustand hoher Aktinaffinität (rigorähnlicher Zustand) und verbleiben dauerhaft in diesem. Es ist nicht ausgeschlossen, dass durch die experimentellen Bedingungen ein solcher Zustand erst hervorgerufen wurde und die beobachtete Persistenz eine artifizielle Situation darstellt. Jedoch ist bisher keine solche Wirkung von BDM beschrieben worden.

b) Des Stromulus wird an einen am Aktin sitzenden Anker-Komplex übergeben, der ihn unabhängig vom Myosin stabilisiert (siehe Abb. 8.4 B).

BDM ist in seiner Spezifität umstritten. Obwohl Ostap (2002) vor der geringen Spezifität von BDM warnt und in seinen Versuchen *in vitro* zeigt, dass BDM nicht in der Lage ist die ATPase Funktion von überexprimiertem und gereinigtem Myosin V zu inhibieren, scheint es die Wirkung von Myosin XI, dem nächsten Homologen zu Klasse V Myosinen, *in vivo* zu inhibieren. So konnten viele Prozesse, die deutlich einer Myosinwirkung unterliegen, in Pflanzen gehemmt werden. Zu diesen Prozessen gehört zum Beispiel die Zytoplasmaströmung (Samaj et al., 2000; Funaki et al., 2004) und die Bewegung verschiedener Organellen (Nebenführ et al., 1999).

Stromuliähnliche Strukturen lassen sich aus künstlichen Vesikeln formen. Für die Bildung von Stromuli ist nach dem derzeitigen Wissenstand das Aktinskelett und die Wirkung von Myosinen notwendig. Ob weitere, zum Beispiel den Stromulus stabilisierende, Komponenten daran beiteiligt sind ist noch nicht ermittelt.

Dass *in vitro* für die Ausformung und Persistenz tubulärer Membranausstülpungen, außer einer motorischen Kraft und einem entsprechenden Widerlager, keine weiteren Komponenten notwendig sind, zeigen die Arbeiten von Roux et al. (2002). Die Autoren konnten darlegen, dass aus künstlichen Lipidvesikeln lediglich das Motorprotein Kinesin und die dazugehörigen Mikrotubulifilamente notwendig sind. Die durch die Autoren *in vitro* erzeugten tubulären Fortsätze gleichen in ihrer Form und im Durchmesser auffallend Stromuli.

8. Inhibieren der Translation und Myosinaktivität

Ähnliche künstliche Membranröhren wurden von Jesorka and Orwar (2008); Bauer et al. (2006); Karlsson et al. (2001) untersucht. In dem von den Autoren untersuchten System werden die Membranröhren mittels feiner Glasspitzen aus der Oberfläche der Vesikel gezogen und mit anderen Vesikeln verbunden (*Nanotube-Vesicle Networks*). Die sich bildenden Membranröhren (*Lipotubes*) sind durchschnittlich 100 nm im Durchmesser und entsprechen damit Stromuli, wie sie von (Pyke and Howells, 2002) in Tomate beschrieben wurden. Jesorka and Orwar (2008) fassen zusammen, dass der Durchmesser durch die Lipidzusammensetzung und damit von den Biegeeigenschaften der Lipide abhängt. Die Plastidenhülle unterscheidet sich außer in ihrer Lipidzusammensetzung von den durch die Autoren eingesetzten künstlichen Vesikeln durch den Besitz von Membranproteinen, die doppelte Plastidenhülle und das viskose Stroma. Auf diese Weise lassen sich auch die in der Regel etwas dickeren Stromuli (400 nm - 800 nm) erklären.

Teil III.

Allgemeine Diskussion

9. Gemeinsamkeiten der Stromuliinduktion

Um zu hinterfragen mit welchen zellulären Vorgängen Stromuli verbunden sind, wurde in dieser Arbeit nach stromuliinduzierenden und -reprimierenden Bedingungen gesucht. Die folgenden Bedingungen wurden als stromuliinduzierend erkannt:

- Wachsende und sich entfaltende Blätter
- Saccharose und Glukose, sowie deren Analoge
- Übergang von Nacht zu Tag
- Pathogenbefall von Oomyceten und echten Pilzen
- flg22 in *A. thaliana*
- *Agrobacterium* (Cytokinin) in *N. benthamiana*

Die folgenden Bedingungen wurden als stromulireprimierend erkannt:

- Fortschreitendes Blattalter
- Anhaltende Dunkelheit
- Verlust des Turgors

Die Reaktion der Stromuli auf verschiedene Stimuli gleicht sich. Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene stromuliinduzierende Bedingungen identifiziert. Die Bildung von Stromuli ist demnach keine Antwort der Zelle auf einen speziellen Stress oder Umweltreiz. Zudem ist die Ausprägung der Stromuliantwort für alle identifizierten Bedingungen qualitativ (Anteil Stromuliklassen, Zunahme der SH%) und quantitativ (Induktionskompetenz) sehr ähnlich und unterscheidet sich unter einigen Bedingungen nur in der Geschwindigkeit mit der die Stromulihäufigkeit zunimmt. Weitere Gemeinsamkeiten der beobachteten Stromulireaktionen sind die maximal erreichte Stromulihäufigkeit, die meist bei ca. 60 % lag, und die in allen Experimenten auftretende zeitliche Verzögerung zwischen der Reizapplikation und wachsender Stromulihäufigkeit.

Zwei Szenarien sind als Erklärung denkbar. Den zum Teil sehr spezifischen Induktoren der Stromulibildung (flg22 und 3-OMG) steht eine sehr generalisierte Stromuliantwort gegenüber. Um diesen scheinbaren Widerspruch auszulösen, sind zwei Szenarien denkbar. a) Stromuli haben verschiedene Funktionen und werden als Reaktion auf reizspezifisch veränderte Parameter gebildet. b) Stromuli erfüllen eine Funktion und alle stromuliinduzierenden Bedingungen verändern einen Parameter so, dass die Zelle mit Stromulibildung reagiert.

Welches der beiden Szenarien zutrifft und ob es eventuell ein Zusammenspiel beider Szenarien gibt, kann mit dem derzeitigen Wissen nicht geklärt werden und muss noch Gegenstand von Spekulationen bleiben. Eine Möglichkeit Hinweise für die eine oder die andere Erklärung zu finden, bietet der Vergleich der stromuliinduzierenden Bedingungen.

Zellen mit erhöhtem Stoffumsatz und Energiebedarf haben viele Stromuli. Eine auffallende Gemeinsamkeit von Zellen mit einer großen Stromulihäufigkeit ist, dass sie sich in Situationen befinden, in denen ein erhöhter Stoffumsatz bzw. Energiebedarf zu erwarten ist. So ist eine hohe Stromulihäufigkeit in wachsenden Geweben (Köhler and Hanson, 2000), nach Zugabe von Glukose und Saccharose, in reifenden Tomatenfrüchten (Waters et al., 2004), unter erhöhten Temperaturen (Holzinger et al., 2007a), in Zellen mit Pathogenkontakt sowie in symbiotischen Interaktionen (Hans et al., 2004) zu finden. Weiterhin sind heterotroph wachsende und sich schnell teilende Zellen wie Kalli und in Flüssigkulturen sehr reich an Stromuli (Köhler and Hanson, 2000). Im Gegensatz dazu finden sich in Zellen, die eine eingeschränkte Aktivität erwarten lassen (Turgorverlust, niedrige Temperaturen um 5 °C (Holzinger et al., 2007a) sowie fortschreitender Seneszenz), nur sehr wenige Stromuli.

Um welche gemeinsamen Stoffwechselvorgänge könnte es sich handeln? Wie in den einzelnen Diskussionen im Ergebnisteil dargelegt, gibt es einige Hinweise darauf, dass der Zuckermetabolismus in Zellen mit hoher Stromulihäufigkeit eine zentrale Rolle spielt. Als Regulator scheint in diesem Zusammenhang der Umsatz von Glukose zu Glukose-6-Phosphat durch die bereits als Glukosesensor beschriebene Hexokinase (Rosa et al., 2009) wichtig zu sein. Der aufgebaute Hexosephosphatpool und der Triosephosphatpool versorgen die einzelnen Synthesewege und die Energiegewinnung mit Substraten (Buchanan et al., 2000). Gewebe mit einem sehr hohen Stromuligehalt sollten sich deshalb durch eine besonders hohe Hexokinaseaktivität, wie sie bei einem großen Verbrauch an Hexosephosphaten auftritt, auszeichnen.

Sink-Gewebe zeichnen sich durch Stromuli und besonderen Stoffwechsel aus. Einige der Gewebe, die sich durch eine hohe Stromulihäufigkeit auszeichnen, sind *Sink*-Gewebe. Im Gegensatz zu den photosynthetisch aktiven Plastiden der *Source*-Gewebe importieren die Plastiden der *Sink*-Gewebe aus dem Hexosephosphatpool Glukose-6-Phosphat und legen daraus einen Stärkespeicher an (Buchanan et al., 2000). Interessanterweise wurden solche Stärkespeicher von Waters et al. (2004) in den stromulireichen Zellen des inneren Tomatenmesocarps und im Rahmen dieser Arbeit in den ebenfalls stromulireichen GV3101::pMP90-Infiltrationsstellen beobachtet. *Sink*-Gewebe werden von *Source*-Geweben mit Saccharose versorgt (Rolland et al., 2006), die nach ihrer Spaltung durch Invertasen zu einem stetigen Fluss von Glukose, mittels Hexokinase, in den Hexosephosphatpool führt. Auf diese Weise würde sich in *Sink*-Geweben ein ständiges stromuliinduzierendes Signal erklären lassen.

Dass eine Verbindung zwischen der Stromulihäufigkeit und dem Kohlehydrathaushalt besteht, liegt durch die Zuckereperimente auf der Hand. Ob die Verbindung *in vivo* tatsächlich auf dem soeben beschriebenen Weg besteht, bleibt noch zu prüfen.

Stromuli können potentiell mit vielen Stoffwechselwegen in Verbindung gebracht werden.

Plastiden sind neben der Photosynthese und der Bildung von Kohlehydraten essentiell für die Synthese von Aminosäuren, Terpenoiden, Fettsäuren, die Reduktion von Stickstoff und Schwefel sowie deren Einbau in die entsprechenden Aminosäuren (Block et al., 2007). Alle Reaktionswege, an denen die Plastide beteiligt ist, sind wie der Kohlehydratstoffwechsel im metabolischen Netzwerk der Zelle integriert und bedürfen eines Stoffaustausches mit dem Zytoplasma. Nach Weber and Fischer (2009) gehören zu den prominentesten ausgetauschten Metabolitgruppen: Zuckerphosphate, Dicarboxylat, Glycolat/Glycerat, ATP/ADP, Aminosäuren, Maltose, Glukose und verschiedene Ionen. Da stromuliinduzierende Bedingungen, wie zum Beispiel die getesteten abiotischen und biotischen Stressfaktoren, eine sehr komplexe metabolische Zellantwort hervorrufen, können alle genannten Stoffwechselwege mit der Stromulibildung unter den entsprechenden Bedingungen in Verbindung stehen.

Keines der Szenarien kann ausgeschlossen werden. Auf Grund des derzeitigen Wissensstandes kann keines der beiden Szenarien ausgeschlossen werden. Wie beschrieben verbindet einige stromuliinduzierende Bedingungen die durch sie ausgelöste Umstellung des Zuckerstoffwechsels (Szenario b). Andererseits lassen sich andere stromuliinduzierende Bedingungen, wie die Temperaturabhängigkeit (Holzinger et al., 2007a), Kalli- und Flüssigkulturen (Köhler and Hanson, 2000), Turanose, Palatinose, filamentöse Pathogene und *flg22* mit dem derzeitigen Wissen nur schwer mit dem Kohlehydrathaushalt in Verbindung bringen (Szenario a).

Auf Grund der bereits angesprochenen allgemeinen Reaktion auf die verschiedenen Bedingungen bleibt jedoch anzunehmen, dass Stromuli eine allgemeine Funktion ausüben, die alle stromuliinduzierenden Bedingungen auf eine noch unbekannt Weise verbindet.

10. Funktion von Stromuli

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, mittels der durchgeführten Experimente Hinweise nicht nur auf die Regulation von Stromuli, sondern auch auf deren Funktion zu bekommen.

Vergrößerung der Plastidenoberfläche?

Die wahrscheinlich am häufigsten vorgeschlagene und diskutierte Funktion von Stromuli ist die ihnen zugesprochene Vergrößerung der Plastidenoberfläche. Durch die Bildung eines Stromulus, so wird argumentiert, würde die Kontaktoberfläche zwischen Plastid und Zelle vergrößert, was sich positiv auf den Stoffaustausch auswirke (Hanson and Sattarzadeh, 2008). Dass Stromuli, wie bereits diskutiert, in Zellen mit hohem Zellstoffwechsel vorkommen und eine unterstützende Funktion im Stoffumsatz besitzen sollen, lässt die Schlussfolgerung plausibel erscheinen.

Gleichbleibendes Volumen erfordert eine Zunahme der Oberfläche.

Dennoch ist die von den Autoren geführte Argumentation über die Oberflächenvergrößerung nicht zufriedenstellend. Wenn die Form des Plastidenkörpers als Kugel oder besser als Ellipsoid angenommen wird, besitzen diese Organellen ein sehr günstiges Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Dies bedeutet, dass eine geringe Menge an Hüllmembran ein großes Volumen umgibt. Bei einer Umformung des Plastiden, wie es das Bilden eines Stromulus darstellt, müsste es bei gleichbleibendem Volumen zu einer Zunahme an Membranoberfläche kommen. Entweder geschieht dies durch Dehnen der vorhandenen Membran oder durch den Einbau neuer Lipide. Dass Membranen sich zu einem gewissen Maße dehnen lassen und dadurch ihre Transporteigenschaften verändern können, ist aus Untersuchungen an Vesikeln, die aus Rattendarm gewonnen wurden, bekannt (Fujime and Miyamoto, 1991). Hanson and Sattarzadeh (2008) berechneten, dass eine 3 μm lange Plastide mit einem 0,2 μm breiten und 10 μm langen Stromulus 20 % zusätzliche Membran benötigt. Eine Dehnung der Hüllmembranen um diesen Membranzuwachs zu gewährleisten, würde sicher die Membranintegrität gefährden und ist daher auszuschließen. Die Autoren spekulierten, dass die um manche Plastiden zu beobachtende *mobile jacket* (siehe Einleitung) die zusätzliche Membran darstellt. Da es sich dabei aber lediglich um unregelmäßig geformte Hüllmembranen handelt, stellt das Formen eines Stromulus aus diesen Membranen keinen Gewinn an Hüllmembranoberfläche dar.

Um die zusätzlich benötigte Membran zu liefern, wäre Neusynthese und Einbau von Lipiden in die Hüllmembranen notwendig. Doch die Geschwindigkeit der Stromulibildung kann, wie sie Gunning (2005) in Videoaufnahmen festgehalten hat, sehr hoch sein (0.23 $\mu\text{m s}^{-1}$ bis 0.05 $\mu\text{m s}^{-1}$) und deshalb ist die Hypothese einer *de novo*-Synthese nicht haltbar. Selbst wenn die Hüllmembranen mit den entsprechenden Lipiden in der benötigten Geschwindigkeit

aufgefüllt werden, müssten entsprechend Transporterproteine in einer Geschwindigkeit in die Membran eingebaut werden, die der Geschwindigkeit des Membranzuwachses entspricht. Ansonsten wäre nur der Transport von Molekülen, die zum Überqueren der Membranen keine Transportproteine benötigen, beschleunigt. Metabolite und Ionen würden von der vergrößerten Membranfläche unbeeinflusst bleiben.

Es ist demnach zu überdenken, ob die Argumente wie sie in der Literatur angeführt werden ausreichen, um einen verbesserten Stofffluss durch eine stromulivermittelte Oberflächenvergrößerung zu diskutieren.

Verringerung des Volumens bei gleichbleibender Oberfläche.

Wenn keine tatsächliche Zunahme an Plastidenoberfläche durch die Bildung eines Stromulus zu verzeichnen ist, bleibt die alternative Überlegung, ob eine Verringerung des Volumens bei gleichbleibender Oberfläche erfolgt. Bei der Verformung des ellipsoiden Plastiden durch das Ausbilden eines Stromulus verschiebt sich das Oberflächen-Volumen-Verhältnis so, dass bei gleichbleibender Oberfläche das Volumen entsprechend abnehmen muss. Nur ergibt sich dadurch keine größere Kontaktfläche zum umgebenden Zytosol.

Lizana et al. (2008) führen an, dass in Tier- und Hefezellen bei den meisten Organellen unter bestimmten Bedingungen Größen- und Volumenveränderungen zu beobachten sind, die auch durch Formveränderung induziert werden können. Weiterhin fassen die Autoren zusammen, dass es in der Literatur eine Reihe von Hinweisen auf eine Verbindung zwischen der Form- und Volumenänderung von Organellen zu den in ihnen ablaufenden Reaktionen gibt. In den durch Lizana et al. (2008) durchgeführten Rechnungen an einem mitochondriengroßen Modellvesikel konnte gezeigt werden, dass sich durch eine Volumenzunahme von 60 %, wie sie für Mitochondrien beschrieben wurde, die Reaktionskinetiken verschiedener mitochondrieller Enzyme bedeutend veränderten.

Bei einem sich ausbildenden Stromulus könnte sich das Volumen bei unveränderlicher Membranfläche durch das Ausströmen von Wasser anpassen. Dies würde zu einer Konzentrierung des Stromas führen. Die veränderten Konzentrationen können nach den Berechnungen von Lizana et al. (2008) die Reaktionen bestimmter Enzyme und den Stoffumsatz im Stromulus beeinflussen. Dass die durch die Konzentration des Stromas verursachten Änderungen im Stoffumsatz des Stromulus komplexe Auswirkungen haben können, zeigen die Berechnungen der Autoren ebenfalls. So wurden manche Enzyme in ihrem Modell nur gering durch die Volumenänderung beeinflusst und manche sehr stark. Stromuli können auf diese Weise simultan auf viele Stoffwechselwege Einfluss nehmen, was zu der generellen Natur der Stromuliantwort passt. Dass für die Anpassung des Volumens bei der Ausformung von Stromuli Porine nicht unbedingt notwendig sind und die Integrität der Membran nicht gefährdet ist, zeigen die bereits angesprochenen Versuche an *Nanotube-Vesicle Networks* (Jesorka and Orwar, 2008). Diese Vesikel besitzen kein spezielles Druckausgleichssystem, um ihr Volumen anzupassen.

Modellrechnung Ob es *in vivo* tatsächlich zu einer Volumenabnahme durch die Stromulibildung kommt und ob diese Abnahme ausreichend ist, um über die sich veränderten

Konzentrationen Einfluss auf Enzymaktivitäten zu nehmen, bleibt noch experimentell zu überprüfen.

An dem von Hanson and Sattarzadeh (2008) erwähnten Modellstromulus, wie er maßstabsgerecht in Abb. 10.1 dargestellt ist, lässt sich die Hypothese jedoch durch Berechnung recht einfach überprüfen. Die Autoren nehmen für den Plastidenkörper eine Kugel von $3,0\ \mu\text{m}$ Durchmesser und für den Stromulus einen Zylinder von $0,2\ \mu\text{m}$ Durchmesser mit $10,0\ \mu\text{m}$ Länge an. Mit Hilfe dieser Angaben wurde der Volumenunterschied des Plastiden mit Stromulus zu einem Plastiden ohne Stromulus, aber mit der selben Oberfläche, berechnet (Berechnung siehe Teil V Anhang auf Seite 162). Es ergibt sich bei der Bildung des Stromulus ein Volumenverlust von ca. 23 %, was ungefähr einem Viertel des Ausgangsvolumens entspricht. Die theoretisch verursachte Konzentrierung des Stromas würde bei einer ursprünglichen Konzentration eines Metaboliten von $1,0\ \mu\text{M}$ nach dem volumenverlust in einer Konzentration von $1,4\ \mu\text{M}$ resultieren. Abbildung 10.1 macht deutlich, dass trotz signifikanter Volumenabnahme die im mikroskopischen Bild sichtbaren Silhouetten der Plastidenkörper sich nicht sehr deutlich verändern.

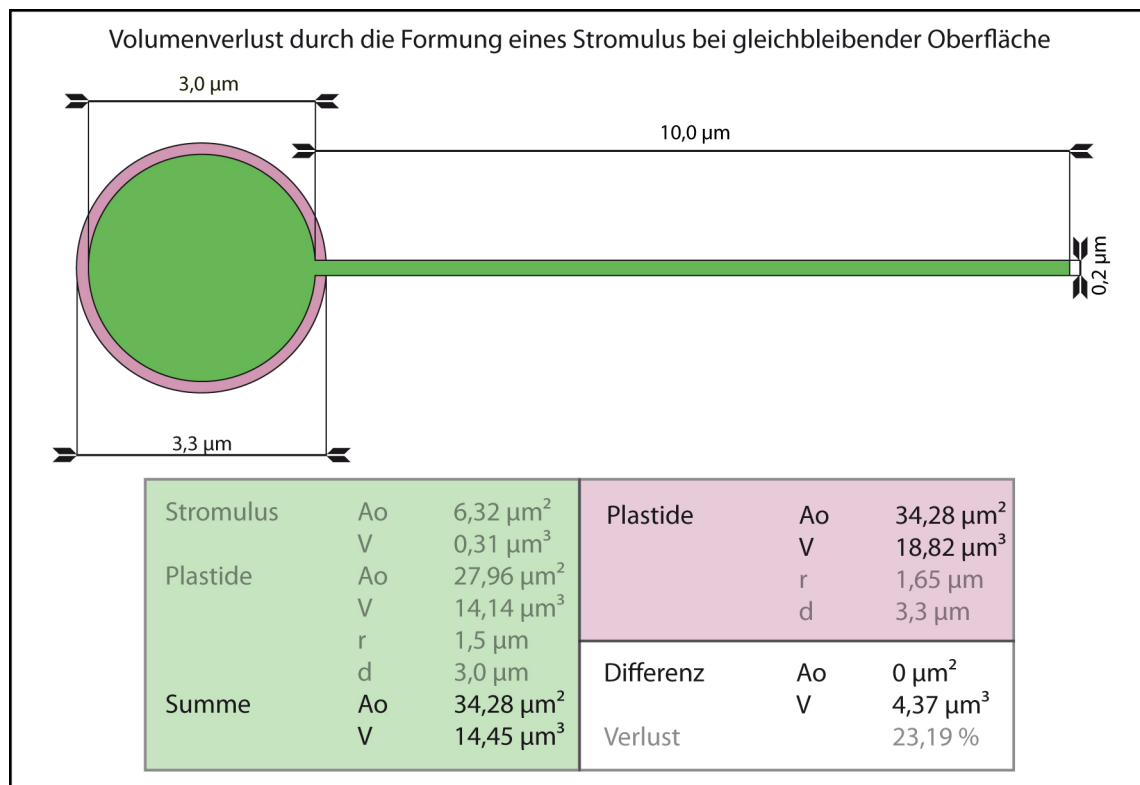


Abbildung 10.1.: Volumenverlust durch die Formung eines Stromulus bei gleichbleibender Oberfläche - oben) Schematische und maßstabgerechte Silhouetten einer Plastide mit einem Standardstromulus (grün) nach (Hanson and Sattarzadeh, 2008), sowie die Silhouetten einer Plastide ohne Stromulus (violett), aber mit gleicher Oberfläche; **unten)** geometrische Eckdaten der Plastiden, sowie die sich ergebende Volumendifferenz, die bei der Verformung des Plastiden bei der Stromulibildung entsteht. (V Volumen, Ao Oberfläche, r Radius und d Durchmesser) Weitere Details siehe Text.

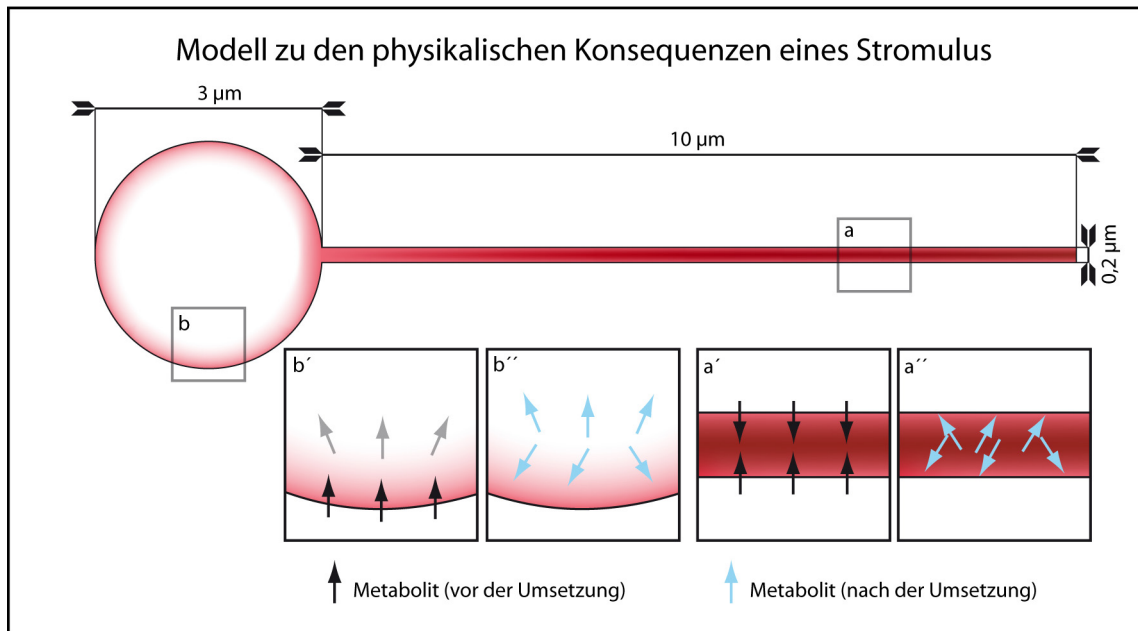


Abbildung 10.2.: Modell zu den physikalischen Konsequenzen eines Stromulus - Schematische und maßstabgerechte Darstellung eines Standardstromulus nach Hanson and Sattarzadeh (2008); die Farbintensität symbolisiert die Konzentration eines im Stroma umzusetzenden Metabolits; **b)** Nachdem ein Metabolit über die Membran transportiert wird, kann er sich im großen Volumen des Plastidenkörpers verdünnen, besonders da ein Konzentrationsgefälle zum Plastidenkörperinneren besteht. (b') Nach der Umsetzung hat das entsprechende Produkt große Diffusionsfreiheit (b''). **a)** Im geringen Volumen eines Stromulus steht dem importierten Metabolit nur begrenzt Raum zur Diffusion zur Verfügung, weshalb er sich bei gleicher Transportrate, wie am Plastidenkörper, kaum verdünnt (a'). Nach dem Umsatz hat das Produkt kaum Diffusionsfreiheit und eine hohe Membrandichte in unmittelbarer Umgebung (a'').

Physikalische Konsequenzen der Stromuli?

Auch wenn sich *in vivo* die Oberfläche und das Volumen der Plastiden nicht wie in der Rechnung verhalten sollten, so zeigen die Arbeiten von Lizana et al. (2008), dass der Aspekt der Form und die damit zusammenhängenden physikalischen Konsequenzen einen lohnenden Ansatzpunkt darstellen über die Funktion der Formveränderung von Organellen nachzudenken. So zeigt sich, dass aus der Bildung von Stromuli weitere physikalische Konsequenzen resultieren, die ebenfalls einen Einfluss auf die Stoffumsätze im Stromulus haben können.

Stromuli als Subkompartiment Eine weitere Konsequenz, die aus der Bildung eines Stromulus hervorgeht, ist das Separieren von Stroma in einem kleinen Querschnitt. Im Beispiel des bereits erwähnten Standardstromulus von Hanson and Sattarzadeh (2008) befindet sich das Stromavolumen, separiert vom Plastidenkörper, in einem 10 µm langen Stromulus mit einem Querschnitt von 0,2 µm. Das subkompartimentierte Stroma unterscheidet sich nach bisherigen Erkenntnissen zwar nicht in der Proteinzusammensetzung, aber auf Grund des geringen Stromulusquerschnittes und der langgestreckten Form sollten sich trotz gleicher Transportraten über die Membranen die resultierenden Metabolitkonzentrationen im Stromulus anders entwickeln als im Plastidenkörper (Abb. 10.2).

Im Plastidenkörper können sich auf Grund des großen Volumens importierte Metabolite von der Membran ausgehend in den Plastidenkörper hinein verdünnen (Abb. 10.2 b'). Im Stromulus steht dem Metaboliten diese Freiheiten nicht zur Verfügung und bei gleicher Transportrate

wird deshalb im Stromulus eine höhere Konzentration erreicht werden (Abb. 10.2 b''). Als Konsequenz aus der erhöhten Substratkonzentration wird analog zu den Berechnungen von Lizana et al. (2008) abhängig vom Enzym die Umsatzgeschwindigkeit im Stromulus anders sein als im Plastidenkörper.

Ein weiterer Vorteil, der aus dem kleinen Volumen und dem geringen Querschnitt resultiert, wirkt sich auf die Metaboliten aus, die wieder zurück ins Zytosol transportiert werden sollen. Im großen Volumen des Plastidenkörpers hat das Produkt einen relativ großen Raum zur Diffusion zur Verfügung (Abb. 10.2 b''). Im kleinen Volumen des Stromulus hat der Metabolit eine geringere Diffusionsfreiheit und kürzere Wege zur nächsten Membran, was zu einem effektiveren Export führt (Abb. 10.2 a'').

Man mag argumentieren, dass sich die höheren Konzentrationen im Stromulus durch Diffusion mit dem Plastidenkörper angleichen und sich somit keine lokale Konzentrierung aufbauen kann. Dem ist entgegenzuhalten, dass der Austausch von Stroma mit dem Plastidenkörper nur über den kleinen Querschnitt der Stromulusöffnung zum Plastidenkörper (0,2 µm im Durchmesser) stattfinden kann und je nach Stromulus eine nicht unerhebliche Strecke für die Moleküle zu überwinden ist. Weiterhin ist zu bedenken, dass die Diffusionsgeschwindigkeit im Stroma nach Köhler et al. (2000) 100 mal langsamer ist als im Zytosol und somit der Konzentrationsausgleich mit wachsender Entfernung vom Stromulusursprung (Öffnung in den Plastidenkörper) immer mehr Zeit in Anspruch nimmt.

Peroxules und Matrixules

Da die physikalischen Konsequenzen nicht spezifisch für die Formveränderung bestimmter Organellen oder Kompartimente sind, sondern allgemeine Gesetzmäßigkeiten solcher Verformungen darstellen (Lizana et al., 2008), lassen sich die eben angeführten Überlegungen auch auf die in den letzten Jahren an den Peroxisomen und Mitochondrien beschriebenen ebenfalls filamentösen Protrusionen, den *Matrixules* (Mitochondrien) und den *Peroxules* (Peroxisomen) übertragen (Sinclair et al., 2009; Logan et al., 2004).

Auch Mitochondrien und Peroxisomen sind in das metabolische Netzwerk der Zelle eingebunden und müssen unter bestimmten Bedingungen eine höhere Metabolismusrate aufweisen und Ausgangsstoffe sowie Produkte mit dem Zytosol austauschen. Dabei könnten die tubulären Fortsätze auf die gleiche Weise, wie gerade für Stromuli diskutiert, für Peroxisomen und Mitochondrien von Vorteil sein. Tatsächlich finden sich zum Beispiel *Peroxules* vermehrt unter Bedingungen, in denen reaktive Sauerstoffspezies entstehen und diese durch Peroxisomen entgiftet werden müssen (Sinclair et al., 2009). *Matrixules* und lang gezogene Mitochondrien sind zum Beispiel in Tabakkeimlingen unter verringertem Sauerstoffgehalt zu beobachten (Waters, 2004). Obwohl Scott et al. (2007) spekulieren, dass *Matrixules*, *Peroxules* und Stromuli jeweils die Organelloberfläche vergrößern, um einen besseren Austausch von Produkten der Photorespiration zu gewährleisten, ist es wahrscheinlicher, dass nicht die zweifelhafte Oberflächenvergrößerung, sondern eher die physikalischen Eigenschaften von tubulären Fortsätzen mit geringerem Querschnitt die verbindende Gemeinsamkeit zwischen *Matrixules*, *Peroxules* und Stromuli darstellen.

Interplastidäre Verbindungen

Interplastidäre Verbindungen sind selten. Obwohl ein Fluss von fluoreszenzmarkierten Proteinen zwischen zwei Plastidenkörpern mehrmals experimentell nachgewiesen wurde (Köhler et al., 1997; Kwok and Hanson, 2003, 2004a) und diesem eine aktive Komponente zu Grunde zu liegen scheint (Köhler et al., 2000), ist bis heute nicht klar, was unter natürlichen Bedingungen zwischen den verbundenen Plastiden ausgetauscht wird. Die meisten dokumentierten Beobachtungen solcher interplastidären Verbindungen wurden in etiolierten Keimlingen gemacht. In anderen Geweben scheinen sie jedoch eher selten zu sein. So liegt ihr Anteil in der oberen Epidermis von *A. thaliana* wie bereits diskutiert sehr wahrscheinlich weit unter 2,3% (siehe 3.3 auf Seite 29). Eine Hauptfunktion der filamentösen Stromuli zur Brückenbildung zwischen Plastiden scheint bei solch geringer Abundanz unwahrscheinlich zu sein. Hinzu kommt, dass unter stromuliinduzierenden Bedingungen auch keine Zunahme solcher Brücken beobachtet werden konnte, weshalb sie in der oberen Blattepidermis von *A. thaliana* nicht die Hauptfunktion von Stromuli bilden.

Hanson and Sattarzadeh (2008) führen an, dass es sich bei der Plastidenverbindung um sehr seltene und kurze Ereignisse handelt, die aber über eine längere Zeit häufig genug stattfinden, um funktional zu sein. Dass sich bestimmte Tageszeiten durch bevorzugte Bildung von Stromulibrücken auszeichnen, konnte im Rahmen der Lichtrhythmusexperimente ausgeschlossen werden, da in den aufgenommenen z-Stapeln keine interplastidären Brücken gefunden wurden.

Kommunikation zum Zellkern

Plastiden und Stromuli wurden von verschiedenen Autoren (Kwok and Hanson, 2004c) und auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit (Abb. 10.3 und 10.4 auf Seite 135) in sehr engem Kontakt mit dem Zellkern beobachtet. Diese enge Lagebeziehung lässt vermuten, dass Stromuli die Funktion der nahe am Zellkern liegenden Plastiden unterstützen. Stromuli werden in diesem Zusammenhang als mögliche Kommunikationshilfen für den Plastiden zum Zellkern (wenn sie auf diese hin zeigen), oder als Kommunikationsbrücken zwischen Zellkern und Zellperipherie (wenn sie vom Zellkern weg zeigen) diskutiert (Kwok and Hanson, 2004c; Hanson and Sattarzadeh, 2008). Die verschiedenen Zellkernausrichtungen der Stromuli erscheinen widersprüchlich und führen zu unterschiedlichen funktionalen Interpretationen, für die bisher die experimentellen Belege fehlen.

Stromuli und Lage am Zellkern sind für einen Plastiden wahrscheinlich zwei verschiedene Dinge. In der Literatur und in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit finden sich Hinweise darauf, dass die Lage eines Plastiden am Zellkern nicht gleichzeitig bedeutet, dass dieser einen Stromulus besitzt. So finden sich in verschiedenen pflanzlichen Geweben zwei verschiedene Situationen.

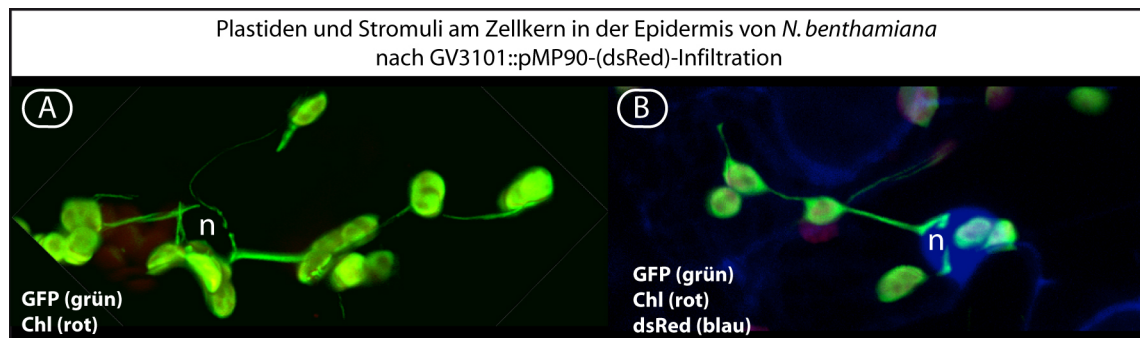


Abbildung 10.3.: Plastiden und Stromuli am Zellkern in der Epidermis von *N. benthamiana* *FNR-EGFP* 48 h nach GV3101::pMP90-(dsRed)-Infiltration - **A** und **B**) Projektionen von LSM-Bildstapeln entlang der z-Achse. Es ist deutlich zu sehen, wie Stromuli, die den Zellkern (n) erreichen, auf dessen Oberfläche aufliegen. **A**) In diesem Bild ist der dsRed-Kanal ausgeblendet, um besser zeigen zu können, wie die Stromuli um den Zellkern liegen. **B**) Das exprimierte dsRed (blau) markiert den Zellkern, auf dessen Oberfläche zwei Stromuli liegen.

- a) Eine Vielzahl von stromulilosen Plastiden liegt direkt am Zellkern, wie zum Beispiel in manchen Tabakflüssigkulturzellen (Kwok and Hanson, 2004c), Epidermiszellen am Ende einer *normalen Nacht* und manchen Zellen in *N. benthamiana* nach LBA4404-Infiltration (Abb. 10.6 auf Seite 136).
- b) Eine Vielzahl von stromulitragenden Plastiden liegt direkt am Zellkern, wie zum Beispiel die meisten Tabakflüssigkulturzellen (Kwok and Hanson, 2004c), Epidermiszellen während des Tages und die meisten Zellen in *N. benthamiana* nach GV3101::pMP90-Infiltration (Abb. 10.6 auf Seite 136).

Wie lässt sich die Ausrichtung von nahe dem Zellkern gebildeter Stromuli erklären? Nach heutigem Wissensstand werden Stromuli durch die Wirkung von Myosinen aus der Oberfläche der Plastiden herausgezogen. Auf Grund der Aktinabhängigkeit der Myosinbewegung erfolgt die Stromulibildung entlang von Aktinfilamenten, weshalb Stromuli eng mit diesen assoziiert beobachtet werden (Kwok and Hanson, 2004b; Gunning, 2005). Stromuli sind demnach betreffend ihrer Richtungsfreiheit vom Aktinskelett abhängig. Wie Iwabuchi et al. (2010) zeigen, wird der Zellkern von Epidermiszellen von *A. thaliana* durch Aktinfilamente in der Zellmitte positioniert. In den durch die Autoren gezeigten Abbildungen sind deutlich nahe des Zellkerns auf den Aktinsträngen liegend Plastiden zu erkennen. An vergleichbaren Positionen konnten auch in den hier durchgeführten Experimenten Plastiden beobachtet werden (Abb. 10.4). Der Zellkern selbst ist von einem dichten Aktinnetzwerk umgeben.

Kommt es zu einer Stromuliinduktion, wie es zum Beispiel beim Übergang vom Ende einer *normalen Nacht* zu einem *normalen Tag* der Fall ist, muss die Stromulibildung entlang der Aktinfilamente erfolgen. Dies hat zur Folge, dass bei den nahe am Zellkern liegenden Plastiden die entstandenen Stromuli entweder vom Zellkern weg oder zu ihm hin gerichtet sind.

Auf gleiche Weise ist die Ausrichtung von Stromuli in Flüssigzellkulturen von Tabak zu erklären. In diesen Zellen liegt der Zellkern ebenfalls in der Mitte der Zellen (Sheahan et al., 2004b; Köhler et al., 2000) und hat meist keinen Kontakt zur Zellwand. Er ist an einem Netz von Plasmasträngen in der Zelle aufgehängt. Die in diesen Zellen eng am Zellkern liegenden

Plastiden haben keine andere Möglichkeit als ihre Stromuli entlang der Aktinfilamente, die in den Plasmasträngen verlaufen, hin zur Peripherie zu bilden.

Die Ausrichtung von Stromuli auf den Zellkern scheint hauptsächlich eine Konsequenz der Ausrichtung der Aktinfilamente zu sein. Ob ein funktionaler Zusammenhang besteht, bleibt unklar.

Warum werden Stromuli hauptsächlich in der Nähe des Zellkerns gebildet? Obwohl die Lage eines Plastiden am Zellkern nicht zwingend mit der Bildung von Stromuli verbunden ist, besitzen Epidermisplastiden in der Nähe des Zellkerns bedeutend häufiger Stromuli. Die derzeitige Datenlage lässt über den Grund dafür nur Spekulationen zu. Wie im Rahmen der Lichtrhythmusexperimente und der Translationshemmung diskutiert, erfolgt die Umsetzung des stromuliinduzierenden Signals über den Zellkern. Dies würde dazu führen, dass sich das Signal zur Stromulibildung vom Zellkern ausgehend in der Zelle verbreitet. Auf diese Weise würden zuerst die nahe am Zellkern liegenden Plastiden von dem Signal betroffen und weiter entfernt liegende Plastiden würde das Signal nicht erreichen. Bei sehr intensiven Stimuli, wie 40 mM Saccharose, ist voraussichtlich das Signal stark genug auch weiter entfernt liegende Plastiden zu erreichen. In der Zellperipherie liegende Plastiden, die nicht auf den zellkernpositionierenden Aktinfasern liegen, besitzen mehr Richtungsfreiheiten für die Stromulibildung und können deshalb in jegliche Richtungen weisen (Abb. 10.5 auf der nächsten Seite).

Welche Funktion haben die Plastiden am Zellkern? Tatsächlich diskutieren Kwok and Hanson (2004c) die Funktion der Lage von Plastiden am Zellkern getrennt von der Stromuliausrichtung, führen diese Trennung aber in späteren Übersichtsartikeln nicht mehr weiter (Hanson and Sattarzadeh, 2008). In der früheren Publikation spekulieren die Autoren, dass die Lage der Plastiden am Zellkern einen Vorteil bei der Zellteilung bietet und gewährleistet, dass die Plastiden gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden. Gestützt werden diese Überlegungen von Beobachtungen an sich teilenden *N. tabacum*-Mesophyllprotoplasten und Flüssigkulturzellen, in denen sich vor der Teilung die Plastiden um den Zellkern sammeln (Sheahan et al., 2004a; Nebenführ et al., 2000a). Durch weitere Beobachtungen an Kalli kommen Sheahan et al. (2004a) zu dem Schluss, dass die Akkumulation von Plastiden am Zellkern eine Eigenschaft von Zellen ist, die das Potential für weitere Zellteilungen besitzen. Diese Schlussfolgerung scheint im Widerspruch zu der Akkumulation von Plastiden am Zellkern nach Infiltration mit GV3101::pMP90 in *N. benthamiana* zu stehen, da sich in den entfalten Blättern keine massiven Zellteilungen erwarten lassen. Falls sich bestätigen lässt, dass GV3101::pMP90 im größeren Maße das Cytokinin trans-Zeatin produziert, wären Cytokinine als Auslöser für die Plastidentranslokation potentielle Kandidaten. Dies wäre insofern stimmig, da Cytokinine zusammen mit Auxinen für die Initiation und Aufrechterhaltung der Zellteilung verantwortlich sind.

Neben den gerade beschriebenen sehr ausgeprägten Akkumulationen finden sich zum Beispiel in der oberen Epidermis von *A. thaliana* moderate Ansammlungen von Plastiden am Zellkern, die wahrscheinlich keine Zellteilungsreaktion darstellen. Kwok and Hanson (2004c) diskutieren, dass die Zellkernassoziation den Plastiden zu einer verbesserten Aufnahme von am Zellkern

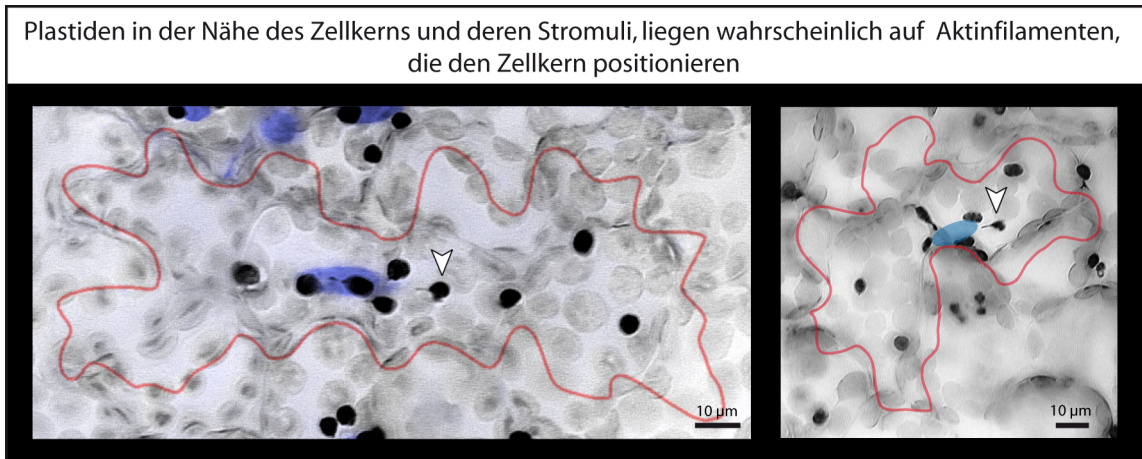


Abbildung 10.4.: Plastiden in der Epidermis von *A. thaliana* - invertierte Graustufenfluoreszenzbilder der oberen Epidermis von *A. thaliana* *FNR-EGFP-7-4* mit EDOF mit eingezeichneten Zellkonturen (rot). Die Zellen wurden während eines *normalen Tages* aufgenommen. **links:** Zellkern durch Färbung mit DAPI (blau eingefärbte, invertierte Graustufenfluoreszenz) sichtbar gemacht; **rechts:** Position des Zellkerns durch blaue Ellipse gekennzeichnet. Die Pfeilköpfe markieren Plastiden, die im Vergleich zu den Bildern von Iwabuchi et al. (2010) auf den Zellkern positionierenden Aktinfasern liegen.

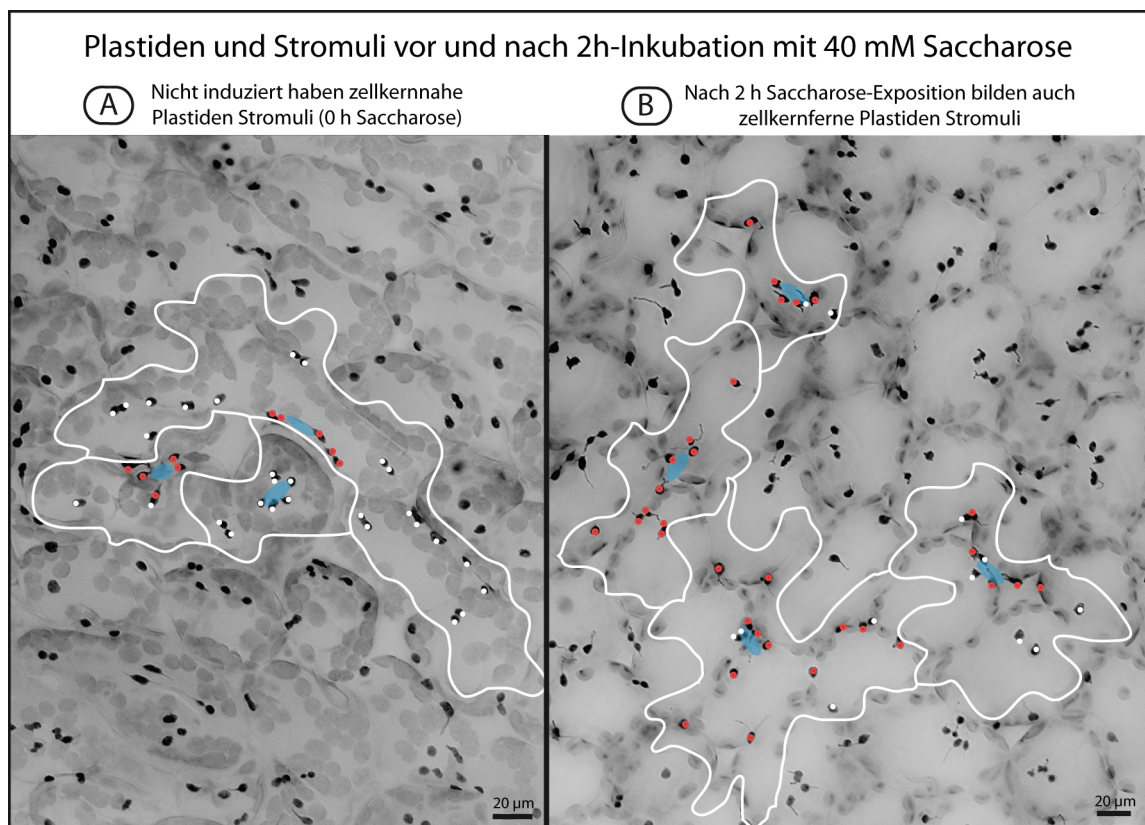


Abbildung 10.5.: Plastiden und Stromuli nach 2 h-Inkubation mit 40 mM Saccharose - **A** und **B** zeigen invertierte Graustufenfluoreszenzbilder der oberen Epidermis von *A. thaliana* *FNR-EGFP-7-4* mit EDOF; um die Plastiden mit und ohne Stromuli besser unterscheiden zu können, wurden diese mit Punkten markiert - **A**) In nicht-induzierten Blättern haben hauptsächlich Plastiden in der Nähe des Zellkerns (**blau**) Stromuli (**rot**). Weiter vom Zellkern entfernt liegende Plastiden haben meist keine Stromuli (**weiß**). **B**) Nach 2 h-Inkubation haben auch weiter vom Zellkern entfernt liegende Plastiden Stromuli, die nicht auf den Zellkern ausgerichtet sein müssen. Die Markierungen wurden gesetzt, da in der Vergrößerung der Abbildung leider nicht alle Stromuli gut sichtbar sind.

10. Funktion von Stromuli

produzierten Proteinen befähigt oder das *retrograde signalling* unterstützt. Beides würde bedeuten, dass, wenn kein Positionswechsel zwischen zellkernassoziierten und zellkernfernen Plastiden stattfindet, sich die Plastiden am Zellkern von den anderen Plastiden in ihrer Bedeutung für die Kommunikation zum Zellkern und der Versorgung mit Proteinen unterscheiden. Da bisher für keine der diskutierten, möglichen Funktionen experimentelle Hinweise vorliegen, bleibt die Bedeutung der Zellkernassoziation von Plastiden im Modellgewebe noch unklar.

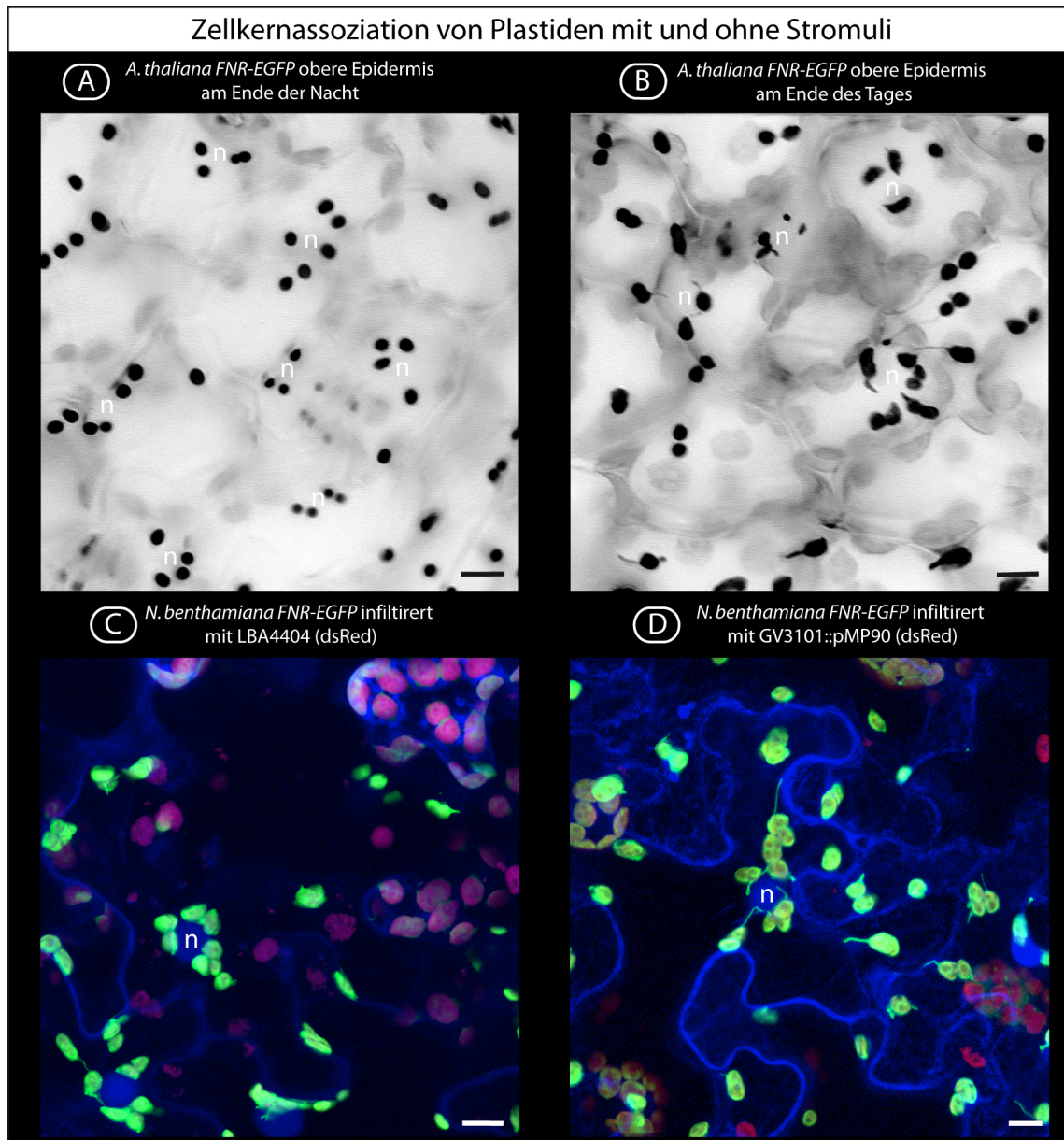


Abbildung 10.6.: Zellkernassoziation von Plastiden mit und ohne Stromuli - A und B) EDOF igf-Bilder der oberen Epidermis von *A. thaliana* A) am Ende einer *normalen Nacht* und B) am Ende eines *normalen Tages*. C und D) Projektionen von CLSM z-Stapeln der unteren Epidermis von *N. benthamiana*, 48 h nach C) LBA4404- und D) GV3101::pMP90-Infiltration. Beide Stämme trugen pCP60::dsRed. Die Farben entsprechen der Chlorophyll- (rot), dsRed- (blau) und GFP (grün) -Fluoreszenz. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

11. Stromuli eine frühe Erfindung?

In der bisher geführten Diskussion hat sich gezeigt, dass Stromuli eng mit den zellulären Vorgängen der gewählten Modellpflanzen (*A. thaliana*, *N. benthamiana*) verbunden sind. Wie bedeutend Stromuli letztendlich für die Pflanzenzelle im Allgemeinen sind, ist bis heute nicht klar (Hanson and Sattarzadeh, 2008). Wie grundlegend bestimmte Bestandteile und Vorgänge für eine Zelle sind, lässt sich häufig daran ablesen zu welchem Zeitpunkt in der Evolution sie entwickelt wurden und wie konserviert sie in rezenten Spezies sind. Um einen Überblick über die Verbreitung von Stromuli im phylogenetischen Stammbaum der Pflanzen zu bekommen, wurden die in der Literatur zu findenden Nachweise zusammengetragen und das entsprechende Taxon im Stammbaum markiert (Abb. 11.1 auf Seite 139).

Stromulibeschreibungen in verschiedenen Pflanzengruppen (Systematik nach Straßburger Aufl. 36, 2008) Köhler et al. (1997) machten ihre Untersuchungen und ersten Beschreibungen an *Nicotiana tabacum*. Seit diesem Zeitpunkt wurden entweder Beschreibungen von Stromuli in älterer Literatur wiederentdeckt oder durch die Expression von plastidenlokalisierten Fluoreszenzproteinen in weiteren Spezies neu beschrieben (zusammengefasst in Gray et al., 2001; Hanson and Sattarzadeh, 2008; Natesan et al., 2005). Aufgrund dessen gibt es heute eine Reihe von einzelnen Nachweisen in verschiedensten taxonomischen Gruppen.

Die meisten Nachweise erfolgten in den Eudikotyledonen (Natesan et al., 2005) und in Monokotyledonen (Sage and Sage, 2009), beide aus dem Taxon der Samenpflanzen (*Spermatophytina*). Ein Grund für die vielen Nachweise in Eudicotyledonen ist vermutlich, dass eine Reihe von heute untersuchten Modellpflanzen aus dieser Gruppe stammen und dass die transiente Expression von Fluoreszenzproteinfusionen immer weitere Verbreitung gefunden hat. Durch Transmissionselektronen- und Lichtmikroskopie (DIC) konnten Stromuli auch zweifelsfrei in Monokotyledonen wie Reis und anderen Gräsern nachgewiesen werden (Sage and Sage, 2009; Lütz and Engel, 2007; Buchner et al., 2007).

Neben den häufigen Nachweisen in Samenpflanzen finden sich Beschreibungen von Stromuli und Hüllmembranausstülpungen in einigen anderen Gruppen der Embryophyten wie Moose, Farne und Bärlappe. Die Beschreibungen in Farnen und Bärlappen sind in älterer Literatur häufig als Zeichnung zu entnehmen (Kwok and Hanson, 2004d; Gray et al., 2001). Im Gegensatz dazu stammen die Beschreibungen von Stromuli aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* aus neuerer Zeit und erfolgten mit Hilfe von Fluoreszenzproteinfusionen (Gremillon et al., 2007). Die einzige Beschreibung von Stromuli außerhalb des Taxon *Streptophyta* (beinhaltet alle Landpflanzen und weitere einzelne Gruppen) erfolgte fluoreszenzmikroskopisch durch Menzel (1994) an *Acetabularia cliftonii*. Diese einzellige Alge ist den *Dasycladophyceae* zuzuordnen und gehört somit zu der zweiten großen Gruppe innerhalb der grünen Pflanzen (*Chlorobionta*),

11. Stromuli eine frühe Erfindung?

den *Chlorophyta*.

Von Taxa außerhalb der *Chloroplastida* findet sich in neuerer Literatur nur ein Hinweis auf Stromuli und dieser wurde ebenfalls älteren Beschreibungen entnommen. Kwok and Hanson (2004d) zeigen in ihrem Übersichtsartikel die Zeichnung einer Kieselalge (*Striatella unipunctata*), die von Senn (1908) angefertigt wurde. Die Verbindungen, die Senn zwischen den Plastiden der Alge zeichnete interpretieren die Autoren als Stromuli, da es sich bisher um die einzige Beschreibung stromuliähnlicher Strukturen außerhalb der *Chlorobionta* handelt, ist die Existenz von Stromuli außerhalb der *Chlorobionta* nicht als gesichert anzusehen.

Stromuli sind wahrscheinlich in allen *Chlorobionta* zu finden. Markiert man die taxonomischen Gruppen, in denen Stromuli bisher beschrieben wurden, auf einem phylogenetischen Stammbaum der *Chlorobionta* (Abb. 11.1) fällt auf, dass aus den meisten Gruppen der Embryophyten Stromulibeschreibungen vorliegen und nur die Horn- und Lebermoose bisher ohne Nachweise sind. Die weite phylogenetische Verbreitung innerhalb der Embryophyten zeigt, dass Stromuli eine Eigenschaft der Plastiden wahrscheinlich aller Mitglieder dieser Gruppe sind. Dass in Horn- und Lebermoosen die Beschreibung von Stromuli fehlt, liegt anscheinend nur daran, dass diese Gruppen bisher noch nicht in Bezug auf Stromuli genauer untersucht wurden.

Die zweifelsfreie Beschreibung von Stromuli in *Acetabularia cliftonii* durch Menzel (1994) zeigt, dass beide Entwicklungsrichtungen der *Chlorobionta*, die *Streptophyta* und die *Chlorophyta* stromulibildende Spezies beherbergen. Wenn Stromuli nicht mehrmals in der Evolution der *Chlorobionta* entwickelt wurden, muss die Erfindung der Stromuli auf einen gemeinsamen Plastiden besitzenden Vorfahren der *Chlorobionta* zurückgehen. Die Fähigkeit zur Stromulibildung ist demnach allen Pflanzen mit grünen Plastiden gemein. Leider liegen bis heute noch keine Beschreibungen aus den anderen Gruppen der *Primoplantae* (*Glaucobionta* und *Rhodobionta*) vor, weshalb nicht gesagt werden kann, ob Stromuli bereits kurz nach der Etablierung der primären Endosymbiose entstanden sind.

Die Bestätigung der Existenz von Stromuli in Kieselalgen wirft eine Reihe von Fragen auf. Da die Plastiden der Kieselalgen (*Bacillariophyceae*) sehr wahrscheinlich aus einer sekundären Endosymbiose eines Protisten mit einer Rotalge hervorgegangen sind, zeichnen sich diese Plastiden durch den Besitz von vier Hüllmembranen aus. Die beiden äußeren Membranen stammen vom Wirt, wobei eine sich aus dessen ER ableitet. Zumindest die Innere der Wirtsmembranen umschließt den Plastiden vollständig und schließt damit auch die Stromulimaschinerie des Endosymbionten ein. Falls Vertreter der *Bacillariophyceae* wirklich Stromuli bilden können, stellt sich die Frage, ob nur die Wirtsmembran den Stromulus bildet oder ob alle Membranen ausgeformt werden? Unabhängig davon wie viele Membranen an der Stromulusbildung beteiligt sind, muss die dafür notwendige Maschinerie vom Wirt gestellt werden. Woher diese kommt, ist eine der zu beantwortenden Fragen. Entweder der Wirt erhält die entsprechenden Gene aus dem Kern des Endosymbionten oder er muss die Fähigkeit zur Stromulusbildung nach der sekundären Endosymbiose neu entwickelt haben.

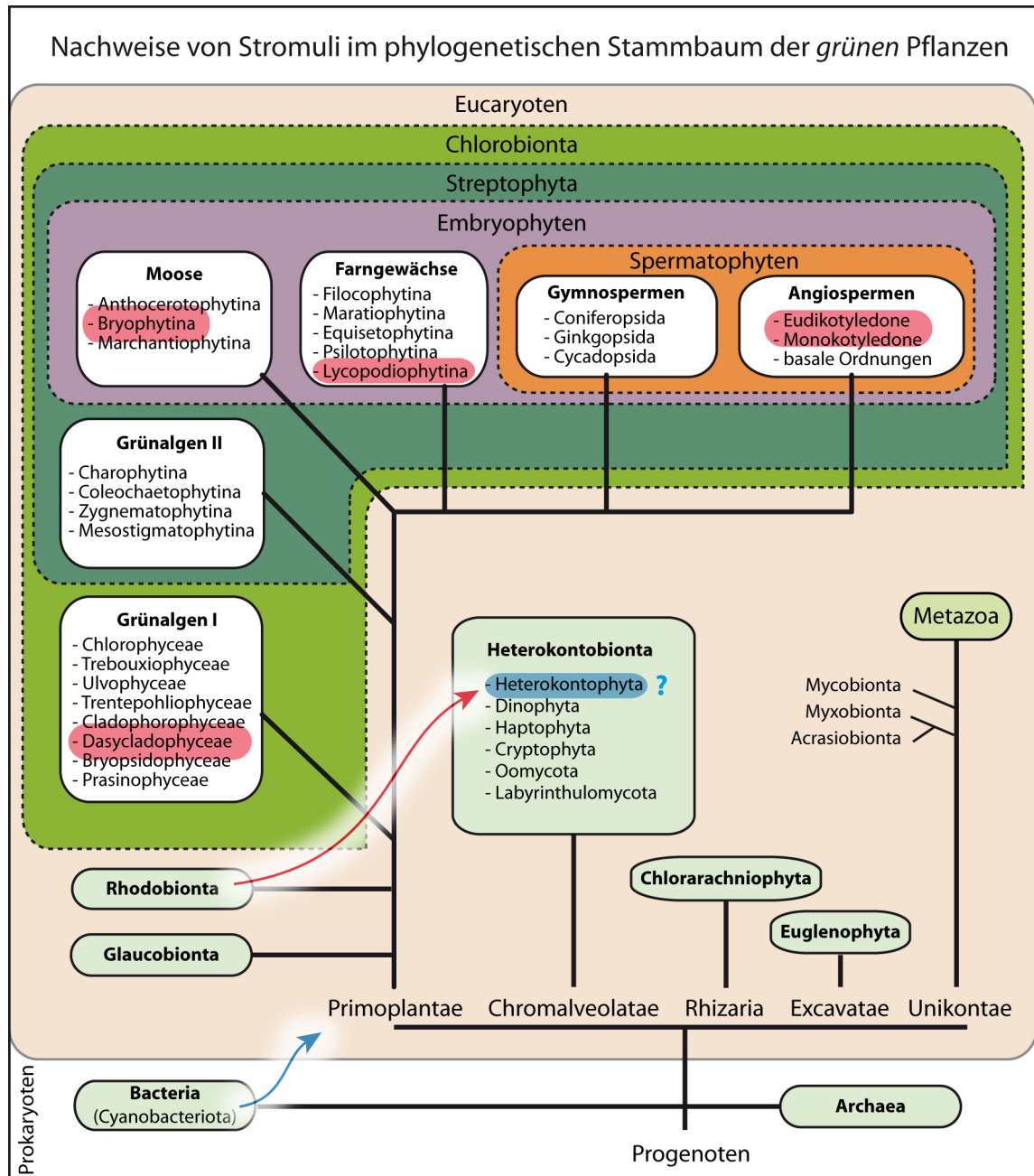


Abbildung 11.1.: Phylogenetischer Stammbaum der *grünen* Pflanzen adaptiert nach Straßburger Aufl. 36, 2008 - **Rötlich** unterlegt sind die Taxa, in denen Stromuli nachgewiesen wurden. Mikroskopische Belege aus neuerer Zeit mit Fluoreszenzproteininfusionen, liegen aus den *Angiospermen*, *Bryophytina* und *Dasycladophyceae* vor. **Dasycladophyceae:** *Acetabularia cliftonii* (Menzel, 1994); **Bryophytina:** *Physcomitrella patens* (Gremillon et al., 2007); **Lycopodiophytina:** *Selaginella kraussiana* (Gremillon et al., 2007), *Funaria hygrometrica* (Kwok and Hanson, 2004d), *Bryopsis spec.* (Gray et al., 2001); **Samenpflanzen (Seedplants):** Stromuli konnten sowohl in verschiedensten Monokotyledonen (*Zea mays*, *Oryza sativa*, *Alium cepa* und weitere) als auch in verschiedenen dikotyledonen Arten (*Comelina communis*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* und weitere) nachgewiesen werden (zusammengefasst in Natesan et al., 2005).

12. Modell zur Stromuliinduktion in Epidermiszellen von *Arabidopsis thaliana*

Abbildung 12.1 fasst die, mit Hilfe des etablierten Modellsystems, in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse basierend auf den Diskussionen zusammen und positioniert Stromuli in Relation zu den diskutierten Stoffwechselwegen. Die als potentielle Startpunkte der Stromuliinduktion erkannten Proteine Hexokinase, FLS2 und *Saccharose bindende Proteine* der Plasmamembran sind entsprechend markiert.

Extrazelluläre Zucker (dicke Linien) Extrazelluläre Saccharose und Maltose sowie Glukose, 3-OMG und Fruktose werden über Saccharosetransporter (SucT) bzw. Hexosetransporter (HexT) in das Zelllumen importiert. Fruktose und Glukose können aus der Spaltung von Saccharose durch extrazelluläre Zellwandinvertasen freigesetzt werden. Nach dem Import erfolgt vermutlich sehr schnell die Spaltung der Disaccharide zu Glukose bzw. Fruktose durch Maltase (Malt) bzw. die zytosolische Invertase (Inv)¹. Das Einschleusen der Glukose in den Hexosephosphatpool löst durch die Phosphorylierung an der Hexokinase das stromulibildende Signal aus. Zur weiteren Umsetzung des Signals ist *downstream* die nukleäre Transkription sowie Translation an 80S-Ribosomen notwendig. Die erzeugten Translationsprodukte führen letztendlich zur Myosin-XI-abhängigen Stromulibildung.

Da Turanose und Palatinose weder importiert noch aus ihnen die Glukoseeinheiten mobilisiert werden können, muss diesen Disacchariden und potentiell auch der Saccharose ein von Hexokinase unabhängiger Signalweg zur Verfügung stehen. Für die Perzeption von Saccharose und saccharoseähnlicher Disaccharide auf der Zelloberfläche sind wahrscheinlich die Zellwandinvertasen (CWinv), nicht funktionale Saccharosetransporter (Sut2) oder Homologe zu dem aus Hefe bekannten Gpr1/Gpr2-System verantwortlich. Auf Grund der zu Saccharose ähnlichen Stromulireaktion (zeitlicher Verlauf) ist es wahrscheinlich, dass auch die von Turanose und Palatinose ausgelöste Signalkette über die zellkernabhängige Transkription und Translation verläuft.

Weitere Faktoren (dünne Linien) Der Umsatz von Glukose durch die Hexokinase scheint auch für die Änderungen der Stromulihäufigkeit im Tagesverlauf von Bedeutung zu sein. Am Tage, bei ablaufender Photosynthese, ist dieser Umsatz durch den konstanten Glukosespiegel gleichmäßig. In der Nacht sinkt der Glukosespiegel, weshalb der Hexokinase allmählich immer weniger Glukose zur Verfügung steht. Entsprechend der Umsetzung von Glukose durch die Hexokinase ändert sich in diesem Zyklus auch die Stromulihäufigkeit. Inwieweit der Befall

¹Saccharosesynthase produziert aktivierte Glukose und bleibt deshalb im Modell unbeachtet

durch *P. infestans*, Seneszenz, Trockenheit und das PAMP flg22 über die Veränderung des Zuckerstatus oder unabhängig davon Einfluss auf die Stromulihäufigkeit nehmen, bleibt noch offen. Eine Einbindung nukleärer Transkription und entsprechender Translation ist für alle Bedingungen anzunehmen.

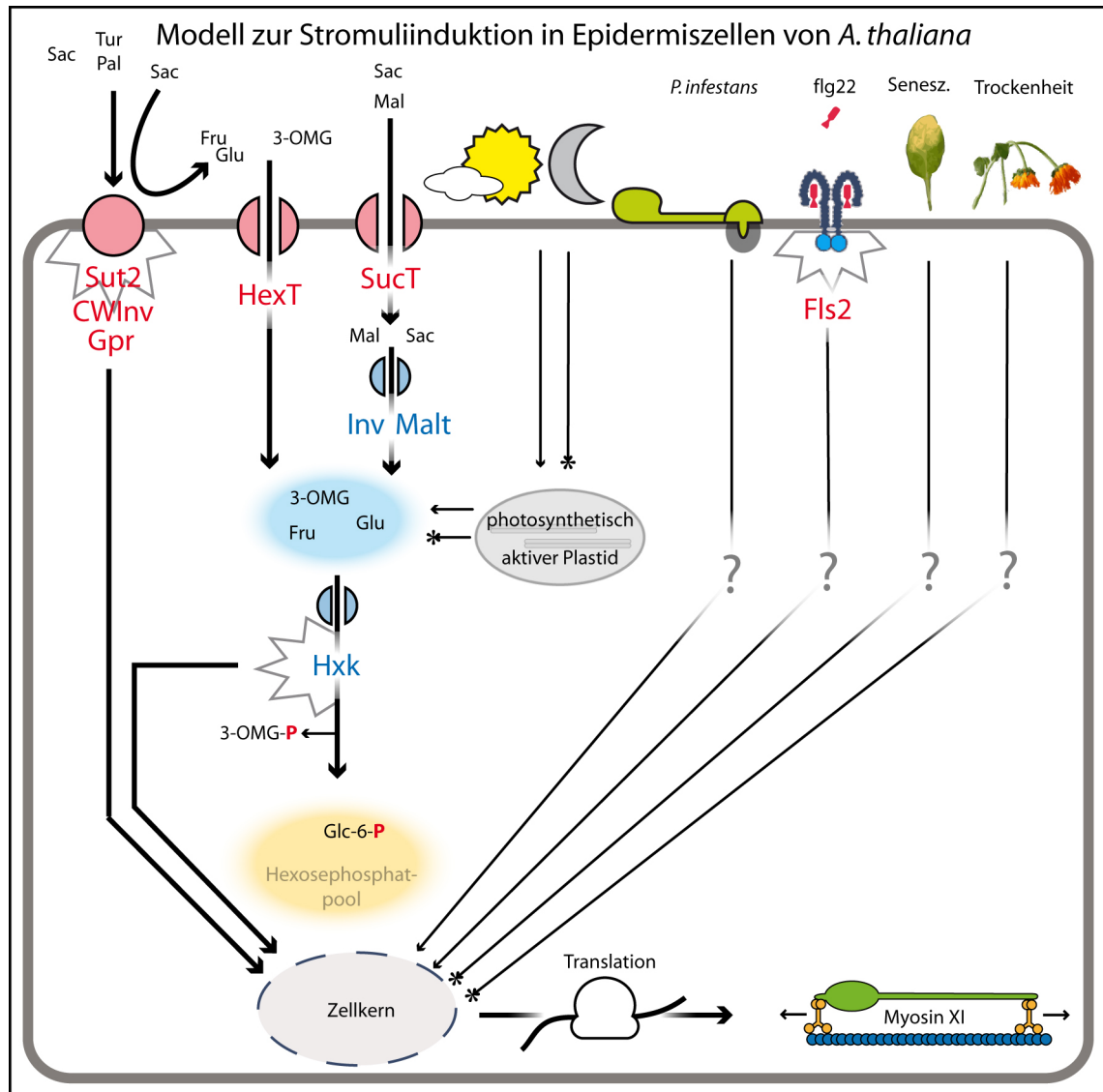


Abbildung 12.1.: Modell zur Stromuliinduktion in *A. thaliana* - dicke Linien: Stromuliinduktion über extrazelluläre Zucker; **dünne Linien:** Induktionen über andere Stimuli; **Linien mit Pfeilen:** stromuliinduzierende Wege; **Linien mit Sternchen:** stromulireprimierende Wege; **Blitzwolke:** markiert Proteine, die sehr wahrscheinlich Ausgangspunkte von stromulibildenden Signalketten sind; **Sut2** nicht funktioneller Saccharosetransporter mit potentieller Sensorfunktion, **CWInv** Zellwandinvertase, **Gpr** zu den Gpr1/Gpr2 Saccharoserezeptoren Homologe in Arabidopsis, **HexT** Hexosetransporter, **SucT** Saccharosetransporter, **FLS2** *flagellin insensitive 2* das funktionale Homodimer des Flagellinrezeptors, **Mal** Maltose, **Sac** Saccharose, **3-OMG** 3-Oxo-Methyl-Glukose, **Glu** Glukose, **Fru** Fruktose, **Inv** zytosolische Invertase, **Mal** Maltase, **Hxk** Hexokinase, **3-OMG-P** 3-Oxo-Methyl-Glukose-Phosphat, Glukose-6-Phosphat; weitere Details und Erläuterung siehe Text.

13. Die Epidermis als Modellsystem zur Analyse von Stromuli

Die obere Epidermis von *A. thaliana*-Rosettenblättern wurde gelösten Zuckern, verschiedenen Inhibitoren, verändertem Lichtrhythmus, Trockenstress und Pathogenen ausgesetzt. Zusammen mit der etablierten Methode zur Dokumentation und Auswertung war es möglich die Reaktion der Epidermisplastiden auf diese Bedingungen durch einen umfangreichen Datensatz zu quantifizieren. Trotz ihrer erwiesenen Flexibilität ist die obere Epidermis nicht für alle Fragestellungen einsetzbar, weist aber gegenüber anderen Geweben einige Vorteile auf.

Beobachtungen in der obere Blattepidermis haben eine biologische Relevanz. Die zur Untersuchung verwendeten Zell- und Kalluskulturen (Köhler and Hanson, 2000; Köhler et al., 2000; Kwok and Hanson, 2004c) sowie Zellen etiolierten Hypokotyls von *N. tabacum* und *A. thaliana* (Waters et al., 2004; Kwok and Hanson, 2003, 2004c,a) wurden hauptsächlich auf Grund ihrer großen Stromulihäufigkeit und -morphologie ausgewählt. Ein großer Nachteil dieser Gewebe ist, dass sie sich in einem physiologisch *unnatürlichen* Zustand befinden, der zum Beispiel im Falle der Zell- und Kalluskulturen durch Zugabe von Zucker und Hormonen aufrecht erhalten wird. Der besondere Zustand dieser Gewebe erschwert bedeutend die Beantwortung von Fragen, welche eine natürlichen Regulation der Stromuli betreffen. Erst in den letzten Jahren wurden zunehmend *natürliche* Systeme, wie reife Tomatenfrüchte (Waters et al., 2004; Forth and Pyke, 2006), Wurzelzellen (Itoh et al., 2010) und Mesophylzellen (Holzinger et al., 2007b; Buchner et al., 2007) intensiver analysiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Verwendung *natürlicher* Gewebe eine größere biologische Relevanz der Ergebnisse garantiert und den Bezug auf den bekannten Zellstoffwechsel erleichtert. Da das ausführlichste Wissen über die Zellstoffwechselforgänge im Mesophyll besteht, mag das Fehlen von Chloroplasten in der Epidermis als Nachteil für die Interpretation angesehen werden. Dem ist entgegen zu halten, dass, wie in Abschnitt 4.7 diskutiert, die Plastiden der Epidermis morphologische und physiologische Ähnlichkeiten zu Chloroplasten aufweisen.

Die Stromulihäufigkeit der oberen Epidermis ist mit anderen bisher untersuchten *natürlichen* Geweben vergleichbar. Quantifizierungen in reifen Tomaten zeigen einen Anteil von 32 % stromulitragender Plastiden im inneren und von 10 % im äußeren Tomatenmesokarp (Waters et al., 2004). Holzinger et al. (2007b) bestimmten den Anteil von Plastiden mit Stromuli und CP in verschiedenen Spezies bei 20 °C auf ca. 30 %. Die Stromulihäufigkeit in der Epidermis von *Nicotiana benthamiana* wurde von Natesan et al. (2009) mit 20-25 % angegeben. Die Stromulihäufigkeit der oberen Epidermis ist demnach mit 10 %-30 % vergleichbar zu den

bisher eingesetzten Geweben.

Eine softwarebasierte Stromuli-Erkennung ist möglich. Wie sich im Rahmen der Experimente zeigte, sind mehrere Stichproben mit ausreichender Plastidenzahl sowie mindestens drei Wiederholungen notwendig, um einen gesicherten Eindruck von der Stromulihäufigkeit im Gewebe zu bekommen. Auf diese Weise fließen 8.000 bis 13.000 Plastiden in die Messungen für eine zu testende Bedingung ein. Obwohl die entwickelte Vorgehensweise die Auswertung beschleunigt, ist noch Handarbeit (Markieren der Stromuli und Plastiden) notwendig. Eine softwarebasierte Erkennung von Plastiden mit und ohne Stromuli würde die Auswertzeit weiter verkürzen und einen Mutanten-Screen im größeren Maßstab erlauben. Ein Ansatz, der sich in Vorversuchen als vielversprechend gezeigt hat, die Stromulihäufigkeit softwarebasiert zu quantifizieren, nutzt die Tatsache, dass die Chlorophyll-tragenden Thylakoide sich ausschließlich auf die Plastidenkörper beschränken und nicht in Stromuli zu finden sind (Daten nicht gezeigt). In einem Zweikanal-CLSM-Bild ergibt sich durch die Subtraktion der Chlorophyll- von der GFP-Fluoreszenz eine Anzahl von Pixeln, die der Menge an Stromuli entspricht.

Durch biolistische Transformation sind KO-Mutanten einfach zu analysieren. Ein weiterer Vorteil, den die obere Epidermis bietet, ist ihre Transformierbarkeit mittels *particle bombardment*. Besonders bedeutend ist dies für die Analyse von *knock-out*-Mutanten. Durch transiente Expression können Plastiden und Stromuli in verschiedenen Pflanzenlinien sichtbar gemacht werden. So ist eine erste Analyse von Mutationen möglich ohne stabil transgene Linien etablieren zu müssen (Daten nicht gezeigt). Ein Vorteil gegenüber bakterienvermittelter Transformation ist, dass keine von Pathogenen induzierten Prozesse in der Zelle ablaufen, welche die Stromulihäufigkeit beeinflussen könnten. Auch wenn durch die Transformationsprozedur eine Reihe von Zellen zerstört werden, hat dies keinen Einfluss auf die Stromulihäufigkeit (Daten nicht gezeigt). Durch die Charakterisierung des Modellsystems kann abgeschätzt werden mit welcher Wahrscheinlichkeit eine transformierte Zelle mindestens einen Stromulus trägt.

14. Ausblick

Die Stromulihäufigkeit stellt ein vielversprechendes Testsystem dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Reihe von Hinweisen gesammelt werden, die eine enge Verbindung zwischen Stromulihäufigkeit und Kohlehydratmetabolismus zeigen. Obwohl der Kohlehydratmetabolismus ein gut untersuchtes Wissenschaftsgebiet ist, sind insbesondere die Wege, auf denen Pflanzen Kohlehydrate erkennen und das Signal weiterleiten, noch wenig verstanden (Jansson, 2005). Stromuli stellen in diesem Zusammenhang ein vielversprechendes Testsystem dar, da die Reaktion der Zelle auf die gebotenen Kohlehydrate sprichwörtlich sichtbar ist und somit auf andere Analysen verzichtet werden kann.

Induktionsexperimente mit verschiedenen Zuckern und Inhibitoren versprechen neue Erkenntnisse. Ein wichtiger nächster Schritt, um den Signalweg von extrazellulären Zuckern zur Stromulibildung zu verstehen, ist zu unterscheiden, über welchen der in der Literatur vorgeschlagenen Saccharose- und Glukosesignalwege (Jansson, 2005), Stromuli induziert werden. Mannoheptulose und Glucosamine sind neben Trehalose-6-Phosphat Hexokinaseinhibitoren (Jansson, 2005) und könnten in entsprechenden Induktionsexperimenten klären helfen, welche Rolle Hexokinase für die von Glukose abhängige Stromuliinduktion spielt. Weitere Zucker und Zuckerderivate, wie Lactulose, Trehalulose, Maltulose, Mannose, 2-Deoxy-Glukose und 6-Deoxy-Glukose können zu dem verwendet werden, um zusätzliche Evidenzen für eine Verbindung zum Zuckermetabolismus zu sammeln.

Die Arbeiten mit Inhibitoren wie Cycloheximid und BDM haben im Rahmen dieser Arbeit vielversprechende Ergebnisse geliefert. Zusammen mit der kürzlich veröffentlichten Arbeit von Itoh et al. (2010) macht dies deutlich, dass der Einsatz von weiteren Inhibitoren einen vielversprechenden Ansatz zur Klärung von Signalwegen zur Stromulibildung darstellt, wobei die Besonderheiten im Einsatz von Inhibitoren bei der Auswertung der Daten zu beachten ist.

KO-Mutanten und Überexpressoren können zur Klärung der Signalkette beitragen. Jansson (2005) listen eine Reihe von bereits gut charakterisierten Mutanten der Hexose- und Disaccharidsignalketten auf, die zur Klärung des Signalverlaufes der zuckerabhängigen Stromuliinduktion analysiert werden können. Um zwischen der externen und internen Erkennung von Saccharose zu unterscheiden, könnten weiterhin KO-Mutanten der Saccharosetransporter, wie AtSuc9 (Sivitz et al., 2007) oder Überexpressoren von Invertaseinhibitoren (Link et al., 2004) dienen. KO-Mutanten bieten sich auch für die Analyse der flg22-Reaktion und anderer pathogenbezogener Signalketten an (Bethke et al., 2009).

Phytohormone haben einen großen Einfluss auf den Zuckermetabolismus. Haben sie diesen auch auf Stromuli? Dass es intensive Wechselwirkungen zwischen Zuckersignalen und anderen Signalwegen gibt, konnte bereits gezeigt werden (Rosa et al., 2009; Gupta and Kaur, 2005). Aus diesem Grund bietet es sich an zu hinterfragen inwieweit verschiedene Phytohormone Einfluss auf die Stromulibildung nehmen können. Besonders naheliegend sind die in der Pathogenabwehr bedeutenden Jasmonate, Salicylsäure und Ethylen. Abszissinsäure scheint ebenfalls relevant für die Stromulibildung zu sein, da es wichtig im Rahmen der Reaktion auf Kohlehydrate ist (Roitsch et al., 2003; Gupta and Kaur, 2005), ein *ABA responsive protein* im VIGS-Screen identifiziert wurde und die Überexpression eines ABA-induzierten RNA-Bindeproteines zu geringerem Stromuligehalt führt (Daten nicht gezeigt).

Eine differenzielle Microarray-Analyse könnte stromulispezifische Gene identifizieren. Die hemmende Wirkung von Cycloheximide auf die Stromuliinduktion macht die Anwendung von globalen Transkriptionsanalysen (Microarray) möglich. Durch den Vergleich verschiedener stromuliinduzierender und -reprimierender Bedingungen bietet sich die Möglichkeit stromulispezifische Gene zu identifizieren. Die Tatsache, dass Mesophyll- und Epidermisplastiden gleichermaßen auf Glukose und Saccharose reagieren, macht die Präparation von Epidermisabzügen zur RNA-Isolation nicht notwendig und gestaltet die Probengewinnung recht einfach. Da einige der Versuche an bereits bestehende Microarrayexperimente angelehnt sind, können noch vor eigenen Experimenten erste Hinweise über die Transkriptionsaktivität im Stromulikontext über die Auswertung der vorhandenen Daten erlangt werden.

Teil IV.

Material und Methoden

15. Material

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von einer der folgenden Firmen bezogen: Biomol (Hamburg), Difco (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka über Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen). Gesondert aufgeführt sind hier die verwendeten Zucker, sowie deren Derivate und eingesetzte Inhibitoren.

Bezeichnung	Lot	Reinheit	Firma
Turanose	1192757	≈99 % (HPLC)	Fluka
Palatinose	388163/1	≥99 % (HPLC)	Fluka
Saccharose	379108748	≥99,5 %	Roth
Sorbitol	080604	≥99,5 %	Serva
Mannitol	299108195	≥98 %	Roth
D-Fruktose	1085354	≥99 % (HPLC)	Fluka
D-Leucrose	330687/1	≥98 % (HPLC)	Fluka
β -Gentiobiose	116K1125	for research use only	Sigma
D-Cellobiose	1334389	for microbiology	Fluka
Maltose _{Monohydrat}	1321963	≥98 % (HPLC)	Fluka
3-Oxomethyl-Glukose	106K1241	minimum 98 %	Sigma

Tabelle 15.1.: Zucker

Bezeichnung	Lot	Reinheit	Firma
Cycloheximid	15715	keine Angabe / 100 mg/mL in DMSO	Sigma
BDM	024K0108	minimum 98 %	Sigma

Tabelle 15.2.: Inhibitoren

Mikroskopische Farbstoffe, Puffer und Anwendung

	Quelle/Zitat	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Lugolsche Lösung	Roth	—	1:10 verdünnt
DAPI	Roth	Stammlsg. I 11 mg/ml 31,4mM Stammlsg. II 1,1 mg/ml 3,14 mM	6 µM in Wasser oder APW
artificial pond water (APW)	Yamada et al., 2003	Stammlsg. 100x - 10 mM KCl, 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 100 mM HEPES-Na	1:100 verdünnt
Paraformaldehyd (PFA)-Fixativ	Sigma	8 mM Na_2HPO_4 ; 1,47 mM KH_2PO_4 ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH auf 7,4 mit HCL oder NaOH einstellen (autoklavieren)	3,7 % PFA erhitzen auf 70°C, Abkühlen auf Eis und anschließend Filtrieren

Tabelle 15.3.: Mikroskopische Farbstoffe

Molekularbiologische Kits

Anwendung	Bezeichnung	Herkunft
Sequenzierung von DNA	ABI PRISM®dRhodamine	Applied Biosystems
Isolation von Plasmid-DNA (Miniprep)	NucleoSpin®Plasmid	Macherey-Nagel
Isolation von Plasmid-DNA (Midiprep)	NucleoBond®PC 100	Macherey-Nagel
Reinigung von DNA-Fragmenten	NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel
Isolation von RNA	TRIZOL®Reagent	Invitrogen

Tabelle 15.4.: Molekularbiologische Kits

Vektoren

Bezeichnung	Expr.kassette	Resistenz	Referenz
pCP60	35S::dsRed	in Agrobacterium Kan^r (abgeleitet von pBin 19)	Original Vektor: Dr. P. Ratet (ISV-CNRS, Frankreich), nicht veröffentlicht; Konstrukt Klonierung: C. Papst
pGreenII0129: :FNR-EGFP	35S::FNR-EGFP im Gegensatz zu Marques et al. (2004) gibt es keinen Linker zwischen Transitpeptid und EGFP	in Agrobacterium Kan^r in Pflanzen Hyg^r	Original Vektor: Hellens et al. (2000b); Konstrukt Klonierung: B. Baudisch, J. Marques; B. Knop
pYL279a	doppel35S::TRV-RNA2::Gateway	$Amp^r Kan^r$	Liu et al. (2002a,b)
pTRV1	doppel35S::TRV-RNA1	Kan^r	Liu et al. (2002a,b)

Tabelle 15.5.: Vektoren

Bakterien

Bakterienstämme

Bezeichnung	Stamm	Resistenz / Genotyp	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101::pMP90	Rif ^R & Gent ^R / Ti- Plasmid: pMP90 (pTiC58 ΔT-DNA), Nopalintyp, entwaffnet	Koncz and Schell (1986)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404::pAL4404	Rif ^R & Strep ^R / Ti-Plasmid: pAL4404 (pAch5 ΔT-DNA), Gene für Opalintyp, entwaffnet	Ooms et al. (1982)
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	keine / <i>supE44 lacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
<i>Escherichia coli</i>	Top10	keine / <i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Germany

Tabelle 15.6.: Bakterienstämme

Kulturmedien

Species	Medium	Rezept
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	YEB	0,5 % (w/v) Bakto-beef-Extrakt; 0,1 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,5 % (w/v) Saccharose; 0,5 % (w/v) Bakto-Pepton; 0,2 % 1 M MgSO ₄ pH 7,2 pH 7,2
<i>Escherichia coli</i>	LB	1 % (w/v) Bakto-Trypton; 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt pH 7,5
	Festmedium	1,5 % (w/v) Bakto-Agar

Tabelle 15.7.: Medien zur Bakterienkultur

Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration / Quelle
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml Serva
Streptomycin	10 mg/ml	100 µg/ml Duchefa
Spectinomycin	10 mg/ml	100 µg/ml Duchefa
Gentamycin	25 mg/ml	25 µg/ml Duchefa
Tetracyclin	5 mg/ml	5 µg/ml Duchefa
Chloramphenicol	34 mg/ml (Ethanol)	34 µg/ml Sigma-Aldrich
Cefotaxim	250 mg/ml	500 µg/ml Duchefa
Ampicillin	50 mg/ml	100 µg/ml Serva
Rifampicin	100 mg/ml (DMSO)	100 µg/ml Fluka

Tabelle 15.8.: Antibiotika

Protokolle

Anzucht, Präparation elektrokompenter Zellen und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* und *Escherichia coli* erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 2001).

Anlegen von Dauerkulturen

Lagermedium		
Glycerin	65 %	(v/v)
MgSO ₄	0,1 M	
Tris/HCl	25 mM	pH 8,0

Tabelle 15.9.: Lagermedium

0,5 ml einer Übernachtskultur wurden mit der gleichen Menge an Lagermedium in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Pflanzenmaterial und Anzucht

Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* auf Erde

Samen von *A. thaliana* und *N. benthamiana* wurden auf feuchter Erde ($\frac{1}{3}$ Vermiculitgemisch) ausgesät und unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) bei 20°C am Tag und 16°C während der Nacht kultiviert. Die Lichtintensität betrug ca. $100 \mu\text{Einstein}/\text{m}^2\text{s}$. Zur Blüten- und Samenbildung wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit) bei 25°C weiter kultiviert. Für die Experimente zum Lichtrhythmus wurden die Pflanzen in einen Klimaschrank (Seitenbeleuchtung) mit 12 h Licht/12 h Dunkelheit Rhythmus gestellt und bei einer Temperatur von ebenfalls 20°C kultiviert.

Pflanzenlinien

Spezies	Pflanzenlinie	Transgen	Referenz
<i>Arabidopsis thaliana</i> eco. Col	FNR-EGFP-7-4	N-terminale Fusion des FNR-Transitpeptids mit EGFP	Marques et al. (2004)
		Wenn nicht anders im Text erwähnt ist diese Linie verwendet worden.	
<i>Arabidopsis thaliana</i> eco. Col	pt-gk	N-terminale Fusion des SSU-Transitpeptides mit GFP	Nelson et al. (2007)
<i>Arabidopsis thaliana</i> eco. Col	WT	—	—
<i>Nicotiana benthamiana</i>	FNR-EGFP #3, #6, #7	Vektor: pGreenII0129::FNR-EGFP N-terminale Fusion des FNR-Transitpeptides mit EGFP	diese Arbeit
<i>Nicotiana benthamiana</i>	WT	—	—

Tabelle 15.10.: Pflanzenlinien

Bildaufnahme und Verarbeitung

Mikroskophardware und Steuerungssoftware

	Epifluoreszenz Setup 1	Epifluoreszenz Setup 2
Mikroskop	Axioskop 2 (aufrecht)	Axioskop 2 (aufrecht)
Kamerasystem	Axiocam HRc	JVC KY-F75 3-Chip
Software	Axiovision, Zeiss	DISKUS (Ingenieurbüro Hilgers)
Filterset: EndowGFP (AHF F41-017)	Ex. 470 / 40 nm Farbteiler 495 nm LP Em. 525 / 50 nm	
Filterset: DAPI (AHF F46-000)	Ex. 350 / 50 nm Farbteiler 400 nm LP Em. 460 / 50 nm	
Filterset: DsRed ET Bandpass (AHF F46-005)	Ex. 545 / 30 nm Farbteiler 570 nm LP Em. 620 / 60 nm	
Filterset: Zeiss "F02"	Ex. 365 nm Farbteiler 395 nm Em. 420 nm	
LSM Setup	Laser	Mikroskop
GFP	Ex. 488 nm Em. 505 - 530 nm Bandpass	Zeiss LSM510 invert
Chlorophyll	633 nm 650 nm Langpass	
dsRed	Ex. 543 nm Em. 560 - 615 nm Bandpass	
DIC	633 nm	

Tabelle 15.11.: Mikroskophardware, Steuerungssoftware, Filtersätze und LSM-Konfigurationen: "Ex." Anregungswellenlänge; "Em." Emissionswellenlänge; "AHF" AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany;

Weitere Software

Software	Firma	Version	Eingesetzt für:
LSM Imagebrowser	Zeiss	4.2.0.121	Importieren von Bildstapeln und markieren von Plastiden
Axiovision LE	Zeiss	4.7	Stapelverarbeitung zur Bildschärfung und Export
Zen LE	Zeiss	2007	Exportieren von LSM Bildern als Tiff-Datei
Adobe Photoshop CS4 extended	Adobe	11.0	weitere Bildoptimierung
Adobe Illustrator CS4	Adobe	14.0	Zusammenstellung und Beschriftung der Abbildung
FoveaPro 4 Demo	Raindear graphics	4.0	automatisches Zählen farbiger Objekte und Ausgabe in einer Exceltabelle
CombineZP	Allan Hedlay	2009	<i>stacking</i> von Epifluoreszenzbildern aus z-Stapeln, um daraus ein Bild mit erweiterter Tiefenschärfe zu erhalten
SigmaPlot	SPSS Inc.	2000 v6.1	Diagramme, t-Test, R^2
Excel	Microsoft	2003	Kalkulationen

Tabelle 15.12.: Weitere Software

16. Methoden

Molekularbiologische Methoden

Für den Umgang mit DNA und Bakterien wurden Standardmethoden nach Sambrook et al. (2001) verwendet.

Pflanzenmethoden

Stabile Pflanzentransformation von *Nicotiana benthamiana*

Die *N. benthamiana* Pflanzenlinien wurden mit freundlicher Unterstützung von A. Strauß (AG Bonas, Pflanzengenetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) erstellt (nach Altpeter et al. (2006)).

Transiente Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*

	Rezept
Agrobakterium Infiltrationsmedium (AIM)	10 mM <i>MgCl</i> ₂ ; 5 mM MES pH 5,3; 150 µM Acetosyringon
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
Acetosyringon	3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenon

Tabelle 16.1.: Agrobakteriuminfiltrationsmedium (AIM)

Die verschiedenen *A. tumefaciens* Stämme wurden in Flüssigkulturen (4 ml) angezogen, abzentrifugiert (1 min bei 13.000 rpm) und das Pellet in Agrobakterieninfiltrationsmedium (AIM) resuspendiert. Die Bakterienlösung wurde auf eine optische Dichte (*OD*₆₀₀) von 0,2, 0,8 oder 1,6 eingestellt. Die standardmäßig verwendete, optische Dichte betrug 0,8. Die Infiltration der Bakterienlösung erfolgte 1 – 2 Stunden nach Resuspension in AIM mit einer kanülenlosen Spritze in die Interzellularräume des Blattgewebes der Blattunterseite.

Transiente Transformation mittels Partikelbeschuss

Die transiente Transformation mittels Partikelbeschuss (Goldpartikel) erfolgte nach Salinas J (2006).

VIGS

Der VIGS-Screen und das Scilencing verschiedener cDNAs wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. S. Schornack (zu diesem Zeitpunkt in der AG Bonas, Abteilung Pflanzengenetik,

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) nach Padmanabhan and Dinesh-Kumar (2009) durchgeführt.

Infektionen mit *Phytophthora infestans*

Infektionen mit *P. infestans* nach Standardbedingungen (Landtag, 2006; Lipka et al., 2005), wurden freundlicherweise durch L. Westphal (Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie, IPB, Halle an der Saale) durchgeführt. Die Sporenkonzentration des quantifizierten Experimentes betrug 5×10^4 . Für die Mediumkontrolle wurden leere Kulturplatten wie die Proben behandelt und entsprechend auch verdünnt.

Um die Reaktion der Plastiden auf Phytophthora besser einschätzen zu können, wurde analog zu den Induktionsversuchen mit Zucker, die Stromulihäufigkeit und der relative Anteil der Stromuliklassen bestimmt. Zusätzlich wurde bestimmt, wie groß der Anteil von Plastiden mit GFP-freien Einschlüssen zu den verschiedenen Zeitpunkten war.

Infektionen mit *Erysiphe spec.*

Bestimmung der Spezies Da *E. cruciferarum* und *E. cichoracearum* *A. thaliana* *eco columbia* infizieren können, wurde zunächst die Spezies bestimmt. Wie Adam et al. (1999) zusammen fassten, ist dies über morphologische Merkmale auch an den asexuellen Strukturen des Pilzes möglich. Nach den von Adam et al. (1999) angegebenen Merkmalen wurde der Pilz als *E. cruciferarum* identifiziert. Eines der typischsten morphologischen Merkmale für *E. cruciferarum* ist die Form der Konidiosporen und der Appressorien, letztere sind in Abbildung 7.5 auf Seite 85 A zusehen. Eine zusätzliche molekulare Analyse der 5,8SrRNA, wie sie die Autoren empfehlen, konnte nicht durchgeführt werden.

Infektion und Untersuchung Die Infektion mit *E. cruciferarum* (Übertragung von Konidiosporen) erfolgte durch Betupfen von Blättern nicht infizierter Pflanzen mit *mehligem* Blättern (konidiosporenhaltig) infizierter Pflanzen. Es wurde mit der Untersuchung gewartet, bis sich Sporulation an den betupften Stellen zeigte. Auf Grund der nicht standardisierten experimentellen Bedingungen erschien eine Quantifizierung der Plastidenreaktion nicht sinnvoll.

Mikroskopische Methoden

Aufnahme der Bilder für die Voruntersuchungen

Von einer 12 Wochen alten, transgenen Pflanze der Linie *FNR-EGFP-7-4* wurden für die Voruntersuchungen je zwei Blätter verschiedener Altersstadien (jung, entfaltet, seneszent; siehe Abb. 3.1 B) gerntet und mikroskopisch untersucht. Von jedem Stadium und jeder Epidermis wurden auf diese Weise insgesamt 55 unabhängige Abschnitte (pro Aufnahme wird ein Bereich von $186 \mu\text{m} \times 230 \mu\text{m}$ abgebildet, bei 55 Stück entspricht das einer Gesamtfläche von $2,3529 \text{mm}^2$) des Gewebes in einer Fokusebene aufgenommen (Abb. 3.1 A). Zur Auswertung wurden die in den aufgenommenen Fokusebenen scharf abgebildeten und stromulitragenden Plastiden

(insgesamt 2096) dokumentiert und morphologisch kategorisiert. Für die Bilderzeugung wurde das DISKUS-System mit einem 40x Objektiv verwendet.

Aufnahme der Bilder für die Charakterisierung des Modellsystems

Es zeigte sich, dass bei zu jungen Blättern die sehr dicht stehenden Trichome die Beobachtung häufig störten, da sie beim Eindeckeln mit dem Deckglas abknicken und somit häufig Epidermiszellen verdecken. So war eine flächendeckende Analyse in zu jungen Blättern nicht möglich. Aus diesem Grund wurden für die Charakterisierung etwas weiter entwickelte Blätter verwendet.

Von zwei 12 Wochen alten, transgenen Pflanzen der Linie *FNR-EGFP-7-4* wurden 8 Blätter gleichen Entwicklungsstandes (siehe 16 auf der nächsten Seite) geerntet und mit DAPI gefärbt. Von diesen wurden insgesamt 80 Blattbereiche mit mehreren Bildern entlang der z-Achse unter GFP- und DAPI-Fluoreszenzbedingungen dokumentiert (DISKUS-Setup). Die Bildstapel der einzelnen Blattbereiche wurden in den ImageBrowser importiert und dort Zell- und Zellkernumriss markiert. Da die erzeugten Bilder keine mikroskopbezogenen Informationen enthalten, konnten die Messwerkzeuge des ImageBrowsers nicht ohne Eichung verwendet werden. Zur Eichung wurde ein Objektträger mit Längenskala auf gleiche Weise wie die Epidermen aufgenommen. Folgende gemessene Größen flossen in die Arbeit ein: Stromulilänge, Plastidenlänge und -breite, Abstand der Plastiden vom Zellkern.

	Wert	Einheit
$\sum Zellen$	1023	n
$\sum ZellAo$	930076,4	μm^2
$\sum Plastiden_{-Str}$	4835	n
$\sum Plastiden_{+Str}$	602	n
$\sum Plastiden$	5432	n

Tabelle 16.2.: Charakterisierungsdaten - Die Tabelle macht den Umfang der, für die zur Charakterisierung und Analyse des *unbeeinflussten* Zustandes in der oberen Epidermis junger Rosettenblätter, aufgenommenen Daten deutlich. Plastiden mit mindestens einem Stromulus "+Str"; Plastiden ohne Stromulus "-Str".

Projektion der Epidermiszellen (3D) in eine Ebene (2D) Die Epifluoreszenzbilder erlauben es nicht Messungen durchzuführen, die durch Tiefe (z-Achse) beeinflusst sind. Gemeint sind zum Beispiel Stromuli, die auf die Bildebene zu oder von ihr weglaufen. Die Messungen können nur eine 2-dimensionale Projektion der Zelle darstellen. Je parallel die Strukturen in der Zelle zur Bildebene der Kamera stehen, desto mehr spiegeln die Messungen im Bild die Dimensionen im Objekt wider. Hier bietet die Epidermis durch ihre Form deutliche Vorteile. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Bilder von Zellen aufgenommen wurden, die möglichst parallel zur Bildebene lagen. Auf diese Weise gibt es durch die Messungen kaum winkelabhängige Verfälschungen der Längenmessung. **Zellgröße** - Als Maß für die Zellgröße wurde die sichtbare Kontur genommen. Dies war möglich, da die Epidermis ein sehr flaches Gewebe und wenig 3-dimensional strukturiert ist. Die von oben sichtbare Fläche spiegelt somit gut die Zellgröße wider. Außerdem wachsen Epidermiszellen hauptsächlich in x- und y-Richtung. **Plastidengröße** - Die Körper der Plastiden sind linsenförmig und unterscheiden

sich somit in ihrer Silhouette je nachdem, ob sie von oben oder von der Seite betrachtet werden. In der Epidermis liegen nur sehr wenig Plastiden an den lateralen Wänden der Zellen und drehen dem Betrachter ihre Seite zu. Die meisten Plastiden liegen hauptsächlich auf der dem Blattinneren zugewandten Seite, weshalb sich ihre Länge und Breite gut messen lassen. **Stromulilänge** - Zusammen mit den sie ausbildenden Plastiden liegen Stromuli in der Regel auf der dem Blattinneren zugewandten Seite und verlaufen entlang der Peripherie in einer z-Ebene, weshalb die gemessene Strecke somit gut der realen Stromulilänge entspricht.

Die in 2D gemessenen Strecken entsprechen demnach den realen Dimensionen der beobachteten Strukturen.

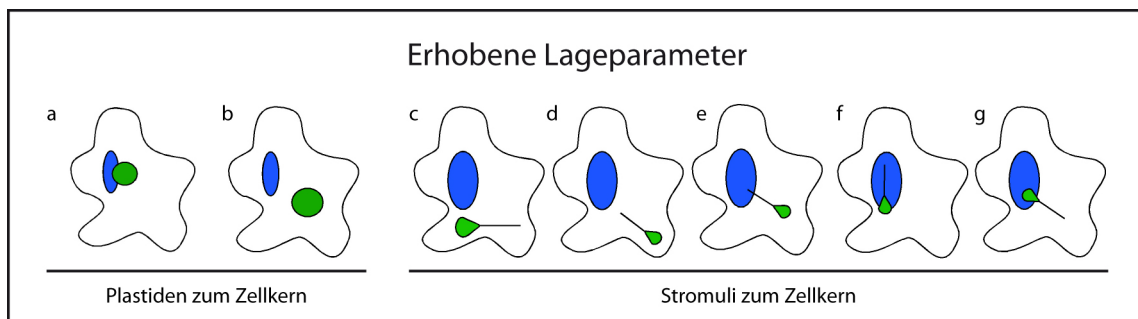


Abbildung 16.1.: Erhobene Lageparameter: Beschreibung siehe Text

Erhobene Lageparameter (relativ zum Zellkern) a) Plastiden ohne Stromulus am Zellkern b) Plastiden ohne Stromulus nicht am Zellkern c) Plastid liegt nicht am Zellkern und Stromulus weist vom Zellkern weg d) Plastid und Stromulus stehen nicht im Kontakt mit Zellkern, aber Stromulus weist deutlich auf den Zellkern hin e) wie d, nur dass der Stromulus den Zellkern erreicht f) Plastid und Stromulus liegen komplett am Zellkern an g) Plastid liegt am Zellkern und der Stromulus weist von diesem weg. d-f) werden als Stromuli mit Zellkernkontext bezeichnet.

Auswahl von Blättern einheitlichen Entwicklungszustandes

Um zu gewährleisten, dass ein einheitliches Entwicklungsstadium untersucht wird, wurde für die Induktionsversuche von jedem verwendeten Blatt die Länge und Breite bestimmt. Da die Größe der Blattrosetten bei *A. thaliana* je nach Wachstumsbedingungen unterschiedlich sein können und somit die Blattgrößen variieren, wurden zusätzlich für die entsprechende Pflanze die drei größten Blätter als interne Referenz mit gemessen. Auf diese Weise konnte reproduzierbar das gleiche Entwicklungsstadium untersucht werden.

	Pflanze 1		Pflanze 2		Pflanze 3		Pflanze 4	
	Länge	Breite	Länge	Breite	Länge	Breite	Länge	Breite
entfaltet1	4,2	1,7	3,9	1,8	3,5	1,7	4,0	2,0
entfaltet2	4,0	1,9	4,0	2,0	4,0	2,0	3,5	1,8
entfaltet3	3,7	1,8	3,5	1,7	3,7	1,7	4,0	1,5
MW (1bis3)	4,0	1,8	3,8	1,8	3,7	1,8	3,8	1,7
Probeblatt	3,2	1,3	3,2	1,4	3,2	1,4	3,0	1,2
Index	0,81	0,72	0,84	0,763	0,86	0,78	0,78	0,68

Tabelle 16.3.: Längen- und Breitenindex für die Wahl des einheitlichen Entwicklungszustandes

Vakuuminfiltration und Präparation für die Induktionsexperimente

Vakuuminfiltration wurde in 2 ml Eppendorfgläsern und mit Hilfe einer 10 ml Einwegspritze durchgeführt. Die Präparation für die Induktionsexperimente werden unter 4.1 auf Seite 30 beschrieben.

Aufnahme der Daten der Induktionsversuche

Um den Arbeitsablauf immer effektiver zu gestalten, wurde im Laufe der Arbeiten die Vorgehensweise stetig angepasst. Es soll hier nur die letzte Version vorgestellt werden.

Aufnahme - Aufnahme von Bildserien entlang der z-Achse von mindestens drei Bildabschnitten (pro Zeitpunkt) mit dem Epifluoreszenzsetup 1 (40x Objektiv und EndowGFP-Filterset). Dazu wurden in Axiovision Zeitserien von 20 Bildern aufgenommen. Zwischen den einzelnen Bildern der Zeitserie wurde die Fokusebene per Hand sukzessive verändert. **Optimierung** - Nach dem Schärfen der Bilder durch *Unschärfmaskierung* (Filterradius und Stärke 2,0) wurden die Zeitserien als Einzelbilder in separate Ordner exportiert. Von da aus wurde über *batch processing* mit CombineZP aus den Bildstapeln jeweils ein Bild mit erweiterter Tiefenschärfe errechnet, auf dem alle Plastiden und Stromuli, die der Bildstapel enthielt, simultan scharf abgebildet sind (genutztes Makro *Do Weighted Average*). **Zählen** - Die Bilder mit erweiterter Tiefenschärfe wurden im ImageBrowser geöffnet und Plastiden wurden einem Farbcode folgend manuell markiert, dabei wurde zwischen Plastiden ohne Stromuli (weiß), Plastiden mit einem Stromulus (rot), Plastiden mit zwei Stromuli (pink), Plastiden mit drei Stromuli (hellblau) und Plastiden mit vier Stromuli (dunkelblau) unterschieden. Die Bilder mit den Markierungen (mit schwarzem Hintergrund) wurden exportiert. Über einen automatisierten Prozess mit FoveaPro wurden die Markierungen der einzelnen Farben gezählt und in einer Textdatei ausgegeben, die in Excel importiert und ausgewertet werden konnte. Auf diese Weise wurden insgesamt 530.100 Plastiden im Rahmen dieser Arbeit gezählt.

Transmissionselektronenmikroskopie

Um zu untersuchen, ob es einen Einfluss der Induktionsversuche (wie unter 4.1 auf Seite 30 beschrieben) auf die Ultrastruktur der Plastiden und Stromuli gibt, wurde zusätzlich ein solcher mit 40 mM Turanose und zur Kontrolle mit APW durchgeführt. Kurz nach der Infiltration (Zeitpunkt 0 min) und 2 h danach wurden die Blattquadrate in Fixierlösung

gegeben und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Ein Teil der fixierten Blattquadrate wurde mikroskopiert und mit den nicht fixierten Blattstücken verglichen. In Bezug auf die Stromulizahl und -morphologie gab es keine offensichtlichen Unterschiede zwischen frischem und fixiertem Gewebe. Die Fixierung hat die Stromuli gut erhalten (Daten nicht gezeigt).

Fixieren von Material Das Fixieren von Blattmaterial für die Mikroskopie wurde nach Marques et al. (2004) durchgeführt.

Einbetten, Schneiden und Mikroskopieren Einbetten, Schneiden von Semi- und Ultra-dünnschnitten, sowie die Mikroskopie wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Dr. Dr. Gerd Hause (Abteilung "Bildgebende Verfahren am Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg", Halle an der Saale) durchgeführt.

Aufarbeitung von Fluoreszenzbildern zum Druck

Um die Wiedergabe von Details in den Fluoreszenzbildern im Druck zu verbessern, wurden vor allem Fluoreszenzbilder in Graustufen umgewandelt und invertiert, auf diese Weise entsteht ein Bild, in dem die Fluoreszenzintensität durch einen Grauwert ausgedrückt ist. **weiß**) keine Fluoreszenz (0 %), **schwarz**) helle Fluoreszenz (100 %). Diese Graustufen-Invert-Bilder wurden an manchen Stellen wieder eingefärbt (rot dsRed, blau DAPI, grün GFP).

Statistische Methoden

Bestimmung der Zellgrößenkategorien

Die gebildeten Zellgrößenklassen basieren auf der Histogrammfunktion von Microsoft Excel 2003, welches für eine Verteilungsanfrage automatisch Klassen generiert. Die hier getroffene Einteilung wurde für die weitere Verteilungen als Grundlage verwendet. Die Gruppierung in *sehr klein*, *klein*, *mittelgroß*, *groß* und *sehr groß* erfolgte nach eigenem Ermessen.

Ungepaarter t-Test und Bestimmtheitsmaß R^2

Ungepaarter t-Test und die Berechnung von R^2 wurde mit Sigmaplot durchgeführt.

Vorbereitung von Epifluoreszenzbildern für den Druck

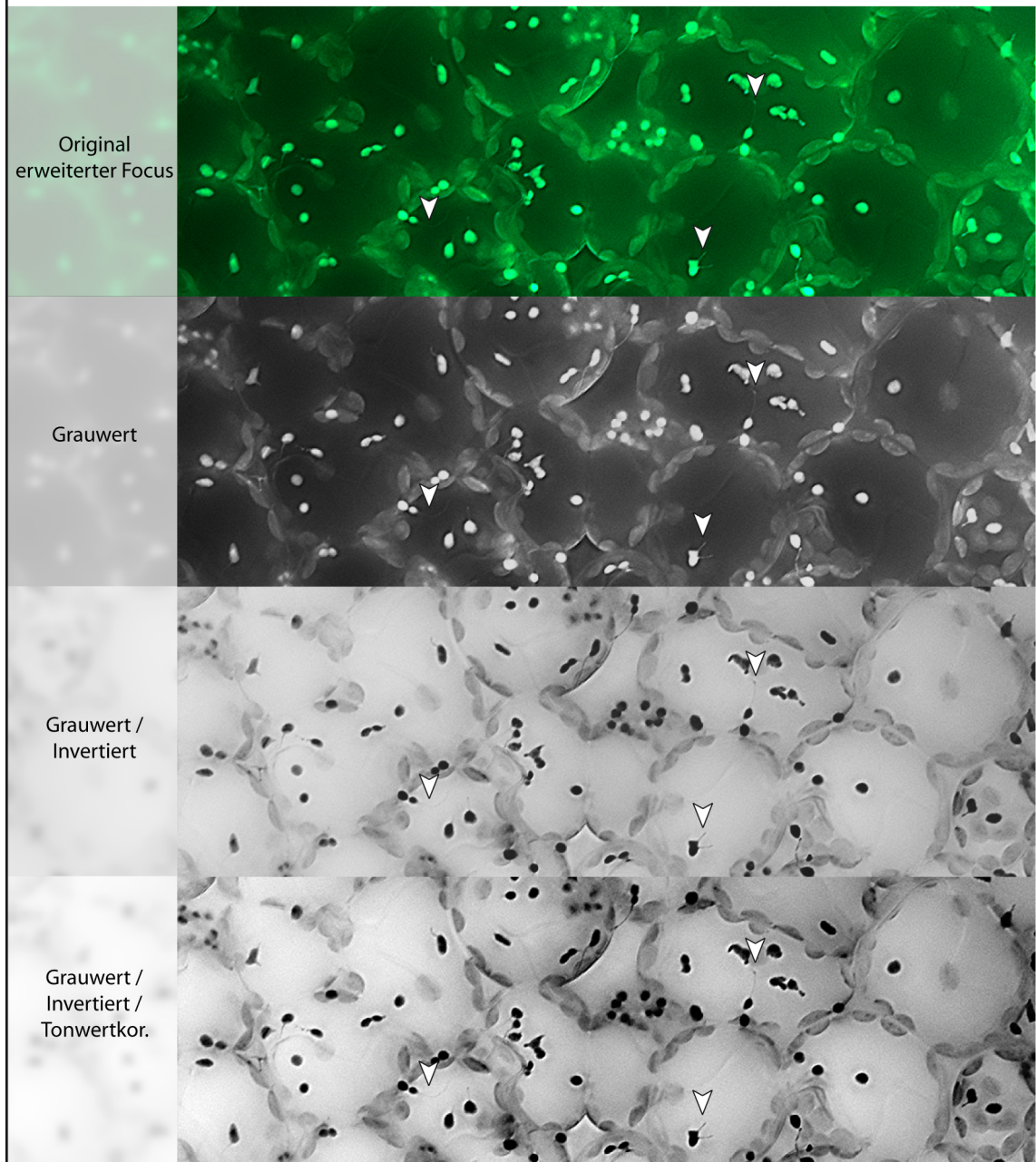


Abbildung 16.2.: Aufarbeitung von Fluoreszenzbildern zum Druck

Teil V.

Anhang

17. Berechnungen

Volumensverlust durch Stromulibildung

Oberfläche (Ao) des Stromulus tragenden Plastiden gegeben: Durchmesser Plastidenkörper 3 μm (Radius 1,5 μm); Länge des Stromulus 10 μm ; Durchmesser des Stromulus 0,2 μm (Radius 0,1 μm); **gesucht:** Membranoberfläche; **Ansatz:** Der Plastidenkörper als Kugel angenommen und Stromulus als Zylinder, die Kontaktflächen von Kugel und Zylinder zählen nicht als Fläche, da der Plastid eine Öffnung zum Stromulus hat.

a) Oberfläche des Stromulus

$$A_{O\text{Stromulus}} = A_{O\text{Zylinder}} - A_{O\text{Kreis}}$$

$$A_{O\text{Stromulus}} = 2\Pi r(h + r) - (r^2\Pi)$$

$$A_{O\text{Stromulus}} = 2\Pi \times 0,1\mu\text{m}(10\mu\text{m} + 0,1\mu\text{m}) - (0,1^2\mu\text{m}^2 \times \Pi)$$

$$A_{O\text{Stromulus}} = 6,346\mu\text{m}^2 - 0,0314\mu\text{m}^2$$

$$A_{O\text{Stromulus}} = 6,315\mu\text{m}^2$$

b) Oberfläche des Plastidenkörpers

$$A_{O\text{Plastidenkörper}} = A_{O\text{Kugel}} - A_{O\text{Kreis}}$$

$$A_{O\text{Plastidenkörper}} = 4\Pi r^2 - r^2\Pi$$

$$A_{O\text{Plastidenkörper}} = 4\Pi \times 1,5\mu\text{m}^2 - 0,1^2\mu\text{m}^2 \times \Pi$$

$$A_{O\text{Plastidenkörper}} = 28,272\mu\text{m}^2 - 0,0314\mu\text{m}^2$$

$$A_{O\text{Plastidenkörper}} = 27,96\mu\text{m}^2$$

c) Gesamtoberfläche des Plastiden mit Stromulus

$$A_{O\text{Plastid-mit-Stromulus}} = A_{O\text{Plastidenkörper}} + A_{O\text{Stromulus}}$$

$$A_{O\text{Plastid-mit-Stromulus}} = 27,96\mu\text{m}^2 + 6,315\mu\text{m}^2$$

$$A_{O\text{Plastid-mit-Stromulus}} = 34,275\mu\text{m}^2$$

Ergebnis: Der Standardplastid mit einem Stromulus und den angegebenen Maßen hat ein Volumen von $34,275\mu m^2$

Wie groß ist der Durchmesser eines Plastiden mit $34,275\mu m^2$ Ao und ohne Stromulus? gegeben: Volumen von $34,275\mu m^2$; **gesucht:** Radius des Plastiden ohne Stromulus

$$A_{OKugel} = 4\pi r^2$$

$$r = \sqrt{\frac{Ao}{4\pi}}$$

$$r = \sqrt{\frac{34,275\mu m^2}{4\pi}}$$

$$r = \sqrt{2,728\mu m^2}$$

$$r = 1,65\mu m$$

$$d = 3,3\mu m$$

Ergebnis: Durchmesser eines Plastidenkörpers mit Stromulus $3\mu m$ / ohne Stromulus $3,608\mu m$

Wie groß ist das Volumen der Plastiden mit gleicher Ao? gegeben **Plastid mit Stromulus:** Durchmesser Plastidenkörper $3\mu m$ (Radius $1,5\mu m$); Länge des Stromulus $10\mu m$; Durchmesser des Stromulus $0,2\mu m$ (Radius $0,1\mu m$); **gegeben Plastid ohne Stromulus:** Radius $1,65\mu m$; **gesucht:** Volumen von Plastiden mit Stromulus

a) Volumen von Plastiden mit Stromulus?

$$V_{Stromulus} = \pi r^2 h$$

$$V_{Stromulus} = \pi \times 0,1^2 \mu m^2 \times 10\mu m$$

$$V_{Stromulus} = 0,314\mu m^3$$

$$V_{Plastid} = \frac{4}{3}\pi r^3$$

$$V_{Plastid} = \frac{4}{3}\pi \times 1,5^3 \mu m^3$$

$$V_{Plastid} = \frac{4 \times \pi \times 3,375\mu m^3}{3}$$

$$V_{Plastid} = 14,137\mu m^3$$

$$V_{Plastid-mit-Stromulus} = V_{Plastid} + V_{Stromulus}$$

$$V_{Plastid-mit-Stromulus} = 0,314\mu m^3 + 14,137\mu m^3$$

$$V_{Plastids-mit-Stromulus} = 14,451\mu m^3$$

b) Volumen von Plastiden ohne Stromulus, aber mit gleicher Oberfläche

17. Berechnungen

$$V_{\text{Plastid-ohne-Stromulus}} = \frac{4}{3}\Pi r^3$$

$$V_{\text{Plastid-ohne-Stromulus}} = \frac{4}{3}\Pi \times 1,65^3 \mu\text{m}^3$$

$$V_{\text{Plastid-ohne-Stromulus}} = 18,816 \mu\text{m}^3$$

Ergebnis: Das Volumen des Standardplastiden mit Stromulus ist $14,451 \mu\text{m}^3$, bei gleichbleibender Oberfläche hätte ein Plastid ohne Stromulus ein Volumen von $18,816 \mu\text{m}^3$

Volumenverlust bei Stromulibildung und gleicher Oberfläche? gegeben: Volumen des Standardplastiden mit Stromulus $14,451 \mu\text{m}^3$, Volumen Plastid ohne Stromulus $18,816 \mu\text{m}^3$; **gesucht:** Volumendifferenz und Anteil

a) Differenz

$$V_{\text{diff}} = V_{\text{Plastid-ohne-Stromulus}} - V_{\text{Plastid-mit-Stromulus}}$$

$$V_{\text{diff}} = 18,816 \mu\text{m}^3 - 14,451 \mu\text{m}^3$$

$$V_{\text{diff}} = 4,356 \mu\text{m}^3$$

b) Anteil

$$\frac{18,816 \mu\text{m}^3}{100\%} = \frac{4,356 \mu\text{m}^3}{x}$$

$$x = 23,19\%$$

Ergebnis: Die Volumendifferenz des Plastiden ohne Stromulus zu einem Plastiden mit Stromulus beträgt bei gleicher Oberfläche $4,356 \mu\text{m}^3$, was ca. 23 % vom Volumen des Plastiden ohne Stromulus darstellt.

18. Literaturverzeichnis

- Adam, L., Ellwood, S., Wilson, I., Saenz, G., Xiao, S., Oliver, R. P., Turner, J. G., Somerville, S., Dec 1999. Comparison of *erysiphe cichoracearum* and *e. cruciferarum* and a survey of 360 *arabidopsis thaliana* accessions for resistance to these two powdery mildew pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 12 (12), 1031–1043.
- Akiyoshi, D. E., Regier, D. A., Gordon, M. P., Sep 1987. Cytokinin production by *agrobacterium* and *pseudomonas* spp. *J Bacteriol* 169 (9), 4242–4248.
- Allwood, J. W., Ellis, D. I., Goodacre, R., Feb 2008. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. *Physiol Plant* 132 (2), 117–135.
- Altpeter, F., Angenon, G., Austin-Phillips, S., Ayliffe, M., Bent, A., Binns, P. B.-M. A. N., Burza, W., Campbell, L. M., Cardoza, V., Clemente, T., Collier, R., Cosson, P. C. V., Curtis, I. S., DŽErfurth, I., Dale, P. J., 2006. *Agrobacterium* Protocols - Second Edition - Volume 1, 2nd Edition. Vol. 1 of *Methods In Molecular Biology*. Humana Press.
- Antonio, C., Larson, T., Gilday, A., Graham, I., Bergström, E., Thomas-Oates, J., Nov 2007. Quantification of sugars and sugar phosphates in *arabidopsis thaliana* tissues using porous graphitic carbon liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1172 (2), 170–178.
- Arimura, S., Hirai, A., Tsutsumi, N., Feb 2001. Numerous and highly developed tubular projections from plastids observed in tobacco epidermal cells. *Plant Sci* 160 (3), 449–454.
- Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I., Doolittle, W. F., Nov 2000. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 290 (5493), 972–977.
- Bauer, B., Davidson, M., Orwar, O., Oct 2006. Direct reconstitution of plasma membrane lipids and proteins in nanotube-vesicle networks. *Langmuir* 22 (22), 9329–9332.
- Baulcombe, D. C., Apr 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* 2 (2), 109–113.
- Beaty, J. S., Powell, G. K., Lica, L., Regier, D. A., Macdonald, E. M. S., Hommes, N. G., Morris, R. O., 1986. Tzs, a nopaline ti plasmid gene from *agrobacterium-tumefaciens* associated with trans-zeatin biosynthesis. *Molecular & General Genetics* 203 (2), 274–280.
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., Bhattarai, T., Apr 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J Biosci* 32 (3), 501–510.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J. F., Pöschl, Y., Gust, A. A., Scheel, D., Lee, J., May 2009. Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from map kinase 6 in *arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (19), 8067–8072.
- Block, M. A., Douce, R., Joyard, J., Rolland, N., May 2007. Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosynth Res* 92 (2), 225–244.
- Bläsing, O. E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W.-R., Stitt, M., Dec 2005. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *arabidopsis*. *Plant Cell* 17 (12), 3257–3281.

18. Literaturverzeichnis

- Boller, T., Felix, G., 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60, 379–406.
- Bourett, T. M., Czymbek, K. J., Howard, R. J., 1999. Ultrastructure of chloroplast protuberances in rice leaves preserved by high-pressure freezing. *Planta* 208 (4), 472–479.
- Bouteau, F., Dellis, O., Bousquet, U., Rona, J. P., Feb 1999. Evidence of multiple sugar uptake across the plasma membrane of laticifer protoplasts from hevea. *Bioelectrochem Bioenerg* 48 (1), 135–139.
- Börnke, F., Hajirezaei, M., Sonnewald, U., Apr 2001. Cloning and characterization of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *erwinia rhapontici*. *J Bacteriol* 183 (8), 2425–2430.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., 2000. *Biochemistry and Molekularbiology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Buchner, O., Holzinger, A., Lütz, C., Nov 2007. Effects of temperature and light on the formation of chloroplast protrusions in leaf mesophyll cells of high alpine plants. *Plant Cell Environ* 30 (11), 1347–1356.
- Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B., Dinesh-Kumar, S. P., Sep 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J* 39 (5), 734–746.
- Chandran, D., Reinders, A., Ward, J. M., Nov 2003. Substrate specificity of the *arabidopsis thaliana* sucrose transporter *atsuc2*. *J Biol Chem* 278 (45), 44320–44325.
- Chen, X.-Y., Kim, J.-Y., Jun 2009. Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal Behav* 4 (6), 489–492.
- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S. C., Smith, S. M., Smith, A. M., Mar 2004. A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *arabidopsis* leaves at night. *Plant J* 37 (6), 853–863.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G., Feb 2006. The *arabidopsis* receptor kinase *fls2* binds *flg22* and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* 18 (2), 465–476.
- Cohn, J., Sessa, G., Martin, G. B., Feb 2001. Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* 13 (1), 55–62.
- Cortès, S., Gromova, M., Evrard, A., Roby, C., Heyraud, A., Rolin, D. B., Raymond, P., Brouquisse, R. M., Feb 2003. In plants, 3-o-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiol* 131 (2), 824–837.
- Cutler, S. R., Ehrhardt, D. W., Griffiths, J. S., Somerville, C. R., Mar 2000. Random *gfp::cdna* fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (7), 3718–3723.
- Delessert, C., Wilson, I. W., Straeten, D. V. D., Dennis, E. S., Dolferus, R., May 2004. Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in *arabidopsis* leaves. *Plant Mol Biol* 55 (2), 165–181.
- Deuschle, K., Chaudhuri, B., Okumoto, S., Lager, I., Lalonde, S., Frommer, W. B., Sep 2006. Rapid metabolism of glucose detected with fret glucose nanosensors in epidermal cells and intact roots of *arabidopsis* rna-silencing mutants. *Plant Cell* 18 (9), 2314–2325.
- Ellis, J. R., Leech, R. M., 1985. Cell size and chloroplast size in relation to chloroplast replication in light-grown wheat leaves. *Planta* 165 (1), 120–125.
- Escobar, M. A., Dandekar, A. M., Aug 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci* 8 (8), 380–386.

- Fernie, A. R., Roessner, U., Geigenberger, P., Apr 2001. The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. *Plant Physiol* 125 (4), 1967–1977.
- Fester, T., Strack, D., Hause, B., Oct 2001. Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* 213 (6), 864–868.
- Fischer, K., Weber, A., Aug 2002. Transport of carbon in non-green plastids. *Trends Plant Sci* 7 (8), 345–351.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T. D., May 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in *c3* plants. *Plant Biol (Stuttg)* 6 (3), 269–279.
- Forth, D., Pyke, K. A., 2006. The suffulta mutation in tomato reveals a novel method of plastid replication during fruit ripening. *J Exp Bot* 57 (9), 1971–1979.
- Frantziou, G., Galatis, B., Apostolakis, P., Oct 2005. Aluminium causes variable responses in actin filament cytoskeleton of the root tip cells of *triticum turgidum*. *Protoplasma* 225 (3-4), 129–140.
- Fromm, H., Edelman, M., Aviv, D., Galun, E., Nov 1987. The molecular basis for rna-dependent spectinomycin resistance in *nicotiana chloroplasts*. *EMBO J* 6 (11), 3233–3237.
- Fry, W., May 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and r gene) destroyer. *Mol Plant Pathol* 9 (3), 385–402.
- Fu, D. Q., Zhu, B. Z., Zhu, H. L., Zhang, H. X., Xie, Y. H., Jiang, W. B., Zhao, X. D., Luo, Y. B., Feb. 2006. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. *Molecules And Cells* 21 (1), 153–160.
- Fujime, S., Miyamoto, S., 1991. Elasticity of biomembranes studied by dynamic light-scattering. *Laser Applications In Life Sciences, Parts 1 And 2* 1403, 306–315.
- Funaki, K., Nagata, A., Akimoto, Y., Shimada, K., Ito, K., Yamamoto, K., Sep 2004. The motility of *chara corallina* myosin was inhibited reversibly by 2,3-butanedione monoxime (bdm). *Plant Cell Physiol* 45 (9), 1342–1345.
- Galletti, R., Lorenzo, G. D., Ferrari, S., Jan 2009. Host-derived signals activate plant innate immunity. *Plant Signal Behav* 4 (1), 33–34.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A., Jul 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* 19 (7), 711–724.
- Gielwanowska, I., Szczuka, E., Bednara, J., Górecki, R., Nov 2005. Anatomical features and ultrastructure of *deschampsia antarctica* (poaceae) leaves from different growing habitats. *Ann Bot* 96 (6), 1109–1119.
- Giese, J.-O., Herbers, K., Hoffmann, M., Klösgen, R. B., Sonnewald, U., Jan 2005. Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *nicotiana tabacum*. *FEBS Lett* 579 (3), 827–831.
- Gils, M., Kandzia, R., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Gleba, Y., Nov 2005. High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnol J* 3 (6), 613–620.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., Boller, T., May 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *arabidopsis thaliana*. *Plant J* 18 (3), 277–284.
- Gonzali, S., Novi, G., Loreti, E., Paolicchi, F., Poggi, A., Alpi, A., Perata, P., Nov 2005. A turanose-insensitive mutant suggests a role for *wox5* in auxin homeostasis in *arabidopsis thaliana*. *Plant J* 44 (4), 633–645.
- Gray, J., Gelvin, S. B., Meilan, R., Morris, R. O., 1996. Transfer rna is the source of extracellular isopentenyladenine in a ti-plasmidless strain of *agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 110 (2), 431–438.

18. Literaturverzeichnis

- Gray, J. C., Sullivan, J. A., Hibberd, J. M., Hansen, M. R., 2001. Stromules: Mobile protrusions and interconnections between plastids. *Plant Biology* 3 (3), 223–233.
- Gremillon, L., Kiessling, J., Hause, B., Decker, E. L., Reski, R., Sarnighausen, E., 2007. Filamentous temperature-sensitive *z* (*ftsZ*) isoforms specifically interact in the chloroplasts and in the cytosol of *Physcomitrella patens*. *New Phytol* 176 (2), 299–310.
- Gunning, B. E. S., Apr 2005. Plastid stromules: video microscopy of their outgrowth, retraction, tensioning, anchoring, branching, bridging, and tip-shedding. *Protoplasma* 225 (1-2), 33–42.
- Gupta, A. K., Kaur, N., Dec 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J Biosci* 30 (5), 761–776.
- Hanahan, D., Jun 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166 (4), 557–580.
- Hans, J., Hause, B., Strack, D., Walter, M. H., Feb 2004. Cloning, characterization, and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cells of maize. *Plant Physiol* 134 (2), 614–624.
- Hanson, M. R., Sattarzadeh, A., May 2008. Dynamic morphology of plastids and stromules in angiosperm plants. *Plant Cell Environ* 31 (5), 646–657.
- Hara-Nishimura, I., Matsushima, R., Dec 2003. A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum: a plant strategy against environmental stresses? *Curr Opin Plant Biol* 6 (6), 583–588.
- Hardham, A. R., Takemoto, D., White, R. G., 2008. Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of Arabidopsis epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC Plant Biol* 8, 63.
- Harmer, S. L., 2009. The circadian system in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 60, 357–377.
- Hückelhoven, R., Apr 2005. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiol Lett* 245 (1), 9–17.
- Heath, M. C., Aug 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 3 (4), 315–319.
- Hellens, R., Mullineaux, P., Klee, H., Oct 2000a. Technical focus: a guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5 (10), 446–451.
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S., Mullineaux, P. M., Apr 2000b. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42 (6), 819–832.
- Herrmann, C., Wray, J., Travers, F., Barman, T., Dec 1992. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry* 31 (48), 12227–12232.
- Hibberd, J. M., Linley, P. J., Khan, M. S., Gray, J. C., 1998. Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. *Plant Journal* 16 (5), 627–632.
- Hilson, P., Allemeersch, J., Altmann, T., Aubourg, S., Avon, A., Beynon, J., Bhalerao, R. P., Bitton, F., Caboche, M., Cannoot, B., Chardakov, V., Cognet-Holliger, C., Colot, V., Crowe, M., Darimont, C., Durinck, S., Eickhoff, H., de Longevialle, A. F., Farmer, E. E., Grant, M., Kuiper, M. T. R., Lehrach, H., Léon, C., Leyva, A., Lundeberg, J., Lurin, C., Moreau, Y., Nietfeld, W., Paz-Ares, J., Reymond, P., Rouzé, P., Sandberg, G., Segura, M. D., Serizet, C., Tabrett, A., Taconnat, L., Thareau, V., Hummelen, P. V., Vercruyse, S., Vuylsteke, M., Weingartner, M., Weisbeek, P. J., Wirta, V., Wittink, F. R. A., Zabeau, M., Small, I., Oct 2004. Versatile gene-specific sequence tags for Arabidopsis functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res* 14 (10B), 2176–2189.

- Holzinger, A., Buchner, O., Lütz, C., Hanson, M. R., 2007a. Temperature-sensitive formation of chloroplast protrusions and stromules in mesophyll cells of *arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 230 (1-2), 23–30.
- Holzinger, A., Kwok, E. Y., Hanson, M. R., Nov-Dec 2008. Effects of *arc3*, *arc5* and *arc6* mutations on plastid morphology and stromule formation in green and nongreen tissues of *arabidopsis thaliana*. *Photochem Photobiol* 84 (6), 1324–1335.
- Holzinger, A., Wasteneys, G. O., Lütz, C., May 2007b. Investigating cytoskeletal function in chloroplast protrusion formation in the arctic-alpine plant *oxyria digyna*. *Plant Biol (Stuttg)* 9 (3), 400–410.
- Hsieh, K., Huang, A. H. C., Feb 2007. Tapetosomes in brassica tapetum accumulate endoplasmic reticulum-derived flavonoids and alkanes for delivery to the pollen surface. *Plant Cell* 19 (2), 582–596.
- Huang, J., Taylor, J. P., Chen, J.-G., Uhrig, J. F., Schnell, D. J., Nakagawa, T., Korth, K. L., Jones, A. M., May 2006. The plastid protein thylakoid formation1 and the plasma membrane g-protein *gpa1* interact in a novel sugar-signaling mechanism in *arabidopsis*. *Plant Cell* 18 (5), 1226–1238.
- Huitema, E., Vleeshouwers, V. G. A. A., Francis, D. M., Kamoun, S., 2003. Active defence responses associated with non-host resistance of *arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 4 (6), 487–500.
- Ingle, R. A., Carstens, M., Denby, K. J., Sep 2006. Pamp recognition and the plant-pathogen arms race. *Bioessays* 28 (9), 880–889.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M. R., Mae, T., Sep 2008. Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an *atg* gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol* 148 (1), 142–155.
- Itoh, R. D., Yamasaki, H., Septiana, A., Yoshida, S., Fujiwara, M. T., Jan 2010. Chemical induction of rapid and reversible plastid filamentation in *arabidopsis thaliana* roots. *Physiol Plant*.
- Iwabuchi, K., Minamino, R., Takagi, S., Jan 2010. Actin reorganization underlies phototropin-dependent positioning of nuclei in *arabidopsis thaliana* leaf cells. *Plant Physiol*.
- Jansson, C., 2005. Mutation: Sugar signaling mutants in *arabidopsis*. *Progress in Botany* 66, 50–67.
- Jesorka, A., Orwar, O., 2008. Liposomes: Technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry* 1, 801–832.
- Johansen, L. K., Carrington, J. C., Jul 2001. Silencing on the spot. induction and suppression of rna silencing in the agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol* 126 (3), 930–938.
- Jones, M. G. K., Outlaw, W. H., Lowry, O. H., Sep 1977. Enzymic assay of 10 to 10 moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiol* 60 (3), 379–383.
- Kamoun, S., 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* 44, 41–60.
- Kamoun, S., Aug 2007. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Curr Opin Plant Biol* 10 (4), 358–365.
- Kamoun, S., Smart, C. D., 2005. Late blight of potato and tomato in the genomics era. *Plant Disease* 89 (7), 692–699.
- Karcher, D., Bock, R., Mar 1998. Site-selective inhibition of plastid rna editing by heat shock and antibiotics: a role for plastid translation in rna editing. *Nucleic Acids Res* 26 (5), 1185–1190.

18. Literaturverzeichnis

- Karlsson, A., Karlsson, R., Karlsson, M., Cans, A. S., Strömberg, A., Ryttsén, F., Orwar, O., Jan 2001. Networks of nanotubes and containers. *Nature* 409 (6817), 150–152.
- Köhler, R. H., Cao, J., Zipfel, W. R., Webb, W. W., Hanson, M. R., Jun 1997. Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science* 276 (5321), 2039–2042.
- Köhler, R. H., Hanson, M. R., Jan 2000. Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. *J Cell Sci* 113 (Pt 1), 81–89.
- Köhler, R. H., Schwillie, P., Webb, W. W., Hanson, M. R., Nov 2000. Active protein transport through plastid tubules: velocity quantified by fluorescence correlation spectroscopy. *J Cell Sci* 113 (Pt 22), 3921–3930.
- Knoblauch, M., Hibberd, J. M., Gray, J. C., van Bel, A. J., Sep 1999. A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. *Nat Biotechnol* 17 (9), 906–909.
- Kodama, Y., Tamura, T., Hirasawa, W., Nakamura, K., Sano, H., Apr 2009. A novel protein phosphorylation pathway involved in osmotic-stress response in tobacco plants. *Biochimie* 91 (4), 533–539.
- Koh, S., André, A., Edwards, H., Ehrhardt, D., Somerville, S., Nov 2005. Arabidopsis thaliana subcellular responses to compatible erysiphe cichoracearum infections. *Plant J* 44 (3), 516–529.
- Koncz, C., Schell, J., 1986. The promoter of tl-dna gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet* 204, 383–396.
- Kumagai, M. H., Donson, J., della Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., Grill, L. K., Feb 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived rna. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (5), 1679–1683.
- Kwok, E. Y., Hanson, M. R., Jul 2003. Microfilaments and microtubules control the morphology and movement of non-green plastids and stromules in nicotiana tabacum. *Plant J* 35 (1), 16–26.
- Kwok, E. Y., Hanson, M. R., Mar 2004a. Gfp-labelled rubisco and aspartate aminotransferase are present in plastid stromules and traffic between plastids. *J Exp Bot* 55 (397), 595–604.
- Kwok, E. Y., Hanson, M. R., Feb 2004b. In vivo analysis of interactions between gfp-labeled microfilaments and plastid stromules. *BMC Plant Biol* 4, 2.
- Kwok, E. Y., Hanson, M. R., Oct 2004c. Plastids and stromules interact with the nucleus and cell membrane in vascular plants. *Plant Cell Rep* 23 (4), 188–195.
- Kwok, E. Y., Hanson, M. R., May 2004d. Stromules and the dynamic nature of plastid morphology. *J Microsc* 214 (Pt 2), 124–137.
- Lager, I., Looger, L. L., Hilpert, M., Lalonde, S., Frommer, W. B., Oct 2006. Conversion of a putative agrobacterium sugar-binding protein into a fret sensor with high selectivity for sucrose. *J Biol Chem* 281 (41), 30875–30883.
- Landtag, J., 2006. Untersuchung des pathosystems arabidopsis thaliana phytophthora infestans und charakterisierung von mutanten mit einem veränderten nichtwirtsresistenz-phänotyp.
- Lee, D., Polisensky, D. H., Braam, J., Feb 2005. Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and xth genes. *New Phytol* 165 (2), 429–444.
- Leech, R. M., Pyke, K. A., 1988. Division and Segregation of Organelles - Chloroplast division in higher plants with particular reference to wheat. Cambridge University Press.
- Link, M., Rausch, T., Greiner, S., Aug 2004. In arabidopsis thaliana, the invertase inhibitors atc/vif1 and 2 exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Lett* 573 (1-3), 105–109.

- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S., Schulze-Lefert, P., Nov 2005. Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in arabidopsis. *Science* 310 (5751), 1180–1183.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S. P., Sep 2002a. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* 31 (6), 777–786.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S. P., May 2002b. Tobacco rar1, eds1 and npr1/nim1 like genes are required for n-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J* 30 (4), 415–429.
- Lizana, L., Bauer, B., Orwar, O., Mar 2008. Controlling the rates of biochemical reactions and signaling networks by shape and volume changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (11), 4099–4104.
- Logan, D. C., Scott, I., Tobin, A. K., Mar 2004. Adl2a, like adl2b, is involved in the control of higher plant mitochondrial morphology. *J Exp Bot* 55 (397), 783–785.
- Lohse, S., Hause, B., Hause, G., Fester, T., Aug 2006. Ftsz characterization and immunolocalization in the two phases of plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots of medicago truncatula. *Plant Cell Physiol* 47 (8), 1124–1134.
- Lohse, S., Schliemann, W., Ammer, C., Kopka, J., Strack, D., Fester, T., Sep 2005. Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of medicago truncatula. *Plant Physiol* 139 (1), 329–340.
- Loreti, E., Alpi, A., Perata, P., Jul 2000. Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. *Plant Physiol* 123 (3), 939–948.
- Loreti, E., Bellis, L. D., Alpi, A., Perata, P., 2001. Why and how do plant cells sense sugars? *Annals Of Botany* 88 (5), 803–812.
- Lütz, C., Engel, L., 2007. Changes in chloroplast ultrastructure in some high-alpine plants: adaptation to metabolic demands and climate? *Protoplasma* 231 (3-4), 183–192.
- Ma, H., Oct 2001. Plant g proteins: the different faces of gpa1. *Curr Biol* 11 (21), R869–R871.
- Mahajan, S., Tuteja, N., Dec 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* 444 (2), 139–158.
- Marques, J. P., Schattat, M. H., Hause, G., Dudeck, I., Klösgen, R. B., Aug 2004. In vivo transport of folded egfp by the deltapH/tat-dependent pathway in chloroplasts of arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* 55 (403), 1697–1706.
- Marx, S., Nosberger, J., Frehner, M., 1997. Hydrolysis of fructan in grasses: A beta-(2-6)-linkage specific fructan-beta-fructosidase from stubble of lolium perenne. *New Phytologist* 135 (2), 279–290.
- Mathur, J., Nov 2007. The illuminated plant cell. *Trends Plant Sci* 12 (11), 506–513.
- Matthewson, D. K., 1977. Hypersensitive reactions of tomaato leaves to phytophthora infestans. *New Phytologist* 78 (3), 643–647.
- McCullen, C. A., Binns, A. N., 2006. Agrobacterium tumefaciens and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 101–127.
- Menzel, D., 1994. An interconnected plastidom in acetabularia: implications for the mechanism of chloroplast motility. *Protoplasma* 179, 166–171.

18. Literaturverzeichnis

- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S., Shinozaki, K., Aug 2001. An essential role of a tadc homologue of a delta ph- dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (18), 10499–10504.
- Natesan, S. K. A., Sullivan, J. A., Gray, J. C., Mar 2005. Stromules: a characteristic cell-specific feature of plastid morphology. *J Exp Bot* 56 (413), 787–797.
- Natesan, S. K. A., Sullivan, J. A., Gray, J. C., Nov 2009. Myosin xi is required for actin-associated movement of plastid stromules. *Mol Plant* 2 (6), 1262–1272.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., Jones, J. D. G., Jun 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* 135 (2), 1113–1128.
- Nebenführ, A., Frohlick, J. A., Staehelin, L. A., Sep 2000a. Redistribution of golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant Physiol* 124 (1), 135–151.
- Nebenführ, A., Gallagher, L. A., Dunahay, T. G., Frohlick, J. A., Mazurkiewicz, A. M., Meehl, J. B., Staehelin, L. A., Dec 1999. Stop-and-go movements of plant golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol* 121 (4), 1127–1142.
- Nelson, B. K., Cai, X., Nebenführ, A., Sep 2007. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in arabidopsis and other plants. *Plant J* 51 (6), 1126–1136.
- Nethra, P., Nataraja, K. N., Rama, N., Udayakumar, M., Feb. 2006. Standardization of environmental conditions for induction and retention of post-transcriptional gene silencing using tobacco rattle virus vector. *Current Science* 90 (3), 431–435.
- Nott, A., Jung, H.-S., S.Koussevitzky, Chory, J., 2006. Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol* 57, 739–759.
- Omasa, K., Konishi, A., Tamura, H., Hosoi, F., Jan 2009. 3d confocal laser scanning microscopy for the analysis of chlorophyll fluorescence parameters of chloroplasts in intact leaf tissues. *Plant Cell Physiol* 50 (1), 90–105.
- Ooms, G., Hooykaas, P. J., Veen, R. J. V., Beelen, P. V., Regensburg-Tuinck, T. J., Schilperoort, R. A., Jan 1982. Octopine ti-plasmid deletion mutants of agrobacterium tumefaciens with emphasis on the right side of the t-region. *Plasmid* 7 (1), 15–29.
- Ostap, E. M., 2002. 2,3-butanedione monoxime (bdm) as a myosin inhibitor. *J Muscle Res Cell Motil* 23 (4), 305–308.
- Outlaw, W. H., Vlieghere-He, X. D., Aug 2001. Transpiration rate. an important factor controlling the sucrose content of the guard cell apoplast of broad bean. *Plant Physiol* 126 (4), 1716–1724.
- Padmanabhan, M., Dinesh-Kumar, S. P., Feb 2009. Virus-induced gene silencing as a tool for delivery of dsrna into plants. *CSH Protoc* 2009 (2), pdb.prot5139.
- Panteris, E., Apostolakos, P., Quader, H., Galatis, B., 2004. A cortical cytoplasmic ring predicts the division plane in vacuolated cells of coleus: the role of actomyosin and microtubules in the establishment and function of the division site. *New Phytologist* 163 (2), 271–286.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., Zhang, Y. H., 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology* 59, 417–441.
- Pego, J. V., Kortstee, A. J., Huijser, C., Smeekens, S. C., Feb 2000. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* 51 Spec No, 407–416.

- Pego, J. V., Smeeckens, S. C., Dec 2000. Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends Plant Sci* 5 (12), 531–536.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H. B., Lacy, M., Austin, M. J., Parker, J. E., Sharma, S. B., Klessig, D. F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A. B., Mundy, J., Dec 2000. Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103 (7), 1111–1120.
- Pikis, A., Immel, S., Robrish, S. A., Thompson, J., Mar 2002. Metabolism of sucrose and its five isomers by *fusobacterium mortiferum*. *Microbiology* 148 (Pt 3), 843–852.
- Pruss, G. J., Nester, E. W., Vance, V., Dec 2008. Infiltration with *agrobacterium tumefaciens* induces host defense and development-dependent responses in the infiltrated zone. *Mol Plant Microbe Interact* 21 (12), 1528–1538.
- Pyke, K. A., Howells, C. A., Nov 2002. Plastid and stromule morphogenesis in tomato. *Ann Bot* 90 (5), 559–566.
- Pyke, K. A., Leech, R. M., 1987. The control of chloroplast number in wheat mesophyll cells. *Planta* 170, 416–420.
- Pyke, K. A., Leech, R. M., Jul 1992. Chloroplast division and expansion is radically altered by nuclear mutations in *arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 99 (3), 1005–1008.
- Pyke, K. A., Leech, R. M., Jan 1994. A genetic analysis of chloroplast division and expansion in *arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 104 (1), 201–207.
- Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X. W., Chen, Z., Qu, L.-J., May 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res* 17 (5), 471–482.
- Rödiger, A., Baudisch, B., Klösgen, R. B., Dec 2009. Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *J Plant Physiol*.
- Regier, D. A., Morris, R. O., Feb 1982. Secretion of trans-zeatin by *agrobacterium tumefaciens*: a function determined by the nopaline ti plasmid. *Biochem Biophys Res Commun* 104 (4), 1560–1566.
- Reinders, A., Sivitz, A. B., Hsi, A., Grof, C. P. L., Perroux, J. M., Ward, J. M., Oct 2006. Sugarcane *shs1*: analysis of sucrose transport activity and inhibition by sucralose. *Plant Cell Environ* 29 (10), 1871–1880.
- Riens, B., Lohaus, G., Heineke, D., Heldt, H. W., Sep 1991. Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol* 97 (1), 227–233.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., Sinha, A. K., Jan 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and pr protein. *J Exp Bot* 54 (382), 513–524.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57, 675–709.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., H., M., Prado, F. E., May 2009. Soluble sugars—metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signal Behav* 4 (5), 388–393.
- Roux, A., Cappello, G., Cartaud, J., Prost, J., Goud, B., Bassereau, P., Apr 2002. A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (8), 5394–5399.
- Ruckle, M. E., Larkin, R. M., 2009. Plastid signals that affect photomorphogenesis in *arabidopsis thaliana* are dependent on genomes uncoupled 1 and cryptochrome 1. *New Phytol* 182 (2), 367–379.

18. Literaturverzeichnis

- Ryu, C. M., Anand, A., Kang, L., Mysore, K. S., Oct. 2004. Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse solanaceous species. *Plant Journal* 40 (2), 322–331.
- Sage, T. L., Sage, R. F., Apr 2009. The functional anatomy of rice leaves: implications for refixation of photorespiratory CO₂ and efforts to engineer C₄ photosynthesis into rice. *Plant Cell Physiol* 50 (4), 756–772.
- Salinas J, S.-S. J., 2006. *Arabidopsis Protocols*, 2nd Edition. Vol. 323 of *Methods in Molecular Biology*. Humana Press.
- Samaj, J., Peters, M., Volkmann, D., Baluska, F., May 2000. Effects of myosin ATPase inhibitor 2,3-butanedione 2-monoxime on distributions of myosins, F-actin, microtubules, and cortical endoplasmic reticulum in maize root apices. *Plant Cell Physiol* 41 (5), 571–582.
- Sambrook, J., William, D., Maniatis, T., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Vol. Volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sattarzadeh, A., Krahmer, J., Germain, A. D., Hanson, M. R., Nov 2009. A myosin XI tail domain homologous to the yeast myosin vacuole-binding domain interacts with plastids and stromules in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant* 2 (6), 1351–1358.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M., Wisman, E., Jan 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13 (1), 113–123.
- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., Paul, M., May 2003. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (11), 6849–6854.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M., Smeekens, S., Jun 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol* 135 (2), 879–890.
- Schmelzer, E., Sep 2002. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends Plant Sci* 7 (9), 411–415.
- Schmitt, M. R., Hitz, W. D., Lin, W., Giaquinta, R. T., Aug 1984. Sugar transport into protoplasts isolated from developing soybean cotyledons : II. sucrose transport kinetics, selectivity, and modeling studies. *Plant Physiol* 75 (4), 941–946.
- Scott, I., Sparkes, I. A., Logan, D. C., Sep 2007. The missing link: inter-organellar connections in mitochondria and peroxisomes? *Trends Plant Sci* 12 (9), 380–1; author reply 381–3.
- Senthil-Kumar, M., Hema, R., Anand, A., Kang, L., Udayakumar, M., Mysore, K. S., 2007. A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytologist* 176 (4), 782–791.
- Sheahan, M. B., McCurdy, D. W., Rose, R. J., Dec 2005. Mitochondria as a connected population: ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell dedifferentiation through massive mitochondrial fusion. *Plant J* 44 (5), 744–755.
- Sheahan, M. B., Rose, R. J., McCurdy, D. W., Feb 2004a. Organelle inheritance in plant cell division: the actin cytoskeleton is required for unbiased inheritance of chloroplasts, mitochondria and endoplasmic reticulum in dividing protoplasts. *Plant J* 37 (3), 379–390.
- Sheahan, M. B., Staiger, C. J., Rose, R. J., McCurdy, D. W., Dec 2004b. A green fluorescent protein fusion to actin-binding domain 2 of *Arabidopsis* fimbrin highlights new features of a dynamic actin cytoskeleton in live plant cells. *Plant Physiol* 136 (4), 3968–3978.

- Sinclair, A. M., Trobacher, C. P., Mathur, N., Greenwood, J. S., Mathur, J., Jul 2009. Peroxule extension over er-defined paths constitutes a rapid subcellular response to hydroxyl stress. *Plant J* 59 (2), 231–242.
- Sinha, A. K., Hofmann, M. G., Römer, U., Köckenberger, W., Elling, L., Roitsch, T., Apr 2002. Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiol* 128 (4), 1480–1489.
- Sivitz, A. B., Reinders, A., Johnson, M. E., Krentz, A. D., Grof, C. P. L., Perroux, J. M., Ward, J. M., 2007. Arabidopsis sucrose transporter atsuc9. high-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. *Plant Physiology* 143 (1), 188–198.
- Sivitz, A. B., Reinders, A., Ward, J. M., Oct 2005. Analysis of the transport activity of barley sucrose transporter hvsut1. *Plant Cell Physiol* 46 (10), 1666–1673.
- Smith, A. M., Stitt, M., Sep 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* 30 (9), 1126–1149.
- Sogin, M. L., Silberman, J. D., Jan 1998. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int J Parasitol* 28 (1), 11–20.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A., Perata, P., Feb 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in arabidopsis. *Plant Physiol* 140 (2), 637–646.
- Suarez-Rodriguez, M. C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S. H., Jester, P. J., Zhang, S., Bent, A. F., Krysan, P. J., Feb 2007. Mek1 is required for flg22-induced mpk4 activation in arabidopsis plants. *Plant Physiol* 143 (2), 661–669.
- Takemoto, D., Jones, D. A., Hardham, A. R., Feb 2003. Gfp-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of arabidopsis by oomycete pathogens. *Plant J* 33 (4), 775–792.
- Tirlapur, U. K., Dahse, I., Reiss, B., Meurer, J., Oelmüller, R., 1999. Characterization of the activity of a plastid-targeted green fluorescent protein in arabidopsis. *European Journal Of Cell Biology* 78 (4), 233–240.
- Usadel, B., Bläsing, O. E., Gibon, Y., Retzlaff, K., Höhne, M., Günther, M., Stitt, M., Apr 2008. Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in arabidopsis rosettes. *Plant Physiol* 146 (4), 1834–1861.
- van Bentem, S. F., Hirt, H., Sep 2007. Using phosphoproteomics to reveal signalling dynamics in plants. *Trends Plant Sci* 12 (9), 404–411.
- Vleeshouwers, V. G., van Dooijeweert, W., Govers, F., Kamoun, S., Colon, L. T., May 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210 (6), 853–864.
- Wang, Y., Weathers, P. J., Jul 2007. Sugars proportionately affect artemisinin production. *Plant Cell Rep* 26 (7), 1073–1081.
- Waters, M. T., 2004. Plastid tubules in higher plants: An analysis in form and function. Dissertation University of Nottingham.
- Waters, M. T., Fray, R. G., Pyke, K. A., Aug 2004. Stromule formation is dependent upon plastid size, plastid differentiation status and the density of plastids within the cell. *Plant J* 39 (4), 655–667.
- Weber, A. P. M., Jun 2004. Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. *Curr Opin Plant Biol* 7 (3), 247–253.
- Weber, A. P. M., Fischer, K., May 2007. Making the connections—the crucial role of metabolite transporters at the interface between chloroplast and cytosol. *FEBS Lett* 581 (12), 2215–2222.

18. Literaturverzeichnis

- Weber, A. P. M., Fischer, K., 2009. The role of metabolite transporters in integrating chloroplasts with the metabolic network of plant cells. *Plant Cell Monographs* 13-2009, 159–180.
- Wege, S., Scholz, A., Gleissberg, S., Becker, A., Sep. 2007. Highly efficient virus-induced gene silencing (vigs) in california poppy (*eschscholzia californica*): An evaluation of vigs as a strategy to obtain functional data from non-model plants. *Annals Of Botany* 100 (3), 641–649.
- Wikipedia, 2010. Plastid — wikipedia, die freie enzyklopädie. [Online; Stand 14. März 2010].
URL <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Plastid&oldid=71220086>
- Wildman, S. G., Hongladarom, T., Honda, S. I., Oct 1962. Chloroplasts and mitochondria in living plant cells: Cinephotomicrographic studies. *Science* 138 (3538), 434–436.
- Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T., Aeschbacher, R. A., 2000. Trehalose induces the adp-glucose pyrophosphorylase gene, *apl3*, and starch synthesis in *arabidopsis*. *Plant Physiology* 124 (1), 105–114.
- Wingler, A., Roitsch, T., Sep 2008. Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biol (Stuttg)* 10 Suppl 1, 50–62.
- Yamada, S., Sonobe, S., Shimmen, T., Nov 2003. Synthesis of a callosic substance during rhizoid differentiation in *spirogyra*. *Plant Cell Physiol* 44 (11), 1225–1228.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57, 781–803.
- Zipfel, C., Feb 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* 20 (1), 10–16.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T., Felix, G., May 2006. Perception of the bacterial pamp ef-tu by the receptor efr restricts agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125 (4), 749–760.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., Boller, T., Apr 2004. Bacterial disease resistance in *arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428 (6984), 764–767.
- Zubko, M. K., Day, A., Jul 1998. Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome-free plastid inheritance. *Plant J* 15 (2), 265–271.

19. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional	igfGFP	invertierte Graustufenfluoreszenz von GFP
3-OMG	3-Oxomethyl-Glukose	Inv	Invertase
3-OMG-6P	3-Oxo-Methyl-Glukose-6-Phosphat	Ks	Keimschläuche
35S	viraler Promotor aus dem Tabakmosaikvirus	KO-Mutante	knock-out-Mutante
3D	dreidimensional	LBA4404	ein Agrobacteriumstamm
70S-Translation	Translation der 70S Ribosomen	LSM	Laser Scanning Mikroskop
80S-Translation	Translation der 80S Ribosomen	Malt	Maltose
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MAP	mitogen-activated protein
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	MAPK	mitogen-activated protein kinase
ABA	Abscisic acid	MLU	Martin-Luther-Universität
Abb.	Abbildung	MS Medium	Murashige und Skoog Medium
ADP / ATP	Adenosindiphosphat / Adenosintriphosphat	MW	Mittelwert
Agro.	Agrobacterium	N-Terminus	Amino-Terminus
AIM	Agrobacterium-Infiltrationsmedium	<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Ap	Appressorium	<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
APW	artificial pond water	OD	optische Dichte
BDM	2,3-Butanedion-Monoxim	ORF	open reading frame
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	P	Plastid
CCD-Kameras	Charge-coupled Device Kamera	p-Wert (p)	Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert
cDNA	complementary DNA	<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
CHX	Cycloheximid	PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern
CLSM	confocal laser scanning microscopy	PFA	Paraformaldehyd
CP	chloroplast protrusions	PG	Plastoglobuli
CRA208	Bbezeichnet ein Isolat von <i>P. infestans</i>	Pi	anorganisches Phosphat
CWI	cell wall invertase	Pp	Papillen
CWInv	cell wall invertase	PTGS	Post-transcriptional gene silencing
Cy	Zyste	R ²	Bestimmtheitsmaß, Determinationskoeffizient

19. Abkürzungsverzeichnis

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	RNA	ribo nucleic acid
dest.	destilliert	Sacch.	Saccharose
DIC	Differenzieller Interferenz Kontrast	Senesz.	Seneszenz
DMSO	Dimethylsulfoxid	SH	Stromulihäufigkeit
DNA	desoxy nucleic acid	SP	Stromulidichte
dsRed	rot fluoreszierendes Fluoreszenzprotein von <i>Discosoma</i> sp.	St	Stärke
dsRNA	double-stranded RNA	Stabw	Standardabweichung
<i>E. cichoracearum</i>	<i>Erysiphae cichoracearum</i>	Sthy	Stromathylakoide
<i>E. coli</i>	<i>Echerischia coli</i>	T-6-P	Trehalose-6-Phosphat
<i>E. cruciferarum</i>	<i>Erysiphae cruciferarum</i>	T-DNA	Transfer DNA
EDOF	extended depth of focus	TEM	Transmissions Elektronen Mikroskopie
EFTu	elongation factor thermo unstable	Ti-Plasmid	Tumor induzierender Plasmid
Ep	envelope protrusions	TPP	Trehalosephosphatphosphatase
ER	Endoplasmatisches Retikulum	TPS	Trehalosephosphatsynthase
et al.	und andere	tRNA	transfer RNA
flg22	22 Aminosäuren langes Peptid aus einem konservierten Bereich des Flagellin	TRV	tobacco rattle virus
FNR-EGFP	N-terminales Fusionsprotein aus dem Transitpeptid der Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase und dem enhanced green flurescent protein	TRV1	tobacco rattle virus RNA 1
FP	Fluoreszenzprotein	TRV2	tobacco rattle virus RNA 2
FRAP	Fluoreszenz Recovery After Photobleaching	tzs	trans zeatin synthase
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer	UTR	untranslated region
Fru	Fruktose	VIGS	virus induced gene scilencing
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	Vorbeh.	Vorbehandlung
Glu	Glukose	WT	Wildtyp
GRAM-domain	Proteindomäne, die in einigen membranassoziierten Proteinen, wie Glycosyltransferase gefunden wurde.	YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
Gthy	Granathylakoide	ZellAo	Zelloberfläche
H	Haustorien	ZK	Zellkern
HexT	Hexosetransporter		
HR	Hypersensitive Reaktion		
Hxk	Hexokinase		

Abbildungsverzeichnis

1.1. Einleitung - Plastidentypen höherer Pflanzen und Bild eines Stromulus	4
1.2. Einleitung - Modelle zur Stromulibildung und Stromuli in <i>N. benthamiana</i>	5
3.1. Ergebnisse - Laubblattquerschnitt und Blattrosette von <i>A. thaliana</i>	15
3.2. Ergebnisse - Stromuliklassen und deren absolute Häufigkeiten	17
3.3. Ergebnisse - Zellgrößenverteilung	19
3.4. Ergebnisse - mittlere Plastidenzahl pro Zelle	20
3.5. Ergebnisse - mittlere Plastidengröße	21
3.6. Ergebnisse - Häufigkeitsverteilung bestimmter Stromulizahl pro Zelle	22
3.7. Ergebnisse - Zellen mit Stromuli abh. von Plastidenzahl und Zellengröße	23
3.8. Ergebnisse - Stromulilängen in verschiedener Größenklassen	24
3.9. Ergebnisse - Relative Lage von Plastiden und Stromuli zum Zellkern	26
3.10. Ergebnisse - Entfernung stromulitrager Plastiden vom Zellkern	28
4.1. Ergebnisse - Formeln der zu Induktionsversuchen eingesetzten Zucker	31
4.2. Ergebnisse - Durchführung der Experimente	33
4.3. Ergebnisse - Einfluss der Probenpräparation und des Infiltrationsmediums	35
4.4. Ergebnisse - Saccharose, Sorbitol und Mannitol	39
4.5. Ergebnisse - Konzentrationsabhängigkeit der Induktion	40
4.6. Ergebnisse - Palatinose, Turanose und Leucose	44
4.7. Ergebnisse - Fruktose, Glukose und 3-O-Methyl-Glukose	50
4.8. Ergebnisse - Disaccharide der Glukose	53
4.9. Ergebnisse - Trehalose	55
4.10. Ergebnisse - Saccharose, Glukose, Sorbitol und APW auf Chloroplasten	58
4.11. Ergebnisse - Wirkung von Saccharose auf Chloroplasten von <i>N. benthamiana</i>	60
4.12. Ergebnisse - Modell zur von Zuckern abhängigen Stromuliinduktion	63
4.13. Ergebnisse - TEM von Laubblätter	64
5.1. Ergebnisse - Einfluss des Lichtrhythmus auf die Stromulihäufigkeit	69
6.1. Ergebnisse - Wirkung von Trockenstress auf die Stromuli	76
7.1. Ergebnisse - Lebenszyklus von <i>P. infestans</i>	78
7.2. Ergebnisse - 2 h, 4 h und 6 h nach Infektion mit <i>P. infestans</i>	79
7.3. Ergebnisse - 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Infektion mit <i>P. infestans</i>	81
7.4. Ergebnisse - Stromulihäufigkeit nach <i>P. infestans</i> Infektion	82
7.5. Ergebnisse - Stromuli während <i>E. cruciferarum</i> Besiedelung	85
7.6. Ergebnisse - Stärkenachweis in <i>E. cruciferarum</i> befallenen Blättern	87
7.7. Ergebnisse - Induktionen mit flg22	91
7.8. Ergebnisse - Stromuliinduktion durch GV3101::pMP90	95
7.9. Ergebnisse - Stromuliinduktion abhängig vom <i>Agro.</i> Stamm - Bilder	96
7.10. Ergebnisse - Stromuliinduktion abhängig vom <i>Agro.</i> Stamm - Diagramme	98
7.11. Ergebnisse - <i>Agrobacterium</i> induzierte Stärkeakkumulation (makroskopisch)	99
7.12. Ergebnisse - <i>Agrobacterium</i> induzierte Stärkeakkumulation (mikroskopisch)	102
7.13. Ergebnisse - Makroskopisch sichtbare Reaktion auf <i>Agrobacterium</i>	103

Abbildungsverzeichnis

7.14. Ergebnisse - Ablauf des <i>virus induced gene silencing</i> Screens	108
7.15. Ergebnisse - VIGS Quantifizierung	109
8.1. Ergebnisse - Inhibierung der 70S-Translation	114
8.2. Ergebnisse - Inhibierung der 80S-Translation	116
8.3. Ergebnisse - Inhibierung der Myosinaktivität	118
8.4. Ergebnisse - Inhibierung der Myosinaktivität - Modell	120
10.1. Diskussion - Volumensverlust bei gleich bleibender Oberfläche	129
10.2. Diskussion - Modell zu den physikalischen Konsequenzen eines Stromulus	130
10.3. Diskussion - Plastiden und Stromuli am Zellkern	133
10.4. Diskussion - Plastiden in der oberen Epidermis von <i>A. thaliana</i>	135
10.5. Diskussion - Plastiden und Stromuli nach 2h Induktion	135
10.6. Diskussion - Zellkernassoziation von Plastiden mit und ohne Stromuli	136
11.1. Diskussion - Phylogenetischer Stammbaum der grünen Pflanzen	139
12.1. Diskussion - Modell zur Stromuliinduktion in <i>A. thaliana</i>	141
16.1. MuM - Mikroskopische Methoden - Erhobene Lageparameter	156
16.2. MuM - Pflanzenmethoden - Längen- und Breitenindex	159

Tabellenverzeichnis

7.1. Ergebnisse - Eigenschaften der cDNA Bank für den VIGS-Screen	106
7.2. Ergebnisse - VIGS identifizierte cDNA-Klone	107
15.1. MuM - Chemikalien - Zucker	148
15.2. MuM - Chemikalien - Inhibitoren	148
15.3. MuM - Mikroskopische Methoden - Farbstoffe	149
15.4. MuM - Molekularbiologische Kits	149
15.5. MuM - Vektoren	149
15.6. MuM - Bakterien - Bakterienstämme	150
15.7. MuM - Bakterien - Kulturmedien	150
15.8. MuM - Bakterien - Antibiotika	150
15.9. MuM - Bakterien - Lagermedium	151
15.10 MuM - Pflanzenmaterial - Pflanzenlinien	151
15.11 MuM - Mikroskopische Methoden - Hardware/Settings	152
15.12 MuM - Mikroskopische Methoden - sonst. Software	152
16.1. MuM - Pflanzenmethoden - AIM	153
16.2. Ergebnisse - Charakterisierungsdaten	155
16.3. MuM - Pflanzenmethoden - Längen- und Breitenindex	157