

**Reaktionsketten in Zellkulturen von  
*Arabidopsis thaliana*, ausgelöst durch den  
gereinigten Proteinelicitor PaNie aus  
*Pythium aphanidermatum*.**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

**Jörg M. Wörle**  
aus Neuss am Rhein

2004

Tag der mündlichen Prüfung:

19. Dezember 2003

Dekan:

Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.U. Seitz

2. Berichterstatter

Prof. Dr. C. Oecking

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Grundlegende Erläuterungen .....	7
1.2	Pflanze-Pathogen Interaktion.....	8
1.3	Elicitoren.....	9
1.4	Präformierte Abwehr .....	11
1.5	Induzierte Abwehr und Hypersensitive Reaktion (HR).....	11
1.6	Induzierte Abwehr und Systemisch Erworbene Resistenz (SAR).....	13
1.7	Intra- und interzelluläre Signalweiterleitung .....	14
1.8	Das Modellsystem aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und dem Elicitor PaNie aus Pythium aphanidermatum .....	16
1.9	Zielsetzungen dieser Arbeit .....	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Elicitor .....	21
2.2	Pflanzliche Zellkulturen.....	21
2.3	Pflanzen .....	21
2.4	Bestimmung des gepackten Zellvolumens .....	22
2.5	Elicitorinduzierter Zelltod.....	22
2.5.1	Vitalitätsnachweis mittels Tetrazolium-Test .....	22
2.5.2	Nekrosen in Blättern von <i>A. thaliana</i> .....	23
2.6	Camalexin Isolierung aus Zellsuspension von <i>A. thaliana</i> .....	23
2.6.1	Nachweis des Camalexin über Dünnschichtchromatographie.....	24
2.6.2	Nachweis einer Alkalisierung des Kulturmediums durch Elicitierung mit PaNie .....	24
2.7	Bestimmung des Salicylsäuregehaltes im Medium .....	25
2.7.1	Extraktion von Salicylsäure aus dem Kulturmedium .....	25
2.7.2	Nachweis der Salicylsäure über HPLC.....	25
2.8	Nukleinsäurepräparation.....	26
2.8.1	Isolierung von gesamt RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA .....	27
2.8.3	Quantifizierung der Nukleinsäuren.....	27
2.8.3.1	Quantifizierung im Gel .....	27
2.8.3.2	Photometrische Quantifizierung der gesamt RNA .....	27
2.8.4	Elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren .....	27
2.8.4.1	DNA-Auftrennung über nicht denaturierende-Agarosegele.....	27
2.8.4.2	RNA-Auftrennung über denaturierende Agarosegele .....	28
2.8.4.3	Elution der Nukleinsäure aus Agarosegelen.....	28
2.9	Northern-Blot Analysen.....	28
2.9.1	Blotten der aufgetrennten RNA .....	28
2.9.2	Radioaktive Markierung der Sonden .....	29
2.9.3	Hybridisierung .....	29
2.9.4	Detektion.....	29
2.10	Genspezifische DNA Amplifikation.....	30
2.10.1	Primer.....	30
2.10.2	PCR Reaktion .....	30
2.11	Klonierung der PCR-Fragmente .....	31
2.11.1	Ligation.....	31
2.11.2	Transformation.....	31

2.12	Sequenzierung.....	31
2.12.1	Sequenzreaktion.....	31
2.12.2	Industrielle Sequenzierung .....	32
2.13	Ionenchromatographie .....	33
2.13.1	Anionenanalyse.....	33
2.13.2	Kationenanalyse.....	33
2.14	Gaschromatographischer Nachweis der Ethylenakkumulation .....	34
2.14.1	Gaschromatographischer Nachweis der Ethylen-akkumulation im Gasraum einer Zellkultur von <i>A. thaliana</i> .....	34
2.14.2	Messbedingungen .....	34
2.14.3	Identifizierung und Quantifizierung von Ethylen.....	35
2.15	Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS: reactive oxygen species).....	35
2.16	Kalloseablagerungen.....	35
2.17	Durchmusterung einer T-DNA Insertions Linie.....	36
2.17.1	Selektive Anzucht in BM-PaNie Medium.....	36
2.17.2	Auswahl der selektiv angezogenen Pflanzen.....	36
2.17.3	Jack T-DNA Insertionslinie .....	36
2.17.4	Sterilisation der Jack T-DNA Linien .....	37
2.17.5	Isolation von genomischer DNA aus den T-DNA Linien .....	37
2.17.6	Tail-PCR auf der genomischen DNA der T-DNA Linien .....	38
2.17.7	Abgleich der Sequenzdaten mit einer Gendatenbank.....	38
2.18	Alternative PaNie Sequenzen aus verschiedenen Pythiaceen.....	39
2.19	Abkürzungen.....	40
2.20	Puffer, Lösungen und Medien .....	41
2.21	Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	42
3	Ergebnisse .....	43
3.1	Abwehrreaktionen der pflanzlichen Zellkultur.....	43
3.1.1	Wachstumsverlauf einer <i>A. thaliana</i> Zellkultur nach Subkultivierung ...	43
3.1.2	Vitalitätstest mit der MTT-Methode.....	44
3.1.3	Vitalitätsverlust unter konstantem pH-Wert.....	45
3.1.4	Vitalitätsverlust nach Elicitierung unter Hemmstoffeinfluss.....	46
3.1.5	Einfluss von G-Protein Aktivatoren und Inaktivatoren auf den Zelltod.	48
3.1.6	Elicitor-induzierter Vitalitätsverlust in Zellkultur von <i>Panicum maximum</i> 49	49
3.2	Alkalisierung des Kulturmediums bei Elicitorkontakt .....	50
3.2.1	Alkalisierung des Kulturmediums durch Elicitierung mit PaNie .....	50
3.2.2	Alkalisierung des Kulturmediums nach Vorbehandlung mit Salicylsäure 51	51
3.2.3	Inhibition der Alkalisierung durch gepuffertes Kulturmedium .....	52
3.2.4	Einfluss von Hemmstoffen auf die Alkalisierung des Außenmediums..	53
3.2.5	Alkalisierungsreaktionen einer Zellkultur von <i>P. maximum</i> .....	56
3.2.6	Alkalisierungsreaktion nach G-Protein Aktivierung oder Inaktivierung	57
3.3	Induktion der Camalexinakkumulation durch Elicitierung .....	58
3.3.1	Camalexinakkumulation in Zellkulturen von <i>A. thaliana</i> .....	58
3.3.2	Camalexininduktion durch pH-Wert Erhöhung.....	59
3.3.3	Camalexinproduktion nach Zugabe von Hemmstoffen der Signaltransduktionskette.....	60
3.3.4	Inhibition der Camalexinakkumulation durch Pufferung der Mediums.	62
3.4	Salicylsäure.....	63

3.4.1	Salicylsäure in Zellkulturen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	63
3.4.2	Salicylsäureakkumulation unter Hemmstoffeinfluss .....	64
3.5	Northern Blot Analyse .....	65
3.6	Ionenchromatographie zum Nachweis von Ionenverschiebungen .....	67
3.6.1	Anionenanalyse .....	67
3.6.2	Kationenanalyse .....	68
3.7	Ethylen .....	69
3.7.1	Ethylen in Zellkulturen von <i>A. thaliana</i> .....	69
3.7.2	Ethylen in Zellkulturen von <i>A. thaliana</i> unter konstantem pH .....	70
3.7.3	Ethylen in Zellkulturen von <i>A. thaliana</i> unter Hemmstoffeinfluss .....	71
3.8	Abwehrreaktionen in Pflanzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	72
3.8.1	Reaktive Sauerstoff Spezies .....	72
3.9	Callose .....	73
3.10	Zelltod im Mesophyllgewebe von <i>A. thaliana</i> .....	75
3.11	Ethylen in Blättern von <i>A. thaliana</i> .....	77
3.12	Identifikation von Elicitor Erkennungsmutanten in einer <i>A. thaliana</i> T-DNA Insertions Mutanten Linie .....	77
3.12.1	Selektive Anzucht in BM-PaNie Medium .....	77
3.12.2	Lokalisation der T-DNA Insertionen im Genom von <i>A. thaliana</i> .....	79
3.12.3	Charakterisierungen des Phänotyps der Mutanten .....	80
3.13	PCR-Screen nach Sequenzen aus verschiedenen Pythiaceen Arten .....	80
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>82</b>
4.1	PaNie aus <i>Pythium aphanidermatum</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> eine Nicht- Wirtsbeziehung .....	82
4.2	Das gereinigte Elicitorprotein PaNie .....	82
4.3	Hypersensitive Reaktionen im Modellsystem .....	83
4.3.1	Programmierter Zelltod in Zellkulturen und <i>in planta</i> .....	83
4.3.2	Programmierter Zelltod und die Bedeutung des pH in der HR .....	83
4.3.3	Programmierter Zelltod, die Bedeutung der reaktiven Sauerstoffspezies, des Calciumeinstroms und der translationalen Aktivität der Zellen .....	84
4.3.4	Programmierter Zelltod, ein Signalweg über G-Proteine .....	85
4.4	Alkalisierung des Kulturmediums auf Elicitorkontakt .....	86
4.4.1	Alkalisierung einer <i>Arabidopsis</i> Zellkultur nach PaNie Kontakt .....	86
4.4.2	Alkalisierung einer <i>Arabidopsis</i> -Zellkultur nach Kontakt mit PaNie und Salicylsäure-Vorbehandlung .....	86
4.4.3	Alkalisierung einer gepufferten Zellkultur von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Kontakt mit PaNie .....	87
4.4.4	Alkalisierung einer Zellkultur von <i>Arabidopsis</i> nach Kontakt mit PaNie und Hemmstoff Vorbehandlung .....	88
4.4.5	Alkalisierung einer Zellkultur von <i>Arabidopsis</i> nach Kontakt mit PaNie und Vorbehandlung mit G-Protein-Hemmstoffen .....	89
4.5	Das Phytoalexin Camalexin .....	89
4.5.1	Camalexin in elicitorbehandelten Zellkulturen von <i>A. thaliana</i> .....	89
4.5.2	Camalexin unter erhöhtem pH-Wert .....	90
4.5.3	Camalexinakkumulation bei konstantem pH-Wert .....	90
4.5.4	Camalexin und die Bedeutung der ROS, des Calciumeinstroms und der Proteinneusynthese .....	91
4.6	Salicylsäure .....	92
4.6.1	Salicylsäurenachweis in Zellkulturen von <i>Arabidopsis</i> .....	92

4.6.2	Salicylsäureakkumulation unter Hemmstoffeinfluss .....	93
4.7	Analyse von elicitorinduzierten Abwehrgenen.....	94
4.8	Ionenanalyse .....	95
4.8.1	Anionenanalyse nach Elicitierung mit PaNie .....	95
4.8.2	Kationenanalyse nach Elicitierung mit PaNie .....	96
4.9	Gaschromatographischer Nachweis der Ethylenakkumulation nach Elicitorapplikation .....	96
4.9.1	Ethylenakkumulation in einer <i>Arabidopsis thaliana</i> –Zellkultur nach Elicitierung.....	96
4.9.2	Ethylenakkumulation bei konstantem pH-Wert in Zellkulturen von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Elicitierung.....	97
4.9.3	Hemmstoffwirkungen auf die Ethylenakkumulation in Zellkulturen von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Elicitierung .....	98
4.10	Reaktive Sauerstoff Spezies.....	98
4.11	Abschottung des infiltrierten Gewebes mit Callose .....	99
4.12	Identifikation von Elicitor-Erkennungsmutanten aus einer T-DNA Insertions Mutanten Linie.....	100
4.13	Der Elicitor PaNie im evolutionären Kontext.....	100
4.14	Elicitorwirkung auf <i>Panicum maximum</i> .....	101
5	Zusammenfassung.....	102
6	Literatur.....	104
	Lebenslauf .....	120

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlegende Erläuterungen

Säugetiere besitzen ein lymphatisches System welches für Abwehrreaktionen gegen Pathogene verantwortlich ist. Als Reaktion auf Befall mit Pathogenen (Viren, Bakterien oder Pilze) werden von den betroffenen Zellen Zytokine ausgeschüttet, welche die Signalübermittlung koordinieren und die Immunantwort den Bedürfnissen des Organismus anpassen (Hick und Hick, 2000). Pflanzen verfügen nicht über ein derartiges System der Immunabwehr, deshalb reagiert im pflanzlichen Organismus jede einzelne Zelle auf ein Pathogen. Pflanzen sind, wie alle Organismen, ständig sich verändernden Umwelteinflüssen ausgesetzt, auf die sie reagieren müssen. Hierfür sind sie, wie auch tierische Organismen, mit Sensoren ausgestattet, mit denen die für sie relevanten Umweltparameter erfasst werden können. Nachgeschaltete Signalverarbeitungssysteme, durch die Informationen ausgewertet und gewertet werden, vermitteln diese an Effektorstrukturen, welche wiederum Antwortprogramme aktivieren, die es einer Pflanze ermöglichen, selbst unter Extrembedingungen zu überleben (Ryals *et al.*, 1996; Pennell und Lamb, 1997; Cosgrove *et al.*, 2000). Der Befall einer Pflanze mit pathogenen Mikroorganismen stellt beispielsweise eine derartige Extremsituation dar. Der Eingriff in den pflanzlichen Stoffwechsel, der einen Verlust von Nährstoffen und Metaboliten zur Folge hat, führt zur Schwächung des gesamten Organismus. Durch die Produktion von Toxinen seitens phytopathogener Bakterien, Pilze oder Viren kann eine Verzögerung des Wachstums und der Entwicklung, schlimmstenfalls der Tod der befallenen Pflanze eintreten. Im Gartenbau sind Nutzpflanzen einem hohen Infektionsdruck ausgesetzt; da hierdurch eine Adaptation von Schadorganismen begünstigt wird und die Monokulturen gegenüber den Wildtypen meist eine geringere Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten besitzen. Die Pflanzen in Monokultur verfügen dennoch über eine Grundresistenz, die sich auf induzierbare sowie präformierte Abwehrmechanismen stützt (Kombrink und Somssich, 1995; Prell, 1996) was

sie gegen einen Befall durch die meisten möglichen Phytopathogene resistent macht. Diese Schutzmechanismen können mechanischer oder chemischer Art sein und sowohl konstitutiv als auch induziert auftreten. Die pflanzliche Zellwand, die Kutikula auf Blättern und Sprossen oder Suberinlamellen in der Endodermis bilden eine Barriere, durch die das Eindringen von Mikroorganismen in die Pflanze (Ride, 1983) erheblich erschwert wird. Antimikrobielle Produkte des Sekundärstoffwechsels, die in der Vakuole gespeichert werden und erst durch den Befall mit Pathogenen freigesetzt werden, unterdrücken mikrobielles Wachstum (Mansfield, 1983; Maher *et al.*, 1994; Osbourn, 1996). Für die zukünftige Etablierung neuer Methoden zur Pathogenbekämpfung und Entwicklung dauerhaft resistenter Nutzpflanzen ist daher ein vollständiges Verständnis der Abwehrreaktionen der Pflanze von großem Interesse.

## **1.2 Pflanze-Pathogen Interaktion**

*Pythium aphanidermatum*, das zu den so genannten falschen Mehltauen (Peronosporales) gehört, ist unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten sehr bedeutsam; der Befall verursacht vor allem bei Gewächshauskulturen immense Ernteverluste. Dieser Oomycet ist weltweit verbreitet, kommt im Boden vor und stellt im kommerziellen Pflanzenbau in Gewächshäusern ein Problem dar. *Pythium aphanidermatum* verursacht die so genannte Umfallkrankheit bei Keimlingen der Erbse und in vielen Kürbisgewächsen (Herrero *et al.*, 2003). Für diesen wohl potentesten Erreger von Pflanzenkrankheiten aus der Ordnung Pythiales sind 367 Wirte beschrieben (Farr *et al.*, 2003). Im Vergleich dazu kommt *Pythium monospermum* mit zehn Wirten und *Pythium middletonii* mit zweiundzwanzig beschriebenen Wirten eine wirtschaftlich untergeordnetere Rolle zu. Obwohl es zwischen Pflanze und einer Vielzahl von Pathogenen täglich zum Kontakt kommt, ist eine erfolgreiche Infektion eher die Ausnahme als die Regel. Durch Aktivierung einer Hypersensitiven Reaktion (HR) ist es der Pflanze meist möglich, selbst nach Penetration durch das Pathogen die Ausbreitung zu verhindern. Unter dem Begriff der Hypersensitiven Reaktion werden alle lokalen, auf die Infektionsstelle begrenzten Abwehrreaktionen der Pflanze

zusammengefasst, dies hat zur Festlegung allgemein anerkannter Merkmale geführt (Greenberg, 1997; Hutcheson, 1998). Im Gegenzug ist hierbei die Systemische Erworbene Resistenz (SAR: systemic acquired resistance) zu nennen (Ryals *et al.*, 1996), welche unabhängig von der Infektionsstelle ebenfalls definierte, allgemein anerkannte Merkmale zeigt.

### **1.3 Elicitoren**

Als Elicitoren bezeichnet man heute Substanzen, die in der Pflanze spezifische Abwehrreaktion auslösen (Keen und Brügger, 1977; Ebel und Scheel, 1997; McDowell und Dangl, 2000; Shirasu und Schulze-Lefert, 2000). Früher wurde dieser Begriff auf solche Verbindungen beschränkt, die in der Lage waren, die Akkumulation von Phytoalexinen anzuregen (Keen *et al.*, 1975). Elicitoren können verschiedenen Stoffklassen angehören, darunter sind Peptide, Glykoproteine, Lipide und Oligosaccharide (Ebel und Cosio, 1994). Sie können entweder einen Teil des Pathogens sein, in diesem Fall spricht man von exogenen Elicitoren, oder entstehen beim hydrolytischen Abbau der pflanzlichen Zellwand durch Mikroben und werden in diesem Fall als endogene Elicitoren bezeichnet. Beiden Typen von Elicitoren ist gemeinsam, dass sie neben einer generellen, auch eine sehr spezifische Antwort in der Pflanze auslösen (Boller, 1995; de Witt, 1995; Ebel und Scheel, 1997). Für die Auslösung von Resistenzreaktionen ist bereits eine niedrige Konzentration (1-10 nM) dieser Signalmoleküle (Elicitoren) ausreichend. Neben einem aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* isolierten Proteinelicitor (Harpin), durch welchen Zelltod induziert wird (Wei *et al.*, 1992; He *et al.*, 1993) und Flagellin (Felix *et al.*, 1999), welches die Hauptkomponente der bakteriellen Geißel ausmacht, wurden überwiegend Elicitoren aus Pilzen und Oomyceten identifiziert (Elicitine, PaNIE, NPP1, PEP13). Endogene Elicitoren (Ryan und Farmer, 1991; Cervone *et al.*, 1997, Churngchow und Rattarasarn, 2000) entstehen, wenn ein Pathogen mit Hilfe hydrolytischer Enzyme die Zellwand der Pflanze aufzulösen beginnt, um in die Zelle einzudringen. Hierbei werden Oligosaccharide als Abbauprodukte der Zellwand freigesetzt. Die Pflanze ist in der Lage, diese

Fragmente ihrer eigenen Zellwand zu erkennen und beginnt unter anderem Chitinasen freizusetzen. Diese greifen an der Zellwand der Pilze an (Kombrink und Somssich, 1997) und setzen dadurch  $\beta$ -Glucane frei, welche wiederum als Elicitoren fungieren. Für einen Großteil der beschriebenen exogenen Elicitoren gibt es keine zugeordnete Funktion, ihre Wirkungsweise für die Pathogenabwehr und ihre Bedeutung für den kodierenden Organismus ist mit Ausnahme des Flagellins nicht bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass die Elicitoren von Genen kodiert werden, die für Produkte kodieren die an der Quervernetzung von Zellwandbestandteilen der Oomyceten beteiligt sind (Romanski, 2001; Brunner *et al.*, 2002).

Die hier beschriebenen Elicitoren bilden strukturell eine große heterogene Gruppe. Sie lassen sich in zwei Unterklassen unterteilen: die generellen Elicitoren, welche annähernd von allen Pflanzen erkannt werden und eine Pathogenabwehr induzieren und die rassenspezifischen Elicitoren, die lediglich durch spezielle Kultivare der Pflanze erkannt werden und deren Abwehr aktivieren. Die durch beide Elicitortypen ausgelöste pflanzliche „Immunantwort“ ist in ihrer Ausprägung nicht zu unterscheiden. Der einzige Unterschied besteht darin, dass die generellen Elicitoren mehr oder weniger von jeder Pflanze erkannt und das Pathogen nach der Erkennung bekämpft wird. Wo hingegen der rassenspezifische Elicitor nur von einem speziellen Kultivar erkannt und bekämpft wird. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel rassenspezifischer Resistenz stellt das *avr9/cf9* System aus dem Pathogen *Cladosporium fulvum* (*avr9*) und Tomate (*cf9*) dar. Das Pathogen kodiert hierbei für ein Avirulenzgenprodukt (Elicitor) und die Pflanze für ein Resistenzgenprodukt in Form eines Rezeptors (Keen, 1992; Joosten *et al.*, 1994). Diese Gen-für-Gen Interaktion geht auf eine These von Flor (1947) zurück und ist als Modell auf andere Systeme, wie Tabak (Romeis *et al.* 2000) übertragbar. Transgene Tabakpflanzen kodieren für das R-Gen, und können damit ein Pathogen erkennen, welches im Regelfall vom Wildtyp nicht erkannt wird (Rivas *et al.*, 2002).

### **1.4 Präformierte Abwehr**

Zu den präformierten Abwehrmechanismen der Pflanze zählt die Einlagerung von Ligninen in die Zellwand, die Wachsschichten der Kutikula (Ride, 1983) als mechanische Barrieren und die konstitutive Synthese von toxischen Verbindungen wie Saponinen, Phenolen, Peptiden und Glukosinolaten (Osbourn, 1996; Filippone *et al.*, 1999) die in der Vakuole akkumuliert werden. Glukosinolate werden nach Verwundung des Pflanzengewebes z.B. durch Fraß oder eindringende Hyphen, von pflanzlichen Myrosinase katalysiert und in eine biologisch aktive Form umgesetzt. Saponine entfalten ihre antibiotische Wirkung über die Wechselwirkung mit Membransterolen, die eine Permeabilisierung der Pilzmembranen bewirkt (Osbourn, 1996) und diese dadurch zerstört. Diese Substanzen sind allerdings auch für die Pflanze selbst toxisch, jedoch umgeht der pflanzliche Organismus das Problem der Autointoxikation dadurch, dass die glykosidierten Substanzen mit den spaltenden Enzymen nicht kolokalisiert werden: das Substrat wird in der Vakuole, das Enzym im Cytoplasma gelagert.

### **1.5 Induzierte Abwehr und Hypersensitive Reaktion (HR)**

Der induzierten Abwehr geht die Erkennung des Pathogens voraus. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, dass die Pflanze Oberflächenstrukturen des Pathogens oder lösliche Signalmoleküle erkennt in Form exogener oder endogener Elicitoren (Nürnberger, 1999). Diese Elicitoren setzen in der Pflanze nach Kontakt mit einem mutmaßlichen Rezeptor (Takemoto *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001) eine lokale, spezifische Antwort in Gang. Diese erste Reaktion wird als Hypersensitive Reaktion bezeichnet (HR). Sie umfasst den lokalen programmierten Zelltod, die Auflagerung von Callose, die Produktion von ROS (reactive oxygen species), die Freisetzung von Salicylsäure und Ethylen, die Alkalisierung des Kulturmediums, die Akkumulation von Phytoalexinen und die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Abwehrgene (Hammond-Kosack und Jones, 1996; Hammond-Kosack und Jones, 1997). Der programmierte Zelltod (PCD: programmed cell death) ist ein Wohldefinierter Prozess, der auch anhand verschiedener Merkmale belegbar ist (Greenberg *et al.* 1994; Dangl *et al.*,

1996; Greenberg, 1997; Heath, 1998). Zum einen ist die Fragmentierung des Chromatins (DNA laddering) (Koch *et al.*, 1998; Veit *et al.*, 2001), zum anderen ist eine Expression von HIN (harpin induced) Genen (Gopalan, *et al.*, 1996), die über Northern Blot Analyse nachgewiesen werden können (Pontier *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001) zu beobachten. Der PCD tritt in der Pflanze lediglich an der Infektionsstelle ein, in der Zellkultur durchläuft jede Zelle, die mit dem Elicitor in Kontakt kommt einen PCD. Im pflanzlichen Gewebe kann der PCD lokal begrenzt werden. Zu den schnellsten detektierbaren Reaktionen der HR zählt der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  (Bach *et al.* 1993) in die Zelle, welcher vermutlich durch einen elicitorresponsiven Calciumkanal erfolgt (Zimmermann *et al.*, 1997) und der damit einhergehende Einstrom von Protonen ( $\text{H}^+$ ) in die Zelle. Zum Potentialausgleich folgt daraufhin ein Chloridionen und Kaliumionen Ausstrom (Jabs, 1994; Jabs *et al.*, 1997). Diese massive Verlagerung von Ionen und Ladungsträgern über die Plasmamembran hat zur Folge, dass sich der cytoplasmatische pH-Wert erniedrigt und den Apoplasten in Richtung alkalischer pH-Wert verschoben wird (Felix *et al.*, 1993; Mathieu *et al.*, 1994; Roos *et al.*, 1998; Viehweger *et al.*, 2002). Die Rolle, die  $\text{Ca}^{2+}$  für die intrazelluläre Signaltransduktion über Calcium-Calmodulin-Komplexe oder calciumabhängige Proteinkinasen einnimmt, sind bekannt (White, 2000; Blume *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 2000). Die Auswirkungen der Änderung des pH-Wert sind immer noch unklar. Es ist davon auszugehen, dass durch diese Änderungen entsprechende pH-Optima für bestimmte Enzyme erreicht werden, welche die Synthese von Abwehrstoffen ermöglicht (Mathieu *et al.*, 1996; Lapous *et al.*, 1998; Roos *et al.*, 1998). Vorstellbar ist, dass die Callosesynthese als Teil des Cellulosesynthese-Komplexes durch die Verschiebung des pH-Wertes einen solchen Optimalbereich für die Synthese von Callose erhält. Die Hypersensitive Reaktion zeichnet sich zudem durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus, einer Reaktion die ebenfalls lokal begrenzt erfolgt (Dat *et al.*, 2000). Durch die Superoxiddismutase entsteht nach Umwandlung des Superoxidradikals das reaktive Wasserstoffperoxid (vgl. Tabelle 1.1). Damit es zu einer Anreicherung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  kommen kann, bedarf es einer gleichzeitigen Hemmung der Katalase. Durch die ROS wird einerseits das Pathogen geschädigt, andererseits werden

durch sie Phenole mit Zellwandbestandteilen vernetzt, was eine Verstärkung der Zellwand zur Folge hat (Hahlbrock und Scheel, 1989). Ein Weiterwachsen des Pathogens wird dadurch erschwert. Entscheidend für eine erfolgreiche Abwehr ist die Geschwindigkeit mit der Maßnahmen in Gang gesetzt werden (Hutcheson, 1998). Von der Infektionsstelle gehen Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen aus. Diese Moleküle können eine antibiotische Wirkung haben. Salicylsäure hat daneben noch einen Signalcharakter (Vijayan *et al.*, 1998; Brader *et al.*, 2001; O'Donell *et al.*, 2001; O'Donell *et al.*, 2003). Jasmonsäure wird beim Abbau von Biomembranen freigesetzt und steht in engem Zusammenhang mit IP3 (Inositoltrisphosphat) und DAG (Diacylglycerol), Bestandteilen intrazellulärer Signalketten. Die sich anschließenden Schritte der HR sind die Aktivierung und Expression von PR-Genen und damit die Produktion von Phytoalexinen und Abwehrproteinen.

### **1.6 Induzierte Abwehr und Systemisch Erworbene Resistenz (SAR)**

Im Rahmen der induzierten Abwehr werden alle Zellen des Organismus über den Pathogenbefall informiert. Diese Information ermöglicht es Geweben, die weit von der Infektionsstelle entfernt sind, schneller und stärker auf einen späteren Pathogenbefall zu reagieren. Die Abwehrreaktionen, die zu diesem Zeitpunkt in einem systemisch resistenten Gewebe erfolgen, laufen heftiger, schneller und spezieller ab als in nicht systemisch resistenten Kontrollen (Ryals *et al.*, 1996). Die Ausbreitung des Pathogens kann hier effizienter unterbunden werden. Diese Resistenz kann bis zu vier Wochen anhalten. Die daran beteiligten Signalmoleküle werden in der Literatur weiter diskutiert. Salicylsäure und Jasmonsäure, sowie deren gasförmigen Derivate, das Methyljasmonat und die Methylsalicylsäure stellen dafür geeignete Kandidaten dar (O'Donnell, *et al.*, 2003). Hinweise auf Wasserstoffperoxid und Ethylen als Botenstoffe sind ebenfalls gegeben (Desikan *et al.*, 1998; Huckelhoven und Kogel, 2003). Besonders gasförmige Signalstoffe können entfernt gelegene Pflanzenteile resistent machen. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass im Phloemsaft der elicitierten Pflanze SA nachweisbar ist (Shulaev *et al.*, 1995; Molders *et al.*,

1996; Kiefer und Slusarenko, 2003). Weiter ist bekannt, dass verschiedene Gene, die an der Abwehr beteiligt sind, in ihrer Expression durch SA beeinflusst werden (Alvarez, 2000; Conrath *et al.*, 2002, Seeger, 2003). Die Ausschüttung von Ethylen, einem klassischen Stresshormon, ist ein unter ungünstigen Umweltbedingungen oft beobachteter Prozess. Auch gibt es Hinweise auf eine wichtige Rolle des Ethylens bei einem Pathogenbefall. Romeis (pers. Mitteilung) zeigte, dass Ethylen als Inhibitor einer pflanzlichen calciumabhängigen Proteinkinase wirksam ist, und damit eine Unterscheidung von Verwundung und Infektion möglich macht.

### **1.7 Intra- und interzelluläre Signalweiterleitung**

Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt über eine rezeptorvermittelte Signalkaskade (Bischoff *et al.*, 1999; Nürnberger und Scheel, 2001). So ist die Aktivierung von Ionenflüssen über die Plasmamembran, die durch elicitorresponsive Kanäle vermittelt werden, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die Aktivierung von Serin-Threonin-Kinasen, Phosphatasen (Felix *et al.*, 1994) und GTP-bindenden Proteinen in diese Kaskaden involviert (Dixon *et al.*, 1994; Kombrink und Somssich, 1995; Ebel und Scheel, 1997; Ligterink *et al.*, 1997; Scheel, 1998; Rajasekhar *et al.*, 1999; Kawasaki *et al.*, 1999). In tierischen Zellen verläuft diese Signaltransduktion nach Bindung entsprechender Liganden über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Pflanzliche Zellen scheinen mit ähnlichen Rezeptormolekülen ein extrazelluläres Signal zu erkennen und in ein intrazelluläres Signal umzuwandeln (Scheel, 1998). G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen sind in Pflanzen äußerst selten (Braun und Walker, 1996) und es gibt wenig Tyrosinkinasen in Pflanzen Serin-Threonin-Kinasen dagegen in beiden (Rivas *et al.*, 2002). Als erste Reaktion der Pflanzenzellen nach Elicitierung wird ein Einstrom von Protonen und  $\text{Ca}^{2+}$  gemessen, der mit einem Chlorid- und Kalium-Efflux einhergeht (Nürnberger *et al.*, 1994; Tavernier *et al.*, 1995; Jabs *et al.*, 1997; Pugin *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Blume *et al.*, 2000). Dabei ist extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  essentiell für die Induktion der pflanzlichen Pathogenabwehr. Sowohl das

Entfernen von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Kulturmedium (z.B. mit EGTA), als auch das Blockieren des Calciumeinstroms durch Inhibitoren (z.B. mit  $\text{LaCl}_3$ ) hemmen verschiedene pflanzliche Abwehrreaktionen (Tavernier *et al.*, 1995; Pugin *et al.*, 1997; Xu und Heath, 1998; Mithöfer *et al.*, 1999; Blume *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 2000). Die Beteiligung intrazellulärer Calciumquellen ist bislang wenig untersucht. Eindeutige Inhibitor- und Effektorstudien haben gezeigt, dass G-Proteine (Sano und Ohashi, 1995) und Proteinkinasen bei der Auslösung der Ionenflüsse über die Membran eine Rolle spielen (Conrath *et al.*, 1991; Legendre *et al.*, 1992; Felix *et al.*, 1994; Mathieu *et al.*, 1996; Gelli *et al.*, 1997). Auch die Beteiligung von MAP-Kinase-Kaskaden (Mitogenaktivierte Proteinkinasen) konnte in Pflanzen nachgewiesen werden (Hirt, 1997; Zhang und Klessig, 1998; Romeis *et al.*, 1999; Cardinale *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001; Frye *et al.*, 2001). Romeis *et al.* (2000) und Rivas (2002) zeigten, dass in Pflanzen calciumabhängige Proteinkinasen an der Weiterleitung und möglicherweise auch an der Unterscheidung des Schädlingsbefalls beteiligt sind. Entsprechende „Loss and Gain of function“-Mutanten konnten die Ergebnisse aus pharmakologischen Untersuchungen bestätigen.

Die reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) haben neben einer direkten Abwehrwirkung gegen das Pathogen auch eine wichtige Signalfunktion für die Pflanze (Lamb und Dixon, 1997; Bolwell, 1999; Scheel, 2001). Hemmstoffversuche mit DPI haben gezeigt, dass die Akkumulation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und andere Aspekte der Abwehrantwort ausbleiben, dafür konnte durch eine exogene Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in manchen Modellsystemen sogar eine Abwehrantwort ausgelöst werden (Levine *et al.*, 1994; Kovtun *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001).

Die interzelluläre Signalweiterleitung erfolgt sicher nicht über die Weitergabe von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  oder Änderungen des pH-Wertes der Zelle, sondern über Signalverbindungen wie Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen (Anderson *et al.*, 1997; Dong, 1998; Reymond und Farmer, 1998; Thomma *et al.*, 1998; Klessig *et al.*, 2000; McDowell und Dangl, 2000), die nach Pathogenkontakt ebenfalls synthetisiert werden. Diese Moleküle können über den Gasraum, durch Diffusion oder aktiv durch die Leitgewebe transportiert werden. Gewebe,

die in großer Distanz zur Infektionsstelle liegen, können so „vorgewarnt“ und entsprechende Maßnahmen, wie die Aktivierung von SAR-Genen eingeleitet werden. Besonders Salicylsäure ist seit langem als Auslöser der Expression von PR- und SAR-Genen bekannt (Bol *et al.*, 1990; Hock und Elstner, 1995) und konnte nach Infektion im Phloemsaft nachgewiesen werden (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1991; Rasmussen *et al.*, 1991).

### **1.8 Das Modellsystem aus *Arabidopsis thaliana* und dem Elicitor PaNie aus *Pythium aphanidermatum***

Durch Vorarbeiten von Koch (1998), Veit (2001) und Wörle (2000) konnte ein Elicitorprotein aus *Pythium aphanidermatum* kloniert, exprimiert und gereinigt werden. Dieses reine Elicitorprotein diente der Untersuchung einer Pflanze-Pathogen-Interaktion im reduzierten System Zellkultur und Elicitor. Ausgelöst durch den Elicitor zeigten sich in der Interaktion von Pflanze und Pathogen typische Merkmale einer Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis thaliana*. Diese Abwehrreaktionen umfassten den programmierten Zelltod, die Synthese von Callose, die Freisetzung von Ethylen und Salicylsäure, die Produktion von Phytoalexinen, den Ausstoß von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und die Veränderungen der Ionenströme über die Plasmamembran, sowie die transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen. Zellkulturen von *Arabidopsis* können im Unterschied zur intakten Pflanze oder Pflanzenorganen wie Blätter als ein experimentell leicht handhabbares Modellsystem eingesetzt werden. Die Zellkultur ermöglichte biochemische und molekularbiologische Untersuchungen an biologisch identischem Material, das in großer Menge jederzeit zur Verfügung steht.

Dieser Elicitor, der konserviert in verschiedenen Pythiaceen vorkommt, ließ sich im Kulturfiltrat nachweisen und hat für den Pilz eine wichtige Bedeutung. Für seine elicitierende Funktion bedarf es der gesamten Länge des Elicitors (Veit *et al.*, 2001) und auch zweier Cysteine an den Positionen 38 und 64 im Protein (Fellbrich *et al.*, 2000).

Als erste Reaktionen der Zellkultur nach Elicitierung kann die Verschiebung von Ionen über die Plasmamembran beobachtet werden. Protonen werden vom Außenmedium in das Cytoplasma der Zellen geschleust, dabei werden auch

Ca<sup>2+</sup> Ionen transportiert (Jabs *et al.*, 1997, Blume *et al.*, 2000). Entscheidend für nachfolgende Reaktionen ist die cytoplasmatische Calciumkonzentration. Zum Ladungs- und Potentialausgleich erfolgt zudem ein Ausstrom von Kaliumionen und Chlorid (Scheel *et al.*, 1991; Nürnberger *et al.*, 1994). Dies ist bereits eine Minute nach Elicitierung der Zellkultur zu beobachten und durch eine Veränderung im pH-Wert nachweisbar. Die Änderung des pH-Wertes im Kulturmedium verläuft sigmoidal, die Differenz kann bis zu zwei pH-Einheiten betragen (Seeger 2003) und bleibt bis zu 48 h stabil. Mit Pep13, einem anderen Proteinelicitor, konnte mittels Patch Clamp Technik in einer Zellkultur von Petersilie ein Calciumstrom nachgewiesen werden (Zimmerman *et al.*, 1997), was Hinweise auf eine Elicitorresponsivität des Kanals gibt. Hemmstoffversuche deuten darauf hin, dass diese Ionenflüsse für nachfolgende Abwehrreaktionen von besonderer Bedeutung sind. Eine weitere zu beobachtende Reaktion ist die Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies, die ebenfalls sehr schnell abläuft. Untersuchungen haben gezeigt, dass der „Oxidative Burst“ von entscheidender Bedeutung für viele zeitlich nachgeschaltete Prozesse ist. Durch eine Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase (Doke *et al.*, 1985; Baker und Orlandi, 1995; Lamb und Dixon, 1997; Jabs *et al.*, 1997) wird das Superoxid Radikal freigesetzt, welches durch die Superoxiddismutase unter Verbrauch von Protonen (H<sup>+</sup>) zu stabilem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abgebaut wird. Die Reaktionen, die an der Entstehung von ROS beteiligt sind, sind in Tabelle 1.1 zusammen gefasst. Die ROS können einerseits in biologische Moleküle oxidieren und schädigen auf diese Weise das eindringende Pathogen und andererseits können sie die Zellwand verfestigen, indem Proteine, phenolische Verbindungen und Kohlenhydrate kovalent verknüpft werden (Bradley *et al.*, 1992; Brisson *et al.*, 1994).

**Tabelle 1.1:** Entstehung und mögliche Reaktionen reaktiver Sauerstoffspezies in Pflanzen (nach Baker und Orlandi, 1995). Indizes der Fenton-Reaktion geben den ersten und zweiten Teilschritt der Reaktion an.

(1) NAD(P)H-Oxidase	$\text{NAD(P)H} + 2 \text{O}_2 \Leftrightarrow \text{NAD(P)}^+ + 2 \cdot \text{O}_2^- + \text{H}^+$
(2) Superoxiddismutase	$2 \cdot \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \Leftrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

(3) Haber-Weiss-Reaktion	$\text{H}_2\text{O}_2 + \cdot\text{O}_2^- \Leftrightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$
(4) Fenton-Reaktion <sub>1</sub>	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^+) \Leftrightarrow \text{Fe}^{3+}(\text{Cu}^{2+}) + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$
(4) Fenton-Reaktion <sub>2</sub>	$\cdot\text{O}_2^- + \text{Fe}^{3+}(\text{Cu}^{2+}) \Leftrightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^+)$
(5) Katalase	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \Leftrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
(6) Ascorbat-Peroxidase	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Ascorbat} \Leftrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{Dehydroascorbat}$

Die Zellkultur von *Arabidopsis* produziert nach Elicitierung das Phytoalexin Camalexin (Glazebrook *et al.*, 1997). Bach *et al.* (1993) konnten für die rohe Form dieses Elicitors zeigen, dass ein Calciumeinstrom an der Induktion der Phytoalexinbiosynthese (4-Hydroxybenzoesäure) in der Karotte beteiligt ist und durch EGTA-Behandlung unterbunden werden kann. Ethylen als Stresshormon der Pflanze kommt nicht nur bei der Fruchtreife in klimakterischen Früchten eine wichtige Rolle zu, sondern auch in der Signalweiterleitung im Zellverband nach Pathogenkontakt. Neuere Untersuchungen von Romeis (pers. Mitteilung) deuten eine Rolle des Ethylens als Inhibitor pflanzlicher calciumabhängiger Proteinkinasen (CDPK) an, wobei das Ethylen als Signal dient, welches es der Pflanze ermöglicht, zwischen einer Aktivierung der CDPK nach Verwundung und Pathogenbefall zu unterscheiden. Untersuchungen hierzu wurden an „Gain- und Loss- of Function“ Mutanten des Tabaks durchgeführt. Das dort verwendete Modell basiert auf der spezifischen Erkennung eines Avirulenz- durch ein Resistenzgenprodukt aus *Cladosporium fulvum* (avr9) und Tomate (cf9) (Keen, 1992; Joosten *et al.*, 1994). Die Einbindung von Salicylsäure und Jasmonsäure (JA) als Signalmoleküle der systemisch erworbenen Resistenz wurde mehrfach bearbeitet (Delaney, 1997; Seeger, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Abwehrgene durch exogene SA-Applikation ausgelöst wird. Desgleichen wurde an transgenen Pflanzen und durch Pfropfungsexperimente von transgenen Pflanzen die für ein bakterielles Enzym, die Salicylat-Hydroxylase, kodieren (das Salicylsäure zu Catechol abbaut) bestätigt (Vernooji *et al.*, 1994; Friedrich *et al.*, 1995), dass ohne das Vorkommen von Salicylsäure die systemische Resistenz ausbleibt. Obwohl SA im Phloemsaft nach Infektion nachgewiesen werden konnte, bleibt dieser Punkt

umstritten (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1991; Rasmussen *et al.*, 1991).

### **1.9 Zielsetzungen dieser Arbeit**

In vorangegangenen Arbeiten von Koch (1998) und Veit (2002) entstanden die Grundlagen zu diesem Elicitor-Pflanze-Modell. Zu Beginn wurde der Elicitor als Rohelicitor eingesetzt (Koch, 1998) und darauf aufbauend die Abwehrreaktion der Karotte (*Daucus carota*) untersucht. In nachfolgenden Arbeiten konnte der Elicitor vollständig sequenziert, kloniert und heterolog exprimiert werden (Veit *et al.*, 2001). Dieses heterologe Produkt ließ sich affinitätschromatographisch reinigen und stand nun in Reinform zur Verfügung. Alle Reaktionen der Zellkulturen und Pflanzen ließen sich auf die Wirkung und Erkennung eines einzelnen, reinen Elicitors zurückführen. In der vorliegenden Arbeit wurde nun *Arabidopsis thaliana* als genetisch besser charakterisierter Organismus der Karotte vorgezogen. Spätere genetische Analysen zur Elicitorreaktion der Pflanze können so erheblich vereinfacht werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, die komplexen Abwehrreaktion die durch den Elicitor PaNie ausgelöst werden miteinander zu verknüpfen. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf Signalwege und Signalweiterleitungen zwischen den einzelnen Reaktionen gerichtet werden. Umfangreiche pharmakologische Studien mit Hemmstoffen, die die einzelnen Teilaspekte der Abwehrreaktion unterdrücken oder entstehende Produkte abbauen, sollten die Bedeutung einzelner Komponenten für zeitlich nachgelagerte Reaktionen aufklären helfen. Außerdem sollte die zeitliche Auflösung der Abwehrreaktionen in der Pflanze verbessert werden und die an der Zellkultur gemachten Beobachtung *in planta* bestätigt werden. Erweiterungen im Modellsystem zur Pathogenabwehr die in der Zellkultur nicht gezeigt werden konnten wurden an der Ganzpflanze durchgeführt. Um die Wirkung von PaNIE als einem generellen Elicitor zu testen sollte eine monokotyle Zellkultur auf Elicitierung getestet und Daten die in der monokotylen Ganzpflanze gemacht wurden bestätigt werden.

Mit diesem wirksamen Elicitor, sollte in dieser Arbeit ein Initialscreen nach Elicitorrezeptormutanten durchgeführt werden. Die Bedingungen für eine spätere genetische Analyse und zur Isolierung einer solchen Mutante sollten etabliert und mögliche Elicitor Erkennungs-, Signalweiterleitungsmutanten aus einer T-DNA Insertionslinie isoliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Elicitor

Für diese Arbeit wurde ein heterolog exprimierter Elicitor (PaNie= *Pythium aphanidermatum* necrosis inducing elicitor) aus *Pythium aphanidermatum* verwendet (Veit *et al.* 2001). Dieser Elicitor wird bei -20°C gelagert und wurde wenn nicht gesondert darauf hingewiesen wird in einer Konzentration von 500 nM in Zellkulturen und 10 µM in Pflanzen verwendet. Dieses Protein trägt einen sechsfachen Histidinrest, der es ermöglicht dieses Protein über Ni-NTA-Agarose von den anderen Proteinen des exprimierenden Organismus über Affinitätschromatographie zu trennen (Wörle, 2000).

### 2.2 Pflanzliche Zellkulturen

Es wurden Zellkulturen von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp *Landsberg erecta*) verwendet, die in einem modifizierten Murashige und Skoog Nährmedium (MS<sub>A</sub>) kultiviert wurden und als monokotyle Pflanze *Panicum maximum* in BM-Medium. Alle Zellkulturen wurden am siebten Tag der Wachstumsperiode in frisches Medium überführt und stets dunkel bei 27°C auf einem Rundschüttler bei 100 rpm (Pilot Shake, Braun, Melsungen) gehalten. Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben immer am 5. Tag der Wachstumsphase durchgeführt.

### 2.3 Pflanzen

*Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia 0)) wurde im Gewächshaus bei 60% relativer Luftfeuchte und einem Licht/ Dunkelrhythmus von 16h/ 8h angezogen. Die Temperatur betrug 22°C in der Lichtphase und 18°C in der Dunkelheit. Die Pflanzen wurden bis zu einem Alter von 4 Wochen im Gewächshaus gezogen und hatten dann die nötige Größe für die Elicitorapplikation.

## 2.4 Bestimmung des gepackten Zellvolumens

Um den Wachstumsverlauf einer Suspensionszellkultur zu bestimmen, bedient man sich der Bestimmung des gepackten Zellvolumens (nach Seitz und Richter, 1970). Dazu wurden während einer Kulturpassage täglich aus drei getrennt geführten Kolben 1 ml der homogenen Suspension steril entnommen und in modifizierte Hämatokritröhrchen gegeben. Diese wurden dann für eine Minute bei 3400 x g in einer Tischzentrifuge (Phywe, Typ P3/6, Göttingen) sedimentiert und das gepackte Zellvolumen abgelesen. Das Zellvolumen wurde bis zum Erreichen der Lag-Phase bestimmt.

## 2.5 Elicitorinduzierter Zelltod

### 2.5.1 Vitalitätsnachweis mittels Tetrazolium-Test

Eine quantitative Auswertung für die Vitalität bietet die Umsetzung vom farblosen MTT zum rötlichen Formazan durch die Mitochondrien (Schwacke, 1995). Dabei wird den behandelten Zellen 80 µl MTT-Lösung ( $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) zugemischt. Innerhalb von zwei Hn ist die Reaktion abgelaufen und kann photometrisch vermessen werden (Veit et al. 2001, Veit 2002). Die Farbreaktion beruht auf der Reduktion des zellwandgängigen MTT durch die Mitochondrien lebender Zellen zum roten, wasserunlöslichen Formazan. Bei Verwendung von Hemmstoffen, wurden diese wie in Tabelle 2.5.1 beschrieben eingesetzt. Für alle verwendeten Hemmstoffe war eine Vorinkubation von 15 min vor Elicitierung ausreichend, um eine vollständige Durchmischung von Hemmstoff und Zellkultur zu erreichen.

**Tabelle 2.5.1:** Verwendete Hemmstoffe und deren Endkonzentrationen für die Vitalitätstests.

pH-Puffer Tris/MES	50 mM, pH 5.45
NADP(H) Inhibitor DPI	50 nM
Calciumkanalblocker LaCl <sub>3</sub>	500 µM
Chelatbildner EGTA	5 mM
Translationshemmstoff Cycloheximid	$5 \text{ µg} \cdot \text{ml}^{-1}$

G-Protein Aktivator GTP- $\gamma$ -S	2-20 $\mu$ M
G-Protein Inhibitor GDP- $\beta$ -S	2-20 $\mu$ M

### 2.5.2 Nekrosen in Blättern von *A. thaliana*

Um den Einfluss von Elicitoren auf den Zelltod in Blättern von *A. thaliana* zu untersuchen, ist es möglich die Nekrosen, die nach 24 Hn entstanden sind zu dokumentieren (Veit et al., 2001). Um eine zeitlich bessere Auflösung zu erreichen kann Propidiumiodid verwendet werden. Dazu wurden in einer Coinfiltration dem Elicitor Propidiumiodid (1 mg\*ml<sup>-1</sup>) zugesetzt. Dieser interkalierende Farbstoff, der sich in die DNA einlagert, kann die Zellmembran nicht passieren. Stirbt die Zelle und verliert ihre Membranintegrität kann Propidiumiodid eindringen und die DNA anfärben. Diese rötlich-gelbe Färbung kann dann im UV-Licht sichtbar gemacht werden (Mikroskop: Zeiss, Axioplan, Oberkochen, Germany; Filmmaterial: Kodak, Elite Chrom 400).

### 2.6 Camalexin Isolierung aus Zellsuspension von *A. thaliana*

Zur Induktion des Pythoalexins Camalexin in *A. thaliana* wurden 20 ml der Suspensionskultur in sterile 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit Elicitor behandelt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mit Kulturmedium in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und die Zellen für 15 s im Ultraschall (70 W) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (4000 x g, 5 min) wurden die Zellbruchstücke beseitigt, der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 3 ml Chloroform gemischt und dann ausgeschüttelt. Eine beschleunigte Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 4000 x g (5 min) erreicht. Die gesamte organische Unterphase wurde bei 80°C in einem Heizblock abgeblasen und bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde nochmals in 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, gut gemischt und mit 1 ml Chloroform versetzt. Durch zentrifugieren (21000 x g, 5 min) wurden wässrige Oberphase und organische Unterphase getrennt. Aus der Unterphase wurden 950  $\mu$ l in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 65°C abgeblasen und der Rückstand in 50  $\mu$ l Chloroform aufgenommen. Die Probe wurde lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

Der pH-Puffer für die permanente Erhöhung des pH wurde in 50 mM Endkonzentration mit einem pH 6.7 verwendet.

### **2.6.1 Nachweis des Camalexin über Dünnschichtchromatographie**

Das Extrakt wurde vollständig mit einer Kapillare auf einer Dünnschichtplatte aufgetragen (Merck Silica gel 60, F 254). Um die Auftragfläche gering zu halten wurde während des Auftragens die Verdunstung durch einen Druckluftstrom verstärkt. Als Laufmittel wurde Chloroform/ Methanol (9:1, v/v) verwendet. Die Auswertung und Betrachtung fanden auf einem UV-Tisch bei 312 nm Wellenlänge statt. Dokumentiert wurde die Fluoreszenz mit einer Digitalkamera (Canon Powershot G1; 3.5 mio Pixel) und anschließend durch eine Tonwertkorrektur in Adobe Photoshop kontrastierter dargestellt.

### **2.6.2 Nachweis einer Alkalisierung des Kulturmediums durch Elicitierung mit PaNie**

Zum Nachweis einer Alkalisierung des Außenmediums einer Zellkultur von *A. thaliana* Zellkultur wurden jeweils 20 ml der Zellsuspension in 25 ml Erlenmeyerkolben überführt. Um den ersten Stress durch das Überführen vom Kulturkolben in die kleinen Kolben zu eliminieren, wurde die Suspension eine Stunde auf einem Rundschüttler (Bachhofer, Modell TMR) bei 150 rpm belassen. Danach wurde der pH-Wert des Außenmediums bestimmt und als Basiswert festgelegt. Über einen Zeitraum von 30 min erfolgte die pH-Wert Bestimmung im Minutentakt, danach wurden die Intervalle auf fünf, zehn und 30 min erhöht. Die pH-Elektrode war während des Experiments die ganze Zeit im Nährmedium der Zellkultur vorhanden und wurde mitbewegt. Nach zwei Stunden wurde die Messung beendet, da zu diesem Zeitpunkt die Reaktion als beendet betrachtet werden konnte. Änderungen im pH-Wert konnten nach diesem Zeitpunkt keine mehr festgestellt werden. Dieser pH-Wert zeigte sich auch über einen Zeitraum von 24 h konstant. Bei Verwendung von Hemmstoffen, wurden diese wie in Tabelle 2.5.1 beschrieben eingesetzt.

Salicylsäure wurde 2.5 h vor Elicitorapplikation in 10  $\mu$ M Endkonzentration zugefügt.

## **2.7 Bestimmung des Salicylsäuregehaltes im Medium**

### **2.7.1 Extraktion von Salicylsäure aus dem Kulturmedium**

Zur Extraktion der Salicylsäure wurden 10 ml des Mediums mit 5 ml Ethylacetat und 50  $\mu$ l Vanillinsäure (3 mM) als internem Standard versetzt, 2 min intensiv gemischt und dann zur Phasentrennung 5 min bei 2000 x g zentrifugiert. Die organische Oberphase wurde abgehoben und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für eine Minute dann bei 21000 x g zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Abblasen des Ethylacetats in einem Heizblock bei 60°C wurde der Rückstand in 30  $\mu$ l Methanol/Wasser (1:3 v/v) aufgenommen, durchmischt, zentrifugiert, in HPLC-Gefäße überführt und zur Analyse verwendet.

### **2.7.2 Nachweis der Salicylsäure über HPLC**

Die Identifizierung und Quantifizierung der Salicylsäure wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt. Hierzu stand eine HPLC-Anlage mit 2 Pumpen (P422 0.2-2  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Kontron, München), automatischem Probengeber (Gina, Gynkotek, München) und einem UV-Durchflussphotometer (Applied Biosystems, Weiterstadt) zur Verfügung. Zur Auftrennung der Proben wurde als stationäre Phase eine 5  $\mu$ m Hypersil-ODS RP-18 Säule (250x4.6 mm; Grom; Ammerbuch, Deutschland) verwendet; als Vorsäulen fanden Kartuschen (10x4.6 mm) mit gleicher stationärer Phase wie die Trennsäulen Verwendung. Eine Gradientenmischung (siehe Tabelle 2.8.2) aus MeOH/Eisessig (95:5, v/v) und H<sub>2</sub>O/Eisessig (95:5, v/v) diente als Laufmittel bei einer Flussrate von einem  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

**Tabelle 2.8.2:** Gradientenmischung bei der Identifizierung und Quantifizierung von Salicylsäure über HPLC

Zeitverlauf		Anteil MeOH/Eisessig (95:5, v/v)	
0 – 50	min	10 - 50	%
50 - 52	min	50 - 99	%
52 - 57	min	99	%
57 - 60	min	99 - 10	%

Salicylsäure wurde bei 244 nm detektiert. Über die relative Retentionszeit (rrt) im Bezug zum internen Standard Vanillinsäure und den Vergleich zur synthetischen Salicylsäure wurde die isolierte Salicylsäure identifiziert. Zur Quantifizierung wurde der relative response factor (rrf) von käuflicher Salicylsäure zum internen Standard bestimmt. Zur Quantifizierung der Salicylsäurekonzentration wurde die in jedem Lauf cochromatographierte Menge Vanillinsäure nach folgender Formel in Bezug gesetzt.

$$\frac{\mu\text{g Vanillinsäure} \cdot \text{Area Salicylsäure}}{\text{Area Vanillinsäure}} \cdot \text{rrf} = \mu\text{g Salicylsäure}$$

$$\text{rrf} = \frac{\text{Area Vanillinsäure}}{\text{Area Salicylsäure}}$$

Die Gesamtmenge an extrahierter Salicylsäure wurde auf die eingesetzte Menge an Suspensionskultur bezogen. In diesem Experiment kam der ACC-Synthase Hemmstoff AVG in 100  $\mu\text{M}$  Konzentration zum Einsatz.

## 2.8 Nukleinsäurepräparation

### 2.8.1 Isolierung von gesamt RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung der gesamt RNA wurden 0.1-0.4 g Zellen (Frischgewicht) in flüssigem Stickstoff fein gemahlen und anschließend in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt, die Phenol-Chloroform Extraktion wurde wie von Veit (2002) und Seeger (2003) beschrieben durchgeführt.

## 2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte nach einer Modifizierten Methode von Maniatis *et al.* (1989). Dazu wurden Einzelkolonien der transformierten Bakterien über Nacht in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (1 mg/ml) in sterilen Reagenzgläsern angezogen, sedimentiert und mit Phenol-Chloroform die Nukleinsäuren extrahiert. Das Sediment wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und nach Abdampfen des Ethanols in 30 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Entfernung von RNA wurden 1 µl RNase-A zugegeben und die Proben 30 min bei RT inkubiert.

## 2.8.3 Quantifizierung der Nukleinsäuren

### 2.8.3.1 Quantifizierung im Gel

Die Bestimmung des Nukleinsäuregehalts erfolgte über den Vergleich der Fluoreszenzintensität mit Ethidiumbromid in einem nicht denaturierenden Agarosegel. Anregung bei  $\lambda = 302$  nm mit definierten Mengenstandards von 5–50 ng\*µl<sup>-1</sup> DNA, ermöglichte die Bestimmung des Nukleinsäuregehalts in der Probe.

### 2.8.3.2 Photometrische Quantifizierung der gesamt RNA

Die Bestimmung des Nukleinsäuregehalts der isolierten RNA wurde mittels Spektrometrie durchgeführt. Je 3 µl der Probe wurde mit 700 µl ddH<sub>2</sub>O in Quarzküvetten bei den Wellenlängen  $\lambda_1=260$ nm und  $\lambda_3=320$ nm gegen Wasser vermessen.  $A_{260}-A_{320}$  gibt Aufschluss über den Nukleinsäuregehalt, eine OD  $A_{260}-A_{320}$  von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg\*ml<sup>-1</sup>. Die exakte RNA-Konzentration kann so mittels der Formel:

$$(A_{260}-A_{320}) \cdot 40 \cdot (703/3) = \text{RNA-Gehalt in } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

berechnet werden.

## 2.8.4 Elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren

### 2.8.4.1 DNA-Auftrennung über nicht denaturierende-Agarosegele

Plasmide, PCR-Fragmente und genomische DNA wurden über nicht-denaturierende Agarosegele in 1 x TBE Puffer mit 0.00001 Volumen

Ethidiumbromid Lösung aufgetrennt. Nach der Polymerisation der Agarose wurden die im Verhältnis 1:4 mit DNA-Loadingbuffer versetzten Proben aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Die Stromstärke betrug 50 mA für 0.5-2 h. Die Ethidiumbromidfluoreszenz wurde mit Hilfe eines Geldokumentationssystems festgehalten.

#### **2.8.4.2 RNA-Auftrennung über denaturierende Agarosegele**

Zur Auftrennung von RNA wurden 1.8 g Agarose mit 15 ml 10 x MOPS und 108 ml dH<sub>2</sub>O aufgeköcht, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Nach abkühlen auf 60°C wurden 27 ml Formaldehyd (37%) zugegeben und das Gel nach durchmischen in eine Easy Cast<sup>TM</sup>-Gelkammer gegossen. Pro Probe wurden 20 µg RNA mit DEPC-ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und zu 32.5 µl RNA-Loadingbuffer gegeben. Anschließend wurde die RNA 5-10 min bei 65°C denaturiert und auf Eis gestellt. Nach Auftragen auf das Gel begann die Elektrophorese für zwei Min mit 120 V, danach wurde die Spannung für die restlichen 4-5 h auf 70 V reduziert. Als Laufmittel wurde 1 x MOPS verwendet.

#### **2.8.4.3 Elution der Nukleinsäure aus Agarosegelen**

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Da die eluierten Fragmente ausschließlich zur Ligation weiter verwendet werden sollten, wurden die DNA-Fragmente mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Anschließend wurden die eluierten Fragmente zur Konzentrierung mit 2.5 Volumen Ethanol und 0.1 Volumen 3 M NaAc gefällt (30 min bei 20°C, 30 min Zentrifugation bei 4°C, 21000 x g) und dann in 8 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.9 Northern-Blot Analysen**

#### **2.9.1 Blotten der aufgetrennten RNA**

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde mittels Kapillarblot über Nacht auf eine geladene Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) übertragen. Die an die Membran gebundenen Nukleinsäuren wurden für 2 h bei 80°C fixiert. Die Zugabe der radioaktiv markierten Sonden erfolgte nach einer Prähybridisierung für mindestens 3.5 h bei 60°C im Hybridisierungspuffer.

### **2.9.2 Radioaktive Markierung der Sonden**

Die Markierung der DNA-Fragmente mit [ $\alpha$ 32P]-dCTP erfolgte mit dem DNA Labelling Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen). Nach Anlagerung der als Primer dienenden unspezifischen Hexanucleotide wird der komplementäre Strang unter Einbau von [ $\alpha$ 32P]-dCTP durch das Klenow-Fragment, einer Polymerase mit 3'-5' Exonucleaseaktivität synthetisiert. Die Menge der eingesetzten Aktivität betrug pro Ansatz 40  $\mu$ Ci [ $\alpha$ 32P]-dCTP. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nucleotide und aller Fragmente mit einer Länge von weniger als 17 bp erfolgte mit NucTrap Probe Purification Columns (Stratagene, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers. Nach einer abschließenden Denaturierung für 5 min bei 96°C wurden die so markierten Fragmente zu den Membranen gegeben.

### **2.9.3 Hybridisierung**

Da nur homologe Sonden eingesetzt wurden, erfolgte die Hybridisierung immer mit identischen Bedingungen. Nach Abschütten eines Großteils der Hybridisierungslösung wurden die adioaktiv markierten Fragmente zu den Membranen gegeben und über Nacht bei 60°C in einem Hybridisierungsöfen inkubiert. Zum Lösen der unspezifischen Bindungen wurden die Membranen nach Entfernen der Hybridisierungslösung mit verschiedenen Salzkonzentrationen bei unterschiedlichen Temperaturen gewaschen. Die Stringenz nimmt mit steigender Temperatur und fallender Salzkonzentrationen ab, unspezifische Bindungen wurden bei 65°C und 0.5 x SSC gelöst.

### **2.9.4 Detektion**

Nach Einschweißen in Kunststoffolie wurden die Signale zuerst mit einem Phospho-Imager (STORM 860, Molecular Dynamics, Amersham Bioscience, Sunnyvale, CA, USA) detektiert. Zur endgültigen Visualisierung der Ergebnisse mittels Autoradiographie wurden die Membranen in Expositions-kassetten mit Verstärkerfolie überführt und in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm zwischen Membran und Verstärkerfolie gelegt. Die Belichtung erfolgte bei -70°C für unterschiedlich lange Zeiträume.

## 2.10 Genspezifische DNA Amplifikation

### 2.10.1 Primer

Die verwendeten Primer wurden anhand der bekannten Sequenzen der Gene aus der Genbank (NCBI) erstellt. Die Primer wurden bei ARK (Sigma) und Lifetechnologies (Invitrogen) bestellt und dort synthetisiert. Nach Erhalt wurden alle Primer mit einer Endkonzentration von 50 nM in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

**Tabelle: 2.11.1:** Verwendete Primer für die Amplifikation des PaNie Gens (Wörle, 2000) und der Northern Sonden.

PAL rev	GTAGCCATTTGGATGAAGTG
PAL for	GTTGGGACCAGTAGCTTTGG
TCH rev	Grauer M. (2002)
TCH for	Grauer M. (2002)
PR1 rev	Grauer M. (2002)
PR1 for	Grauer M. (2002)
Eli 3 rev	Grauer M. (2002)
Eli 3 for	Grauer M. (2002)
PaNie rev	GAGACC <u>ATG</u> GCCGTGATCAACCATG
PaNie for	CTCTGGATCCCTGGAAAAACGCCTTCACGAG
ACS2 rev	GAGTGTGGTGACATTATCCC
ACS2 for	AACCCATCAAATCCACTCGG

### 2.10.2 PCR Reaktion

Es wurden je nach Versuch verschiedene DNA Polymerasen eingesetzt. Sollte das PCR-Fragment für Ligation, Transformation und spätere Sequenzierung weiterverwendet werden wurde die langsamere aber genauer arbeitende Pwo-DNA-Polymerase (proof reading enzyme mit 3' -> 5' Exonucleaseaktivität) eingesetzt (Peqlab). Ein Standardansatz mit einem Volumen von 50 µl enthielt je 50 pmol jedes Primers, 0.2 mM dNTPs, ca. 100 ng DNA als Vorlage, 5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer, 1 Unit Polymerase und ddH<sub>2</sub>O. Die Reaktionen wurden in einem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, Conneticut, USA) durchgeführt.

## **2.11 Klonierung der PCR-Fragmente**

### **2.11.1 Ligation**

Zu je 8 µl PCR-Fragment wurden 2 µl T4 DNA-Ligase Puffer (MBI, Litauen), 4 µl PEG 4000 (MBI), 1 µl BSA (MBI), 4 Units (2 µl) T4 DNA-Ligase (MBI, Litauen) und 1 µl (circa 50 ng) Vektor gegeben und der Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Zur Ligation wurden die Proben für 1 h bei 22°C inkubiert.

### **2.11.2 Transformation**

Zur Transformation wurden die kompetenten Bakterien im Eisbad aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsansatzes folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Daraufhin wurden die Ansätze 30 s bei 42°C inkubiert, 5 min auf Eis gestellt und nach Zugabe von 800 µl LB-Medium zur Ausbildung der Resistenz eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Von jedem Ansatz wurden je 150 µl auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg\*ml<sup>-1</sup>) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der Ligation wurden dann aus einigen der über Nacht angezogenen Einzelkolonien die Plasmide isoliert und mittels PCR und Restriktionsmuster verifiziert.

## **2.12 Sequenzierung**

### **2.12.1 Sequenzreaktion**

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde in Anlehnung an die Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Mit Markierung von fluoreszenzmarkierten ddNTP's (ABI PRISM™ Big DyeTermination Cycle-Sequencing Ready Reaktion Kit (Perkin Elmer)) und anschließender Auftrennung und Identifizierung durch Kapillarelektrophorese (ABI PRISM 310, Genetic Analyser, Perkin Elmer) wurde die Sequenz ermittelt und später mit dem Programm Lasergene DNASTAR (5.0) ausgewertet.

Die Ansätze für das Cycle-Sequencing enthielten:

Plasmid:	1 µg
Primer:	je 5 pmol
BD-Kit:	3 µl
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 10 µl Endvolumen

Die PCR wurde in einem GeneAmp PCR System 2400 PCR-Block (Perkin Elmer) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Denaturierung:	94°C	30s	
Denaturierung:	94°C	10s	————
Anlagerung:	50°C	5s	↑ 30 Zyklen ↓
Elongation:	60°C	4min	————
Letzte Elongation:	60°C	7min	

Nach dem Cycle-Sequencing wurden die Proben mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt, mit 257 µl Ethanol und 10 µl 3M NaAc (pH 5.2) gefällt, zweimal mit 80% Ethanol gewaschen, das Sediment getrocknet und in 20 µl TSR Kit aufgenommen. Nach einer Denaturierung für 2 min bei 96°C wurden die Ansätze in spezielle Reaktionsgefäße überführt und bis zur Sequenzierung bei 4°C gelagert.

### 2.12.2 Industrielle Sequenzierung

Die zu sequenzierenden Proben wurden mit Pwo-Polymerase amplifiziert und über Gelelektrophorese aufgetrennt, quantifiziert und aus dem Gel eluiert (Qiagen). Die Elute wurden in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und auf die von GATC-Biotech (GATC Biotech, Konstanz, Germany) vorgeschriebenen Konzentrationen verdünnt. Die Sequenzprimer wurden ebenfalls in den von GATC beschriebenen Konzentrationen zur Sequenz vorbereitet. Die Sequenzierung erfolgte auf einem ABI Sequenzierer Modell 3730 (Angaben von GATC) in ungenannten Bedingungen von einer Länge bis zu 700 Basen. Die Sequenzläufe wurden als ABI Traces (\*.abi, und Fasta formatierte Sequenzdateien) und Fasta

Sequenzdateien geliefert. So konnte die Qualität der Sequenz und die Genauigkeit der Korrektur überprüft werden.

## **2.13 Ionenchromatographie**

### **2.13.1 Anionenanalyse**

Zur Analyse der Anionenverteilung durch Elicitierung wurde das Kulturmedium der Zellen analysiert. Fünfzig Milliliter der Zellkultur von *A.thaliana* wurden mit 500 nM PaNie eliciert und zu verschiedenen Zeitpunkten 2 ml entnommen. Diese Probe wurde durch einen Filter (0.2 µm) von allen Schwebeteilchen befreit und in spezielle Ionenchromatographie Gefäße, verdünnt (1:10) mit Millipore Wasser überführt. Die Ionenchromatographie erfolgte auf einem Dionex DX120 Ionenchromatograph (Dionex, Kalifornien, USA), mit einem Probengeber (Dionex AS40 Automated Sampler) über eine Anionensäule (IonPac, AS9HC Dionex). Die Analyse erfolgte bei einem konstanten Laufmittelfluss von 1 ml\*min<sup>-1</sup> als Leitfähigkeitsbestimmung in Kombination mit Retentionszeitbestimmung. Die verwendeten Standards wurden in Konzentrationen von 10 µM, 100 µM, 1 mM, 5 mM und 10 mM als Gemisch von sechs Anionen zum eichen und quantifizieren verwendet. Die jeweiligen Retentionszeiten der Standards dienten der Identifizierung und die Intergrale unter den Flächen der Standards der Quantifizierung der Proben. Verwendete Standards für die Anionen waren Fluorid, Chlorid, Nitrit, Nitrat, Phosphat und Sulfat. Die Analysesoftware war Peak Net Client (Version 6.4) von Dionex.

### **2.13.2 Kationenanalyse**

Zur Analyse der Kationenverteilung durch Elicitierung wurde ebenfalls das Kulturmedium der Zellen analysiert (vgl. oben). Die Kationenchromatographie erfolgte über eine Kationensäule (IonPac, CS12A Dionex). Die Analyse erfolgte bei einem konstanten Laufmittelfluss von 1 ml\*min<sup>-1</sup> als Leitfähigkeitsbestimmung in Kombination mit Retentionszeitbestimmung. Die verwendeten Standards wurden in Konzentrationen von 50 µM, 200 µM, 1 mM und 2 mM als Gemisch von fünf Kationen zum eichen und quantifizieren

verwendet. Verwendete Standards für die Kationen waren Natrium, Ammonium, Kalium, Magnesium und Calcium.

## **2.14 Gaschromatographischer Nachweis der Ethylenakkumulation**

### **2.14.1 Gaschromatographischer Nachweis der Ethylenakkumulation im Gasraum einer Zellkultur von *A. thaliana***

Zellen einer Zellkultur von *A.thaliana* wurden am fünften Tag nach dem Überimpfen eliciert. Dazu wurde die Zellkultur zuerst in kleine Erlenmeyerkolben von 25 ml Volumen (45 ml Gesamtgasvolumen total) zu je 10 ml aliquotiert. Sofort nach Elicitorgabe wurde der Gasraum mit gasdichten Silikonstopfen verschlossen und die Proben wieder auf einem Rundschtüttler befestigt (Bachhofer, Modell TMR, 150 rpm). Nach der Inkubationszeit bei 26°C im Dunkeln ist für jede der drei parallelen Messungen 1 ml aus dem Gasraum mit einer gasdichten Spritze entnommen und der Ethylengehalt gaschromatographisch ermittelt worden.

### **2.14.2 Messbedingungen**

Die Ethylenmessung wurde an einem Gaschromatographen (HP 5890, Hewlett Packard) mit angeschlossenem Integrator (HP 3396 Series II Integrator) durchgeführt. Zur Auftrennung fand eine *fused silica* Kapillare (plot Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KCl, Chrompack, Frankfurt a.M.) mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KCl als stationäre Phase Verwendung. Die Kapillare hatte einen Innendurchmesser von 0.53 mm und eine Länge von 50 m. Die Bedingungen der GC-Läufe sind im Folgenden aufgeführt.

Ofentemperatur: isotherm 50°C

Trärgas: 15 ml N<sub>2</sub>\*min<sup>-1</sup>

Injektor: 200°C, Split 160 ml\*min<sup>-1</sup>, Separator 5 ml\*min<sup>-1</sup>

Detektor: FID 200°C; H<sub>2</sub> 10 ml\*min<sup>-1</sup>, synthetische Luft 400 ml\*min<sup>-1</sup>

### **2.14.3 Identifizierung und Quantifizierung von Ethylen**

Die Identifizierung des Ethylens erfolgte anhand eines mit reinem Ethylen hergestellten Standards durch Vergleich der jeweiligen Retentionszeit der erhaltenen Peaks am Integrator. Zur Herstellung des Standards wurde ein mit N<sub>2</sub> gespülter Glasballon mit reinem Ethylen (99.99%) begast und gasdicht verschlossen. Aus diesem Vorrat wurde über zwei Verdünnungsschritte (1 : 150 und 1 : 1240 = 1 : 186000) der Eichstandard hergestellt. Die Endkonzentration des eingesetzten Standards betrug 5.38 ppm. Die Fläche des bei den Proben auftretenden Ethylenpeaks wurde auf die Ethylenpeakfläche des Standards bezogen.

### **2.15 Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS: reactive oxygen species)**

Reaktive Sauerstoff Spezies wurden mittels der DAB-Methode in Blättern nachgewiesen. Die Methode beruht auf der Polymerisation von DAB (3,3'-Diaminobenzidin) zu einem braunen Polymer bei Anwesenheit eines geeigneten Elektronen-Donators, in diesem Fall H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dafür wurde in die Blattunterseite der Rosettenblätter von *A.thaliana* mit einer Tuberkulinspritze ohne Kanüle 5 µl einer 10 µM PaNie Lösung und 1 mg\*ml<sup>-1</sup> DAB infiltriert (Veit et al., 2001). Eine Chlorophyllextraktion wurde durch Überschichten der Blätter im 15 ml Reaktionsgefäß mit 92% Ethanol bei 100°C erreicht, dazu wurde der Ethanol mehrmals gewechselt. Die entfärbten Blätter wurden zur Rehydrierung in 0.2 M KP<sub>i</sub>-Puffer gelagert und konnten bereits nach 15 min dokumentiert werden. Lagerung der Proben erfolgte in 70% Ethanol, bei 4°C im Dunkeln. Dokumentation erfolgte auf einem Photoscanner (Epson Perfection 1650) bei 600 dpi im Durchlicht.

### **2.16 Kalloseablagerungen**

Zur Abschottung von Wunden und der Eintrittsstelle von Pathogenen wird von der Pflanze Kallose verwendet. Diese Moleküle lassen sich im Gewebe von *Arabidopsis* Blättern mit Anilinblau nachweisen (Gómez-Gómez *et al.*, 1999);

diese Technik geht auf Currier und Strugger (1956) zurück. Die verwendete und abgewandelte Methode ist in Veit *et al.* (2001) beschrieben.

## **2.17 Durchmusterung einer T-DNA Insertions Linie**

### **2.17.1 Selektive Anzucht in BM-PaNie Medium**

Die sterilisierten Samen (vgl. 2.7.2) wurden aus den Reaktionsgefäßen mit einer Pipette entnommen und in 10 ml BM-Medium mit 10 µM PaNie gegeben. Die Anzucht erfolgte in Petrischalen mit einem Durchmesser von 45 mm unter konstanten Bedingungen in einem Wachstumsschrank bei 16/8 h Licht/Dunkel Rhythmus und 21/18°C Temperatur. Die Keimlinge wurden für 6 Wochen so im Medium belassen und die Überlebenden Individuen in Kulturerde überführt.

### **2.17.2 Auswahl der selektiv angezogenen Pflanzen**

Die selektiv angezogenen Pflanzen aus der Selektion mit dem Elicitor PaNie wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt. Die Pflanzen mussten grün, das heißt, photosynthetisch aktiv und auch in Kulturerde überlebensfähig sein. Des Weiteren wurden alle positiv Ausgewählten dieser Auslese einer zweiten, wiederholten Auswahl im BM-Medium mit PaNie unterzogen. Individuen, die dieses zweite Auswahlverfahren ebenfalls positiv überstanden haben, wurden zur weiteren genetischen Analyse herangezogen.

### **2.17.3 Jack T-DNA Insertionslinie**

Um eine Mutante in der Erkennung, Weiterleitung oder Abwehr von Pathogenen, insbesondere des PaNie Elicitor zu finden wurde eine T-DNA Insertions Linie von Thomas P. Jack (Jack T-DNA Lines) verwendet (Campisi *et al.*, 1999). Diese Mutation beruht auf einer durch *Agrobacterium tumefaciens* herbeigeführten Übertragung von DNA vom Vektor in die Wirtszelle, wodurch Gene in ihrer Funktion zerstört werden können. Zur Erstellung der T-DNA Linien wurde der Vektor pD991 mit einer „enhancer trap“ verwendet. Diese T-DNA kodiert für eine Kanamycin Resistenz zur selektiven Anzucht, einer bakteriellen

uidA ( $\beta$ -glucuronidase:GUS) die von einem -60 minimal Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) Promotor und der untranslatierten 3' Region des Nopalin Synthase Gens (3' NOS) flankiert ist. Die Insertionslinie hat eine Populationsgröße von 50.000 Individuen. Zusammengefasst werden sie in 50 Superpools zu je 100 Subpools mit je 10 Linien ( $50 \times 100 \times 10 = 50.000$ ). Die *A.thaliana* Samen mit dem Columbia-6 Ökotyp wurden von der Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC, Plant Science Division, University of Nottingham, UK) bezogen.

#### **2.17.4 Sterilisation der Jack T-DNA Linien**

Zur sterilen Anzucht der Pflanzen wurde diese vor dem Ausbringen in Nährmedium keimfrei gemacht. Dafür wurden etwa 200-250 Samen in destilliertem Wasser für 30 min vorgequollen. Das Wasser wurde verworfen und zu den gequollenen Samen eine 10 prozentige Natriumhypochlorid Lösung gegeben. Nach 15 min wurde das Natriumhypochlorid verworfen und die Samen mit sterilem destilliertem Wasser mehrfach gespült. Abschließend wurden die Samen mit 70% Ethanol für 10 min behandelt. Das Ethanol wurde verworfen, die Samen zwei Mal mit sterilem destillierten Wasser gewaschen und in BM-Medium mit 0.5% Agarose aufgenommen und ausplattiert. In den Inkubationszeiten wurden die Reaktionsgefäße (15 ml) auf einem Überkopfschüttler zur gründlichen Durchmischung befestigt.

#### **2.17.5 Isolation von genomischer DNA aus den T-DNA Linien**

Einhundert Milligramm Blattmaterial wurden mit einem Homogenisator im Reaktionsgefäß (1.5 ml) unter Verwendung von 200  $\mu$ l Extraktionspuffer aufgeschlossen, gemischt und mit 200  $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gemischt und sedimentiert. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Isopropanol zum Überstand wurden die Nukleinsäuren sedimentiert (21000 g, 15 min, 4°C); in 50  $\mu$ l Wasser aufgenommen und ein RNase-A Verdau durchgeführt (RT, 30 min).

### **2.17.6 Tail-PCR auf der genomischen DNA der T-DNA Linien**

Das Prinzip der Tail-PCR geht auf Liu et al. (1995) zurück. Dabei werden unspezifische Primer (random primer) und spezifische Ankerprimer verwendet. Die unspezifischen Primer sind sehr kurze DNA Fragmente, die zufällig in der DNA binden. Die so genannten Ankerprimer dagegen stammen aus der bekannten DNA Sequenz der T-DNA. Die verwendeten Ankerprimer liegen dabei aber unterschiedlich weit vom Ende der T-DNA entfernt. So lässt sich sicherstellen, dass die stattgefundenene PCR-Reaktion keine Zufällige, sondern eine spezifische war. Die Besonderheit der Tail-PCR liegt darin, dass man sozusagen auf der genomischen DNA Sequenzieren kann, ohne die Sequenz vorher schon zu kennen. Die Reaktionsbedingungen für die Tail-PCR, wie Temperatur, Dauer der einzelnen Reaktionen (Denaturation, Annealing und Elongation) wurden exakt nach der vorliegenden Arbeit von Liu et al. durchgeführt.

### **2.17.7 Abgleich der Sequenzdaten mit einer Gendatenbank**

Da die Mutagenese auf der Insertion eines T-DNA Elements in die Wirts-DNA beruht, lässt sich über die Tail-PCR die Stelle in der die T-DNA inseriert ist genau bestimmen. Die angrenzenden Bereiche können über Sequenzvergleiche mit Sequenzdatenbanken genauestens lokalisiert werden. Dafür wurden die, aus der Tail-PCR gewonnenen PCR Produkte einer Sequenzreaktion unterzogen um an die angrenzenden Nukleotidsequenzen der T-DNA zu gelangen. Die an die T-DNA angrenzenden Bereiche der genomischen DNA werden isoliert betrachtet und an eine der öffentlich zugänglichen Gendatenbanken geschickt (NCBI). Dort werden die Sequenzen mit dem gesamten Genom von *A.thaliana* abgeglichen und lokalisiert (Altschul et al. 1997). Diese Informationen aus der Datenbank helfen herauszufinden, ob die Mutation darauf zurückzuführen ist, dass ein Bereich, der für ein Gen kodiert, direkt oder indirekt betroffen ist. Da bei den Sequenzvergleichen nicht nur Informationen über den Ort (Chromosom, Basenabfolgen) der Insertion geliefert werden, sondern auch darüber wofür diese Sequenzen eventuell kodieren.

### **2.18 Alternative PaNie Sequenzen aus verschiedenen Pythiaceen**

Um Klarheit über die Bedeutung des Elicitorproteins für die *Pythium* Arten zu bekommen, wurden Sequenzen aus drei weiteren *Pythiaceae* sequenziert. Dazu wurde die genomische DNA (ein Geschenk von A. Riethmüller, Spezielle Botanik, Abteilung Prof. Dr. Oberwinkler, Universität Tübingen) spezifisch mit den Primern für das PaNie Gen amplifiziert. Verwendet wurden die Primer für das „reife“ Protein und die für das Protein mit „Leader“ Sequenz. Die Bedingungen für die PCR waren unverändert zur Sequenzanalyse von *Pythium aphanidermatum*, lediglich für die Leadersequenz wurde die Annealing Temperatur drastisch gesenkt (50°C). Bei den untersuchten *Pythiaceae* handelt es sich um die Arten *Pythium monospermum* (Pringsh.), *Pythium middletonii* (Sparrow) und *Pythium* aff. *vanterpoolii* (V. Kouyeas und H. Kouyeas).

**2.19 Abkürzungen**

A	Absorption
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
cDNA	komplementäre DNA
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendinitrilo-Tetraacetat
FG	Frischgewicht
g	Gramm
h	Stunde
HR	hypersensitive Reaktion
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol)-2yl2,5-diphenyltetrazolium-bromid
mRNA	messenger RNA
RNase	Ribonuclease
rpm	rotations per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
TRIS	Tris-(hydroxy-methyl)-amino-methan
U	unit
v/v	volume per volume

w/v            weight per volume

### **2.20 Puffer, Lösungen und Medien**

DNA-Extraktionspuffer: 100 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 8.0

DNA-Ladepuffer: TE-Puffer (3.5x), 30% (v/v) Glycerin, 0.02% (w/v) Bromphenolblau

Hybridisierungslösung: 0.33 M NaPi-Puffer pH 7.0, 1 mM EDTA, 7% (w/v) SDS, 1% (w/v) BSA

LB-Medium: 170 mM NaCl, 1% (w/v) Bacto Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, pH 7.0

MS<sub>A</sub>: 4.3 g MS-Salze, 30 g Saccharose, 0.5 mg NAA, 0.05 mg Kinetin, pH 5.7 (KOH) ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O

MOPS-Puffer (10x): 400 mM MOPS, 100 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7.0

**2.21 Chemikalien und Verbrauchsmittel.**

Amersham, Braunschweig:	Hybond N+ Nylonmembran, [ $\alpha$ 32P] - dCTP
Amresco, Solon, USA	Ethidiumbromid (10 mg • ml <sup>-1</sup> )
Appligene, Heidelberg	Taq-DNA Polymerase
ARK, Darmstadt	Sequenz-Primer
Fluka, Neu-Ulm	Formaldehyd, DEPC
Greiner, Nürtingen	Petrischalen, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße
Kodak Company,	Röntgenfilme X-Omat-XAR-5 (13x18 cm)
MBI Fermentas, Litauen	DNA Labelling Kit, Restriktionsendonucleasen: DNA Ligation Kit
Perkin Elmer, USA	ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
PeqLab, Erlangen	Pwo-DNA Polymerase
Pharmacia, Freiburg	RNase A
QIAGEN, Hilden	Qiaquick Gel Extraction Kit
Roth, Karlsruhe	Aqua Roti Phenol, SDS
Sartorius, Göttingen	Sterilfilter (Type: SM 17597)
Sigma, München	Tris/HCl, Tris-Base, MOPS, EDTA, BSA, MES
Stratagene, Heidelberg	NucTrap® Probe Purification Columns

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p.a.-Qualität bezogen.

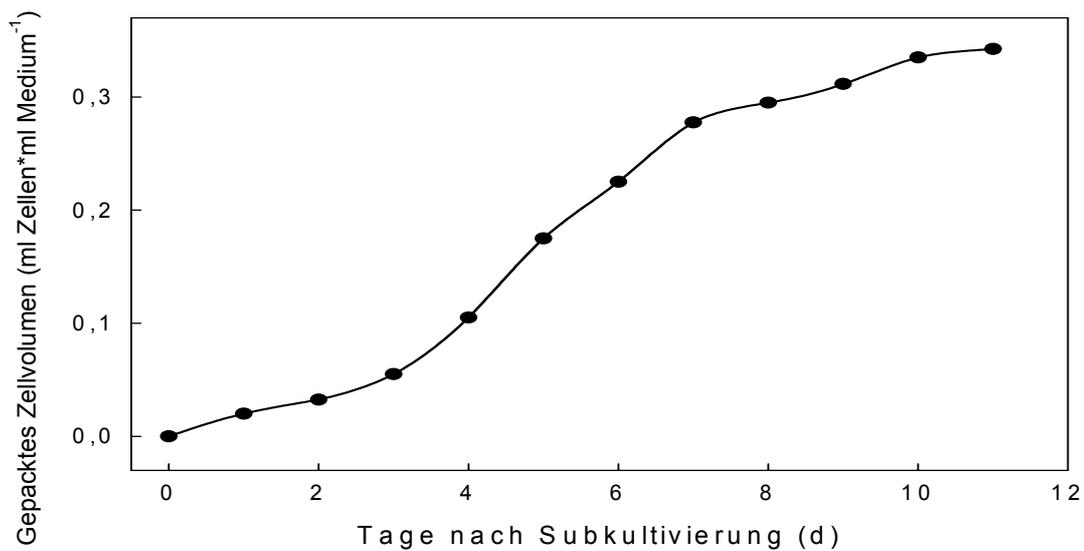
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Abwehrreaktionen der pflanzlichen Zellkultur

An einer Zellkultur von *A.thaliana* wurden verschiedene Abwehrreaktionen auf den Kontakt mit einem gereinigten Proteinelicitor aus *Pythium aphanidermatum* untersucht. Diese Untersuchungen umfassten den quantitativen Nachweis von Zelltod, die Alkalisierung des Kulturmediums als Reaktionen der HR, den zeitlichen Verlauf der Phytoalexinakkumulation, Salicylsäureproduktion und Ethylenfreisetzung, sowie und die Regulation der transkriptionalen Aktivität als Bestandteile der SAR. Ein Nachweis zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies wurde ebenfalls gemacht. Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Teilaspekten der Pathogenabwehr wurden diese Versuche unter Verwendung von Hemmstoffen durchgeführt.

#### 3.1.1 Wachstumsverlauf einer *A.thaliana* Zellkultur nach Subkultivierung

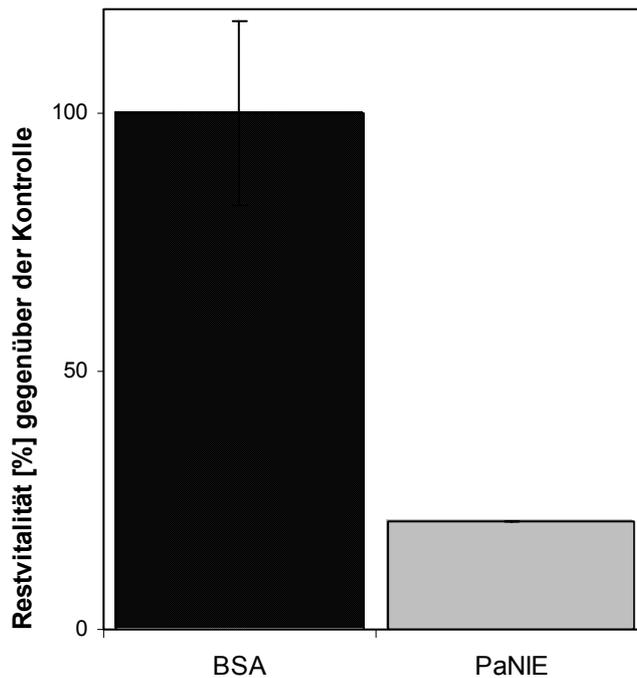
Um die Wirkung des Proteinelicitors PaNie auf die *Arabidopsis thaliana* Suspensionskultur untersuchen zu können, musste zuerst das Wachstumsverhalten der Kultur charakterisiert werden um den günstigsten Zeitpunkt für spätere Elicitierungen zu ermitteln. Für den Zeitpunkt der Behandlungen mit Elicitoren erwies sich bei anderen Zellkulturen, z.B. von *Daucus carota* die exponentielle Wachstumsphase als günstig. Der Wachstumsverlauf wurde mit Hilfe des gepackten Zellvolumens (vgl. Abb. 3.1.1) verfolgt und zeigt das charakteristische Bild für eine schnell wachsende Zellkultur. Die Phase des exponentiellen Wachstums lag auch hier zwischen dem 4. und 6. Tag. In der anschließenden Sättigungsphase nimmt nur noch das Zellvolumen durch Wasseraufnahme zu, Zellteilung findet dann nicht mehr statt.



**Abbildung 3.1.1: Wachstumsverlauf einer Zellkultur von *A.thaliana*.** Zur Ermittlung des gepackten Zellvolumens wurde täglich aus drei Kolben je 1ml Zellsuspension entnommen und in modifizierten Hämatokritröhrchen nach Zentrifugation das gepackte Zellvolumen bestimmt (Seitz und Richter, 1970).

### 3.1.2 Vitalitätstest mit der MTT-Methode

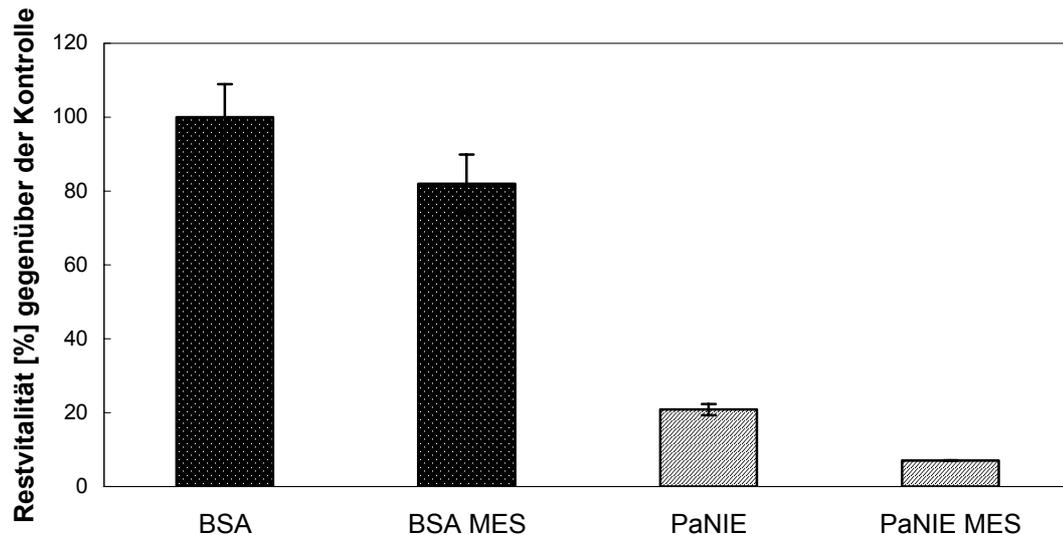
Die Vitalität der Zellkultur wurde mit Hilfe der Umsetzung von farblosen MTT zu farbigen Formazan quantitativ erfasst. Wie Abbildung 3.1.2 zeigt ist die Abnahme der Vitalität ein schneller Effekt. Bereits 16 h nach Elicitierung verbleiben in der Probe lediglich zwanzig Prozent der Zellen vital, die anderen begehen einen programmierten Zelltod.



**Abbildung 3.1.2: Vitalitätsverlust in einer *A.thaliana* Zellkultur.** 16 h nach Elicitierung (500 nM) verbleiben 20% der Zellen nach Elicitor Behandlung vital (schraffiert). Die Kontrolle verliert nicht an Vitalität (massiv mit Punkten).

### 3.1.3 Vitalitätsverlust unter konstantem pH-Wert

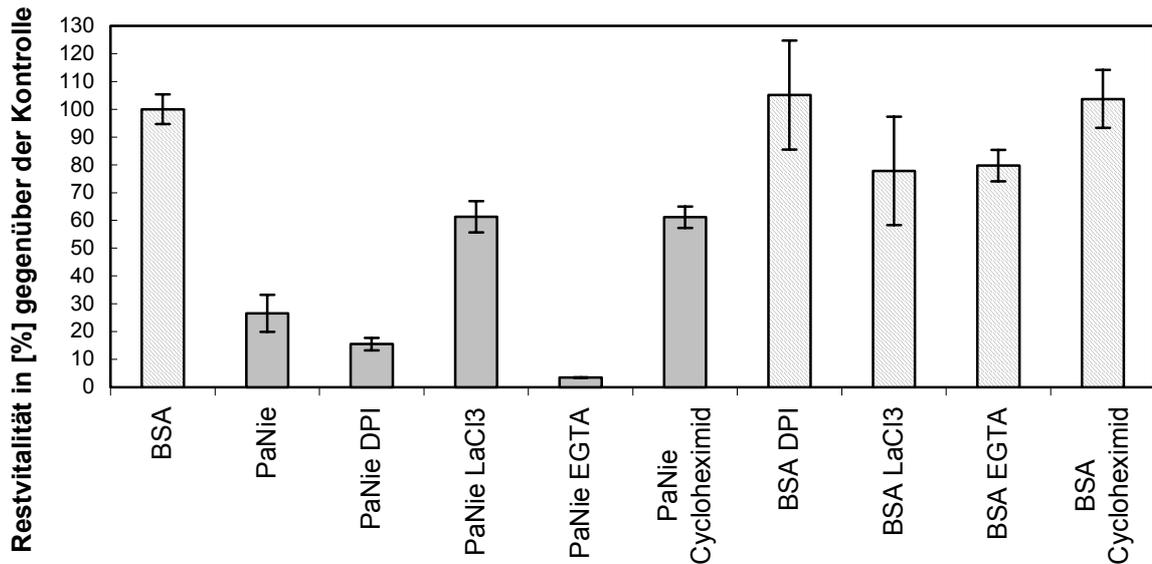
Um die Bedeutung der Alkalisierung des Mediums zu untersuchen, wurde der pH-Wert des Mediums, in dem sich die Zellen befinden mit einem Puffer (50 mM Tris-MES, pH 5.45) stabilisiert. Die durch den Elicitor hervorgerufene Alkalisierung unterbleibt (vgl. Abb. 3.2.3) in diesem System nahezu vollständig. Die jeweils zusätzliche Behandlung mit Puffer führte im Vergleich mit Kontrollen, die nur mit dem Elicitor bzw. BSA, zu einem leicht erhöhten Vitalitätsverlust. Da Kontrolle (BSA+MES) und Probe (PaNie+MES) in ihrer Vitalität gleichermaßen absanken ist dieser Effekt durch den Puffer und nicht mit veränderten pH Bedingungen zu erklären. Die Referenzen ohne Puffer zeigten die üblichen Werte von 20% Restvitalität nach Behandlung mit dem Elicitor.



**Abbildung 3.1.3: Vitalitätsverlust einer Zellkultur von *A.thaliana* nach Elicitierung in gepuffertem Medium bei konstantem pH-Wert.** Die mit dem Elicitor (schraffiert) behandelte Zellkultur von *A.thaliana* zeigte in gepuffertem Medium (pH 5.45, 50 mM Tris-MES) einen deutlichen Vitalitätsverlust (Zeit nach Elicitierung 16 h) gegenüber der Kontrolle (massiv mit Punkten).

### 3.1.4 Vitalitätsverlust nach Elicitierung unter Hemmstoffeinfluss

Um die Bedeutung der einzelnen Signalwege und ihre Vernetzung für Abwehrreaktionen näher zu untersuchen, wurde mit Inhibitoren (DPI, ein Inhibitor der NADPH Oxidase), die Freisetzung von  $H_2O_2$  verhindert. Außerdem wurde der Calciumeinstrom durch Hemmung von Calciumkanälen mit Lanthanchlorid unterbunden, welches den Einstrom in die Zelle unterbindet. Mit EGTA wurde vornehmlich  $Ca^{2+}$  des Mediums gebunden, um die Bedeutung extrazellulären  $Ca^{2+}$  zu untersuchen. Schließlich wurde mit Verwendung von Cycloheximid die Bedeutung translationsabhängiger Prozesse für elicitorinduzierte Abwehrreaktionen geprüft.



**Abbildung 3.1.4: Vitalitätsverlust bei Elicitierung unter Hemmstoffeinfluss.**

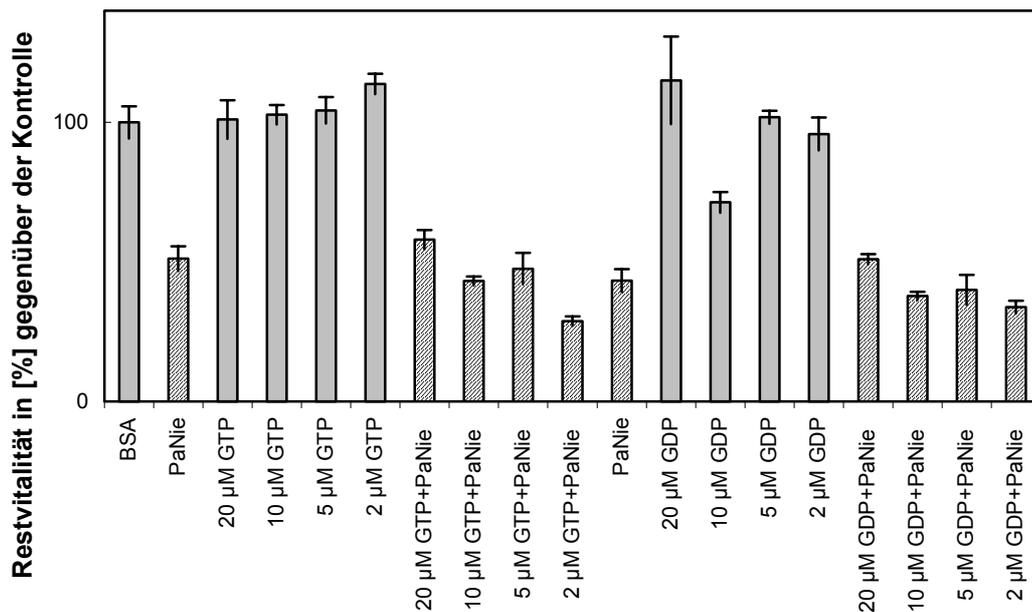
Die mit Elicitor (grau) behandelten Zellkulturen von *A.thaliana* zeigten teils deutlich stärkeren Vitalitätsverlust als die Kontrollen (schraffiert). Zeit nach Elicitierung 16 h.

In Kombination mit BSA führte die Zugabe der untersuchten Hemmstoffe nicht zu einem verstärkten Absterben der Zellkultur. Die einzige Probe, die hierbei einen Unterschied zur Kontrolle zeigte, war die mit EGTA behandelte. Hier sank die Vitalität auf 80%. Die Kombination des Elicitors jeweils mit DPI und EGTA verstärkten den durch den Elicitor induzierten Vitalitätsverlust (auf 15 bzw. 3%). In beiden Fällen sank die Vitalität unter die sonst gemessenen 20% Restvitalität. Bei den mit EGTA behandelten Proben sogar auf 3%, das entsprechen 17% zusätzlichem Vitalitätsverlust.

In den mit LaCl<sub>3</sub> und Cycloheximid behandelten Proben wurde der Zelltod in starkem Maße verhindert. Mehr als sechzig Prozent der Zellen waren nach der Elicitorbehandlung noch vital. Das ist ein Dreifaches der Vitalität verglichen mit den Kontrollen. Die Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration und die Neusynthese von Proteinen sind ein Voraussetzung für Zelltod, die Unterdrückung einer dieser Vorgänge hindert die Zellen in den programmierten Zelltod einzutreten.

### **3.1.5 Einfluss von G-Protein Aktivatoren und Inaktivatoren auf den Zelltod**

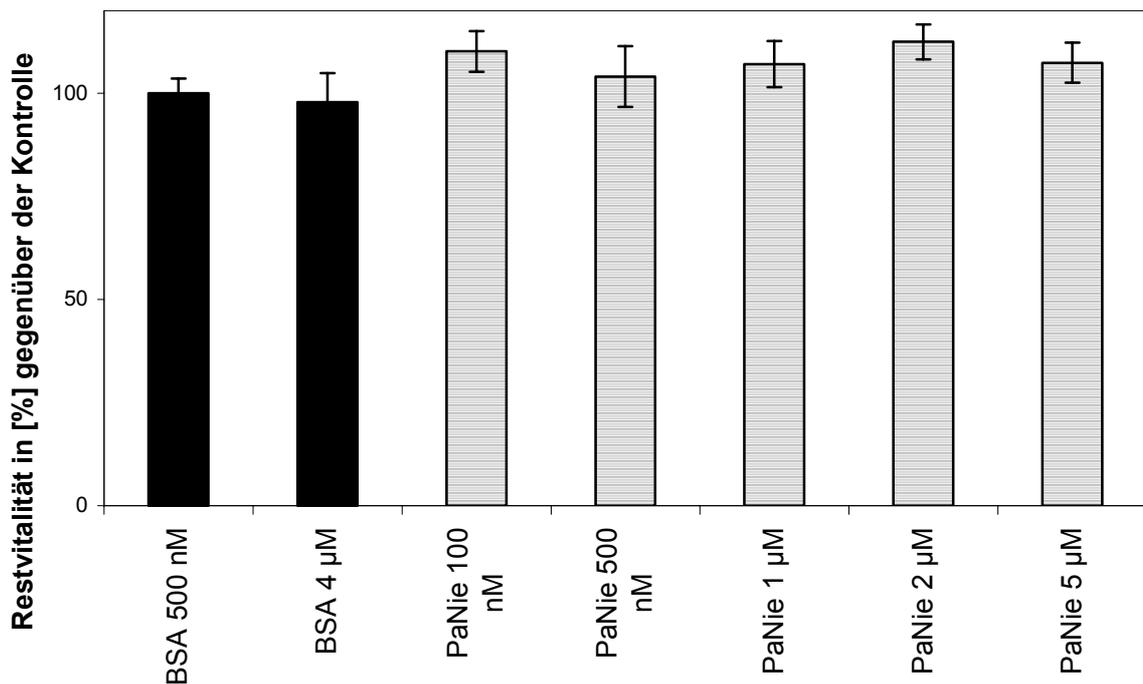
Die Hemmstoffe GTP- $\gamma$ -S und GDP- $\beta$ -S wurden verwendet, um den Einfluss von G-Proteinen auf den Zelltod zu untersuchen. Die Aktivierung der G-Proteine erfolgt über die Einlagerung von GTP in den heterotrimeren Proteinkomplex, welches durch die Spaltung zu GDP in die inaktive Form überführt wird. Bei den verwendeten Molekülen GTP- $\gamma$ -S und GDP- $\beta$ -S handelt es sich um modifizierte Moleküle, welche nicht zu GDP hydrolysierbar sind, und damit die Bindestelle blockieren. Im vorliegenden Fall wurde untersucht, ob sich der Zelltod durch GTP- $\gamma$ -S simulieren lässt und somit die Beteiligung von G-Proteinen an der Signaltransduktion im Falle des elicitorvermittelten Zelltods wahrscheinlich gemacht werden kann. Als Negativkontrolle diente die Gabe von GDP- $\beta$ -S, durch die der G-Protein vermittelte Zelltod unterbunden werden sollte (schraffiert). Aus Abbildung 3.1.5 geht hervor, dass die Situation, die durch den Elicitor ausgelöst wird, hierdurch nicht simuliert werden kann (schraffiert). GTP- $\gamma$ -S und das GDP Analogon GDP- $\beta$ -S (grau) lösten bei keiner der behandelten Proben Zelltod aus; allerdings konnte auch mit keinem der Hemmstoffe ein Elicitor induzierter Zelltod verhindert werden.



**Abbildung 3.1.5: Einfluss von G-Protein Aktivatoren und Inaktivatoren auf den Zelltod.** MTT-Test zum Vitalitätsverlust von Zellkulturen in Kombination von G-Protein Aktivatoren (GTP- $\gamma$ -S) (grau) und Inaktivatoren (GDP- $\beta$ -S) (grau) in Kombination mit dem Elicitor (schraffiert).

### 3.1.6 Elicitor-induzierter Vitalitätsverlust in Zellkultur von *Panicum maximum*

Wie in einer früheren Arbeit gezeigt wurde, löst der Elicitor nur bei Dikotyledonen Nekrosen aus (Veit et al. 2001). Eine Elicitorkonzentration von 100 nM führte bei *A.thaliana* bereits zu einem starken Vitalitätsverlust, löste in der Zellkultur von *P.maximum* keine Reaktion aus. Selbst bei fünfzigfacher Konzentration (5  $\mu$ M) zeigte sich keine Reduktion der Vitalität. Der Effekt des Elicitors auf die Vitalität der Zellkultur konnte bei *A.thaliana* bei Konzentrationen höher als 500 nM nicht übertroffen werden. Höhere Konzentrationen als 5  $\mu$ M wurden in der Hirse nicht untersucht, da bei diesen Konzentrationen bereits mit unspezifischen Verdünnungseffekten zu rechnen gewesen wäre.



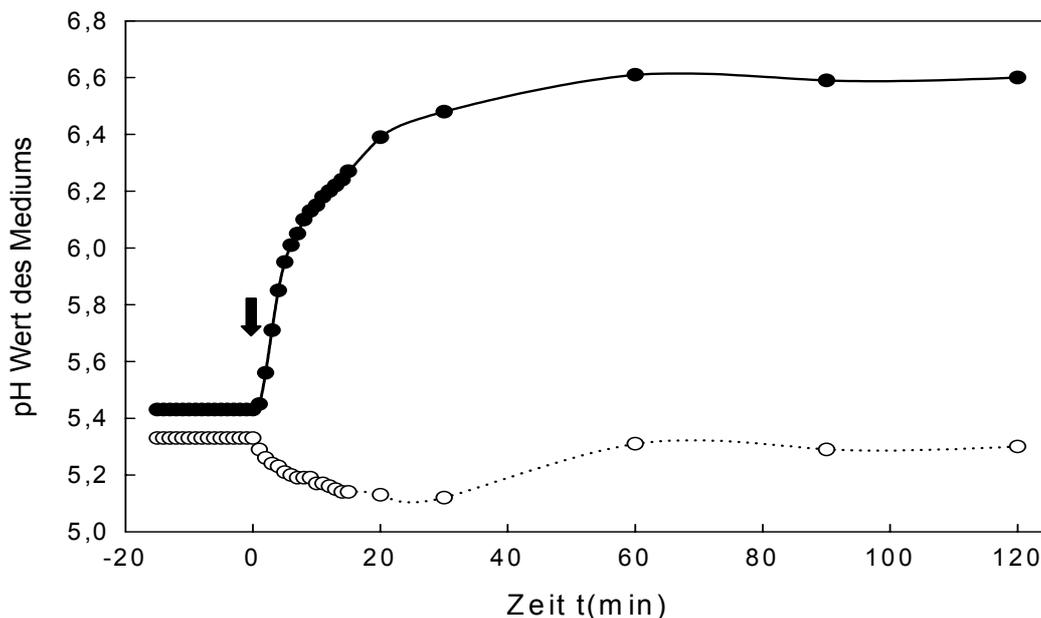
**Abbildung 3.1.6: Vitalitätsverlust bei Elicitierung einer Zellkultur von *Panicum maximum*.** Die mit dem Elicitor behandelte Zellkultur der Hirse zeigte im gleichen Kulturmedium wie *A.thaliana* keinerlei Vitalitätsverlust (schraffiert). Selbst bei zehnfacher Elicitorkonzentration konnte keine Abnahme der Vitalität, wie sie bei Dikotylen beobachtet werden kann, gemessen werden. Die Kontrolle (schwarz) zeigt ebenfalls keine Veränderung. Zeit nach Elicitierung 16 h.

## 3.2 Alkalisierung des Kulturmediums bei Elicitorkontakt

### 3.2.1 Alkalisierung des Kulturmediums durch Elicitierung mit PaNie

Die Ansäuerung des Cytoplasmas und die Alkalisierung des Apoplasten nach Pathogenkontakt oder Elicitorbehandlung sind gut untersuchte Phänomene. Im vorliegenden Fall wurde die Alkalisierung des Kulturmediums in einer Zellkultur von *A.thaliana* untersucht. Die Alkalisierung erfolgte sehr schnell unter Austausch von Protonen ( $H^+$ ) aus dem Außenmedium gegen Kationen (überwiegend  $K^+$ ) aus der Zelle. Die Bedeutung der Alkalisierung (bzw. Ansäuerung des Cytoplasmas) als Teilreaktionen der Pathogenabwehr sollte hierbei untersucht werden. Die Zellkulturen wurden zur Messung aus dem Kulturraum für das Experiment auf einen Rundschüttler im Labor überführt. Nach einer Ruhephase von einer Stunde wurde der pH-Wert zur Dokumentation der Stabilität fünfzehn Minuten vor dem Versuch aufgezeichnet. Wie aus Abbildung 3.2.1 hervorgeht ist die Alkalisierung des Mediums eine sehr schnelle

Reaktion auf den Elicitor, die bereits zwei 2 min nach Elicitorkontakt einsetzte, und der Vorgang innerhalb von 15 min bereits zu 95% gesättigt war. Diese Reaktion erreichte einen Endwert von pH 6.6 und verblieb für circa 48 h auf hohem Niveau. Da der pH-Wert der Zellkulturen großen Schwankungen unterlag (zwischen 4.8 und 5.3), wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Daten im Weiteren der  $\Delta$  pH-Wert angegeben. In den Kontrollproben (BSA) konnte keine Alkalisierung festgestellt werden.

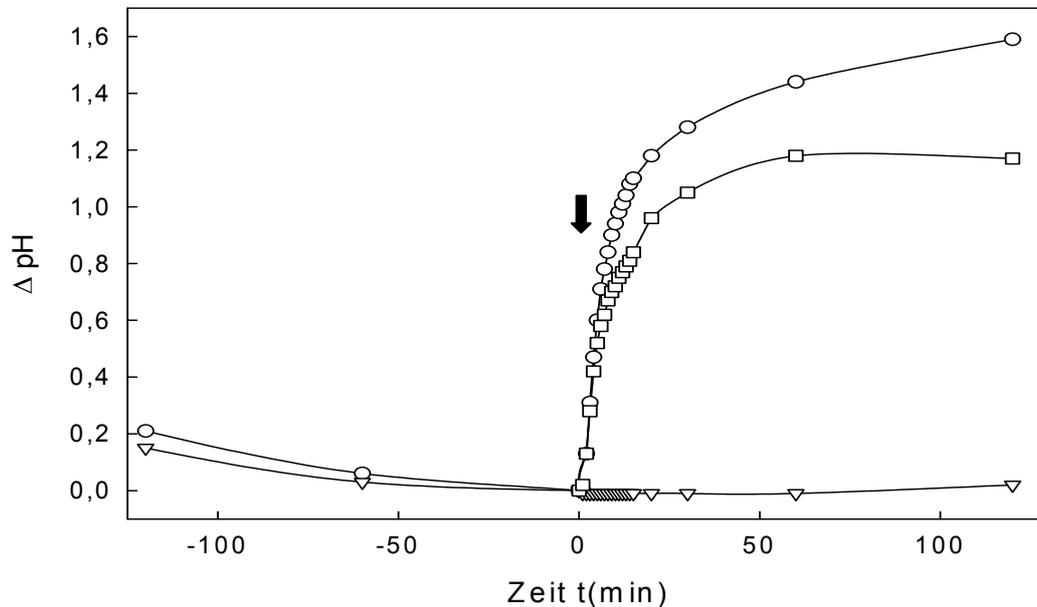


**Abbildung 3.2.1:** Alkalisierung des Kulturmediums durch Elicitierung. Die durch die Elicitorbehandlung (500 nM) induzierte Alkalisierung des Mediums wurde mit Hilfe eines pH-Meters dokumentiert. Die Pfeilspitze gibt den Zeitpunkt der Elicitorzugabe an. Der pH-Wert vor der Behandlung blieb konstant. Er sank nach Zugabe von BSA (○) leicht ab und stieg nach Elicitorapplikation (●) messbar an.

### 3.2.2 Alkalisierung des Kulturmediums nach Vorbehandlung mit Salicylsäure

Da Salicylsäure bei der erfolgreichen Abwehr von Pathogenen eine entscheidende Rolle spielt, wurde in diesem Versuch die Zellkultur mit käuflicher Salicylsäure vorbehandelt. Nach Zugabe von 10  $\mu$ M SA und einer Inkubationszeit von 2.5 h wurde erneut (vgl. 3.2.1) die Alkalisierung gemessen. Es wurde deutlich, dass die Alkalisierungsreaktion nicht schneller, dafür jedoch stärker (vgl. 3.2.2) ausfiel. Es kam zu einer Alkalisierung mit einem  $\Delta$  pH von 1.59 Einheiten nach nur 120 min. Dies entspricht 0.402 pH Einheiten mehr

gegenüber einer Elicitierung ohne SA Vorbehandlung. Die mit SA vorbehandelte Kontrolle zeigte im zeitlichen Verlauf keine Änderung des pH-Wertes. Ein reiner Salicylsäure Effekt ist somit auszuschließen.

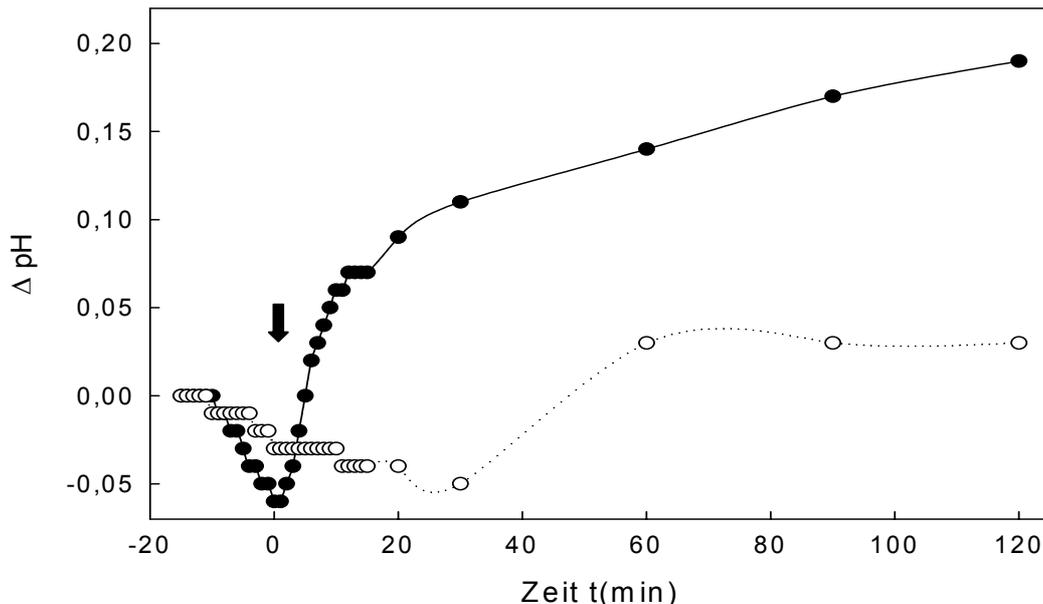


**Abbildung 3.2.2:** Vorbehandlung der Zellkultur mit Salicylsäure vor Elicitorapplikation. Die Zellkultur wurde 2.5 h vor der Elicitierung mit SA (10  $\mu$ M) behandelt. Bis zur 7. Minute waren beide Verläufe identisch, im weiteren Verlauf jedoch alkalisierte die nicht vorbehandelte Kultur ( $\square$ ) schwächer als die mit Salicylsäure vorbehandelte ( $\circ$ ), die Kontrolle mit BSA ( $\nabla$ ) blieb auf stabilem Niveau. Die Pfeilspitze gibt den Zeitpunkt der Elicitorzugabe an.

### 3.2.3 Inhibition der Alkalisierung durch gepuffertes Kulturmedium

Nach Unterbinden der Alkalisierung durch puffern des Kulturmediums (vgl. 3.3.4) konnte die Zellkultur nach Kontakt mit Elicitor kein Camalexin produzieren. Aus Abbildung 3.2.3 wird ersichtlich, in welcher Weise der Puffer die kultivierten Zellen inhibierte den pH des Außenmediums zu alkalisieren. Nach Zugabe des Puffers ließ sich zu Beginn ein leichter Abfall des pH-Wertes erkennen, der von den elicitierten Zellen schnell wieder ausgeglichen werden konnte. Anschließend kam es hier zu einem leichten Anstieg des pH-Wertes. Die Kontrolle mit BSA anstelle des Elicitors wies ebenfalls leichte Schwankungen im pH-Wert auf, welche sich jedoch im Rahmen üblicher Abweichungen bewegten. Der Anstieg des pH-Wertes nach Elicitierung in diesem gepufferten System machte hier lediglich 0.2 Einheiten aus, was verglichen mit einer

Alkalisierungsleistung von über 1.1 pH-Einheiten im ungepufferten Modell (vgl. 3.2.1) gering war. Dieser minimale Anstieg reichte, wie schon aus Abbildung 3.3.4 zu erkennen ist, nicht aus um die Phytoalexin-synthetisierenden Signalwege zu aktivieren.

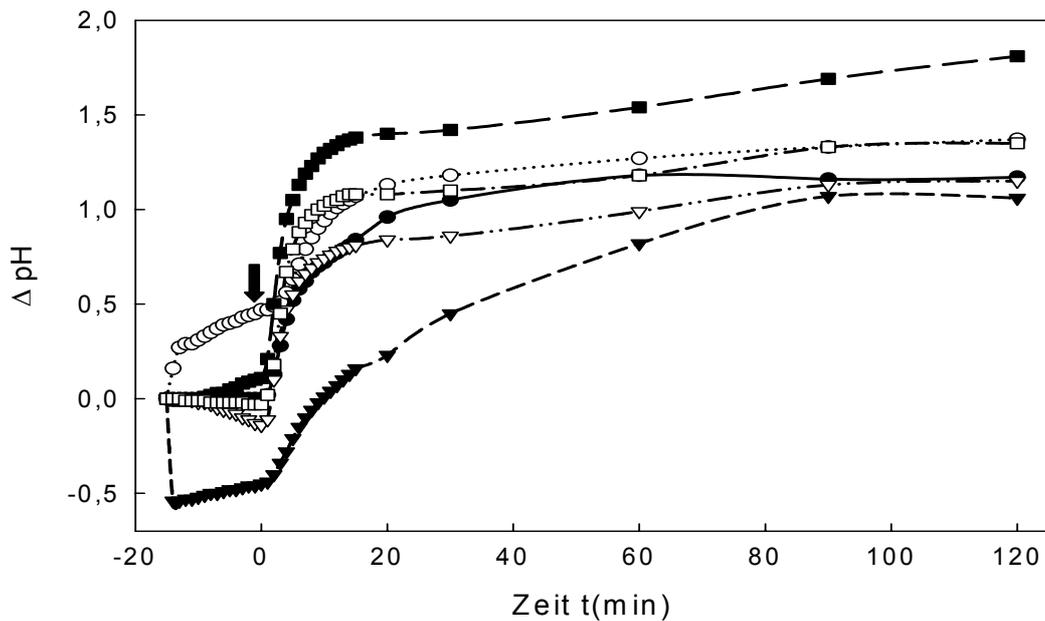


**Abbildung 3.2.3: Inhibition der Alkalisierung durch ein Tris/MES Puffersystem.** Die durch die Elicitorbehandlung (●) (500 nM) induzierte Alkalisierung des Mediums wurde mit Hilfe eines Puffers gehemmt; Kontrolle mit BSA (○). Die Pfeilspitze gibt den Zeitpunkt der Elicitorzugabe an.

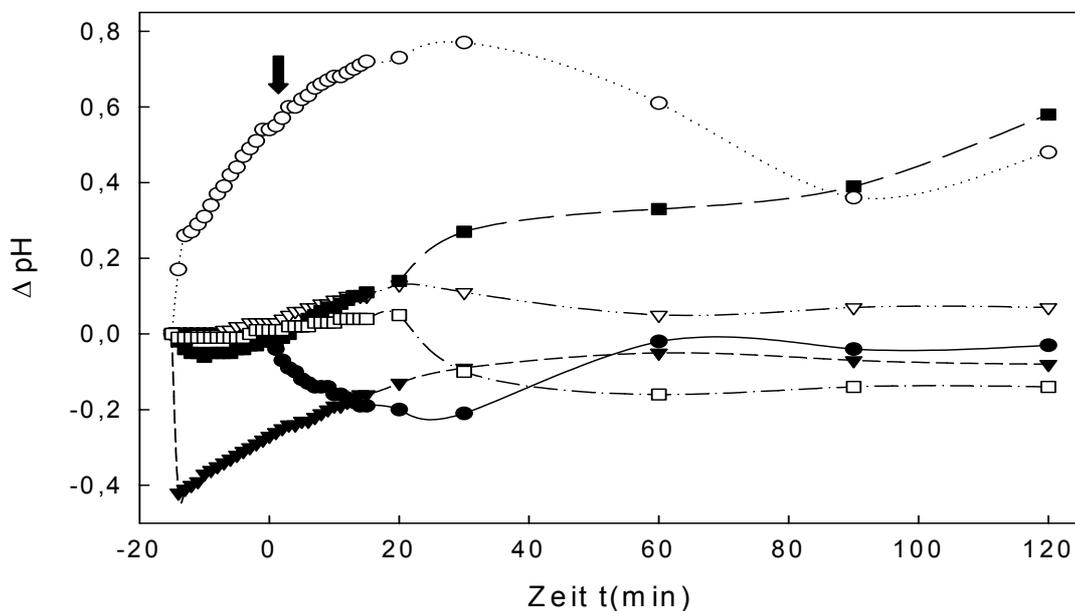
### 3.2.4 Einfluss von Hemmstoffen auf die Alkalisierung des Außenmediums

Die erfolgreiche Pathogenabwehr setzt sich aus einem Bündel unterschiedlicher Abwehrmechanismen und deren zeitlichen Verläufe zusammen; die Interaktion der Reaktionsketten untereinander ist noch nicht vollständig geklärt. Hemmstoffe wie Cycloheximid oder AVG, welche die Translation beeinflussen oder die Aktivität von Enzymen (ACC-Synthase) hemmen, wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Bedeutung für die Alkalisierung untersucht. Aus Abb. 3.2.1 geht hervor, dass die Alkalisierung eine zu schnelle Reaktion ist, als dass sie durch zeitlich nachgeschaltete Prozesse beeinflusst sein könnte. Die Verläufe zwischen der lediglich mit Elicitor behandelten Probe und den Proben, die 15

min vor Elicitor Zugabe mit  $\text{LaCl}_3$ , DPI und AVG vorbehandelt wurden, unterschieden sich nicht. Unterschiede traten dagegen bei den Proben auf, die mit EGTA oder Cycloheximid vorbehandelt worden waren. Die mit EGTA behandelte Probe zeigte einen drastischen Abfall der Protonenkonzentration um 0.6 pH Einheiten, die aber mit Beginn der Elicitierung wieder anstieg. Der Verlauf war hier weniger steil als in der Kontrolle mit PaNie hielt jedoch länger an (vgl. Abb. 3.2.4a). Die mit Cycloheximid behandelten Proben zeigten anfangs einen mit den übrigen Proben ähnlichen Verlauf der Alkalisierung, die jedoch deutlich steiler verlief. Als Folge davon wiesen die mit Cycloheximid behandelten Proben den höchsten positiven  $\Delta$  pH von 1.81 auf. Diese Differenz wird nur von der EGTA Probe erreicht wenn man den  $\Delta$  pH vom Zeitpunkt nach der Applikation des Chelatbildners bestimmt, dann liegt er bei 1.6. Abbildung 3.2.4b zeigt die Alkalisierung der mit BSA versehenen Kontrollen. Auch in diesem Ansatz wurde der Hemmstoff jeweils 15 min vor BSA zugegeben. Es ließ sich kein abweichender Verlauf bei den Proben erkennen, die mit BSA, DPI, AVG, bzw. EGTA behandelt worden waren. Die Proben mit Cycloheximid und  $\text{LaCl}_3$  dagegen zeigten einen höheren  $\Delta$  pH als die übrigen. Diese Steigerung war jedoch nur transient und unterlag großen Schwankungen. Die Abweichung vom Nullwert war nach 120 min geringer als in den ersten Minuten nach Hemmstoffapplikation.



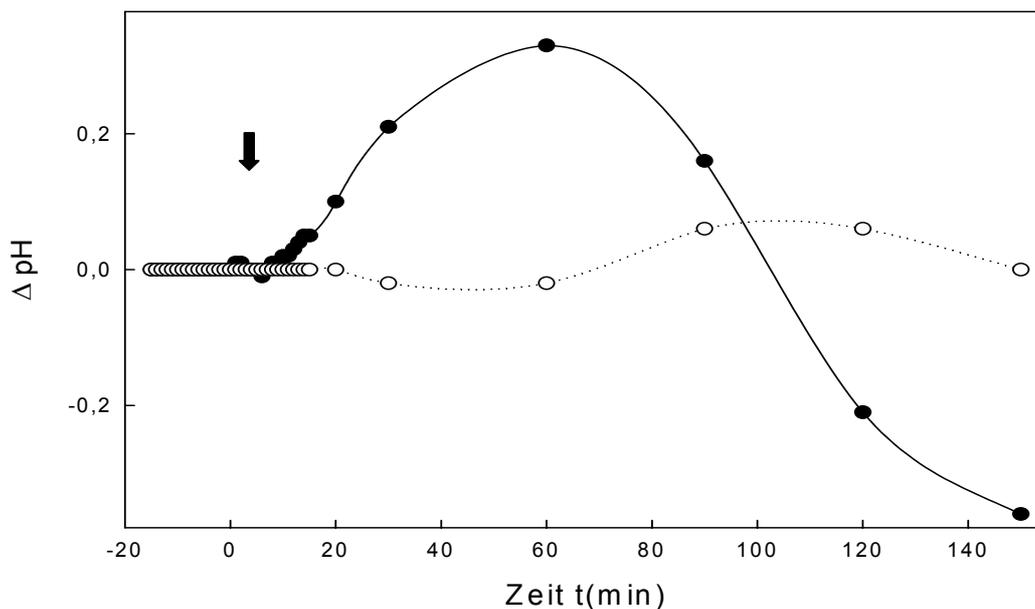
**Abbildung 3.2.4a: Alkalisierungsreaktionen nach Hemmstoffapplikation und Elicitierung.** Die vorbehandelten Zellkulturen von *A.thaliana* wiesen nach Zugabe von DPI (▽),  $\text{LaCl}_3$  (○) und AVG (□) keine Veränderung im Verlauf der Alkalisierungsreaktionen gegenüber PaNie (●) auf. Die mit Cycloheximid (■) bzw. EGTA (▼) behandelten Proben zeigten einen veränderten Verlauf. Die Pfeilspitze gibt den Zeitpunkt der Elicitorzugabe an.



**Abbildung 3.2.4b: Alkalisierungsreaktionen nach Hemmstoffapplikation in der Kontrolle.** Die vorbehandelten Zellkulturen von *A.thaliana* zeigten bei Behandlung mit DPI (▽), EGTA (▼) bzw. AVG (□) keine Abweichung gegenüber BSA (●). Die mit Cycloheximid (■), bzw.  $\text{LaCl}_3$  (○) behandelten Proben zeigten einen veränderten Verlauf. Die Pfeilspitze gibt den Zeitpunkt der BSA Zugabe an.

### 3.2.5 Alkalisierungsreaktionen einer Zellkultur von *P.maximum*

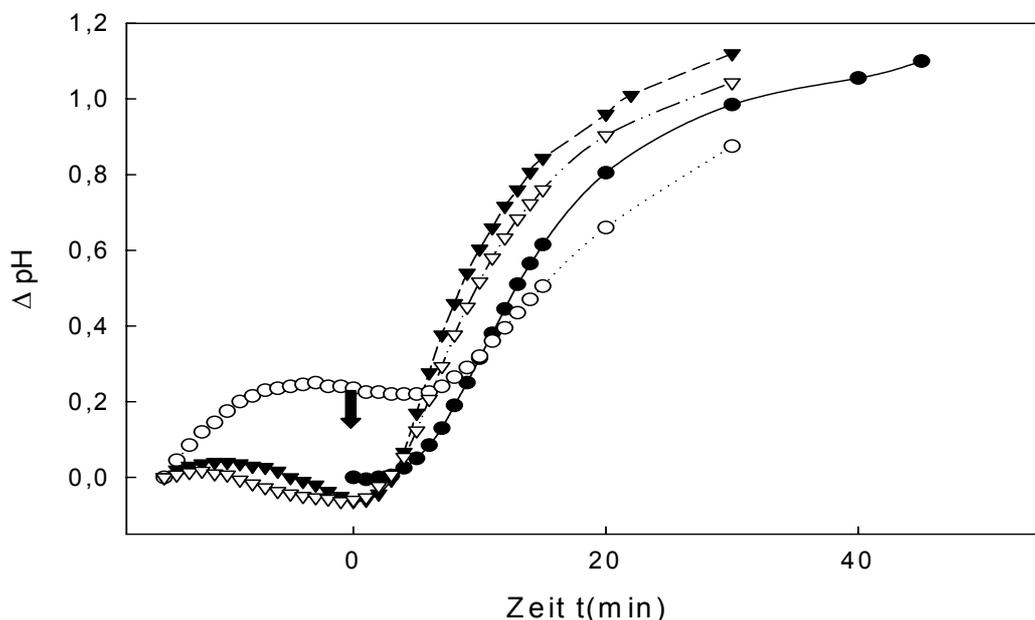
Die Zellkultur von *P.maximum*, die auf keine der getesteten Konzentrationen des Elicitors PaNie mit Zelltod reagierte, wurde auf eine eventuelle Alkalisierung hin untersucht. Es zeigte sich, dass diese Zellkultur nicht auf den Elicitor reagiert. Es konnte kein bei Zellkulturen von *A.thaliana* gemessener schneller und steiler Anstieg des pH-Wertes beobachtet werden. Zu Beginn war der pH-Wert im Außenmedium der Zellkultur (vgl. Abb. 3.2.5) sehr stabil, reagierte auf Elicitierung (●) langsam mit einer schwachen Alkalisierung ( $\Delta$  pH 0.3). Nach 60 min wurde hierbei ein Maximum erreicht, von wo aus der pH-Wert auf den Ausgangswert zurückfiel diesen sogar deutlich unterschritt. Nach Elicitorbehandlung wurde hier somit keine ausreichende Alkalisierung des Außenmediums erreicht, welche zu Zelltod und Phytoalexinbiosynthese führen könnte.



**Abbildung 3.2.5: Alkalisierungsreaktionen der Hirse nach Elicitierung.** Die Zellkultur der Hirse, die in keiner gemessenen Konzentration des Elicitors PaNie mit Zelltod reagierte, wies keine eindeutige Alkalisierungsreaktion auf. Mit PaNie (●) kam es zu einem kurzen Anstieg des pH-Wertes, die BSA Kontrolle (○) blieb unverändert. Die Pfeilspitze gibt den Zeitpunkt der Elicitor Zugabe an.

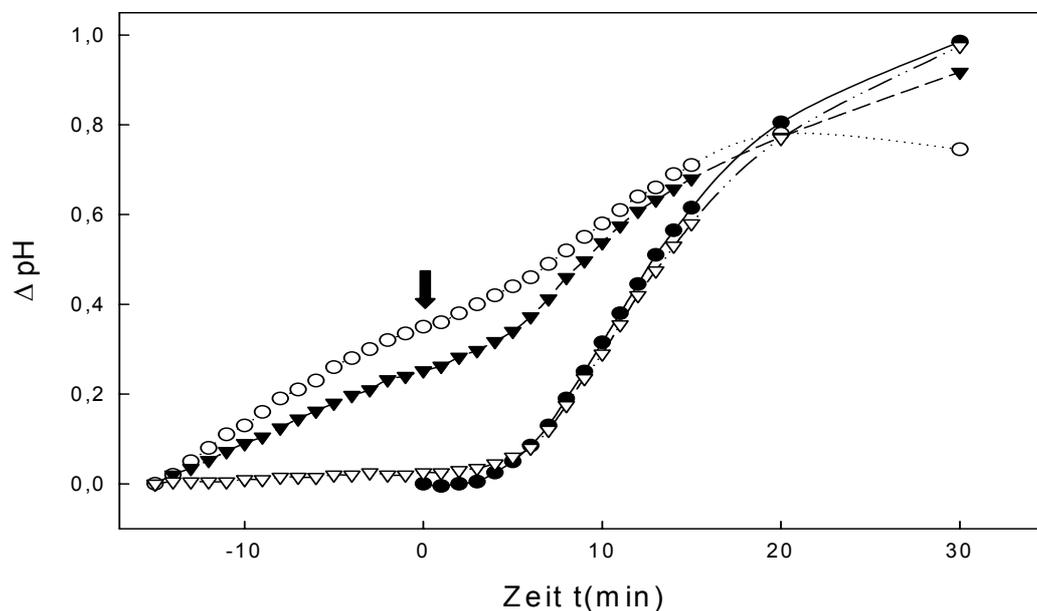
### 3.2.6 Alkalisierungsreaktion nach G-Protein Aktivierung oder Inaktivierung

Zur Untersuchung der Beteiligung von G-Proteinen an der Alkalisierung einer elicitierten *A.thaliana* Zellkultur wurden die Analoga GTP- $\gamma$ -S und GDP- $\beta$ -S sowie der Hemmstoff Mastoparan (unveröffentlichte Ergebnisse) verwendet. GTP- $\gamma$ -S bindet an der  $\alpha$ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine, kann aber nicht hydrolysiert werden und aktiviert daher konstitutiv diese Untereinheit. GDP- $\beta$ -S dagegen wird, wenn eingelagert in die  $\alpha$ -Untereinheit, nicht mehr freigesetzt. Daher bleibt die  $\alpha$ -Untereinheit im inaktiven Zustand. Abbildung 3.2.6a zeigt nun eine Dosis-Wirkungskurve nach Behandlung mit GTP- $\gamma$ -S. Bei Konzentrationen von weniger als 20  $\mu$ M GTP- $\gamma$ -S gab es keine messbare Abweichung vom üblichen Verlauf. Die Behandlung mit 20  $\mu$ M GTP- $\gamma$ -S führte zu Beginn des Versuches zu einem Anstieg des pH-Wertes, welcher sich anschließend stabilisierte und nach Zugabe des Elicitors zeitlich verzögert anstieg.



**Abbildung 3.2.6a: Alkalisierung einer *A.thaliana* - Zellkultur unter Einsatz von GTP- $\gamma$ -S und PaNie.** Die Proben mit 5 und 10  $\mu$ M GTP- $\gamma$ -S ( $\blacktriangledown, \triangledown$ ) zeigten keine Abweichung vom normalen Verlauf ( $\bullet$ ) (vgl. Abb. 3.2.1) und erreichten vergleichbare  $\Delta$ pH Werte nach gleicher Zeit. Die mit 20  $\mu$ M GTP- $\gamma$ -S behandelten Proben (o) alkalisieren von Beginn des Experiments bis zum Zeitpunkt der Elicitorapplikation leicht ( $\Delta$  pH 0.22) das Medium. Die Pfeilspitze gibt den Zeitpunkt der Elicitor Zugabe an.

Die Zellen, die mit dem Hemmstoff GDP- $\beta$ -S behandelt wurden, wiesen in ihrer Alkalisierungsreaktion bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M GDP- $\beta$ -S verglichen mit der Kontrolle keinen Unterschied auf. Ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M GDP- $\beta$ -S konnte sofort nach Zugabe des Hemmstoffes eine Zunahme des pH-Wertes gemessen werden. Dieses Phänomen konnte nicht durch Applikation eines Elicitors verstärkt oder beschleunigt werden. Hier zeigt sich leicht verzögert ein sigmoidaler Verlauf (zwischen 5 und 10 min) (vgl. Abb. 3.2.6b), wie sie für den Elicitor beobachtet werden konnte.



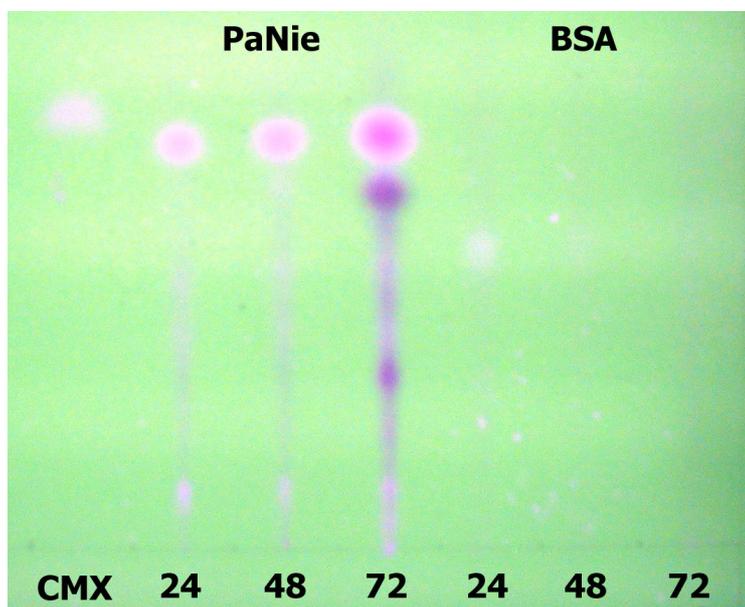
**Abbildung 3.2.6b: Verläufe der Alkalisierung des Mediums einer *A.thaliana* – Zellkultur unter Einsatz von GDP- $\beta$ -S und PaNie.** Die mit 10  $\mu$ M ( $\blacktriangledown$ ) und 20  $\mu$ M (o) GDP- $\beta$ -S behandelten Proben zeigten eine Abweichung vom normalen Alkalisierungsverlauf ( $\bullet$ ) (vgl. Abb. 3.2.1). Die mit 5  $\mu$ M GDP- $\beta$ -S behandelten Proben ( $\nabla$ ) alkalisierten vergleichbar dem Verlauf der Kontrolle das Medium. Die Pfeilspitze gibt den Zeitpunkt der Elicitorzugabe an.

### 3.3 Induktion der Camalexinakkumulation durch Elicitierung

#### 3.3.1 Camalexinakkumulation in Zellkulturen von *A.thaliana*

Das Indolderivat Camalexin ist das wichtigste Phytoalexin der Brassicaceen und somit auch von *A.thaliana*. Seine Produktion wird über abiotische (Malcherowitz, 2001) und biotische Stressfaktoren ausgelöst (Glazebrook et al., 1997). Als antimikrobieller Wirkstoff reduziert es das Wachstum der Schadorganismen.

Dieses Phytoalexin ist als hellblau strahlende Bande bei einer Anregungswellenlänge von 312 nm auf der Dünnschichtplatte zu erkennen. Camalexin wird wie aus Abbildung 3.3.1 zu erkennen ist, bereits 24 h nach Kontakt mit dem Elicitor produziert, erreicht nach 48 h einen höheren Wert und zeigt nach 72 h ein Maximum. Da die Zellkultur als Reaktion auf Behandlung mit dem Elicitor phenolische Verbindungen produziert, die das elicitorinduzierte Camalexinsignal überlagern könnten, wurde nach der ersten Chromatographie die Camalexinbande erneut isoliert und einer Rechromatographie unterzogen.

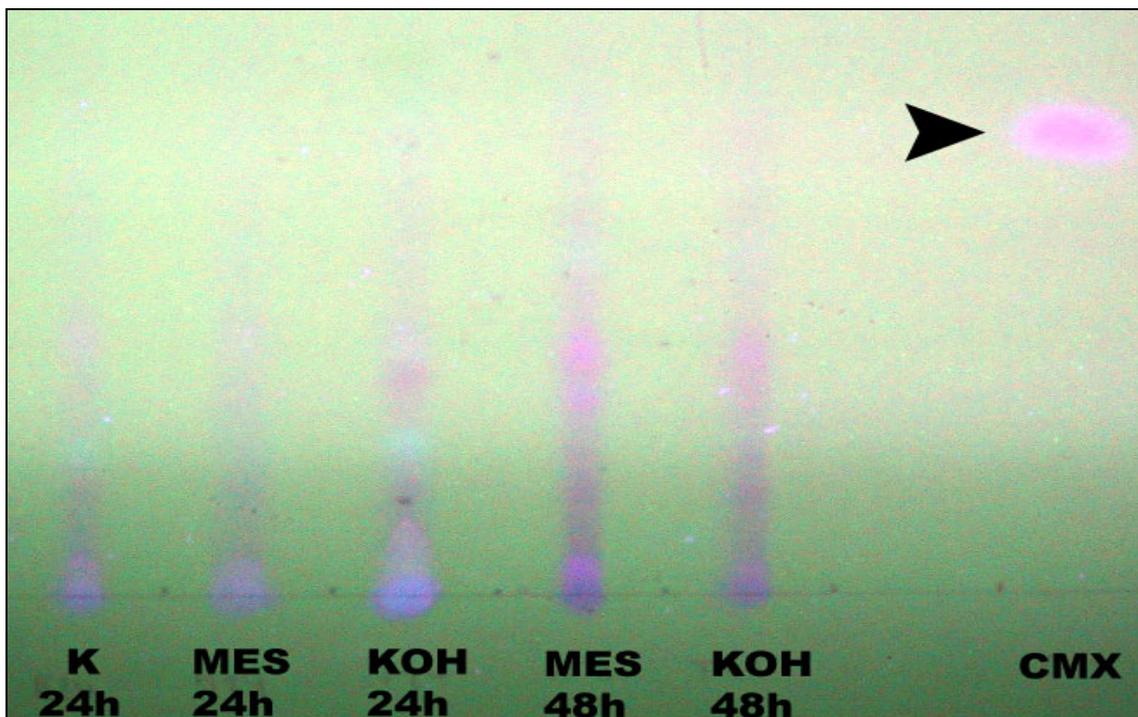


**Abbildung 3.3.1: Kinetik der Camalexinakkumulation.** Die Camalexinakkumulation beginnt nach 24 h und steigert sich bis zum Zeitpunkt nach 72 h. CMX der Camalexinstandard, 24, 48, 72 links zeigen die mit PaNie behandelten Extrakte aus Arabidopsis (in h nach Elicitierung), rechts die Kontrollen mit BSA.

### 3.3.2 Camalexininduktion durch pH-Wert Erhöhung

Da die Alkalisierung des Kulturmediums auf Elicitorkontakt ein häufig beobachtetes Phänomen ist (vgl. 1.4), stellte sich für diesen Versuchsansatz die Frage welche Rolle eine pH-Wert Änderung im Außenmedium auf die Produktion des Phytoalexins Camalexin hat. Hierfür wurde der pH-Wert des Kulturmediums mit einem Puffer auf einen Wert eingestellt, der auch bei Elicitierung erreicht wird (pH 6.7; vgl. Abbildung 3.2.1). In diesem Medium wurden die Zellen für 48 h belassen und anschließend die produzierte Menge

Camalexin bestimmt. Wie aus Abb. 3.3.2 zu ersehen ist, reichte die künstliche Erhöhung des pH-Wertes im Kulturmedium nicht aus, um die Camalexinsynthese zu induzieren. Dabei spielte es keine Rolle ob der pH-Wert mit Kalilauge, mit Tris/MES beziehungsweise MES/KOH auf den Wert von 6.7 eingestellt wurde. Lediglich der pH-Wert in dem mit reiner Kalilauge eingestellten Medium wurde von der Zellkultur innerhalb von 24 h wieder auf den Ausgangswert korrigiert, da hier kein Puffersystem vorlag.

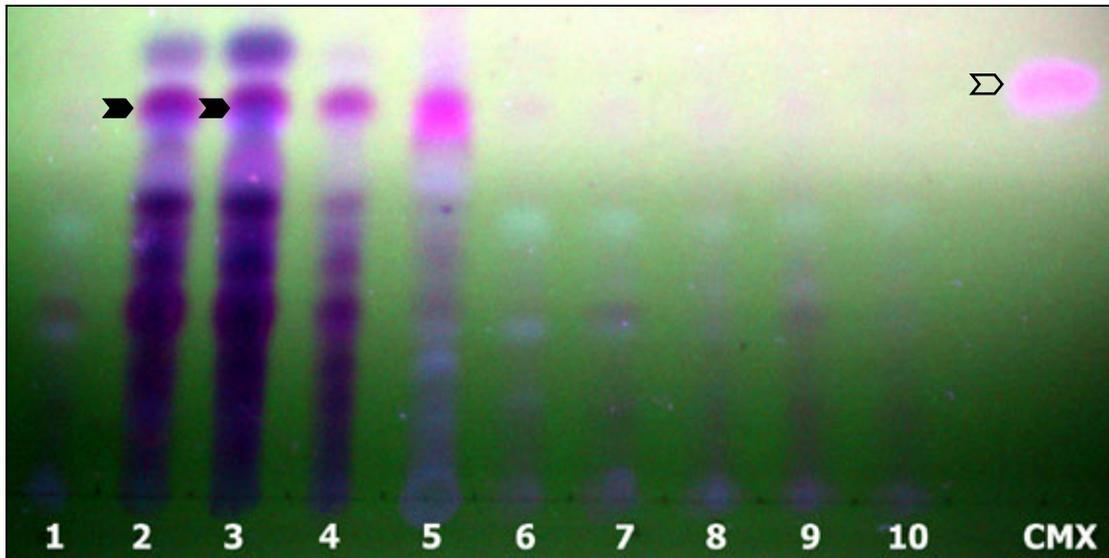


**Abbildung 3.3.2: Dünnschichtchromatographie zur Camalexininduktion durch alkalisiertes, gepuffertes Medium.** Von links nach rechts: Kontrolle mit KOH, 24 h in Tris/MES bzw. MES/KOH, 48 h in Tris/MES bzw. MES/KOH. (pH 6.7). Pfeilspitze kennzeichnet den Camalexinstandard (CMX).

### 3.3.3 Camalexinproduktion nach Zugabe von Hemmstoffen der Signaltransduktionskette

Der Befall mit einem Pathogen oder der Kontakt mit einem Elicitor führt in *A.thaliana* zur Auslösung einer Abwehrreaktion. Dabei kommt es zur transkriptionalen Aktivierung verschiedener Abwehrgene, der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, Alkalisierung des Kulturmediums, Ethylenfreisetzung und Phytoalexinsynthese. Einige dieser Reaktionen treten sehr schnell auf, andere benötigen längere Zeit um wirksam zu werden. Eine dieser

späten Reaktionen ist wie bereits beschrieben (vgl. 3.3.1) die Camalexinakkumulation in elicitorbehandelten Zellen. Um die Beziehungen der einzelnen Abwehrreaktionen untereinander zu klären, wurden unterschiedliche Inhibitoren eingesetzt, welche „upstream“ gelegene Prozesse verhindern sollten.

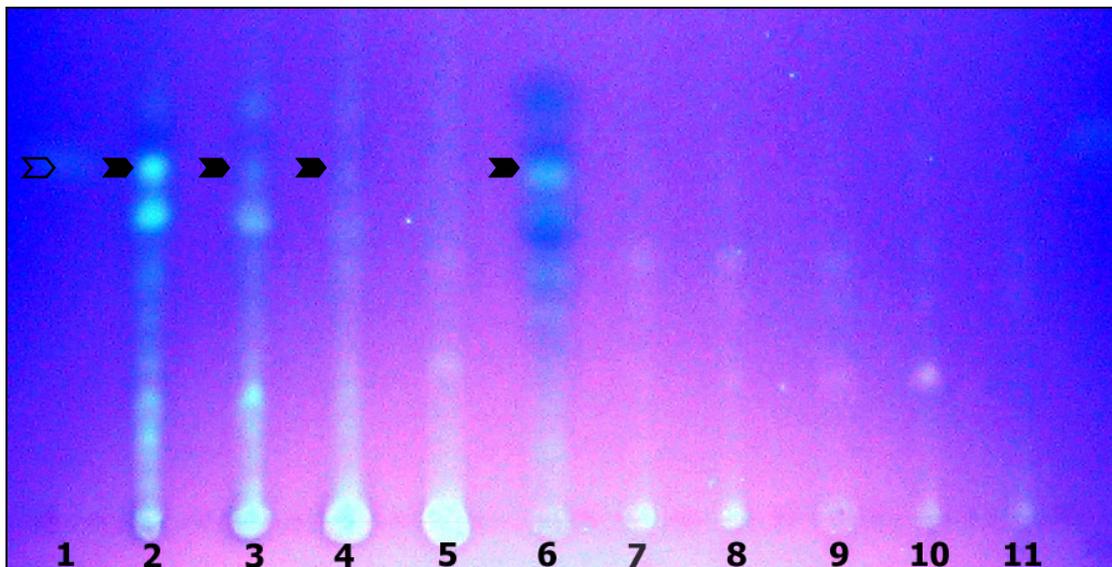


**Abbildung 3.3.3: Dünnschichtchromatographie zur Camalexininhibition mittels Hemmstoffe.** 1 BSA, 2 PaNie (500 nM), 3-6 Elicitor-behandelte Proben: 3 DPI, 4  $\text{LaCl}_3$ , 5 EGTA, 6 Cycloheximid, (7-10) Kontrollen mit BSA und Hemmstoffen wie 3-6. Jeweils 48 h nach Behandlung. Leere Pfeilspitze kennzeichnet den Camalexinstandard (CMX), gefüllte Pfeilspitzen kennzeichnen *de novo* synthetisiertes Camalexin in den Proben.

Aus Abbildung 3.3.3 wird ersichtlich, dass lediglich bei Behandlung mit Elicitor allein oder der Kombination von Elicitor und DPI die Camalexinbiosynthese aktiviert werden konnte.  $\text{Ca}^{2+}$  war für die Induktion der Camalexinbiosynthese jeweils notwendig, denn bei einer Reduktion von cytoplasmatischem, freiem  $\text{Ca}^{2+}$ , ob durch Inhibition durch  $\text{LaCl}_3$  oder durch Bindung mittels EGTA konnte keine Akkumulation von Camalexin nachgewiesen werden. Der Translationshemmstoff Cycloheximid unterbindet ebenfalls die Synthese des Phytoalexins was darauf hindeutet, dass die Enzyme der Camalexinbiosynthese *de novo* produziert werden. Die mit BSA behandelten Proben zeigten keine verstärkte Produktion phenolischer Verbindungen oder Camalexin. Auffallend ist, dass die mit Cycloheximid behandelten Proben sich hierbei nicht von den mit BSA behandelten Kontrollen unterschieden.

### 3.3.4 Inhibition der Camalexinakkumulation durch Pufferung der Mediums

Um weitere Aspekte der pH-Wert Änderung zu untersuchen, wurde die Alkalisierung des Mediums nach Elicitierung mit einem starken Puffersystem unterbunden. Zu der Zellsuspension wurde am 5. Tag der Kulturpassage das Medium so gepuffert, dass eine Alkalisierung nicht auftrat. Wie aus Abbildung 3.2.3 hervorgeht, blieb der pH-Wert der elicitierten Zellkultur auf diese Weise für bis zu 48 h auf dem Ausgangsniveau stabil (vgl. 3.2.3). Es wurde hier deutlich, dass ohne die Alkalisierung des Außenmediums und damit ohne die Ansäuerung des Cytoplasmas keine nachweisbaren Mengen Camalexin produziert wurden.



**Abbildung 3.3.4: Dünnschichtchromatographie zum Nachweis der Inhibition der Camalexinbiosynthese in gepuffertem Kulturmedium.** 1 reines Camalexin, 2-5 Elicitor (500 nM) behandelte Proben mit je 5, 10, 20 und 50 mM Puffer pH 5.45. 6 reiner Elicitor, 7-10 Kontrollen mit gleichen Konzentrationen Puffer jedoch BSA statt Elicitor, 11 BSA pur. Jeweils 48 h nach Behandlung. Leere Pfeilspitze kennzeichnet Camalexinstandard (CMX), gefüllte Pfeilspitzen *de novo* synthetisiertes Camalexin in den Proben.

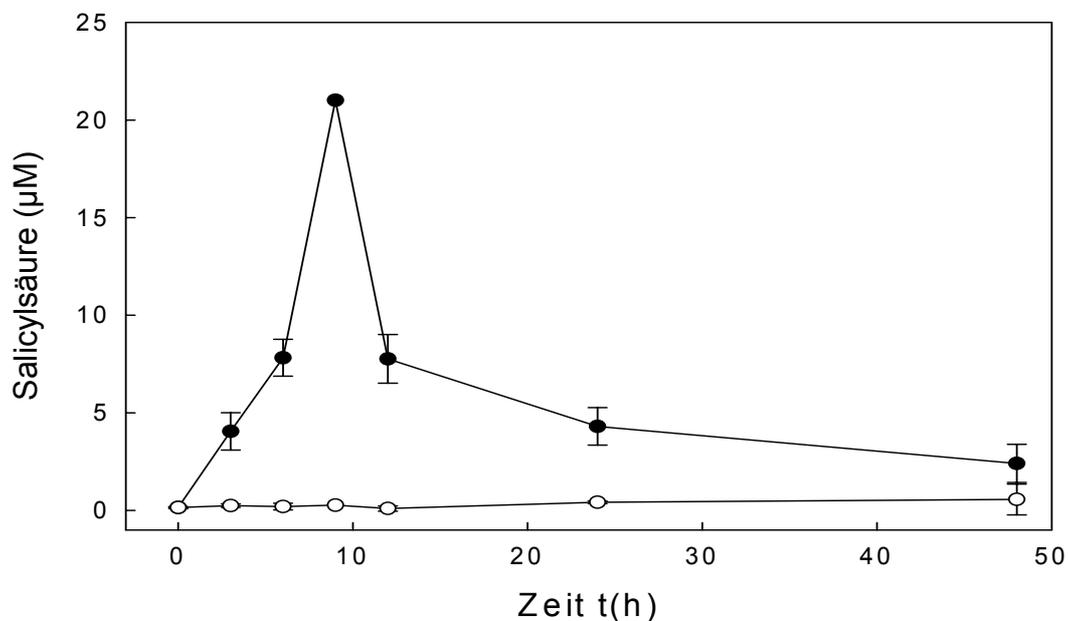
Um die Camalexinproduktion zu unterbinden musste die Alkalisierung des Kulturmediums vollständig unterdrückt werden. In den mit geringen Konzentrationen (5-20 mM) des Puffers versetzten Proben, einem Konzentrationsbereich, in dem die Pufferkapazität nicht ausreichend war um die Alkalisierung vollständig zu verhindern, war die Camalexinakkumulation

umgekehrt proportional zur eingesetzten Puffermenge. Mit steigender Pufferkapazität sank die produzierte Menge Camalexin.

### 3.4 Salicylsäure

#### 3.4.1 Salicylsäure in Zellkulturen von *Arabidopsis thaliana*

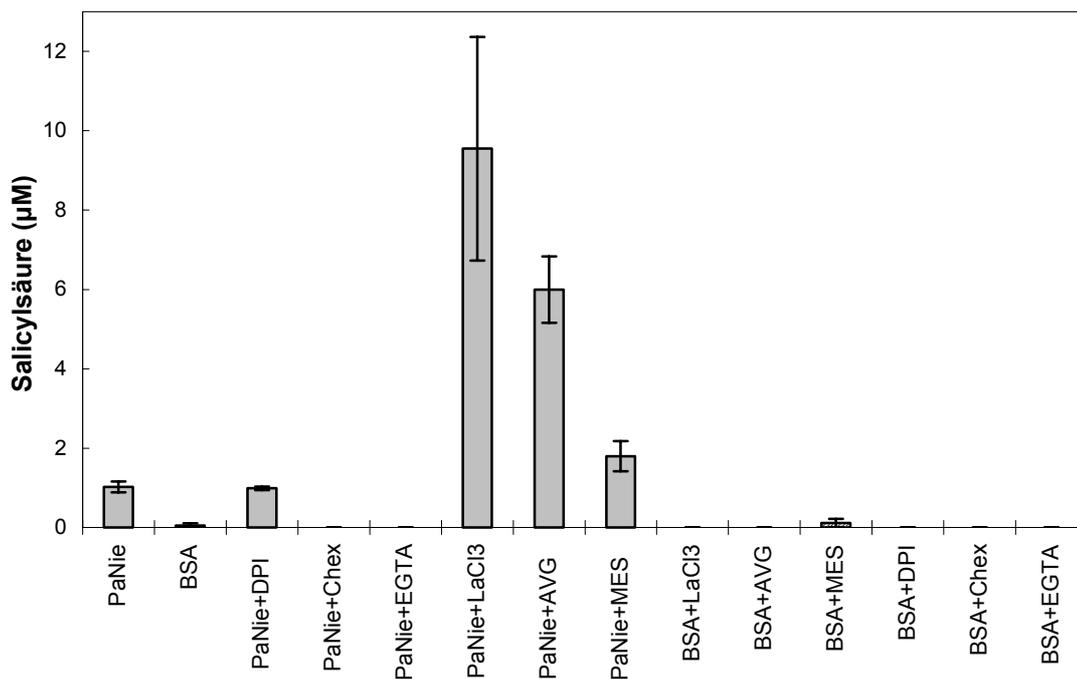
Salicylsäure ist eine der Verbindungen, die in der Abwehr von Pathogenen involviert und auch im Rahmen der systemischen Antwort von Bedeutung ist. Sie wurde durch die Zellkultur von *Arabidopsis thaliana* nach Elicitorkontakt produziert. Der Verlauf der SA-Akkumulation war transient und begann bereits 3 h nach Elicitorzugabe (vgl. Abb. 3.4.1). Nach 9 h war die maximale SA-Konzentration erreicht, welche anschließend absank und für 48 h auf einem Niveau verblieb, welches deutlich höher als in der Kontrolle war. Die mit BSA behandelte Kontrolle zeigte keine signifikante Erhöhung der SA-Konzentration. Die über HPLC nachgewiesenen Mengen an SA lagen alle in physiologischen Konzentrationen und waren nicht höher als in der Pflanze.



**Abbildung 3.4.1: Salicylsäurekonzentration in Zellkulturen von *A.thaliana*.** Salicylsäureakkumulation in Elicitor (●) und BSA (○) behandelten Zellkulturen.

### **3.4.2 Salicylsäureakkumulation unter Hemmstoffeinfluss**

Die in vorangegangenen Versuchen (vgl. 3.1.4, 3.1.5) verwendeten Hemmstoffe wurden auch auf ihre Auswirkung auf die Akkumulation der Salicylsäure hin untersucht. Als Positivkontrolle diente die Behandlung ausschließlich mit PaNie, in der Negativkontrolle wurde eine equimolare BSA Konzentration eingesetzt. Als zusätzliche Kontrolle für die Wirkung der Hemmstoffe wurden nicht nur elicitorbehandelte Proben, sondern auch die mit BSA behandelten Proben in Kombination mit den Hemmstoffen versetzt. Die Salicylsäure wurde 13 h nach Zugabe des Elicitors extrahiert. Abbildung 3.4.1 zeigt, dass der Elicitor alleine in der Lage ist, die Salicylsäureakkumulation anzuregen. In den Kontrollen mit BSA konnten keine signifikant erhöhten Konzentrationen an akkumulierter SA gemessen werden. Aus den mit EGTA behandelten Proben konnte keine Akkumulation von Salicylsäure gemessen werden, dies ist Hinweis für die Bedeutung des Calciums für die Salicylsäureakkumulation. Cycloheximid verhindert die Neusynthese von SA. Bei Verwendung aller übrigen Hemmstoffe wurde die SA-Akkumulation nicht unterbunden, die SA-Konzentrationen nach Behandlung der Zellkultur mit  $\text{LaCl}_3$ , AVG und MES lagen sogar deutlich über denen der Kontrolle.



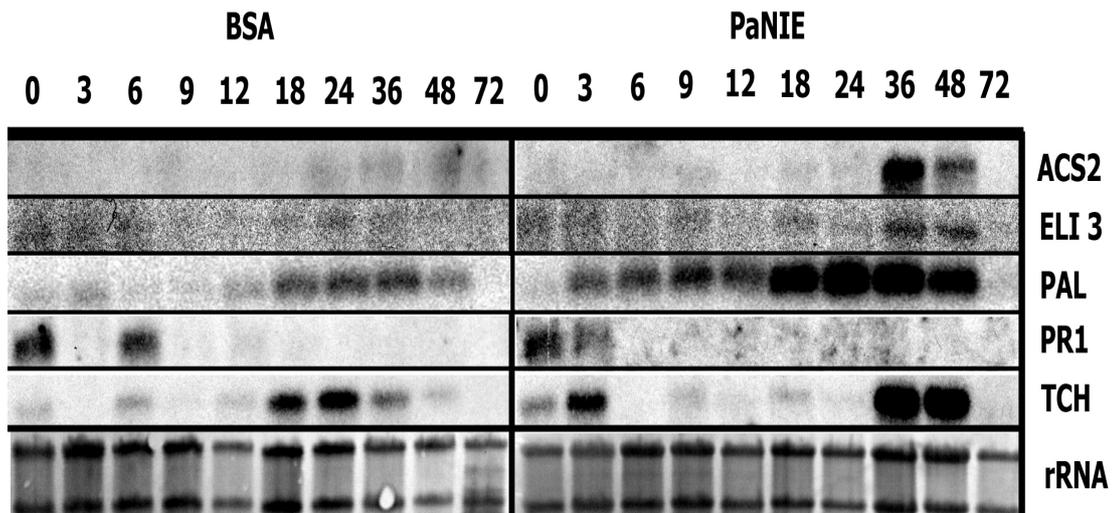
**Abbildung 3.4.2: Salicylsäureakkumulation in elicitorbehandelten Zellkulturen nach Hemmstoffbehandlung.** Mit BSA (schraffiert) und PaNie (grau) behandelte Proben zeigen unterschiedliche SA-Konzentrationen. Die Extraktion von SA erfolgte jeweils 13 h nach Elicitierung.

Die Behandlung mit Puffer, welcher den pH-Wert stabil auf dem Ausgangsniveau hielt (vgl. 3.2.3), führte ebenfalls zu einer leichten Zunahme der SA-Konzentration gegenüber der Kontrolle. In den Proben mit BSA+MES, den einzigen Kontrollen, in denen SA in messbaren Konzentrationen nachweisbar war, kann die SA-Akkumulation als Stress auf die Puffersubstanzen zurückgeführt werden. Alle anderen Kontrollen zeigten keine Akkumulation von Salicylsäure nach Elicitorbehandlung.

### 3.5 Northern Blot Analyse

Die Bedeutung der gezielten und gesteuerten Transkription nach Kontakt mit einem Elicitor ist bekannt (Zhu *et al.*, 1996). Im vorliegenden Fall wurde die Zellkultur auf Transkripte von bekannten und für die Pathogenabwehr bedeutsamen Genen hin untersucht. Über eine Zeitreihe von 72 h ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen Kontrollen und Proben. In den Kontrollen (BSA) konnte für PAL (Phenylalanin Ammonium-Lyase), PR1 (Pathogenesis

Related Protein 1) und TCH (TouCH, Calmodulin-related Proteine und Xyloglucan endotransglycosylase) lediglich ein schwacher Anstieg bis hin zu einem geringen Maximum gezeigt werden, wohingegen die entsprechenden Werte in den elicierten Proben deutlich höher lagen. Die Menge der Transkripte von ACS2 (ACC-Synthase 2) erreichte 36 h nach Elicitierung ein Maximum. Davor war keine nennenswerte Transkriptmenge zu erkennen; die Transkriptionsrate fiel zum Ende der Kinetik steil ab. 48 h nach Elicitorzugabe waren noch vermehrt RNA Kopien registrierbar, nach 72 h konnten keine Transkripte mehr nachgewiesen werden. ELI3 (Elicitor Induced 3) wies ein mit dem von ACS2 vergleichbares Muster auf, die Transkriptionsraten waren hier jedoch kontinuierlich erhöht und erreichten ebenfalls ein Maximum nach 36 und 48 h. Die Transkriptionsrate der PAL, einem Schlüsselenzym zum Übergang vom Primär- in den Sekundärstoffwechsel und bekanntermaßen ein Stressenzym, stieg bereits nach 3 h an und erreichte nach 24 h ein Maximum. Das PR1 Transkript konnte zum Zeitpunkt Null bereits nachgewiesen werden. Durch Elicitierung konnte dieses Signal erhalten bleiben. Im Gegensatz dazu war es in den Kontrollen erst nach 6 h wieder detektierbar. TCH wies nach 3 h ein kleines Maximum auf, wonach ein sich anschließendes Absinken der Transkriptmenge auf Werte der Kontrolle erkennbar war. 36 und 48 h nach Elicitorbehandlung konnte erneut ein starkes Signal gefunden werden. Die Kontrolle zu TCH zeigte ein leichtes Maximum der Trankriptionsrate nach 24 h (ähnlich mit dem nach 3 h in der Probe). Als Ladekontrolle diente mit Ethidiumbromid gefärbte ribosomale RNA (28S und 18S) im Gel. Das Gelbild wurde mittels Farbumkehr digital ins Negativ umgekehrt. Die Abbildung zeigt eine Kinetik von 0 bis 72 h.



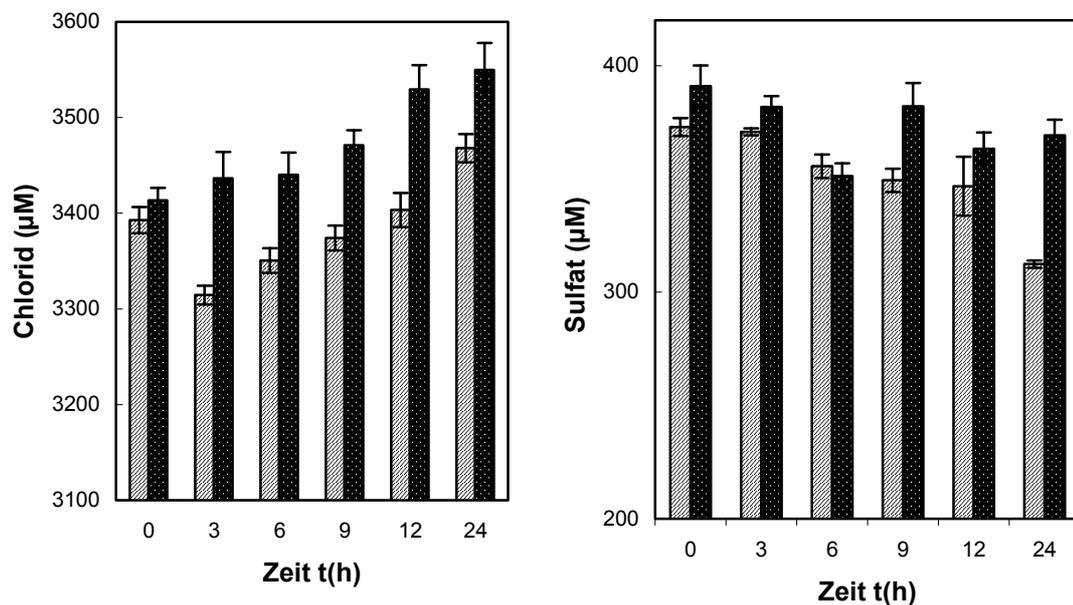
**Abbildung 3.5: Northern-blot-Analyse, von in die Pathogenabwehr involvierte Gene bei *A.thaliana*.** mRNAs wurden über radioaktive Markierung nachgewiesen. Links BSA Kontrollen, rechts Proben mit Elicitor, Zahlen geben Zeitpunkte nach Elicitorbehandlung in h an.

### 3.6 Ionenchromatographie zum Nachweis von Ionenverschiebungen

#### 3.6.1 Anionenanalyse

Die Medienzusammensetzung wurde auf den Gehalt der Anionen Chlorid, Sulfat, Nitrit, Nitrat und Fluorid nach Elicitierung hin untersucht. Die Ionenchromatographie, die auf einem Dionex-Ionen-Chromatograph durchgeführt wurde, deckte deutliche Unterschiede zwischen den beiden Anionen Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) und Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) auf. Die Menge an freiem Chlorid im Kulturmedium sank in den ersten 3 h nach Zugabe des Elicitors (schraffierte Balken) drastisch ab und stieg anschließend im Verlauf weniger Stunden kontinuierlich an. Der Chloridgehalt verblieb dauerhaft und signifikant unter den Chloridwerten der BSA Kontrollen (massive Balken mit Punkten) die ca. 5% höher waren als die Werte der elicitierten Zellen. Wie aus Abb. 3.6.1 (links) ersichtlich wird, war die Aufnahme von Chlorid evtl. im Symport mit Protonen eine sehr schnelle Reaktion. Der Gehalt an Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) dagegen fiel in den elicitierten Proben kontinuierlich ab, jedoch nicht so schnell wie dies bei Chlorid zu beobachten war. Erst nach 24 h zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied

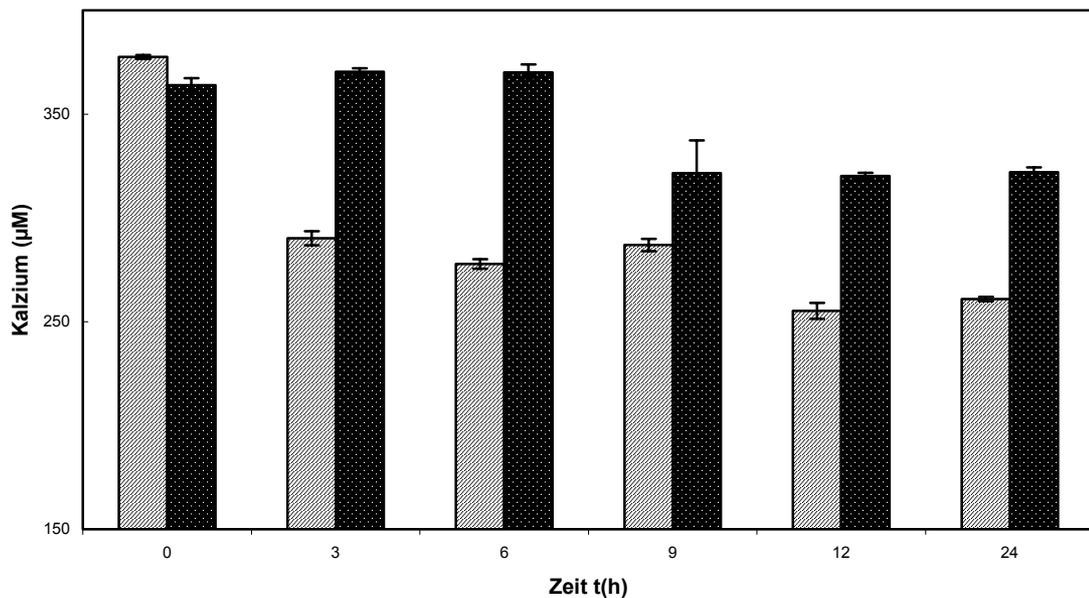
von 15% zwischen Kontrollen und Proben. Werte für die Anionen Nitrit, Nitrat und Fluorid waren nicht verändert.



**Abbildung 3.6.1: Anionenanalyse in elicitorbehandelten Zellkulturen.** Links: Änderungen des Chloridgehalts im Mediums über die Zeit. Es zeigte sich eine Abnahme und sich anschließende langsame Zunahme der Chloridkonzentration im Medium nach Elicitierung (schraffiert). In den Kontrollen wurde ein leichter Anstieg des Chloridgehalts gemessen (massiv mit Punkten). Rechts: Änderungen des Sulfatgehalts im Mediums über die Zeit. In den Proben sank der Sulfatgehalt kontinuierlich (schraffiert), zeigte jedoch erst nach 24 h einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen (massiv mit Punkten).

### 3.6.2 Kationenanalyse

Die Medienzusammensetzung wurde auf die Kationen: Kalium, Natrium, Magnesium, Ammonium und  $\text{Ca}^{2+}$  nach Elicitierung hin untersucht. Für  $\text{Ca}^{2+}$  konnte ein deutlicher Unterschied zur Kontrolle über einen Verlauf von 24 h gemessen werden (vgl. Abbildung 3.6.2). Calcium war zu Beginn des Experiments in den Proben und Kontrollen in gleicher Konzentration im Kulturmedium vorhanden. Durch die Elicitierung sank die Calciumkonzentration innerhalb der ersten 3 h um fast ein Drittel (27.6%) ab. Auf diesem niedrigen Niveau verblieb der Calciumgehalt für die verbleibenden 21 h des Experiments. Die Kontrollen erwiesen sich in ihren Calciumkonzentrationen zunächst stabil. Nach 9 h zeigte sich auch hier ein Abfall, auf ein konstantes Konzentrationsniveau.

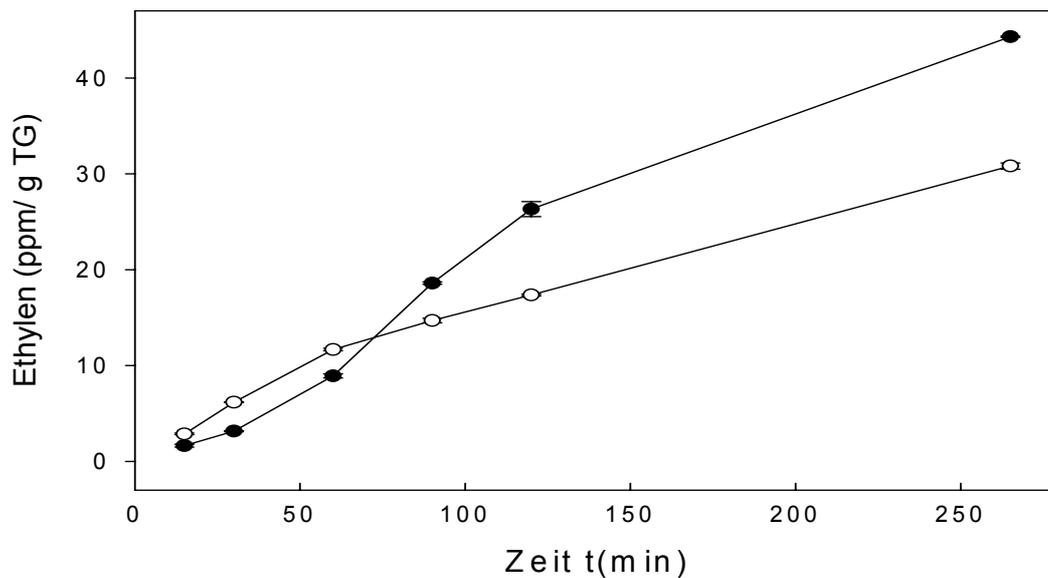


**Abbildung 3.6.2: Kationenanalyse einer Zellkultur von *A.thaliana* nach Elicitation.** Der  $\text{Ca}^{2+}$ gehalt des Mediums sank nach Elicitation um 27.6% innerhalb von 3 h ab (schraffiert) und blieb dauerhaft unter den Kontrollwerten (massiv mit Punkten).

### 3.7 Ethylen

#### 3.7.1 Ethylen in Zellkulturen von *A.thaliana*

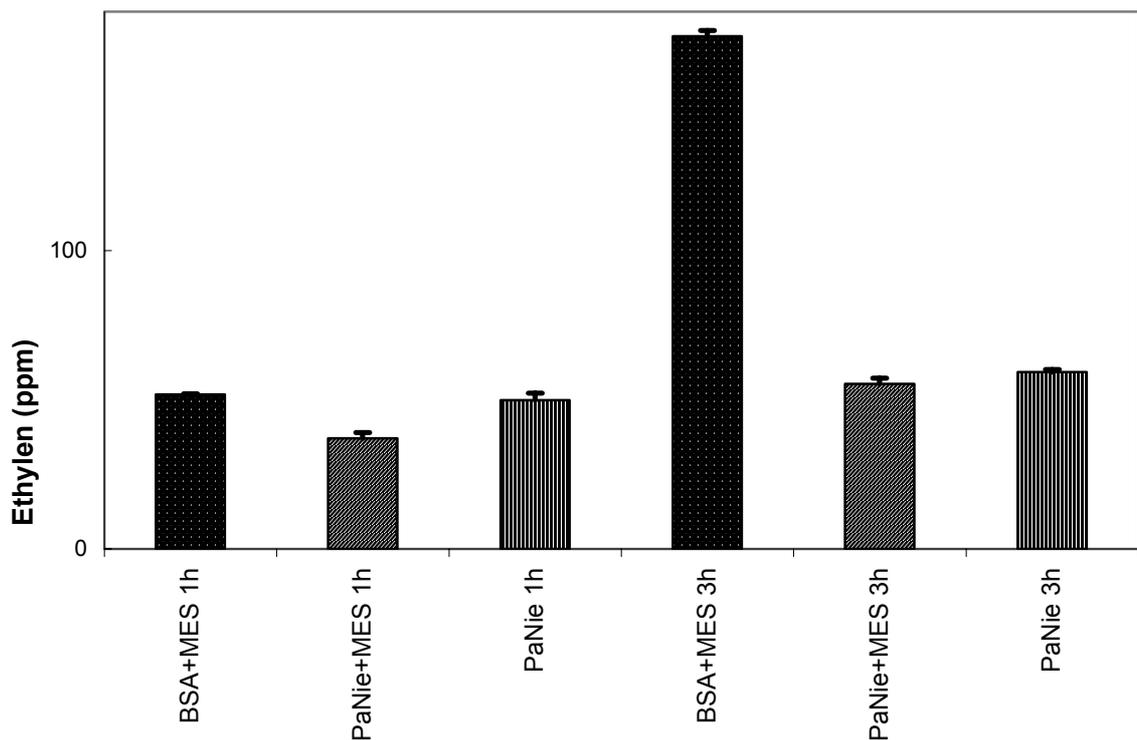
In den Zellkulturen von *A.thaliana* wurde nach Kontakt mit dem Elicitor Ethylen produziert. Dadurch, dass die Zellkulturen für die Messungen unter Luftabschluss gehalten wurden, waren sie rasch einem Sauerstoffmangel ausgesetzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich der Ethylengehalt in Kontrollen und Proben innerhalb der ersten 60 min auf ähnlichem Niveau bewegte, die elicitierten Proben daraufhin jedoch ansteigend mehr Ethylen in den Gasraum des Reaktionsgefäßes abgaben. Nach 4 h sind 50% mehr Ethylen von den elicitierten Zellen (45 ppm) als den Kontrollen abgegeben worden (30 ppm).



**Abbildung 3.7.1: Ethylenakkumulation in Zellkulturen von *A.thaliana* unter Elicitoreinwirkung.** Die mit Elicitor behandelten Proben (●) zeigten nach 90 Min eine stärkere Freisetzung von Ethylen als in der Kontrolle (○).

### 3.7.2 Ethylen in Zellkulturen von *A.thaliana* unter konstantem pH

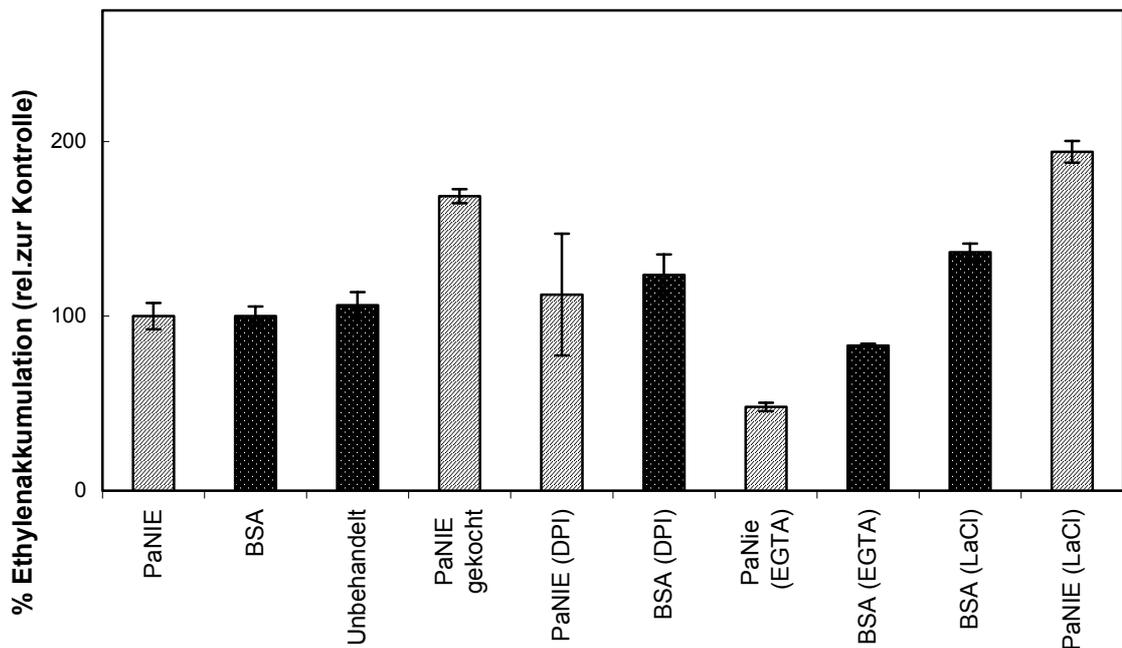
Zellkulturen von *A.thaliana* wurden unter konstanten pH-Bedingungen elicitiert und deren Ethylenproduktion untersucht. Eine Stunde nach Elicitierung war hierbei dieselbe Menge freigesetzten Ethylens messbar wie in den Kontrollen. Drei Stunden nach Beginn des Experiments waren, verglichen mit den elicitierten Proben, in den Kontrollen dreifach erhöhte Konzentrationen an Ethylen nachweisbar. In der reinen BSA-Kontrolle (nicht abgebildet) wurde kein Ethylen produziert. Die erhöhte Ethylenproduktion der BSA+MES Kontrolle lässt sich auf den Stress durch den Puffer zurückführen. In den elicitierten Proben (PaNie und PaNie+MES) hatte zu diesem späten Zeitpunkt der Zelltod bei 80% der Zellen bereits eingesetzt.



**Abbildung 3.7.2: Ethylenfreisetzung unter konstantem pH.** Durch Stabilisierung des pH-Wertes auf 5.45 wurde unter Elicitoreinfluss die Ethylenproduktion nicht erhöht (diagonal und senkrecht schraffiert), Kontrolle (massiv mit Punkten).

### 3.7.3 Ethylen in Zellkulturen von *A.thaliana* unter Hemmstoffeinfluss

Zellkulturen von *A.thaliana* wurden 3 h nach Hemmstoffapplikation auf Ethylenproduktion hin untersucht. Alle erhaltenen Werte wurden auf ihren jeweiligen Ausgangswert bezogen. Es handelt sich somit um relative Steigerungen zur jeweiligen Kontrolle mit PaNie (schraffiert) oder BSA (massiv mit Punkten). Wurden die elicitierten Proben zusätzlich mit EGTA oder  $\text{LaCl}_3$  behandelt waren deutliche Unterschiede zur Kontrolle ersichtlich. In den mit PaNie (EGTA) behandelten Proben wurde deutlich weniger Ethylen produziert (47.94%) als in den Referenzen. Bei Behandlung mit  $\text{LaCl}_3$  dagegen wurde dieser Wert beinahe um das doppelte übertroffen (194.06%). Die Proben, die hitzedenaturiertes PaNie-Protein enthielten, bzw. PaNie+DPI zeigten keine Veränderung gegenüber den elicitierten Kontrollen. Die mit BSA und einem Hemmstoff behandelten Zellen wiesen höhere Ethylenkonzentrationen auf als die Kontrollen. Hier handelt es sich um einen Effekt, der auf den Stress durch den jeweiligen Hemmstoff zurückzuführen war.



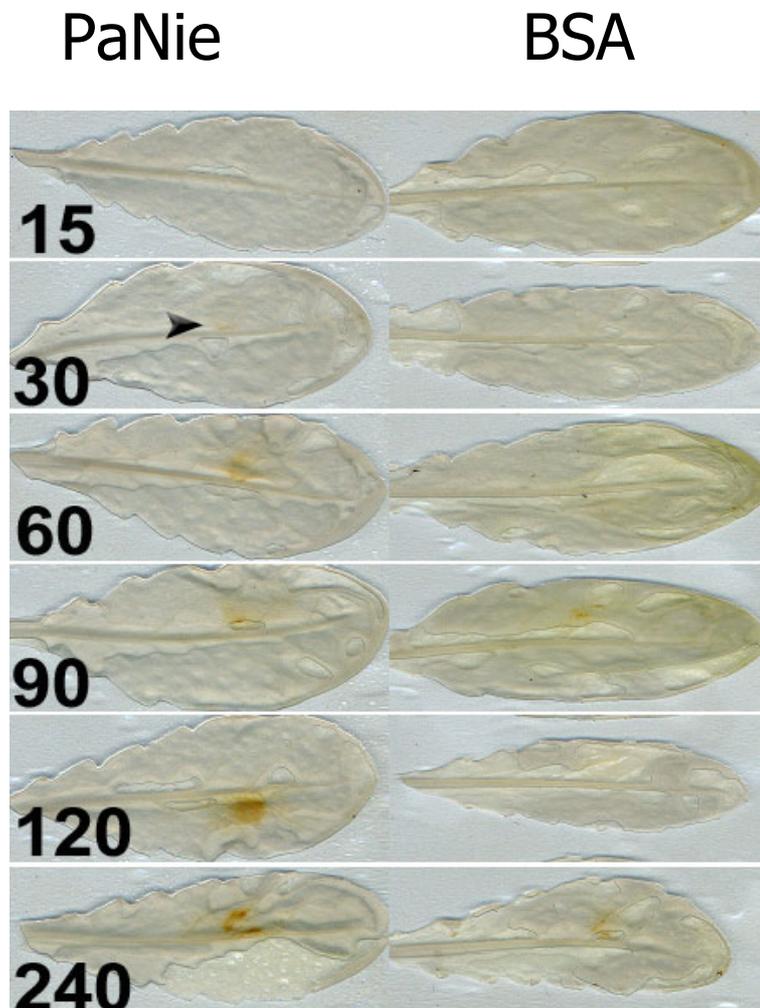
**Abbildung 3.7.3: Ethylenakkumulation nach Hemmstoffbehandlung.** Werte als relative Veränderung gegenüber der gleich behandelten Kontrolle, nach drei Stunden. PaNIE behandelte Proben (schraffiert), Kontrollen (massiv mit Punkten).

### 3.8 Abwehrreaktionen in Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*

#### 3.8.1 Reaktive Sauerstoff Spezies

Als eine der schnellsten Reaktion auf den Kontakt mit einem Elicitor ist in der Literatur neben einem Calciumeinstrom die Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies beschrieben (Baker und Orlandi, 1995; Lamb und Dixon, 1997). Die DAB-Methode gibt einen proportionalen Bezug zur Menge des entstandenen Polymers und damit zum freigesetzten  $H_2O_2$  wieder. In dieser Arbeit wurde eine Koinfiltration von PaNIE und DAB durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass eine sehr genaue zeitliche Auflösung möglich wird und jedes entstehende  $H_2O_2$  in die Messung einbezogen werden kann, da die DAB Monomere bei Versuchsbeginn bereits vorhanden sind. Wie aus Abbildung 3.8.1 hervorgeht, setzte eine mit DAB messbare  $H_2O_2$  -Freisetzung nach etwa 30 min (Pfeilspitze) ein. Die Menge des freigesetzten  $H_2O_2$  stieg kontinuierlich bis 60 min nach Elicitierung an und erreichte nach 150 min die gesamte infiltrierte Fläche. Dabei nahm die Intensität der DAB-Färbung von innen nach außen zu. Eine weitere Ausbreitung der DAB Färbung konnte nicht beobachtet werden. Die

Koinfiltration von BSA+DAB als Kontrollen wiesen keine Färbungen auf, die auf eine Einwirkung des Proteins schließen lassen könnten. Lediglich leichte DAB-Färbungen an den Aufsetzstellen der Spritze waren erkennbar.

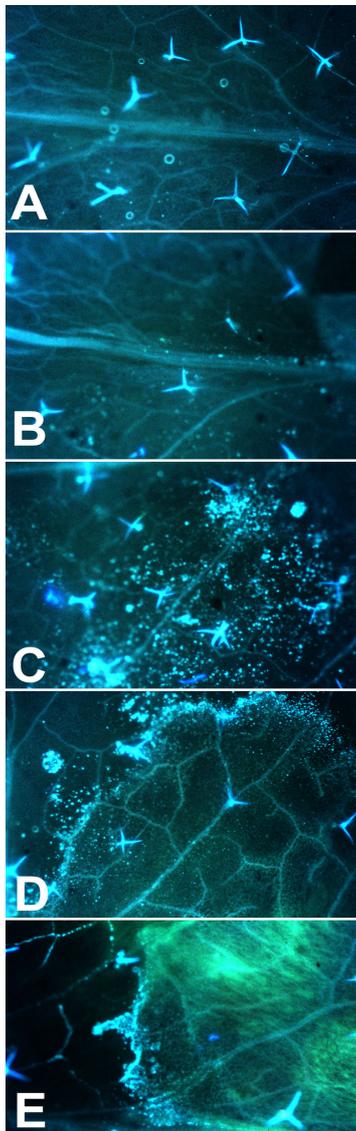


**Abbildung 3.8.1: Elicitorinduzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion.** Nachweis von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Hilfe der DAB-Methode. 10  $\mu$ M PaNie mit 1 mg\*ml<sup>-1</sup> DAB (links) und eine äquivalente Konzentration an BSA 1 mg\*ml<sup>-1</sup> DAB (rechts) wurden in Blätter von *A.thaliana* infiltriert. Zeiten nach Beginn des Experiments sind links außen in Min angegeben. Pfeilspitze kennzeichnet eine beginnende DAB Färbung nach 30 min.

### 3.9 Callose

Um durch Verletzungen entstandene Schäden zu begrenzen, können Pflanzen Calloseauflagerungen auf Zellwände ausbilden. Zudem kommt der Callose bei der Abwehr von Pathogenen eine wichtige Aufgabe zu. Die Pflanze ist damit in

der Lage, das Pathogen auszugrenzen und die Zellwand undurchdringlich für die Schadorganismen zu machen.



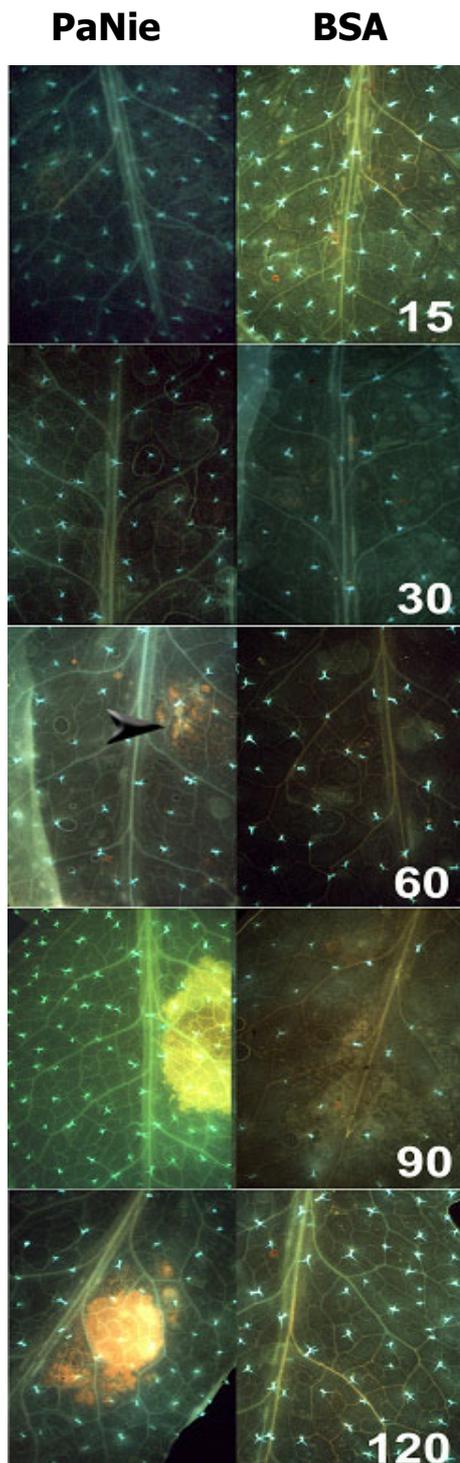
**Abbildung 3.9: Elicitorinduzierte Calloseablagerung.** Callosenachweis mit Anilinblau nach Elicitorinfiltration (10  $\mu\text{M}$ ) in Rosettenblättern von *A.thaliana*. **A** Kontrolle (BSA) nach 4 h, mit PaNie behandelten Proben **B** 30, **C** 60, **D** 120 und **E** 240 min nach Infiltration.

Wie aus Abbildung 3.9 ersichtlich wird, gelang es der Pflanze innerhalb von 4 h, die Infiltrationsstelle des Elicitors mit Callose gegen das angrenzende Gewebe abzuschotten (vgl. Abb. 3.9E). Andererseits löste BSA im Blatt (auch durch die Infiltration mit der Spritze) keine Calloseablagerung aus (vgl. 3.9A), weder an der Aufsatzstelle der Spritze noch an den Grenzen des infiltrierte Bereichs. Unter Einwirkung des Elicitors jedoch sind nach 60 min (C) die ersten Calloseablagerungen durch Anilinblau nachweisbar. Die Callose zeigte sich hier diffus über weite Strecken des infiltrierte Gewebes verteilt. Erst nach einer weiteren Stunde war die Callose anders verteilt und auf die Randbereiche der

Infiltrationsstelle konzentriert (D). Dieses Band aus Callose war nicht dicht und lückenlos geschlossen. Nach 4 h (E) war der gesamte infiltrierte Bereich abgegrenzt und „infiziertes“ von gesundem Gewebe durch eine Calloseauflagerung abgetrennt. Eine leicht grünliche Verfärbung innerhalb des Callose-rings in Abbildung 3.9E ist auf phenolische Verbindungen zurückzuführen.

### **3.10 Zelltod im Mesophyllgewebe von *A.thaliana***

Zellen die in der Integrität ihrer Zellmembran angegriffen sind, lassen den Farbstoff Propidiumiodid in das Cytoplasma eindringen. Die mit Propidiumiodid angefärbte DNA ist in toten Zellen durch UV-Licht visualisierbar, erkennbar an der rot-gelben Färbung. Die Kontrolle, die über den gesamten Verlauf des Experiments keine Anfärbung der DNA zeigte, zeigt dass BSA die Integrität der Zellmembran nicht angriff. Der Elicitor induzierte innerhalb weniger Minuten die Abwehrreaktionen wodurch die Integrität der Plasmamembran verloren ging. Wie aus Abbildung 3.10 ersichtlich ist, waren die infiltrierte Gewebe nach 60 min schwer geschädigt, es kam zum Einsetzen des programmierten Zelltods, wobei noch nicht der gesamte infiltrierte Bereich den Farbstoff aufgenommen hat. Einige Bereiche reagierten offenbar schneller als andere. 90 min nach Elicitierung war der Großteil der infiltrierte Fläche rötlich gefärbt. Der nekrotische Bereich breitete sich aus und erreichte nach 120 min die gesamte Fläche. Im Zentrum der infiltrierte Fläche war die Färbung durch Propidiumiodid am intensivsten, was die auf eine Ungleichverteilung des Farbstoffs hinweist.

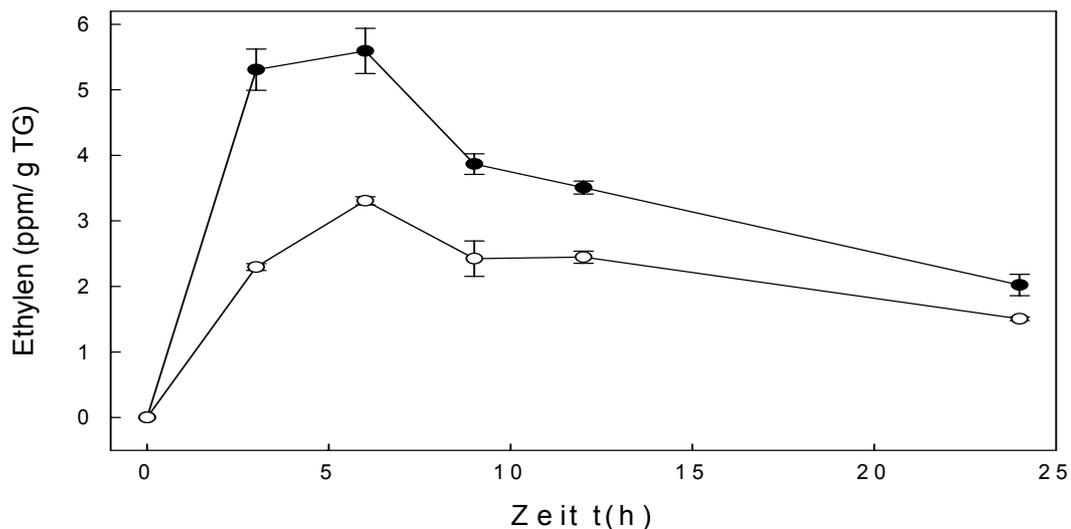


**Abbildung 3.10: Nachweis von elicitor-induziertem Zelltod im Mesophyllgewebe von *A.thaliana* über Propidiumiodid.**

Bereits 60 min nach Elicitierung trat der Zelltod ein (Pfeilspitze). Links PaNie behandelte Proben, rechts Kontrolle mit BSA. Zahlen geben Zeitpunkte in min nach Infiltration an.

### 3.11 Ethylen in Blättern von *A.thaliana*

Der Elicitor wurde in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in Rosettenblätter von circa sechs Wochen alten Pflanzen von *A.thaliana* infiltriert. Die Blätter wurden abgeschnitten und in gasdichte Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 4.5 ml überführt. Es wurden jeweils drei Messungen aus drei unabhängigen Parallelansätzen durchgeführt. Die Werte in Abbildung 3.11 zeigen einen schnellen und steilen Anstieg des akkumulierten Ethylens im Gasraum des Gefäßes. Sechs h nach Infiltration des Elicitors, bzw. von BSA erreichte der Ethylengehalt in den Proben ein Maximum. Anschließend sanken die Ethylenwerte und näherten sich nach 24 h einem ähnlichen Level. Die elicitierten Proben wiesen jedoch stets über den Kontrollen erhöhte Ethylenwerte auf.



**Abbildung 3.11: Ethylengehalt in Blättern von *A.thaliana*.** Ganze Blätter wurden mit Elicitor (●) und BSA (o) behandelt und in gasdichte Gefäße überführt. Zu jedem Zeitpunkt wurde aus der jeweiligen Probe dreimal 1 ml Luft aus dem Gasraum in den GC injiziert.

### 3.12 Identifikation von Elicitor Erkennungsmutanten in einer *A. thaliana* T-DNA Insertions Mutanten Linie

#### 3.12.1 Selektive Anzucht in BM-PaNie Medium

Die sterilisierten Samen wurden wie in 2.7.4 beschrieben in BM-Medium angezogen. Abbildung 3.12.1 zeigt die Auswirkungen eines Anstiegs der PaNie-

Konzentration. Es handelte sich hierbei um einen Vorversuch für ein Screening an Col-0 Samen. Es wird deutlich, dass die Pflanzen im BM-Medium ohne den Zusatz von Elicitor normal keimten, sich entwickelten und die Wurzeln deutlich mit Wurzelhaaren versehen waren (a). Nach der Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  PaNie (b) zeigten sich bereits deutlich erkennbare Abweichungen von der Normalentwicklung. Die Blätter wiesen eine sichtbare Anthocyanfärbung an den Rändern auf, was auf Stress, ausgelöst durch PaNie, hindeutet. Die Wurzeln bildeten nur wenige Wurzelhaare aus. Stieg die Konzentration von PaNie auf ein kritisches Maß von 5  $\mu\text{M}$  an (c), unterblieb eine Entwicklung der Wurzel fast vollständig. Folgeblätter entwickelten sich, blieben jedoch kleiner als in den mit geringeren Konzentrationen des Elicitors behandelten Pflanzen. Zudem war eine Tendenz zur Bildung von Chlorosen im Blatt wie in (d) zu erkennen. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  PaNie unterblieb die Entwicklung des Embryo vollständig. Der Wurzelansatz und die Primärblätter waren erkennbar, eine weitere Entwicklung des Keimlings fand jedoch nicht statt. Bei dieser Konzentration wurde die selektive Anzucht der T-DNA mutagenisierten Pflanzen vollzogen und nach den genannten Auswahlkriterien verfahren.



**Abbildung 3.12.1: Selektive Anzucht von elicitorbehandelten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.** (a) gekeimte Pflanzen 4 Wochen nach Ausbringen in BM-Medium ohne Elicitor PaNie, (b) nach Behandlung der Samen mit 1  $\mu\text{M}$  PaNie, (c) nach Behandlung der Samen mit 5  $\mu\text{M}$  PaNie, (d) nach Behandlung der Samen mit 10  $\mu\text{M}$  PaNie.

Aus dieser Selektion gingen 82 Pflanzen hervor, die auch in Erde überlebensfähig blieben. Diese 82 Pflanzen wurden zur Blüte gebracht und

diese Samen wiederholt einer Auswahl unterzogen, wobei die unterschiedlichen Mutanten nicht gemischt wurden, sondern einzeln behandelt wurden. Hieraus gingen 8 Pflanzen hervor, die diesen zweiten Auswahlprozess überstanden. Jene 8 Pflanzen wurden verwendet, um darauf mittels Tail-PCR die Mutation zu lokalisieren.

### 3.12.2 Lokalisation der T-DNA Insertionen im Genom von *A.thaliana*

Die aus der Sequenzierung gewonnenen Nukleotidabfolgen wurden über die NCBI Blast-Search Funktion analysiert. Dabei wurde die Nukleotidsequenz der Datenbank mit der über das Internet Eingereichten verglichen. Identische oder sehr ähnliche Bereiche wurden dabei hervorgehoben. In der unten angegebenen Tabelle 3.12 ist jede analysierte Mutante mit Chromosom, Locus, Sektion und der Information, welche Klone die entsprechende Sequenz dieses Chromosoms beinhalten angegeben. Aus den Informationen der Datenbank ließ sich ermitteln ob die Insertion direkt in einem Gen auftrat. Im hier vorliegenden Fall jedoch fand keine Insertion in einem bekannten Gen oder in einem bekannten Promotor für ein Gen der Pathogenabwehr statt.

**Tabelle 3.12:** Lokalisation der T-DNA Insertionen in das Genom von *A. thaliana* in den Jack T-DNA Linien.

Mutante	Chromosom	Locus	Sektion	Klone
1	2	AC007019	124	F7D8, T16B14
2	2	AC006201	105	T13L16, T27K22, F8D23
3	4	ATCHRIV34	34	ATCHRIV33, ATCHRIV35
4	5	AB006708	ND	MYJ24
5	ND	AF218466	ND	ND
6			ND	
7	3	ATH298137	ND	genomic
8	5	AB009048	ND	K15E6

### 3.12.3 Charakterisierungen des Phänotyps der Mutanten

Die positiv getesteten Pflanzen zeigten verschiedene phänotypische Auffälligkeiten. Die Pflanzen zeichneten sich besonders durch Zwergwuchs und verzögerte Blütenbildung aus. Es entwickelten sich weniger Rosettenblätter, deren Größe deutlich vermindert war. Die Ursache für diesen veränderten Habitus lassen sich nur über einen möglichen Entwicklungsschaden durch die T-DNA Insertion erklären. Abb. 3.12.3 vermittelt hiervon einen Eindruck. Es wurden jedoch keine weiteren Untersuchungen hierzu vorgenommen.



**Abbildung 3.12.3: Phänotypen aus der T-DNA Selektion.** Acht Wochen alte *A.thaliana* Pflanzen, gezogen in Kulturerde bis zur Blüte. Es ist deutlich der Kleinwuchs zu erkennen; die Pflanzen stammten aus Samen der T-DNA Pools (31011, 31013 und 19960 von links nach rechts) und geben ein repräsentatives Bild wieder.

### 3.13 PCR-Screen nach Sequenzen aus verschiedenen Pythiaceen Arten

Anhand der bekannten Sequenz des Elicitorgens PaNie wurde auf anderen *Pythium*-Arten ein „PCR-Screen“ durchgeführt. Bei den untersuchten Arten handelte es sich um *Pythium* aff. *vanterpoolii*, *Pythium monospermum* und *Pythium middletonii*, deren genomische DNA freundlicherweise von A. Riethmüller zur Verfügung gestellt wurde. Die Sequenzen aller drei Arten unterschieden sich im betrachteten Bereich (PaNie-Gen) nicht voneinander. Es herrschte eine 100%ige Übereinstimmung innerhalb der untersuchten Organismen. Zur Sequenz des Elicitorgens PaNie ergab die Sequenzierung einen Basenaustausch; eine Transition von A nach C an Position 251 führte zum Austausch einer Aminosäure. Es kam zum Tausch von Alanin zu Aspartat, einer sauren Aminosäure mit anderen biochemischen Eigenschaften (unpolare

Seitenkette (Alanin), negative geladene Seitenkette (Aspartat)). Die Accession Nummern der Sequenzen sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

**Tabelle 3.13:** GenBank Accession Nummern der alternativen Pythiaceae

Biologische Art	Akronym	Accession Nummer
<i>Pythium monospermum</i>	PmoNIE	AY389161
<i>Pythium middletonii</i>	PmiNIE	AY389162
<i>Pythium</i> aff. <i>vanterpoolii</i>	PafNIE	AY389163

Diese Arten besitzen durchweg keine eukaryotische Exkretionssequenz wie sie von Veit et al. (2001) für *Pythium aphanidermatum* beschrieben wurde. Mit den Primern für die bekannte Exkretionssequenz aus *Pythium aphanidermatum* ließ sich keine Sequenz für eine mögliche eukaryotische Exkretionssequenz in diesen Spezies ermitteln.

## 4 Diskussion

### 4.1 *PaNie* aus *Pythium aphanidermatum* und *Arabidopsis thaliana* eine Nicht-Wirtsbeziehung

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der Interaktion zwischen *Pythium aphanidermatum* und *Arabidopsis thaliana* um eine Nicht-Wirtsbeziehung. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fall von Basisresistenz der Pflanze gegen einen Oomyceten untersucht (Prell, 1996; Heath, 2000). Das Augenmerk richtete sich nur auf die induzierbaren Reaktionen der Basisresistenz, die auf eine Perzeption durch einen möglichen Rezeptor zurückzuführen sind. Die Arbeiten von Nürnberger *et al.* (1994), Boller (1995) Ebel und Scheel (1997), Mithöfer *et al.* (2000) und Lee *et al.*, (2001) legen die Bindung des Elicitors an einen Rezeptor nahe. Der genetische und direkte biochemische Nachweis für die Anbindung eines möglichen Rezeptors an eine Signalkette ist jedoch noch nicht eindeutig erbracht worden. Keller *et al.* (1999), sowie auch Rushton *et al.* (2002) zeigten mit Hilfe genetischer Modifikationen an Tabakpflanzen, welches wirtschaftliches Potential die Erforschung der Elicitor-Rezeptor Interaktion besitzt. Sie erzeugten bzw. verwendeten pathogenspezifische Promotoren in Kombination mit bekannten Elicitorgen, um Tabakpflanzen gegen eine Reihe von Pathogenen resistent zu machen. Diesen Pflanzen war es nicht möglich, das Pathogen zu erkennen, und sie so zu einer erfolgreichen Abwehr nicht in der Lage waren. Dies gelang erst mittels Übertragung eines pathogenspezifischen Promotors.

### 4.2 *Das gereinigte Elicitorprotein PaNie*

In vorhergehenden Arbeiten (Wagner, 1996; Koch, 1998) an diesem Modellsystem konnte der Elicitor lediglich in einer partiell gereinigten Form für physiologische Versuche verwendet werden. Später wurde der Elicitor heterolog exprimiert (Veit *et al.*, 2001) und über Affinitätschromatographie gereinigt. So konnten alle Reaktionen der Zellkultur und der Ganzpflanze auf dieses eine

Protein zurückgeführt werden und gezeigt werden, dass ein einziger Elicitor ausreicht, die multiplen Antworten im Modellsystem auszulösen.

### **4.3 Hypersensitive Reaktionen im Modellsystem**

#### **4.3.1 Programmierter Zelltod in Zellkulturen und *in planta***

Der Proteinelicitor PaNie ist in der Lage, in verschiedenen dikotylen Pflanzen eine Basisresistenz hervorzurufen (Veit *et al.*, 2001). Ein Aspekt der Basisresistenz ist der programmierte Zelltod, der ebenfalls für das tierische System beschrieben wurde (Steller, 1995). Zelltod im pflanzlichen System ist ein kontrolliert ablaufender Prozess, der *in planta* auf die infiltrierten Gewebe begrenzt bleibt (Seeger, 2003), in der Zellkultur sterben 80% aller Zellen (vgl. 3.1.2). Ein Wert, der durch den Einsatz höherer Konzentrationen (>500 nM) nicht gesteigert werden kann (Veit, 2002; Seeger, 2003). Diese Tatsache lässt auf einen sättigbaren Erkennungsprozess und nicht auf eine Toxinwirkung von PaNie schließen.

#### **4.3.2 Programmierter Zelltod und die Bedeutung des pH in der HR**

Dass die hypersensitive Reaktion mehr umfasst als den Zelltod wurde bereits (vgl. 1.4) erwähnt. Die Bedeutung der durch den Elicitor ausgelösten Alkalisierung des Apoplasten und der damit einhergehenden Ansäuerung des Cytoplasmas wurden hier erstmals in Bezug auf den Zelltod untersucht. Es zeigte sich, dass die Stabilisierung des pH-Wertes im Kulturmedium keinen positiven Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte. Es starben sogar mehr Zellen als in der Kontrolle. Dass dieser Effekt auf den Puffer zurückzuführen ist, wird aus der mit dem Puffer behandelten Kontrolle ersichtlich. Hier lag die Gesamtzahl der Zellen, die Zelltod begingen ebenfalls deutlich unter der in der nicht mit Puffer behandelten Kontrolle (vgl. Abb. 3.1.3). Für den programmierten Zelltod hat die Ansäuerung des Cytoplasmas und die Alkalisierung des Apoplasten keine Bedeutung, sie scheint vielmehr ein sekundärer Effekt des schnellen Einstroms von  $\text{Ca}^{2+}$  und dem Ausstrom von

Kalium und Chlorid zu sein (Bach, 1993; Jabs, 1994; Zimmermann *et al.*, 1997; Jabs *et al.*, 1997).

#### **4.3.3 Programmierter Zelltod, die Bedeutung der reaktiven Sauerstoffspezies, des Calciumeinstroms und der translationalen Aktivität der Zellen**

Neben der Alkalisierung konnten weitere Aspekte der Abwehrantwort nach Elicitierung beobachtet werden. Hierbei sind zu nennen die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und der Calciumeinstrom in die Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass das Unterbinden der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mittels DPI keinen Einfluss auf den PCD hat (vgl. 3.1.4). Wurde die ROS Produktion blockiert, starben signifikant mehr Zellen als in der elicitierten Kontrolle. De Pinto *et al.* (2002) stellten hierzu fest, dass für die erfolgreiche Induktion des PCD in der Tabakpflanze, die gleichzeitige Erhöhung von Stickstoffmonoxid und ROS nötig ist. Die alleinige Zugabe eines Stickstoffmonoxid- bzw. ROS-Generators dagegen löste innerhalb von 7 h keinen Zelltod aus. Für das *Arabidopsis*-System konnte diese Aussage allerdings nicht bestätigt werden. Jedoch wurde im vorliegenden Fall die Vitalität nach 16 h bestimmt, wobei bemerkt werden muss, dass aus de Pinto's Arbeit keine Daten für diesen Zeitpunkt vorlagen. Der Einfluss von EGTA auf die Vitalität der Zellen ist enorm. Die Restvitalität geht bei einer Konzentration von 5 mM EGTA+PaNie auf 3% zurück, fällt allerdings in der Kontrolle (BSA+EGTA) ebenfalls um 15% ab (vgl. 3.1.4). Dieser Wert belegt eindeutig die Schwäche von pharmakologischen Untersuchungen (Jones *et al.*, 2003). Jones *et al.* zeigten in ihrer kürzlich publizierten Arbeit, dass Annahmen zur G-Protein-Interaktion in lichtregulierten Prozessen, die aufgrund pharmakologischer Untersuchungen gemacht wurden, mit Mutanten nicht bestätigt werden konnten. EGTA komplexiert offenbar nicht nur  $\text{Ca}^{2+}$  im Medium, sondern wirkt zudem zerstörend auf die Zelle. Die Blockade der einwärts gerichteten Calciumkanäle durch  $\text{LaCl}_3$  kann den programmierten Zelltod weitestgehend verhindern. Die Restvitalität der Zellen beläuft sich auf über 60%. Ein Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  ist also für die Aktivierung der HR und des PCD von elementarer

Bedeutung und spielt eine wichtige Rolle für den durch Wasserstoffperoxid ausgelösten Zelltod (Levine *et al.*, 1996). Eine transkriptionale Aktivierung von Abwehrgenen nach einem Pathogenbefall ist eine oft beschriebene Reaktion von pflanzlichen Geweben und Zellkulturen (Hammond-Kosack und Jones, 1996; Hammond-Kosack und Jones, 1997). Es scheint daher logisch, dass durch die Inhibierung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid zahlreiche Abwehrreaktionen ausbleiben. Die Tatsache, dass 60% der Zellen 16 h nach Elicitierung unter Cycloheximid vital blieben, gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass der PCD über die Neusynthese von Proteinen gesteuert wird. In Arbeiten von Aviv *et al.* (2002) wird über so genannte „prodeath“ Signalwege diskutiert. Die Hemmung eines „prodeath“ Signalwegs würde somit zu dem hier beschriebenen Phänomen, dem Erhalt der Vitalität trotz gehemmter Proteinbiosynthese führen, da die „prodeath“ Signale ausblieben.

#### **4.3.4 Programmierter Zelltod, ein Signalweg über G-Proteine**

Obwohl wiederholt die Verwendung pharmakologischer Hemmstoffe (insbesondere in Bezug auf G-Proteine) in der Kritik stand (Jones *et al.*, 2003) wurden Versuche zum G-Protein vermittelten, programmierten Zelltod gemacht. Als Effektoren für die G-Proteine wurden GTP- $\gamma$ -S und GDP- $\beta$ -S verwendet. Aus Abbildung 3.1.5 ist zu entnehmen, dass der programmierte Zelltod nicht mit G-Protein-Aktivatoren (GTP- $\gamma$ -S) oder -Inaktivatoren (GDP- $\beta$ -S) beeinflusst werden konnte. Weder die Inhibition, noch die permanente Aktivierung konnten den PCD verhindern. Zhao und Sakai (2003) zeigten eine direkte Beteiligung der G-Proteine am Signalweg zu den Phytoalexinen von *Cupressus lusitanica*, ein Nachweis, der für den PCD noch nicht erbracht wurde. Sano und Ohashi (1995) haben früh eine Rolle der G-Proteine in der Signalkette der Pathogenabwehr postuliert; eine direkte Beteiligung ist allerdings auszuschliessen, da der PCD nur in Kombination mit anderen Abwehrreaktionen induzierbar war und nicht durch die G-Protein Aktivatoren allein ausgelöst werden konnte. Koch (1998) wies auf eine mögliche Beteiligung der G-Proteine am PCD hin, pharmakologische Hemmstoffe wie das Mastoparan stören allerdings nicht nur

die G-Protein Signalkette, sondern „reißen“ auch Löcher in die Plasmamembran (Arbuzova und Schwarz, 1999), was zu einem Zusammenbruch des Ionenhaushalts mit seinen gravierenden Folgen für die Pflanze führt.

#### **4.4 Alkalisierung des Kulturmediums auf Elicitorkontakt**

Bei der Alkalisierung des Kulturmediums handelt es sich um ein bereits beschriebenes Phänomen von Zellkulturen nach Elicitierung (Jabs *et al.*, 1997; Roos *et al.*, 1998; Viehweger *et al.*, 2002). Die Protonen werden im Tausch gegen Kalium über die Membran transportiert; zeitgleich dringt auch  $\text{Ca}^{2+}$  über die Plasmamembran in die Zelle ein und Chlorid strömt aus der Zelle heraus (Zimmermann *et al.*, 1997). Die Bedeutung des  $\text{Ca}^{2+}$  für die Signalkette wurde bereits an anderer Stelle diskutiert (4.3.3). Es ist allerdings nicht geklärt, ob der Transport der Protonen aktiv oder passiv erfolgt.

##### **4.4.1 Alkalisierung einer *Arabidopsis* Zellkultur nach PaNie Kontakt**

Die hier verwendete Zellkultur von *Arabidopsis thaliana* reagierte innerhalb von zwei Min mit einer Alkalisierung auf den Kontakt mit dem Elicitor PaNie (vgl. 3.2.1). Diese Reaktion verlief schnell und heftig: innerhalb von fünfzehn min waren 95% der Alkalisierung vollbracht. Dass dies kein Effekt ist, der auf eine Verdünnung mit Flüssigkeit oder generell beim Kontakt mit Proteinen auftritt, zeigte die mit BSA behandelte Kontrolle. Hier schwankte der pH-Wert nach Zugabe des BSA um den Ausgangswert und verblieb schließlich auf stabilem Niveau. Diese Reaktion auf Elicitierung ist in sehr ähnlicher Form auch für die Karotte (Koch, 1998) und Tabak (Seeger, 2003) beschrieben worden.

##### **4.4.2 Alkalisierung einer *Arabidopsis*-Zellkultur nach Kontakt mit PaNie und Salicylsäure-Vorbehandlung**

Die Bedeutung der Salicylsäure, besonders für die systemische „Immunisierung“ wurde von Kauss *et al.* (1993) beschrieben und als „Priming“ bezeichnet. Am Modell der Petersilie wurde Salicylsäure und deren Derivate verwendet, um nachzuweisen, dass sich die Menge der produzierten Phytoalexine durch

Vorbehandlung steigern lässt. In Arbeitsgruppen von Kauss und Conrath wurde Salicylsäure verwendet, um die ROS Produktion und Ionenströme über die Plasmamembran durch Elicitierung gezielt zu steigern (Kauss und Jeblick, 1995; Katz *et al.*, 2002). Die Erfolge in diesen drei genannten Arbeiten sprechen Salicylsäure eine Rolle zu, welche die Zellen in einen Zustand erhöhter Alarmbereitschaft versetzen. Die Tatsache, dass die erfolgreiche Abwehr eines Pathogens von der Geschwindigkeit, mit der die Pflanze ihre Abwehr starten kann abhängt, verdeutlicht, warum der pflanzliche Organismus durch eine SA Vorbehandlung besser gegen Pathogene gerüstet ist. Wie aus Abbildung 3.2.2 zu erkennen ist, ist der Anstieg des pH-Wertes bei den mit SA behandelten Zellen schneller als in der unbehandelten Kontrolle auch steigt der  $\Delta$  pH in den behandelten Zellen auf einen höheren Wert ( $>0.4$  pH). Diese Beschleunigung kann ausreichen um eine erfolgreiche Abwehr des Pathogens zu erreichen.

#### **4.4.3 Alkalisierung einer gepufferten Zellkultur von *Arabidopsis thaliana* nach Kontakt mit PaNie**

Um die Rolle der Alkalisierung in der Reaktionskette besser zu verstehen, wurde zunächst das Ausbleiben der Alkalisierungsreaktion nach Elicitierung unter Verwendung eines starken Puffers untersucht. Wie aus Abbildung 3.2.3 hervorgeht, wurde die Alkalisierung des Medium durch den Puffer verhindert. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere Ionen wie Kalium,  $\text{Ca}^{2+}$  und Chlorid nicht dennoch über die Membran transportiert wurden. Dieser Versuch belegt, dass nach Zugabe des Puffers der gesamte apoplastische Raum nicht alkalisiert wurde. Um eine elicitorübliche Antwort auszulösen muss allerdings ein Schwellenwert überschritten werden (Roos *et al.*, 1998). Wird diese Schwelle nicht erreicht, wird die Reaktion der Zelle auf den Elicitor unterbunden. Die maximale Alkalisierung, die in den gepufferten Proben erreicht wurde betrug 0.2 pH Einheiten gegenüber 1.2-1.81 in den elicierten Kontrollen.

#### 4.4.4 Alkalisierung einer Zellkultur von *Arabidopsis* nach Kontakt mit PaNie und Hemmstoff Vorbehandlung

Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen keine Arbeiten vor, in welchen die Alkalisierung im Zusammenhang mit anderen Abwehrreaktionen auf Zellkulturen untersucht wurde. Alle Hemmstoffe, die Verwendung fanden, wurden 15 min vor Elicitorapplikation der Zellkultur beigemischt. Es zeigte sich (vgl. 3.2.4), dass durch die Hemmstoffe DPI,  $\text{LaCl}_3$  und AVG keine Veränderung der Alkalisierungsreaktion ausgelöst wurde. Die Produktion der ROS, die durch DPI gehemmt werden, war nicht mit der Alkalisierung gekoppelt. Auch der Calciumeinstrom (gehemmt durch  $\text{LaCl}_3$ ) spielte für die Alkalisierung keine Rolle. Der Einstrom der Protonen erfolgte somit, wie an anderer Stelle postuliert (Hahlbrock *et al.*, 2003) vermutlich als Ausgleich für den Ausstrom von Kalium. Der Ladungsausgleich, der für das einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  erbracht werden muss, wird durch Chlorid- und Kalium-Ionen getragen. Es fällt aber auf, dass der pH-Wert in der EGTA vorbehandelten Probe zunächst binnen Sekunden absinkt, sich leicht erholt und dann nach Elicitierung wieder ansteigt. Am Ende des Experiments erreicht dieser Wert schließlich die gleichen Werte wie in der Kontrolle. Weder der Calciumeinstrom, noch die Präsenz von  $\text{Ca}^{2+}$  im Außenmedium sind somit für einen Anstieg des pH-Wertes nötig. Der Signalweg zwischen einem mutmaßlichen elicitorresponsiven Calciumkanal und der Alkalisierungsreaktion scheinen somit getrennt; die Erkennung des Elicitors und der Kaliumaus- bzw. Protoneneinstroms müssen somit über getrennte Wege laufen. Jabs *et al.* (1997) erwogen die Möglichkeit einer Vielzahl von Calciumkanälen, durch deren Hemmung des Calciumeinstroms in manchen Arten (Petersilie) unterbunden wurde, in anderen (Soja) hingegen nicht. Der Translationshemmstoff Cycloheximid zeigte ähnlich wie die Vorbehandlung mit SA einen größeren Anstieg des pH-Werts als alle vergleichbaren Proben. Eine Erklärung dafür könnte darin liegen, dass die Alkalisierung eine permanent unterdrückte Reaktion der Zelle ist. Wird über die translationale Kontrolle der Faktor, der für die Unterdrückung notwendig ist nicht mehr bereitgestellt, steigt der pH-Wert weiter an und im Folgenden bricht der Ionenhaushalt der Zelle zusammen.

#### **4.4.5 Alkalisierung einer Zellkultur von *Arabidopsis* nach Kontakt mit PaNie und Vorbehandlung mit G-Protein-Hemmstoffen**

Wie bereits in 4.4.4 erwähnt, liegen kaum Daten für eine Beteiligung der einzelnen Signalwege der HR und der Veränderung des pH-Wertes im Apoplasten vor. Es zeigte sich (vgl. 3.2.6a), dass der Aktivator bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keinen Einfluss auf den Protonenfluss hat. Ab 20  $\mu\text{M}$  allerdings begann der pH-Wert schon während der Vorbehandlung stetig zu steigen. Die durch den Elicitor ausgelöste Reaktion wurde deutlich verlangsamt und abgeschwächt. Es scheint fast so, als sei die Alkalisierung eine durch Aktivierung der G-Proteine unterbundene Reaktion. Dies wurde auch durch die Gabe des G-Protein Inaktivators (GDP- $\beta$ -S) bestätigt. Wurden die G-Proteine permanent inaktiviert, stieg der pH-Wert kontinuierlich an. Diese Reaktion und die durch GTP- $\gamma$ -S ausgelöste Hemmung der Alkalisierung legen die Vermutung nahe, dass eine Hemmung der G-Proteine nach Elicitierung erfolgt. Diese Hemmung führt schließlich zu einer Alkalisierung. Hierbei sollten jedoch andere Möglichkeiten der Interaktion nicht außer Betracht gelassen werden wie Jones *et al.* (2003) in einer kritischen Betrachtung der Hemmstoffversuche an G-Protein anhand von Mutanten gezeigt haben.

### **4.5 Das Phytoalexin Camalexin**

#### **4.5.1 Camalexin in elicitorbehandelten Zellkulturen von *A.thaliana***

Phytoalexine als antibiotisch wirksame Substanzen werden nach Pathogenkontakt von *Arabidopsis* produziert. Dieses Phytoalexin ist in *Brassicaceen* das Camalexin (Conn *et al.*, 1988; Hagemeyer *et al.*, 2001). In der hier verwendeten Zellkultur von *A.thaliana* wurde durch Elicitierung mit PaNie die Produktion und Akkumulation von Camalexin induziert (vgl. 3.3.1). Hagemeyer *et al.* (2003) beschrieben einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Camalexinakkumulation.

#### 4.5.2 Camalexin unter erhöhtem pH-Wert

Um die Bedeutung der apoplastischen Alkalisierung besser zu verstehen, wurden Zellen mit einem Puffer auf einen pH-Wert eingestellt, welchen sie normalerweise nur nach Elicitierung erreichen. Dieser pH-Wert lag durchschnittlich bei 6.7. Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Erhöhung des pH-Wertes im Kulturmedium nicht ausreichte, die Phytoalexinproduktion anzuregen (vgl. 3.3.2). Dabei spielte es keine Rolle, welches Puffersystem verwendet wurde (Tris/MES oder Tris/KOH). Die Kultur hielt den pH-Wert bis zum Ende des Experiments auf diesem Niveau, lediglich die ungepufferte Kontrolle (eingestellt mit KOH pH 6.7) wurde von den Suspensionskultur zurück auf das Ausgangsniveau von 5.45 gebracht. Ein Signal, das mit der Alkalisierung einhergeht, lässt sich somit nicht von außen simulieren. Die Änderung des pH-Wertes wird nicht im Apoplasten als Parameter gemessen, sondern, wie Roos *et al.* (1998) feststellten, im Cytoplasma.

#### 4.5.3 Camalexinakkumulation bei konstantem pH-Wert

Auffallend war, dass die Zellkultur nach Elicitierung kein Camalexin produzierte, wenn die Alkalisierungsreaktion durch einen Puffer unterbunden wurde. Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit von der eingesetzten Puffermenge (vgl. 3.3.4). Bei vollständiger Hemmung der Alkalisierung (vgl. 3.2.3) wurde kein Camalexin akkumuliert. Wurde diese Grenze unterschritten, kam es sowohl zur Alkalisierung als auch zur Camalexinakkumulation (vgl. 3.3.4); je schwächer ausgeprägt die Alkalisierung verlief, desto geringere Mengen Camalexin konnten nachgewiesen werden. Dass der Einstrom von Protonen und  $\text{Ca}^{2+}$  als Gegenspieler eines Kalium- und Chlorid-Ausstroms betrachtet werden können, wurde in Arbeiten von Nürnberger (1994), Zimmermann *et al.* (1997), Jabs *et al.* (1997) und Grant *et al.* (2000) auf unterschiedliche Weise gezeigt. Dass die erhöhte Protonenkonzentration eine mögliche Bedeutung für die Funktion intrazellulärer Enzyme hat, wird an vielen Stellen in der Literatur diskutiert (Roos *et al.*, 1998;) Die Funktion einer Redox-Signalkette (Färber *et al.*, 2003, Hahlbrock *et al.*, 2003) wird ebenfalls in Erwägung gezogen.

#### 4.5.4 Camalexin und die Bedeutung der ROS, des Calciumeinstroms und der Proteinneusynthese

Es bestehen deutliche Wechselbeziehungen zwischen den einzelnen Abwehrreaktionen. Kaum eine der beschriebenen Reaktionen ist von den anderen abgekoppelt. Selbst wenn eine Reaktion (z.B. die künstliche pH-Erhöhung) nicht ausreicht um die Camalexinproduktion anzuregen (vgl. 3.3.2), so kann diese Reaktion als Bestandteil der Reaktionskette nicht ausbleiben (vgl. 3.3.4), da sonst eine andere Reaktion unterbleibt. Es ist gezeigt worden, dass sich die NADP(H)-Oxidase mit DPI hemmen lässt (Kroj et al., 2003) und dadurch die Synthese von Furanocoumarinen ausbleibt. Für das Arabidopsis-Modell konnten diese Daten nicht bestätigt werden, der Einfluss der ROS auf die Produktion der Phytoalexine scheint in Arabidopsis ein anderer zu sein. Das mag damit zusammenhängen, dass die beiden Organismen sich stark in der Zusammensetzung ihrer Sekundärmetabolite nach Pathogenbefall unterscheiden; während *A.thaliana* Indol-Derivate anreichert (Camalexin) sind es in *Petroselinum crispum* Produkte, die dem Phenylpropanoid- oder Betaketid-Stoffwechsel entstammen (Hahlbrock et al., 2003). Dagegen zeigte die Verwendung von EGTA, LaCl<sub>3</sub> und Cycloheximid deutliche Wirkung, die Produktion des Phytoalexins unterblieb hierbei vollständig. Jabs et al. (1994, 1997) beschrieben die Bedeutung der Ionenströme über die Plasmamembran. Im intrazellulären Signalweg kommt Ca<sup>2+</sup> eine große Bedeutung zu (Levine et al., 1996; Mithöfer et al., 1999; Romeis et al., 2000), denn es geht Wechselwirkungen mit Calmodulinkomplexen und Proteinkinasen ein. Die Bedeutung der PR-Proteine für die Hypersensitive Reaktion wurde durch Versuche mit Cycloheximid deutlich, welches die Neusynthese von Proteinen unterbindet. Bei einigen dieser *de novo* synthetisierten Proteine handelt es sich um von PAD1- bis PAD4-Genen kodierte. Glazebrook und andere (1997) konnten zeigen, dass diese Gene für Produkte kodieren, welche für die Synthese von Camalexin unbedingt notwendig sind. PAD3 (Zhou et al., 1999), hat eine P450-Monooxygenase-Funktion und katalysiert einen der letzten Schritte zum Camalexin. Dieses Genprodukt ist nach Pathogenkontakt in *Arabidopsis* vorhanden, unterliegt also einer transkriptionalen Kontrolle und

wird wie die anderen PR-Proteine durch Cycloheximid in seiner Synthese gehemmt.

## **4.6 Salicylsäure**

### **4.6.1 Salicylsäurenachweis in Zellkulturen von *Arabidopsis***

Salicylsäure und das Phytohormon Ethylen, sind neben vielfältigen anderen Reaktionen auch an der Pathogenabwehr beteiligt. Abbildung 3.4.1 zeigt eine Kinetik der SA-Akkumulation. Die Akkumulation beginnt 3 h nach Elicitierung und erreicht ein Maximum nach 9 h, danach fällt die Salicylsäurekonzentration der Proben wieder ab. Diese ungewöhnliche Kinetik ist auf eine mögliche Synthese von SA-Konjugaten zurückzuführen und konnte auch im Tabak (Seeger, 2003) mit zeitlicher Verzögerung beobachtet werden. In diesem Versuchsansatz ist nur die Menge an freier Salicylsäure nachgewiesen worden der Gehalt der Salicylsäurekonjugate wurde nicht berücksichtigt. Der Salicylsäure kommt nicht nur eine antibiotische Wirkung gegen das Pathogen zu, sie erfüllt auch eine wichtige Aufgabe als Langstreckensignal der systemischen Resistenz. Es konnte mit Pfropfungsexperimenten und transgenen Pflanzen überzeugend dargestellt werden, dass die Induktion der systemischen Resistenz ausbleibt, wenn das Langstreckensignal Salicylsäure zu Catechol abgebaut wird (Vernooji et al., 1994; Friedrich et al., 1995). Als ein möglicher Transportweg konnte im Phloem SA nach Pathogenkontakt nachgewiesen werden. Eindrucksvoll konnte auch eine Art „Immunisierung“ durch SA „Priming“ dargestellt werden: Zellkulturen, die vor Behandlung mit einem Pathogen oder Elicitor mit SA „geprint“ wurden, reagierten schneller, heftiger und gezielter gegen das vermeintliche Pathogen (Katz *et al.*, 2002; Conrath *et al.*, 2002). Diese Daten konnten in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Alkalisierung untermauert werden, indem gezeigt wurde, dass durch eine dreistündige Vorbehandlung mit physiologischen SA-Konzentrationen die Alkalisierung des Kulturmediums der Zellen schneller und stärker erfolgte als in der unbehandelten Kontrolle (vgl. 3.2.2). Die Bedeutung als systemisches Signal konnte von Seeger (2003) an Tabak-Suspensionzellkulturen gezeigt werden.

Zugabe von Salicylsäure, führte zur transkriptionalen Aktivierung von Genen (5-Epi-Aristolochensynthase), die an der Pathogenabwehr beteiligt sind (Seeger, 2003).

#### **4.6.2 Salicylsäureakkumulation unter Hemmstoffeinfluss**

Die Bedeutung der Salicylsäure für zeitlich nachgeschaltete Prozesse und auf die systemische Resistenz ist in 4.6.1 bereits diskutiert worden. Welche Signale unmittelbar nach Kontakt von Pflanze und Pathogen ausgehen und schließlich die Salicylsäureproduktion anregen, kann anhand der Ergebnisse aus 3.4.2 diskutiert werden. Es zeigte sich, dass jeder Hemmstoff (vgl. 3.4.2) in Kombination mit BSA nicht in der Lage war, eine Salicylsäureakkumulation in den Zellen auszulösen. Ebenso zeigte sich, dass Cycloheximid erfolgreich eine SA-Akkumulation inhibierte. Somit ist anzunehmen, dass die Enzyme, die SA, bzw. deren Vorstufen umsetzen nach Kontakt mit dem Elicitor *de novo* synthetisiert werden. Die Verwendung von EGTA+PaNie, und der hierdurch verstärkt eintretende Zelltod ließen die Menge an freier SA entweder unter die Nachweisgrenze sinken oder das Fehlen des  $\text{Ca}^{2+}$  im Außenmedium unterband die für die SA-Produktion nötigen Signale. Besonders eindeutig war dies bei den mit  $\text{LaCl}_3$  behandelten Proben. Hier stieg der SA-Gehalt auf das achtfache der elicitierten Kontrolle. Wurde die Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegels unterbunden, hatte dies einen starken Anstieg der SA-Konzentration zur Folge. Hierbei ist anzunehmen, dass dies kein unmittelbarer Effekt des fehlenden Calciumeinstroms darstellt, sondern vielmehr auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass prozentual mehr lebende Zellen in der Lage waren diese Substanz herzustellen. Denn die Kontrolle mit reiner Elicitorbehandlung verlor nach wenigen Stunden schon 80% der Vitalität (Veit, 2002), gegenüber 40% in der mit  $\text{LaCl}_3$  behandelten Kontrolle (vgl. 3.1.4). Da in der Literatur Ethylen als negativer Regulator verschiedener Signalwege diskutiert wird (Romeis *et al.*, 1999 und 2000; Rivas *et al.*, 2002) ist anzunehmen, dass der Einsatz von AVG, einem Hemmstoff der ACC-Synthase, dazu führt, dass die Produktion von Salicylsäure nicht reduziert werden kann, da die Produktion von Ethylen durch

diesen Hemmstoff unterbleibt (Luberacki, 2002). Die SA-Konzentration, die in den mit AVG und Elicitor behandelten Proben gemessen wurden, waren um ein fünffaches höher als jene, die in den Kontrollen erreicht wurden. Die Annahme, dass Ethylen als negativer Regulator auf die SA-Produktion wirkt, kann so bestätigt werden. Die Mehrproduktion von SA in den gepufferten Proben ist vermutlich auf den Stress durch den Puffer zurückzuführen. Bei leicht veränderten Vitalitätswerten (vgl. 3.1.3) und stark erhöhter Ethylenfreisetzung (vgl. 3.7.2) steht diese Annahme mit den anderen gewonnenen Ergebnissen aus der Pufferbehandlung im Einklang.

#### **4.7 Analyse von elicitorinduzierten Abwehrgenen**

Gene die durch Pathogenbefall in ihrer Aktivität beeinflusst werden, bezeichnet man als die Pathogenesis Related Genes (PR-Gene) und die daraus synthetisierten Proteine als die Pathogenesis Related Proteins (PR-Proteine). Vor umfangreicherem genetischem und biochemischem Hintergrundwissen wurden diese Gene und Produkte in den letzten Jahren besser charakterisiert und ihnen Funktionen zugeordnet. So sind die Funktionen mancher PR-Gene heute bekannt und man kennt ihre Rolle in der Pathogenabwehr. Eines der PR-Gene kodiert für eine pflanzliche Chitinase, die aktiviert wird, sobald das Pathogen beginnt, in die Pflanze einzudringen. Die Funktion in der Pathogenabwehr der in dieser Arbeit untersuchten PR-Gene (ACS2, ELI3, PAL, PR1, TCH) sind bekannt. Das für die Produktion von Ethylen notwendige ACC (Aminocyclopropancarboxylsäure) wird über die ACS2, einer ACC Synthase angeliefert. Die hier transient nachweisbare Akkumulation von ACS2-Transkripten nach 36 und 48 h tritt erst spät nach Elicitorkontakt auf und ist sicher nicht verantwortlich für die schnelle Neusynthese von Ethylen bereits nach 90 min. Diese Expression verursacht vielmehr die spät auftretende Synthese von Ethylen, wie sie schon von Veit (2002) für diesen Elicitor gezeigt werden konnte. Die Expression von ELI3 erreichte zur gleichen Zeit wie die ACS2 ein Maximum. ELI3, eine NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (Somsich *et al.*, 1996) spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus der aromatischen Aminosäuren nach

Pathogenkontakt. Diese zeitlich sehr spät auftretende Expression geht einher mit der Produktion von Camalexin und anderen phenolischen Verbindungen, die ebenfalls aromatische Elemente enthalten und nach 48 h ein Maximum erreichen (vgl. 3.3.1). Als Enzym am Übergang von Primär- zum Sekundärstoffwechsel kommt der PAL eine besondere Rolle zu. Sie katalysiert die Umsetzung von Phenylalanin im Weiteren zu trans-Zimtsäure unter Abspaltung von Ammoniak. Dieses Substrat ist Grundlage für die weitere Synthese aller phenolischen (und damit aromatischen) Substanzen. Die Bedeutung der PAL wurde schon auf viele Stressfaktoren hin untersucht und gilt als klassisches Stress induziertes Enzym (Logemann *et al.*, 1995). Dass auf Elicitierung mit PaNie die PAL kontinuierlich anstieg und zugleich eines der am schnellsten hochregulierten Gene darstellt, ist in Anbetracht der Funktion von PAL nur verständlich. Die Expression von PR1 wurde nach Elicitorkontakt reprimiert und blieb unterhalb der Detektionsgrenze für den Verlauf der Kinetik. Die Expression von TCH folgte einem biphasischem Verlauf. Das erste Maximum begann nach 3 h und erreichte ein weiteres nach 36 h. Dieses eher zu den durch Verwundung induzierten Genen zählende Transkript wird auch durch verschiedene weitere Stressfaktoren beeinflusst (Braam *et al.*, 1996; Braam *et al.*, 1997). Allerdings zeigten sich in Expressionsmustern die durch mechanischen Kontakt ausgelösten TCH Expressionsmaxima nach bereits 30 min bis zu einer Stunde. Das sehr spät auftretende Maximum bei 36 h scheint dagegen eine spezifische Antwort auf den Kontakt mit dem Elicitor zu sein.

## **4.8 Ionenanalyse**

### **4.8.1 Anionenanalyse nach Elicitierung mit PaNie**

Die Verschiebung von Ionen über die Membran ist eine der ersten und schnellsten Reaktionen die nach Elicitorkontakt ablaufen. Im Tausch gegen einen Protoneneinstrom und einen  $\text{Ca}^{2+}$  Influx werden neben Kaliumionen auch Chlorid Anionen aus der Zelle hinaus transportiert. Dieser Austausch wurde hier mit einem Dionex-Ionen-Chromatographen nachgewiesen. Für dieses Modellsystem konnte der Ausstrom von Chlorid sofort nach Elicitierung nicht

gezeigt werden, allerdings sind die Analysezeiten in bereits beschriebenen Modellen kürzer (Jabs, *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 1997). Der erste Messpunkt lag hier nach 3 h und erstreckte sich über 24 h. Vergleichsdaten für andere Systeme lagen für diesen Zeitraum nicht vor. Die Funktion von Sulfat ist bisher nicht beschrieben worden.

#### **4.8.2 Kationenanalyse nach Elicitierung mit PaNie**

Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  scheint über einen möglichen elicitorresponsiven Calciumkanal geregelt zu sein (Zimmermann *et al.*, 1997) und bewirkt die Aktivierung verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$  abhängiger Signalwege und Proteine. Der hier indirekt gemessene Calciumeinstrom, der mit einer Abnahme des freien  $\text{Ca}^{2+}$  im Kulturmedium einherging, steht in Einklang mit Beobachtungen in anderen Systemen (Fellbrich *et al.*, 2000; Blume *et al.*, 2002). Der rapide Abfall des  $\text{Ca}^{2+}$  im Außenmedium geht auf einen Einstrom innerhalb der ersten Minuten zurück. Da die Werte des freien  $\text{Ca}^{2+}$  nicht wieder anstiegen, ist davon auszugehen, dass diese Ionen permanent gebunden werden, und nicht nach einem kurzen Einstrom wieder in das Außenmedium abgegeben werden. Diese Annahme wird auch von der Tatsache gestützt, dass  $\text{Ca}^{2+}$  nach dem rapiden Abfall um 30% nicht weiter sank, sondern konstant auf niedrigem Niveau verblieb.

### **4.9 Gaschromatographischer Nachweis der Ethylenakkumulation nach Elicitorapplikation**

#### **4.9.1 Ethylenakkumulation in einer *Arabidopsis thaliana* –Zellkultur nach Elicitierung**

Der einfache Kohlenwasserstoff Ethylen ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ) ist ein bedeutsames Phytohormon, verantwortlich für die Reifung von Früchten in vielen Pflanzen. Daneben kommt dem Ethylen auch eine Rolle in der Signalkette zur systemischen Resistenz zu (Verberne *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass ethyleninsensitive Mutanten nicht in der Lage waren, systemische Signale zu erkennen und entsprechend zu reagieren (Verberne *et al.*, 2003). Die Freisetzung von Ethylen auf den Elicitorkontakt ist eine sehr schnelle in *A.thaliana* zu beobachtende Reaktion, die durch diesen Elicitor schon nach 60

min auf ein hohes Maß anstieg (vgl. 3.7.1). Die Werte für Kontrollen und mit Elicitor behandelten Proben stiegen über die Zeit kontinuierlich an, da beide Proben unter Luftabschluss gehalten wurden und dieser Stress in den Kontrollen ebenfalls eine Ethylenfreisetzung auslöste. Es zeigte sich jedoch in den mit PaNie behandelten Proben bereits 60 min nach Elicitorkontakt eine erhöhte Ethylenfreisetzung. Hier wurden beinahe um 50% erhöhte Werte gegenüber der lediglich unter Luftabschluss gehaltenen Kontrollen gemessen. In der Ganzpflanze (vgl. 3.11) konnten ähnliche Ergebnisse gewonnen werden. Die Grenze der Nachweisbarkeit wurde nach 3 h überschritten und sowohl Kontrollen als auch Proben zeigten zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöhte Ethylenwerte. In den elicitierten Proben wurde im Vergleich zu den Kontrollen nach 3 h fast die 1.5fache Menge Ethylen produziert und erreichten ein Maximum nach 6 h; ein ähnlicher Verlauf für die Ethylenakkumulation wurde von Veit (2002) für diesen Elicitor beschrieben. Interessanterweise fällt, ähnlich der SA-Kinetik, die akkumulierte Menge Ethylen nach einigen Stunden wieder ab, eine Beobachtung die auch an der Sonnenblume (Brändle pers. Mitteilung) beobachtet werden konnte. Dies ist entweder auf die Instabilität des Moleküls selbst oder auf Ethylen abbauende Prozesse zurückzuführen, die das Ethylen aus dem Gasraum entfernen.

#### **4.9.2 Ethylenakkumulation bei konstantem pH-Wert in Zellkulturen von *Arabidopsis thaliana* nach Elicitierung**

Die Auswirkungen der Alkalisierung auf die Produktion von Camalexin (vgl. 3.2.4) und anderen Phytoalexinen (Nürnberg *et al.*, 1994) sind deutlich geworden. Wie Abbildung 3.7.2 zeigt hatte die Stabilisierung des pH-Wertes keinen Einfluss auf die freigesetzte Menge Ethylen. Gepufferte Kontrolle, gepufferte elicitierte und ungepufferte elicitierte Probe zeigten nach einer Stunde keinen Unterschied im Ethylenausstoß. Nach 3 h dagegen stieg der Ethylengehalt in der gepufferten Kontrolle auf ein dreifaches der gepufferten PaNie Probe an. Ein Effekt, der stark mit der Wirkung des Puffers zusammenhängt. Der Ethylengehalt der elicitierten Proben stieg gegenüber den Messwerten der ersten Stunde nicht weiter an. Dies könnte mit dem Absterben

der Zellen nach Elicitierung zusammenhängen. In der Kontrolle waren zum gleichen Zeitpunkt fünf Mal mehr Zellen vital als in den Proben. Es steht also mehr biosynthetisch aktives Material zu Verfügung als in den elicitierten Proben. Somit ist ein weiterer Hinweis dafür gebracht, dass die synthetische Aktivität von elicitierten Zellen größtenteils von den vital verbleibenden erbracht wird.

#### **4.9.3 Hemmstoffwirkungen auf die Ethylenakkumulation in Zellkulturen von *Arabidopsis thaliana* nach Elicitierung**

Es konnte gezeigt werden, dass die Alkalisierung des Kulturmediums, keinen Einfluss auf die produzierte Menge Ethylen hat (vgl. 3.7.2). Eine mögliche Beteiligung der anderen Pathogen-Abwehrmechanismen sollte durch Verwendung der bereits bekannten Hemmstoffe (DPI, EGTA und  $\text{LaCl}_3$ ) ermittelt werden. Der Einsatz von DPI hatte hierauf keinen Effekt. Auch wenn die Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  unterbunden wurde, wurde nicht vermehrt Ethylen ausgestoßen. Der Einsatz von EGTA in Verbindung mit dem Elicitor führte dagegen zu einer Reduktion der akkumulierten Ethylenmenge nach 3 h. Dieser Rückgang ist mit Sicherheit auf die stark verminderte Vitalität der Zellen zurückzuführen. Die mit EGTA und PaNie behandelten Proben besaßen nach wenigen Stunden lediglich eine Restvitalität von 3% gegenüber 20% in der Referenz. Dies führte zu einer Reduktion auf 46% des Ethylens im Vergleich zur Kontrolle. Der Calciumkanalblocker PaNie+ $\text{LaCl}_3$  dagegen reduzierte den Vitalitätsverlust der elicitierten Kontrolle auf 40% daher blieben, wie schon bei der Salicylsäure festgestellt wurde, mehr Zellen biosynthetisch aktiv und konnten sich an der Stoffwechsellistung beteiligen. Diese Zellen erreichten einen Wert, der um 94% über dem der Referenz lag. Es scheint somit ein Signal von den Zellen auszugehen das für die Induktion von Ethylen und Salicylsäure nötig und ausreichend ist, aber zusätzlich eines Calciumeinstroms bedarf um den PCD auszulösen. Was dieses Signal sein könnte, bleibt zu klären.

#### **4.10 Reaktive Sauerstoff Spezies**

Die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies kann mit Hilfe von DAB nachgewiesen werden. Dass ROS zur Abwehr eines Pathogens produziert

werden ist bekannt (Doke, 1985; Baker und Orlandi, 1995; Lamb und Dixon, 1997). Der Elicitor PaNie ist, neben den vielfältigen bereits beschriebenen Reaktionen, auch in der Lage ROS zu induzieren. Diese traten im Mesophyllgewebe nach 30 min nachweisbar auf (vgl. 3.8.1) und wurden in größerer Menge auch noch danach produziert. Die DAB Methode ist nicht sensitiv genug, geringe Mengen  $H_2O_2$  nachzuweisen, sonst hätte das von Veit (2002) und Luberacki (2002) mit Oxyburst nachgewiesene  $H_2O_2$  nach 5 min detektiert werden können. Da das von Veit und Luberacki verwendete Oxyburst nach etwa 30 min gesättigt war, und keine weitere Akkumulation von  $H_2O_2$  zeigte, musste bisher der in der Literatur beschriebene biphasische Verlauf der ROS Produktion für dieses Modell verneint werden. Mit der Kombination aus Oxyburst und DAB kann nun die gesamte  $H_2O_2$  Akkumulation nach Elicitierung bis zur Ausbildung der Nekrose gezeigt werden.

#### **4.11 Abschottung des infiltrierten Gewebes mit Callose**

Es dient sowohl der Abschottung mechanischer Verletzungen als auch der Abwehr von eindringenden Hyphen. Callose ist ein durch UDP-Glucose und Callosesynthase schnell bereitgestelltes langkettiges Polysaccharid. Wie aus Abbildung 3.9 hervorgeht, wird die Callose auf Grund der Infiltration in sehr kurzer Zeit der Zellwand aufgelagert. Anfangs nur wenig, nach 60 min in beachtlichen Mengen. Diese zeigte sich diffus verteilt über die infiltrierte Stelle im Blatt; zu einem späteren Zeitpunkt war die diffus verteilte Callose verlagert und in eine scharf begrenzte Bande um die Infiltrationsstelle angeordnet. Nach 240 min ist dieser Prozess abgeschlossen und die gesamte Fläche, in die der Elicitor infiltrierte wurde, mit Callose abgedichtet. Es gibt Hinweise, dass im Fall eines Pathogenbefalls die Callose hilft, die weitere Ausbreitung des Pathogens zu verhindern und damit die Wirksamkeit der selbst produzierten antibiotischen Substanzen zu erhöhen.

#### **4.12 Identifikation von Elicitor-Erkennungsmutanten aus einer T-DNA Insertions Mutanten Linie**

Es gibt viele Hinweise darauf, dass Elicatoren an einen mutmaßlichen Rezeptor binden. Das führt dann, vermutlich unter Beteiligung von Signalketten, zu allen weiteren beschriebenen Reaktionen (vgl. 3.1-3.11). Dieser Screen einer T-DNA Insertions-Mutanten-Linie sollte nun Individuen isolieren, die auf eine Behandlung mit dem Elicitor nicht reagierten (vgl. 3.12.1 und 3.12.2). Es zeigte sich, dass die Auswahlbedingungen (vgl. 3.12.1) gut gewählt worden waren, so dass aus dem ersten Durchlauf noch 82 mögliche positive Kandidaten hervorgingen. Diese Zahl konnte in einem zweiten Durchlauf des Auswahlverfahrens auf 8 Pflanzen reduziert werden. Von diesen acht Individuen wurden die angrenzenden Bereiche der T-DNA Insertion sequenziert und über Datenbankabgleiche lokalisiert; Tabelle 3.12 zeigt das Ergebnis. Keine dieser Insertionen befand sich in einem bekannten Gen oder Promotor für ein bekanntes Gen. Die Insertionen, die lokalisiert wurden, können demnach nur in *cis*- oder *trans*- regulatorischen Elementen in für die Pathogenerkennung verantwortlichen Bereichen liegen, oder es befinden sich weitere Mutationen in diesen Mutanten, die jedoch über die verwendete Methode nicht nachgewiesen werden konnten. Multiple Insertionen von T-DNA machen es nahezu unmöglich, sequenzierbare PCR-Produkte zu erlangen, da immer überlagernde Fragmente aus der anderen Insertion die Reaktion verunreinigen.

#### **4.13 Der Elicitor PaNie im evolutionären Kontext**

In der Arbeit von S. Veit sind Aminosäuresequenzen von verschiedenen anderen Elicatoren (Veit 2002) miteinander verglichen worden. Es zeigte sich, dass aus phylogenetisch weit entfernten Organismen immer noch hohe Ähnlichkeiten mit der zur Grunde liegenden Elicitorsequenz bestanden. So besaßen die Aminosäuresequenzen aus verschiedenen *Phytophthora* Spezies immerhin eine Ähnlichkeit von über 80 Prozent und die aus einem Tiefseebakterium (*Bacillus halodurans*) noch mehr als 78% mit PaNie. Die Analyse von Elicitorsequenzen aus nahe verwandten Arten der *Pythiaceen* (vgl. 3.13) zeigte eine 99% Übereinstimmung mit der Vorlage. Bei allen drei Arten

kam es nur an einer Stelle zu einem Basenaustausch. Ob dieser Basenaustausch und der damit verbundene Austausch einer Aminosäure auch einen Einfluss auf die Aktivität des Elicitors hat, bleibt ungeklärt. Die hohe Konservierung des Elicitormotivs in den *Pythiaceen* und das mit hoher Ähnlichkeit auftretende Motiv in *Phytophthora*, *Fusarium* und *Bacillus halodurans* geben einen großen Hinweis auf eine mögliche, lebensnotwendige Funktion in diesen Arten wieder. Ein wiederkehrendes Elicitormotiv, welches von vielen Pflanzen aufgrund ihrer Basisresistenz erfolgreich erkannt und abgewehrt werden kann, unterliegt einem hohen evolutiven Druck.

#### **4.14 Elicitorwirkung auf *Panicum maximum***

Monokotyle sich nicht nur phylogenetisch von Dikotylen verschieden, sie sind auch physiologisch (Musci *et al.*, 1992) und morphologisch (z.B. Zellwände von *Carpita*) anders beschaffen. Da es in dieser Arbeit um die Untersuchung einer Basisresistenz ging, sollte festgestellt werden, ob eine Zellkultur von *Panicum maximum* ebenfalls mit einer vergleichbaren Abwehrantwort auf Elicitierung mit PaNie, wie sie für Karotte, Tabak und *A.thaliana* (Koch, 1998; Veit, 2002; Seeger, 2003) beschrieben sind, reagiert. Für den PCD konnte festgestellt werden (vgl. 3.1.6), dass die Zellkultur von *Panicum maximum* nicht auf den Elicitor reagierte. Auch eine 10fache Dosierung (5  $\mu\text{M}$ ) hatte keinen Einfluss auf die Vitalität. Die Wirkung des Elicitors als Toxin kann somit ausgeschlossen werden, eine rezeptorvermittelte Erkennung ist damit umso wahrscheinlicher. Auch in Hinsicht auf die Alkalisierung des Kulturmediums konnte bei der Hirse-Zellkultur keine Reaktion beobachtet werden (vgl. 3.2.5). Es scheint in der verwendeten Kultur keine Erkennung des Elicitors zu geben; zumindest wurde mit keiner der bekannten Reaktionen auf PaNie reagiert.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein vollständiges Modell zur Pflanze-Elicitor-Interaktion für Zellkulturen und Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* etabliert.

1. In Zellkulturen von *A.thaliana* konnten alle Reaktionen einer HR als Aspekte einer Nichtwirts-Resistenz beobachtet werden. Dies umfasste den PCD, den Einstrom von Protonen und  $\text{Ca}^{2+}$  in das Cytoplasma. Die transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen und die Akkumulation von freier Salicylsäure, Ethylen und Camalexin als späte Aspekte der HR konnten ebenfalls nachgewiesen werden.
2. In intakten Pflanzen von *A.thaliana* sind ebenfalls verschiedene Aspekte der HR gezeigt worden. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, Auflagerungen von Callose auf Zellwände und die Freisetzung von Ethylen konnten *in planta*, die in der Zellkultur gemachten Ergebnisse bestätigen und damit die Gültigkeit der Aussagen des reduzierten Systems "Zellkultur" stärken.
3. Hemmstoffe, die einzelne Aspekte der Reaktionskette der HR unterbinden, wurden eingesetzt um Wechselwirkungen zwischen den Teilreaktionen untereinander aufzudecken. Es konnte gezeigt werden, dass der erhöht eingestellte pH-Wert des Kulturmediums nicht ausreicht um die Phytoalexinsynthese zu induzieren; eine Unterdrückung der Alkalisierung unterbindet jedoch die Akkumulation dieser Substanzen. Es wurde belegt, dass die Alkalisierung keinen Einfluss auf eine Reaktionskette zum PCD und zur Ethylen- und SA-Akkumulation hat. Die Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$  Einstroms und die Blockierung der Proteinneusynthese hatten erheblichen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Reaktionen nötig sind damit die Zellkultur in den PCD eintritt. Das belegt eine Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  und *de novo* synthetisierten Proteinen am PCD. Die Reaktionskette die ausgehend von Ethylen inhibierend auf die SA-Akkumulation wirkt konnte hier durch einen

Inhibitor der ACC-Synthase demonstriert werden. Die Beteiligung von G-Proteinen an der Reaktions- und Signalkette zum PCD und der Alkalisierung des Apoplasten wurde über Hemmstoffe nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Signale zum PCD nicht über G-Proteine vermittelt werden; der Einstrom von Protonen ins Cytoplasma ist jedoch unabhängig von der Aktivität von G-Proteinen.

4. Durch Screening einer T-DNA Insertions-Mutanten Linie wurden Individuen isoliert die nicht auf den Elicitor reagierten. Diese Insertionen wurden über Tail-PCR lokalisiert und charakterisiert, phänotypisch zeigen alle diese Pflanzen Zwergwuchs.
5. Die Sequenz des Elicitors PaNie wurde mit anderen Elicitorsequenzen verglichen, dabei zeigten sich hohe Übereinstimmungen. mit anderen Pythiaceen.

## 6 Literatur

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- Alvarez, M.E. (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44: 429-442
- Anderson, J.D., Cardinale, F.C., Jennings, J.C., Norman, H.A., Avni, A., Hanania, U., Bailey, B.A. (1997) Involvement of ethylene in protein elicitor-induced plant responses. In: A. K. Kanellis (eds.) *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 267-274
- Arbuzova, A., Schwarz, G. (1999) Pore-forming action of mastoparan peptides on liposomes: a quantitative analysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1420: 139-152
- Aviv, D.H., Rusterucci, C., Iii, B.F., Dietrich, R.A., Parker, J.E., Dangl, J.L. (2002) Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *lsd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *Plant J.* 29: 381-391
- Bach, M., Schnitzler, J-P., Seitz, H.U. (1993) Elicitor-induced changes in  $Ca^{2+}$  influx,  $K^+$  efflux, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplasts of *Daucus carota* L. *Plant Phys.* 103: 407-412
- Baker, C.J., and Orlandi, E.W. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 299-321
- Bischoff, F., Molendijk, A., Rajendrakumar, C. S. V. und Palme, K. (1999) GTP-binding proteins in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 233-256
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Scheel, D. (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12: 1425-1440
- Boller, T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 189-214
- Bolwell, G.P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 287-294
- Braam, J., Sistrunk, M.L., Polisensky, D.H., Xu, W., Purugganan, M.M., Antosiewicz, D.M., Campbell, P., Johnson, K.A. (1996) Life in a changing

- world: TCH gene regulation of expression and responses to environmental signals. *Physiologia Plantarum* 98: 909-916
- Braam, J., Sistrunk, M.L., Polisensky, D.H., Xu, W., Purugganan, M.M., Antosiewicz, D.M., Campbell, P., Johnson, K.A. (1997) Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the Arabidopsis TCH genes. *Planta* 203 Suppl: 35-41
- Brader, G., Tas, E., Palva, E.T. (2001) Jasmonate-Dependent Induction of Indole Glucosinolates in Arabidopsis by culture filtrates of the Nonspecific Pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Phys.* 126: 849-860
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J., (1992) Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant-cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70: 21-30
- Braun, D.W., Walker, J.C. (1996) Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends Biochem. Sci.* 21: 70-73
- Brisson, L.F., Tenhaken, R., Lamb, C. (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6: 1703-1712
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., and Nürnberger, T. (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO J.* 21: 6681–6688
- Campisi, L., Yi, Y., Heilig, E., Herman, B., Cassista, A.J., Allen, D.W., Xiang, H., Jack, T. (1999). Generation of enhancer trap lines in Arabidopsis and characterization of expression patterns in the inflorescence. *Plant J.* 17: 699-707
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J. Biol. Chem.* 275: 36734-36740
- Cervone, F., Castoria, R., Leckie, F.D., De Lorenzo, G. (1997) In: P. Aducci (ed.) *Signal Transduction in Plants*. Birkäuser, Basel pp. 153–177
- Churngchow, N., Rattarasarn, M. (2000) The elicitor secreted by *Phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen. *Phytochemistry* 54: 33-38
- Conn, K.L., Tewari, J.P., Dahiya, J.S. (1988) Resistance to *Alternaria brassicae* and phytoalexin-elicitation in rapeseed and other crucifers, *Plant Sci.* 56: 21-25

- Conrath, U., Jeblinck, W., Kauss, H. (1991) The protein kinase inhibitor, K252a, decreases elicitor induced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and  $\text{K}^+$  release, and increases coumarin synthesis in parsley cells. FEBS Lett. 279: 141-144
- Conrath, U., Pieterse, C.M., Mauch-Mani, B. (2002) Priming in plant-pathogen interactions. Trends Plant Sci. 7: 210-216
- Conrath, U., Silva, H., Klessig, D.F. (1997) Protein dephosphorylation mediates salicylic acid induced expression of pr1 genes in tobacco. Plant J. 11: 747-757
- Cosgrove, D.J., Gilroy, S., Kao, T., Ma, H., Schultz, J.C. (2000) Plant Signalling 2000. Cross Talk Among Geneticists, Physiologists, and Ecologists. Plant Phys. 124: 499-505
- Currier, H., Strugger, S. (1956) Aniline blue and fluorescence microscopy of callose in bulb scales of *Allium cepa* L.. Protoplasma 45: 552-559
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. Plant Cell 8: 1793-1807
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., van Montagu, M., Inze, D., van Breusegem, F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell. Mol. Life Sci. 57: 779-795
- de Pinto, M.C., Tommasi, F., de Gara, L. (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. Plant Phys. 130: 698-708
- De Wit, P.J.G.M. (1995) Fungal avirulence genes and plant resistance genes: Unraveling the molecular basis of gene-for-gene interactions. In: J.H. Andrews und I.C. Tommerup (Eds.) Advances in Botanical Research, Vol. 21, Academic Press, London pp. 147-185
- Delaney, T.P. (1997) Genetic Dissection of Acquired Resistance to Disease. Plant Phys. 111: 5-12
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J.T., Neill, S.J. (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspension cultures. Biochem. J. 330: 115-120
- Dixon, R.A., Harrison, M.J. und Lamb, C.J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 479-501

- Doke, N. (1985) NADPH-dependent O<sub>2</sub>-generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 27: 311-322
- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 316-323
- Ebel, J., Cosio, E.G. (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148: 1-36
- Ebel, J., Scheel, D. (1997) Signals in host-parasite interaction. In: G. Carroll und P. Tudzynski (eds.) *The Mycota, Part A, Plant Relationships* Springer Verlag, Berlin, pp. 85-105
- Farr, D.F., Rossman, A.Y., Palm, M.E., & McCray, E.B. (n.d.) Fungal Databases, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved September 22, 2003 (<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>)
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18: 265-276
- Felix, G., Regenass, M., Boller, T. (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: Induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* 4: 307-316
- Felix, G., Regenass, M., Spanu, P. und Boller, T. (1994) The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labelling with [<sup>33</sup>P]-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 952-956
- Fellbrich, G., Blume, B., Brunner, F., Hirt, H., Kroj, T., Ligterink, W., Romanski, A., Nürnberger, T. (2000) *Phytophthora parasitica* elicitor-induced reactions in cells of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell. Physiol.* 41: 692-701
- Filippone, M.P., Diaz Ricci, J., Mamani de Marchese, A., Farias, R.N., Castagnaro, A. (1999) Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Lett.* 459: 115-118
- Fliegmann, J., Mithöfer, A., Wanner, G., Ebel, J. (2003) An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J. Biol.Chem.* in Press

- Flor, H.H. (1947) Host-parasite interactions in flax rust - Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685
- Friedrich, L., Vernooij, B., Gaffney, T., Morse, A., Ryals, J. (1995) Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol. Biol.* 29: 959-968
- Frye, C.A., Tang, D. und Innes, R.W. (2001) Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 373-378
- Gelli, A., Higgins, V.J., Blumwald E. (1997) Activation of plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup> permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Phys.* 113: 269-279
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., Holub, E.B., Hammerschmidt, R., Ausubel, F.M. (1997) Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* 146: 381-392
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., Boller, T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18: 277-284
- Gopalan, S., Wei, W., He, S.Y. (1996) hrp gene-dependent induction of hin1: a plant gene activated rapidly by both harpins and the avrPto gene-mediated signal. *Plant J.* 10: 591-600
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., Mansfield, J. (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* 23: 441-450
- Grauer M (2002) Isolierung von Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana* und Elicitor-induzierte Abwehrreaktionen. Diplomarbeit, Universität Tübingen
- Greenberg, J.T. (1997) Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 525-545
- Greenberg, J.T., Guo, A., Ausubel, D.F.M. (1994) Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77: 551-563

- Hagemeyer, J., Schneider, B., Oldham, N.J., Hahlbrock, K. (2001) Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 753-758
- Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., Logemann, E., Nürnberger, T., Schmelzer, E., Somssich, I.E., Tan, J. (2003) Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Suppl. 2*, 100: 14569-14576
- Hahlbrock, K., Scheel, D. (1989) Phys. and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 347-369
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 575-607
- He, S.Y., Huang, H.C., Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73: 1255-1266
- Heath, M.C. (1998) Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 117-124
- Heath, M.C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 315-319
- Herrero, M.L., Hermansen, A., Elen O.N., (2003) Occurrence of *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. in Norwegian Greenhouses and their Pathogenicity on Cucumber Seedlings. *J. Phytopathology* 151: 36-41
- Hirt, H. (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends in Plant Sci.* 2: 11-15
- Hock, B., Elstner, E. (1995) (eds.) *Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie.* Spektrum 3. Aufl., Heidelberg
- Hoeberichts, F.A., Woltering, E.J. (2003) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 25: 47-57

- Huckelhoven, R., Kogel, K.H. (2003) Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216: 891-902
- Hutcheson, S.W. (1998) Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 59-90
- Jabs, T. (1994) Beteiligung von elicitorresponsiven Ionenkanälen an der Signaltransduktion zur Aktivierung der Pathogenabwehr in Petersilie. Dissertation an der Universität Tübingen
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and  $O_2^-$  from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4800-4805
- Jones, A.M., Ecker, J.R., Chen, J.G. (2003) A reevaluation of the role of the heterotrimeric G protein in coupling light responses in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* 131: 1623-1627
- Joosten, M.H.A.J., Cozijnsen, T.J., de Wit, P.J.G.M. (1994) Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single basepair change in an avirulence gene. *Nature* 367: 384-386
- Katz, V., Fuchs, A., Conrath, U. (2002) Pretreatment with salicylic acid primes parsley cells for enhanced ion transport following elicitation. *FEBS Lett.* 520: 53-57
- Kauss, H., Franke, R., Krause, K., Conrath, U., Jeblick, W., Grimmig, B., Matern, U. (1993) Conditioning of Parsley (*Petroselinum crispum* L.) Suspension Cells Increases Elicitor-Induced Incorporation of Cell Wall Phenolics. *Plant Phys.* 102: 459-466
- Kauss, H., Jeblick, W. (1995) Pretreatment of Parsley Suspension Cultures with Salicylic Acid Enhances Spontaneous and Elicited Production of  $H_2O_2$ . *Plant Phys.* 108: 1171-1178
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H., Shimamoto, K. (1999) The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10922-10926
- Keen, N.T. (1975) Specific elicitors of plant phytoalexin production: Determinants of race specificity in plants? *Science* 187: 74-75
- Keen, N.T. (1992) Gene-for-Gene complementarity in plant pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24: 447-463

- Keen, N.T., Brügger, B., (1977) In: P.A. Hedin (ed.), Host Plant Resistance to Pests. American Chemical Society, Washington, pp. 1-26
- Keller, H., Pamboukdjian, N., Ponchet, M., Poupet, A., Delon, R., Verrier, J.L., Roby, D., Ricci, P. (1999) Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell* 11: 223-235
- Kiefer, I.W., Slusarenko, A.J. (2003) The pattern of systemic acquired resistance induction within the *Arabidopsis* rosette in relation to the pattern of translocation. *Plant Physiology* 132: 840-847
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8849-8855
- Koch, W. (1998) Signaltransduktion zu Zelltod und Phytoalexinsynthese in *Daucus carota*. Isolierung und molekularbiologische Charakterisierung eines neuen Proteinelicitors aus *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.. Dissertation, Universität Tübingen
- Koch, W., Wagner, C., Seitz, H.U. (1998) Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. *Planta* 206: 523-532
- Kombrink, E. & Somssich, I. (1995) Pathogen Defense in Plants. *Adv. Plant Pathol.* 21: 1-36
- Kombrink, E., Somssich, I. (1997) Pathogenesis-related proteins and plant defense. In: *The Mycota. Plant Relationships*. Carroll, G.C., Tudzynski, P. (Eds.), Springer, Berlin, Part A, Vol. 5: 107-128
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., Sheen, J. (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2940-2945
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gabler, Y., Lee, J., Scheel, D. (2003) Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol. Chem.* 278: 2256-2264
- Lamb, C.J., Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-275
- Lapous, D., Mathieu, Y., Guern, J., Lauriere, C. (1998) Increase of defense gene transcripts by cytoplasmic acidification in tobacco cell suspensions. *Planta* 205: 452-458

- Lee, J., Klessig, D.F. und Nürnberger, T. (2001) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene, HIN1, independent of extra-cellular calcium but dependent on MAPK activity. *Plant Cell* 13: 1079-1093
- Legendre, L., Heinstein, P.F., Low, P.S. (1992) Evidence for the participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.* 267: 20140-20147
- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., Lamb, C. (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6: 427-437
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276: 2054-2057
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Whittier, R.F. (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8: 457-463
- Logemann, E., Parniske, M., Hahlbrock, K. (1995) Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5905-5909
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I. (1990) Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response to tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004
- Malcherowitz, M. (2001) Elicitor-Induzierte Abwehrreaktionen bei *Arabidopsis thaliana* L.. Wissenschaftliche Arbeit für das Staatsexamen, Universität Tübingen
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory
- Mathieu, Y., Jouanneau, J.P., Thomine, S., Lapous, D., Guern, J. (1994) Cytosolic protons as secondary messengers in elicitor-induced defence responses. *Biochem. Soc. Symp.* 60: 113-130

- Mathieu, Y., Lapous, D., Thomine, S., Lauriere, C., Guern, J. (1996) Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta* 199: 416-424
- McDowell, J.M., Dangl, J.F. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochem. Sci.* 25: 79-82
- Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gandin, J., Raschforf, K., Schmidt, E., Blum, W., Inverardi, B. (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006
- Mithöfer, A., Ebel, J., Bhagwat, A.A., Boller, T., Neuhaus-Url, G. (1999) Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with  $\beta$ -glucan or chitin elicitors. *Planta* 207: 566-574
- Mithöfer, A., Fliegmann, J., Neuhaus-Url, G., Schwarz, H., Ebel, J. (2000) The hepta-beta-glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biol. Chem.* 381: 705-713
- Molders W, Buchala A, Métraux JP. (1996) Transport of Salicylic Acid in Tobacco Necrosis Virus-Infected Cucumber Plants. *Plant Physiology* 112: 787-792
- Musci, M.A., Egeland, D.B., Schuler, M.A. (1992) Molecular comparison of monocot and dicot U1 and U2 snRNAs. *Plant J.* 2: 589-599
- Nürnberger, T. (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 167-182
- Nürnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78: 449-460
- Nürnberger, T., Scheel, D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* 6: 372-379
- O'Donnell, P.J., Jones, J., Antoine, F., Ciardi, J. and Klee, H. (2001) Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J.* 25: 315-323
- O'Donnell, P.J., Schmelz; E.A., Moussatche, P., Lund, S.T., Jones, J.B., Klee, H.J. (2003) Susceptible to intolerance – a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *Plant J.* 33: 245-257
- O'Donnell, P.J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J.B., Klee, H.J. (2003) Multiple Hormones Act Sequentially to Mediate a

- Susceptible Tomato Pathogen Defense Response. *Plant Phys.* 133: 1181-1189
- Osbourn, A.E., (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C.A. (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898
- Pennell, R.I., Lamb, C., (1997) Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell* 9: 1157-1168
- Pontier, D., Gan, S., Amasino, R.M., Roby, D., Lam, E. (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol. Biol.* 39: 1243-1255
- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., Guern, J. (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* 9: 2077-2091
- Rajasekhar, V., Lamb, C., Dixon, R.A. (1999) Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Plant Physiol.* 120: 1137-1146
- Rasmussen, J.B., Hammerschmidt, R., Zook, M.N. (1991) Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiology* 97: 1342-1347
- Reymond, P., Farmer, E.E. (1999) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 404-411
- Ride, J.P. (1983) Cell walls and other structural barriers in defense. In: J.A. Callow (ed.) *Biochemical Plant Pathology*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 215-236
- Rivas, S., Romeis, T., Jones, J.D.G. (2002) The Cf-9 Disease Resistance Protein Is Present in an 420-Kilodalton Heteromultimeric Membrane-Associated Complex at One Molecule per Complex. *Plant Cell* 14: 689-702
- Romanski, A. (2001) Das Elicitorprotein NPP1 - Isolierung und Charakterisierung der korrespondierenden cDNA, heterologe Expression des Proteins und Studien zur Signalperzeption. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg

- Romeis, T., Piedras, P., Jones, J.D.G. (2000) Resistance Gene-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase in the Plant Defense Response. *Plant Cell* 12: 803–815
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., Jones, J.D.G. (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 2: 273-287
- Roos, W., Evers, S., Hieke, M., Tschöpe, M., Schumann, B. (1998) Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids . Phytoalexin biosynthesis in cultured cells of *eschscholtzia californica*. *Plant Phys.* 118: 349-364
- Rushton, P.J., Reinstadler, A., Lipka, V., Lippok, B., Somssich, I.E. (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* 14: 749-762
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D. (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819
- Ryan, C.A., Farmer, E.E. (1991) Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42: 651-674
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Sano, H., Ohashi, Y. (1995) Involvement of small GTP-binding proteins in defense signal-transduction pathways of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4138-4144
- Schaller, A., Ryan, C.A. (1996) Systemin - a polypeptide defense signal in plants. *Bioessays.* 18: 27-33
- Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 305-310
- Scheel, D. (2001) Oxidative burst and the role of reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. In: D. Inzé und M. van Montagu (eds.), *Oxidative Stress in Plants*, Harwood Academic Publishers, New York, pp. 137-153
- Scheel, D., Colling, C., Hedrich, R. Kawalleck, P., Parker, J. E., Sacks, W. R. Somssich, I. E. und Hahlbrock, K. (1991). Signals in plant defense gene activation. In: H. Hennecke und D.P.S. Verma (eds.), *Advances in*

- Molecular Genetics of Plant-Microbe-Interaction, Kluwer, Dordrecht, pp. 373-380
- Schwacke, R. (1995) Bildung aktiven Sauerstoffs als Antwort auf pilzliche Elicitoren bei Zellen verschiedener Koniferen, Dissertation, Universität Tübingen
- Seeger, F.T. (2003) Hypersensitive und systemische Abwehrreaktionen von *Nicotiana tabacum* nach Elicitierung mit einem Protein (PaNie) aus *Pythium aphanidermatum*. Dissertation, Universität Tübingen
- Seitz, U., Richter, G. (1970) Isolierung und Charakterisierung schnell markierter, hochmolekularer RNS aus frei suspendierten Calluszellen der Petersilie (*Petroselinum sativum*). Planta 92: 309-326
- Shirasu, K., Schulze-Lefert, P. (2000) Regulators of cell death in disease resistance. Plant Mol. Biol. 44: 371-385
- Shulaev, V., Leon, J., Raskin, I. (1995) Is Salicylic Acid a Translocated Signal of Systemic Acquired Resistance in Tobacco? Plant Cell 7: 1691-1701
- Somssich, I.E., Wernert, P., Kiedrowski, S., Hahlbrock, K. (1996) Arabidopsis thaliana defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol:NADP(+) oxidoreductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14199-14203
- Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 267: 1445-1449
- Takemoto, D., Hayashi, M., Doke, N., Nishimura, M., Kawakita, K. (2000) Isolation of the Gene for EILP, an Elicitor-Inducible LRR Receptor-Like Protein, from Tobacco by Differential Display. Plant Cell Physiol. 41: 458-464
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.P., Pugin, A. (1995) Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells, Plant Phys. 109: 1025-1031
- Thomma, B.P.H., Eggermont, K., Penninck, I.A.M., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 15107-15111
- Veit, S. (2002) PaNIE Ein heterolog exprimierter Proteinelicitor als Auslöser multipler Abwehrreaktionen in Mono- und Dikotyledonen, Dissertation, Universität Tübingen

- Veit, S., Wörle, J.M., Nürnberger, T., Koch, W., Seitz, H.U. (2001) A Novel Protein Elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* Induces Multiple Defense Responses in Carrot, *Arabidopsis*, and Tobacco. *Plant Phys.* 127: 832–841
- Verberne, M.C., Hoekstra, J., Bol, J.F., Linthorst, H.J. (2003) Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant J.* 35: 27-32
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J. (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6: 959-965
- Viehweger, K., Dordschbal, B., Roos, W., (2002) Elicitor-activated phospholipase A(2) generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H(+) pool for pH signaling via the activation of Na(+)-dependent proton fluxes. *Plant Cell* 14: 1509-1525
- Vijayan, P., Shocky, J., Levesque, C., Cook, R. and Browse, J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 7209–7214
- Wagner, C. (1996) Reinigung eines Proteinelicitors aus dem Kulturmedium von *Pythium aphanidermatum*. Wissenschaftliche Arbeit zum Staatsexamen. Universität Tübingen
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P., Ryals, J.A. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., Beer, S.V. (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257: 85-88
- White, P.J. (2000) Calcium Channels in Higher Plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 171-189
- Xu, H., Heath, M.C. (1998) Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell* 10: 585-598
- Yang K.Y., Liu Y., Zhang S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 741-746

- Zhang, Z., Klessig, D.F. (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7225-7230
- Zhao, J., Sakai, K. (2003) Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced beta-thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *J. Exp. Bot.* 54: 647-656
- Zhou, N., Tootle, T.L., Glazebrook, J. (1999) Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* 11: 2419-2428
- Zhu, Q., Droge-Laser, W., Dixon, R.A., Lamb, C. (1996) Transcriptional activation of plant defense genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 624-630
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2751-2755

Poster und Publikationen

- Veit, S., Wörle, J.M., Nürnberger, T., Koch, W., Seitz, H.U. (2001) A Novel Protein Elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* Induces Multiple Defense Responses in Carrot, *Arabidopsis*, and Tobacco. *Plant Phys.* 127: 832–841
- Wörle, J.M. (2000) Heterologe Expression eines elicitoraktiven Proteins (PaNie) aus *Pythium aphanidermatum*. Diplomarbeit, Universität Tübingen
- Wörle, J.M. (2002) Protein elicitor from *Pythium aphanidermatum* (PaNie) inducing multiple defense responses in cell cultures and plants of *Arabidopsis thaliana*. Botanikertagung Freiburg, 22.-27. September (Poster)

Die vorliegende Arbeit wurde am ZMBP Tübingen Abteilung Pflanzenphysiologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hanns Ulrich Seitz angefertigt.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. Seitz für das Überlassen dieses interessanten Themas und der Möglichkeit, Familie und Promotion unter einen Hut zu bringen.

Meinem Engel Martina für die sprachliche Überarbeitung dieses Werkes und für Ihr Leben mit mir, was bestimmt nicht immer einfach und lustig ist dafür aber umso fruchtbarer.

Meinen Kindern Jonathan, Paul und Lisa die meinem Leben einen Sinn geben.

Meiner Mutter, die mit Ihrer Kraft und Stärke die Grundlage dafür gelegt hat, dass ich studieren und promovieren konnte. Darauf kann meine Mutter genauso stolz sein wie ich STOLZ auf meine Mutter bin. Danke!

Dr. Seeger, für seine cordige Art und seinen guten Musikgeschmack, Dr. Weimar für die vielen interessanten Gespräche und Tipps zur Stellensuche, Dr. Koch für seine Hilfe beim Manuskript und seinen fachlichen Sachverstand, Dr. Hirner dafür, dass er beim Spielen immer verloren hat und für die € 50 Kopfgeld auf meine Redekunst, Dr. Veit für die Anleitung zum Diplom und dafür, dass er mich technisch immer auf dem neusten Stand hielt.

Den „Noch-Nicht-Doktoren“, ganz vorne [GQ]Borries für seine unbarmherzige Kritik und seine schier endlose musikalische Vielfalt, Roberto „the rabbit“ für die vielen schweißtreibenden Stunden im Wald, Matze und Manni für ihren interessanten Frauengeschmack und all den anderen, die es schaffen werden und hoffentlich Ihren Spaß an der Forschung nicht verlieren.

Den anderen mir ganz wichtigen Menschen im Labor: Steffi, unserer treuen Seele, die Labor 320 am Laufen hielt; Nizi unserer letzten Diplomandin; Melanie, der fleißigen „Hippe“ aus WoKo's Labor; Stadi für die analytische Hilfe vom GP bis zur Dissertation; den jungen Praktikanten und Diplomanden Isabel, Andrea, Friedericke, Wolfgang.....etc.

Entschuldigen möchte ich mich bei allen dafür, dass nach meinem Rigorosum das Bier ausging, und der Eine oder die Andere unter meinem ach so bösen Mundwerk zu leiden hatte.

## **Lebenslauf:**

### **Zur Person:**

Jörg Manfred Wörle

Geboren am 29.01.1974 in Neuss am Rhein, als Sohn der Eheleute Manfred und Monika Wörle geb. Hofmann

Gösstr. 40

D-72070 Tübingen

### **Schulische Laufbahn:**

Grundschule	1980-1984	Grundschule Burgunderstrasse
Gymnasium	1984-1993	Alexander v. Humboldt Gymnasium
Allg. Hochschulreife	08.06.1993	

### **Wehrersatzdienst:**

Wehrersatzdienst	1993-1994	Diakonisches Werk Neuss
------------------	-----------	-------------------------

### **Hochschule:**

Grundstudium	1994-1996	Biologie
Diplom Vorprüfung	30.07.1996	
Auslandsstudium	1996-1997	Mt. Allison University, NB, Canada
Hauptstudium	1997-2000	Pflanzenphysiologie, Genetik, BWL
Diplom	10.11.2000	Biologie
Promotion	2000-2003	Biologie

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Jörg M. Wörle

Gösstr. 40

D-72070 Tübingen