

1 EINLEITUNG

Pflanzen haben die Möglichkeit, den Angriff potentiell phytopathogener Mikroorganismen abwehren zu können und damit die Ausbreitung auf der Pflanze und die einhergehende Schädigung der Pflanze zu verhindern. Die Pflanze besitzt dazu neben der Basalresistenz (Nicht-wirtsresistenz) die Möglichkeit, mikrobielle Pathogene zu erkennen und geeignete Abwehrreaktionen zu induzieren. Die Pflanze kann zur Erkennung der Pathogene als Elicitoren oder pathogenassoziierte Muster (PAMP) bezeichnete Signalmoleküle wahrnehmen, welche die Abwehrreaktionen stimulieren. Dies hat im Verlauf der Evolution dazu geführt, dass Pflanzen eine sortenspezifische Wirtsresistenz erworben haben und damit von dem Pathogen nicht mehr kolonisiert werden können. Die „Gen-für-Gen-Hypothese“ beschreibt diesen Umstand damit, dass die Pflanzen Resistenzgene (R-Gene) besitzen, deren Produkte durch eine direkte oder indirekte Interaktion mit den Produkten von Avirulenzgenen (AVR-Genen) der Pathogene eine Abwehrreaktion einleiten können. Neben Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen scheint es sehr viel komplexere Interaktionsmechanismen zur Erkennung von Pathogenen zu geben. (nach: [1]).

Zum Thema Elicitoren wurden drei Versuche durchgeführt, die anhand eines Modellsystems den Einfluss von Elicitoren auf Pflanzenzellen in Zellkultur beschreiben sollen. Zu diesem Zweck wurden suspendierte Petersilienzellen mit verschiedenen Elicitoren (Tabelle 1) versetzt und verschiedene Abwehrreaktionen untersucht. Dazu wurde die Bildung von autofluoreszierenden Phytoalexinen, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der hypersensitive Zelltod (hypersensitive Reaktion, HR) der Petersilienzellen untersucht. Zur Untersuchung des hypersensitiven Zelltodes eignen sich Petersilienzellen besonders gut, da diese für den Zelltodassay als Protoplasten vorliegen müssen und für viele andere Pflanzenspezies die bei der enzymatischen Spaltung der Zellwand auftretenden Kohlenhydratfragmente selbst starke Elicitoren darstellen. Dies ist bei den verwendeten Petersilienzellen nicht der Fall [1].

Tabelle 1. Im Versuch verwendete Elicitoren.

Elicitor	Herkunft, Funktion (soweit bekannt) und Sequenz/Struktur
Pep-13	<p>Phytophthora sojae 13 AS-Peptid aus 42 kDa großem Glykoprotein mit Transglutaminase-Aktivität.</p> <p>MVYSPSTYLISAVVAVALQMQQTAATSLYYTPTVSDTNEITDKFFPAYGADVADQDCIIKVEVDPTLP NITTI SPVPVTPDLLANLTTAPADPVYSKVGSAILKEDAPATDAEQDSYISANIPDTNGKVGKPLSDP KDCATGWDDAQTARKLETKRRLLEANGNQDI AKLEAYFGTKMEMTLKDLPTVGVHTPSWAGPYWPTYQDS INVQWSQQQPSAAEKYAKAFGKDVKTFMDAVSKKNGIDSQSGRKKCSSDDDCSTLTDGSSCSIRTGKTSG YCIPTWFGICHAWSPAAILLETEPKCPVKHNGVTFQPMDLKALVSLVYD GARVQTVFTGARFNGGTDTTDE YGRHSNNAYRDLNPAYFHIASANILGKLNSTFVADV TAGAEVWNQPVVRGFKVYEQTEMTLEEGAQTFYGL EAYPNAAAKSLVYVKSRLSWIYETYPDGLVSSGQIDKFTTGQYYYYLLELDDAGEIIGGEWVYGSDDD HPDFLWLPKAKPAANTVTSVGLSYADVSMMLLKKSAACTA (Protein-ID: AAS60096)</p>

Elicitor

Herkunft, Funktion (soweit bekannt) und Sequenz/Struktur

Harpin von HrpZ
Hypersensitive re-
sponse and partho-
genicity

Pseudomonas syringae

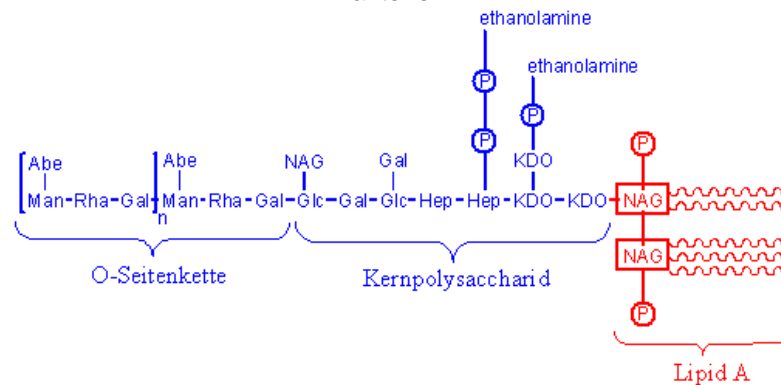
Produkt des Hrp-Genclusters, die u.A. Elemente des TTSS darstellen. HrpZ kann ionophore Kanäle bilden [2].

MQSLSLNSSLQTPAMALVLRPETETTGASTSSKALQEVVVKLAEELMRNGQLDDSSPLGKLLAKSMAA
 DGKAGGGIEDVIAALDKLIHEKLGDNFGASADNASGTGQDLMTQVLSGLAKSMLDDLLTKQDGGASFSE
 DDMPMLNKIAQFMDDNPAQFPKPDGSGSVNELKEDNFDGDETAAFRSALDIIGQQLGNGQSGAGGLAGT
 GGGLGTPSSFSNNSVTDGPLIDANTGPGDSGNSGSEAGQLIGELIDRGLQSVLAGGGLTPVNTPTGT
 AANGGQSAQDLQLLGGLLLKGLEATLKDAGQTATDVQSSAAQIATLLVSTLLQGRNQAAA
 (Protein-ID: BAD20900)

Burkholderia cepaceae

Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien

LPS
(Lipopolysaccharid)



PaNie
(Pythium aphanidermatum
necrosis inducing factor)

Pythium aphanidermatum

MVRFVSAALLAAAGVLASTNAAVINHDAVPVWPQPEPADATQALAVRFPQLDVGVCQPYPAVDPQGNT
 SGGKPKSGSQAAACRDMSKAQVYSRSGTYNGYYAIMYSWYMPKDSPSTGIGHRHDWENVVWLDNAASAN
 IVALSASAHSGYKSFADKSYLDGITAKISYKSTWPLDHELGFTTSSAGKQQLIQWEQMTQAARDALES
 TDFGNANVPFKSNFQDKLVKAFQ (aus [3])

PsojNip
(Phytophthora sojae ne-
crosis inducing protein)

Phytophthora sojae

2 PHYTOALEXINBIOSYNTHESE

Induktion der Phytoalexinbiosynthese durch Elicitoren und Bestimmung der EC₅₀-Werte für verschiedene Elicitoren.

2.A Durchführung

Suspensionskultivierte Petersilienzellen wurden mit Hilfe einer Absaugapparatur auf Filterpapier geerntet und gewaschen. Die Zellen wurden gewogen und mit Zellkulturmedium auf eine definierte Dichte (100 mg / mL) eingestellt und auf Petrischalen (Volumen: 2 mL) verteilt. Vor Zugabe der Elicitoren wurden die Petersilienzellen im Dunkeln geschüttelt. Es wurden verschiedene Elicitoren in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 2. Im Versuch verwendete Elicitoren und Elicitorkonzentrationen.

Elicitor											
Pep-13	(nM)	0	1	2	5	10	20	50	100	200	
Harpin	(nM)	0	10	20	50	100	250	500	1000	2000	
LPS	(µg/ml)	0	2.5	5	10	25	50	100	250		

Die Konzentrationen beziehen sich auf das Volumen in den Petrischalen, diese wurden eingestellt, indem entsprechende Volumina (bis maximal 50 µL auf 2 mL) der Stammlösungen verdünnt oder unverdünnt zu den Zellkulturen gegeben wurden.

Nach 24stündiger Inkubation im Dunkeln wurden von jeder Probe 4 mal 100 µL zellfreier Überstand entnommen und in eine Mikrotiterplatte (96 Loch, für Fluoreszenzmessungen mit schwarzen Wänden) überführt und die Fluoreszenz bei 360/440 nm (Verstärkung: 74) bestimmt.

2.B Ergebnisse

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung wurden durch das Messgerät als absolute Fluoreszenzintensitäten digital gespeichert. Die Fluoreszenzintensitäten aller Negativkontrollen (ohne Zugabe von Elicitor) wurden gemittelt (Intensität: 2575 ± 9 %) und die übrigen Messwerte um diesen Mittelwert korrigiert. Für jede Konzentrationsreihe wurde dann der (korrigierte) Maximalwert als 100% definiert und die anderen Werte einer Messreihe auf diesen bezogen. Es ergeben sich für jeden Elicitor jeweils vier absolute und relative Fluoreszenzintensitäten, die in den folgenden Tabellen aufgeführt sind.

Tabelle 3. Absolute und relative Fluoreszenzintensität nach Zugabe von *Harpin* und 24stündiger Inkubation

Konzentration (nM)	Messung 1		Messung 2		Messung 3		Messung 4	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
10	830	3	869	3	1747	7	2263	8
20	2347	8	3040	10	2552	10	2838	10
50	6014	21	6082	20	6474	25	6964	24
100	8723	30	8590	28	11912	47	15979	56
250	12916	45	16581	55	16332	64	15087	53
500	28690	99	13068	43	14692	57	26229	92
1000	21044	73	30230	100	25599	100	27221	96
2000	28871	100	4791	16	20242	79	28463	100

Tabelle 4. Absolute und relative Fluoreszenzintensität nach Zugabe von *Pep-13* und 24stündiger Inkubation

Konzentration (nM)	Messung 1		Messung 2		Messung 3		Messung 4	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
1	25	0.0	95	0.1	351	0.9	110	0.3
2	357	0.5	666	0.9	1226	3.2	810	2.1
5	7362	9.9	7489	10.4	8904	23.4	7267	18.4
10	14685	19.8	15761	21.8	16646	43.8	17192	43.6
20	25953	35.0	28356	39.2	28194	74.1	30027	76.1
50	35744	48.2	36868	51.0	35780	94.1	36691	93.0
100	74125	100.0	72281	100.0	33012	86.8	32409	82.1
200	54258	73.2	55948	77.4	38033	100.0	39466	100.0

Tabelle 5. Absolute und relative Fluoreszenzintensität nach Zugabe von *LPS* und 24stündiger Inkubation

Konzentration (µg/ml)	Messung 1		Messung 2		Messung 3		Messung 4	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
2.5	1800	5	2048	6	2426	10	2901	10
5	4470	13	3323	10	3774	15	4050	14
10	9838	30	10907	33	4056	16	7910	27
25	12249	37	11156	34	22447	88	21204	73
50	32162	97	29713	91	25438	100	29090	100
100	33202	100	32778	100	9050	36	5819	20
250	8769	26	10256	31	1729	7	1911	7

Die korrigierten, relativen Fluoreszenzintensitäten werden mit der relativen Phytoalexinproduktion (bezogen auf die maximale Phytoalexinproduktion bzw. maximale Fluoreszenzintensität) gleichgesetzt. Die relative Phytoalexinproduktion wird gegen die jeweilige Elicitorkonzentration aufgetragen. Die Graphen (Abb. 1-Abb. 3) zeigen den Mittelwert der aus vier Mes-

sungen bestimmten relativen Phytoalexinproduktion und als Fehler die Standardabweichung zwischen den vier Werten bei der jeweiligen Elicitorkonzentration.

Die Ergebnisse der Messreihe mit dem Elicitor *Harpin* zeigen bei halblogarithmischer Auftragung einen sigmoidalen Verlauf. An diesen kann die „Logistic-Funktion“ angepasst werden:

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^n} \quad (0.1)$$

Die Anpassung liefert den zu bestimmenden EC_{50} -Wert. Zur Anpassung der vorliegenden Messreihe ist der Wert bei maximaler Elicitorkonzentration (2000 nM *Harpin*) vernachlässigt worden, es ergeben sich die folgenden Regressionsergebnisse:

y_{\min}	7.7660E-009	± 5.0555	%
y_{\max}	108.2776	± 14.7554	%
EC_{50}	212.7205	± 80.1816	nM
n	-0.9205	± 0.2343	
R	0.9534		

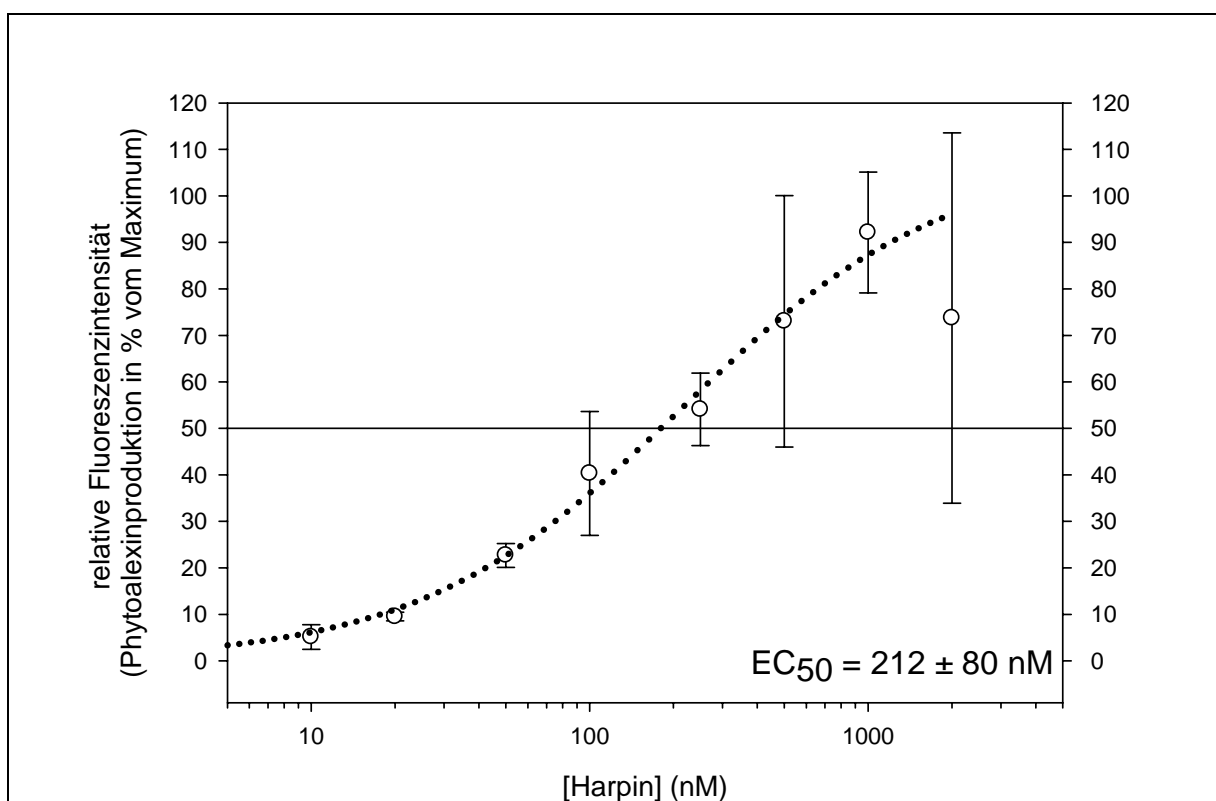


Abb. 1. Halblogarithmische Auftragung der relativen Phytoalexinproduktion gegen die *Harpin*-Konzentration.

Die Messergebnisse mit dem Elicitor *Pep-13* zeigen ein ähnliches Verhalten, auch hier findet sich bei halblogarithmischer Auftragung ein sigmoidaler Verlauf (Abb. 2).

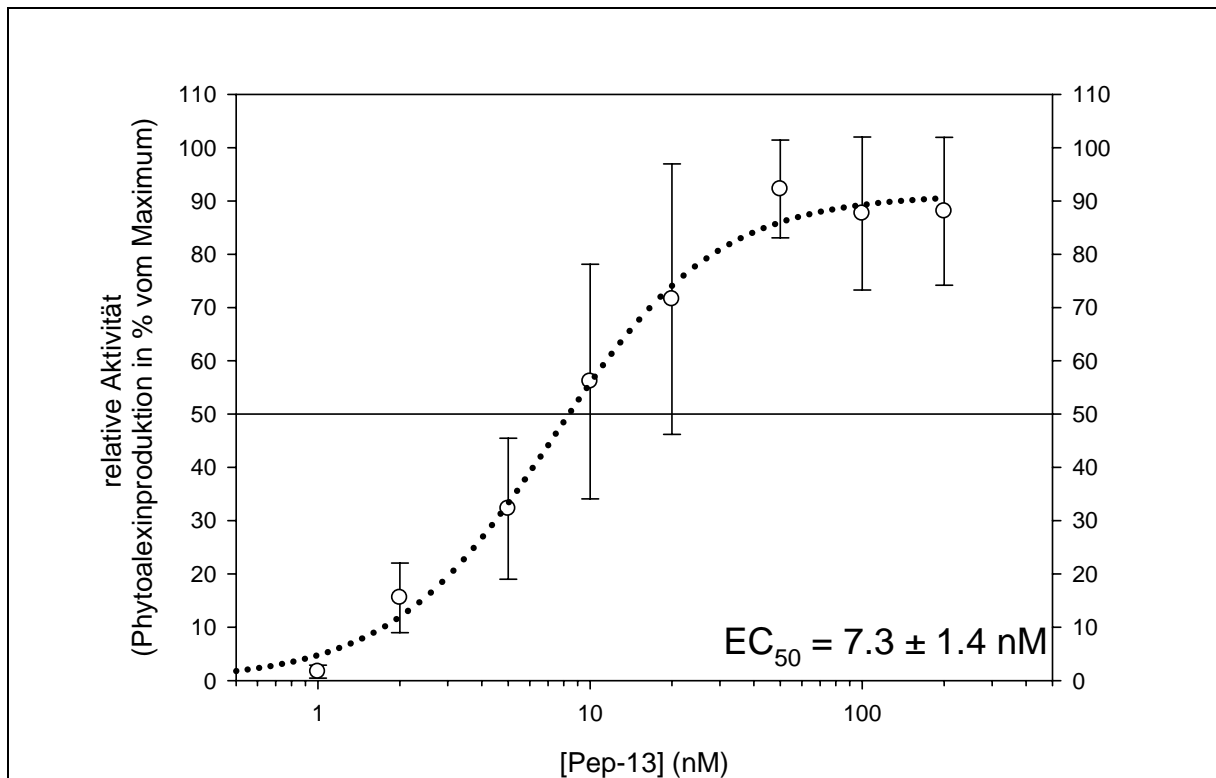


Abb. 2. Halblogarithmische Auftragung der relativen Phytoalexinproduktion gegen die *Pep-13*-Konzentration.

Die Anpassung der „Logistic-Funktion“ liefert hier die folgenden Ergebnisse.

y_{\min}	1.1787E-009	± 5.7268	%
y_{\max}	91.2346	± 5.2146	%
EC_{50}	7.3259	± 1.4229	nM
n	-1.4566	± 0.3845	
R	0.9418		

Für den Elicitor *LPS* zeigen die Ergebnisse ein anderes Bild, die Auftragung ergibt hier keinen deutlich sigmoidalen Verlauf (Abb. 3). Zumindest unter Vernachlässigung der letzten drei Werte (bei 50, 100, 250 $\mu\text{g/ml}$) kann eine sigmoidale Anpassung durchgeführt werden.

y_{\min}	7.8604	± 5.6756	%
y_{\max}	110.5988	± 20.1849	%
EC_{50}	10.2343	± 2.6487	$\mu\text{g/ml}$
n	-2.0944	± 0.8641	
R	0.9494		

Alternativ kann bei linearer Auftragung ebenfalls unter Vernachlässigung der letzten drei Werte eine lineare Anpassung durchgeführt werden (Abb. 4).

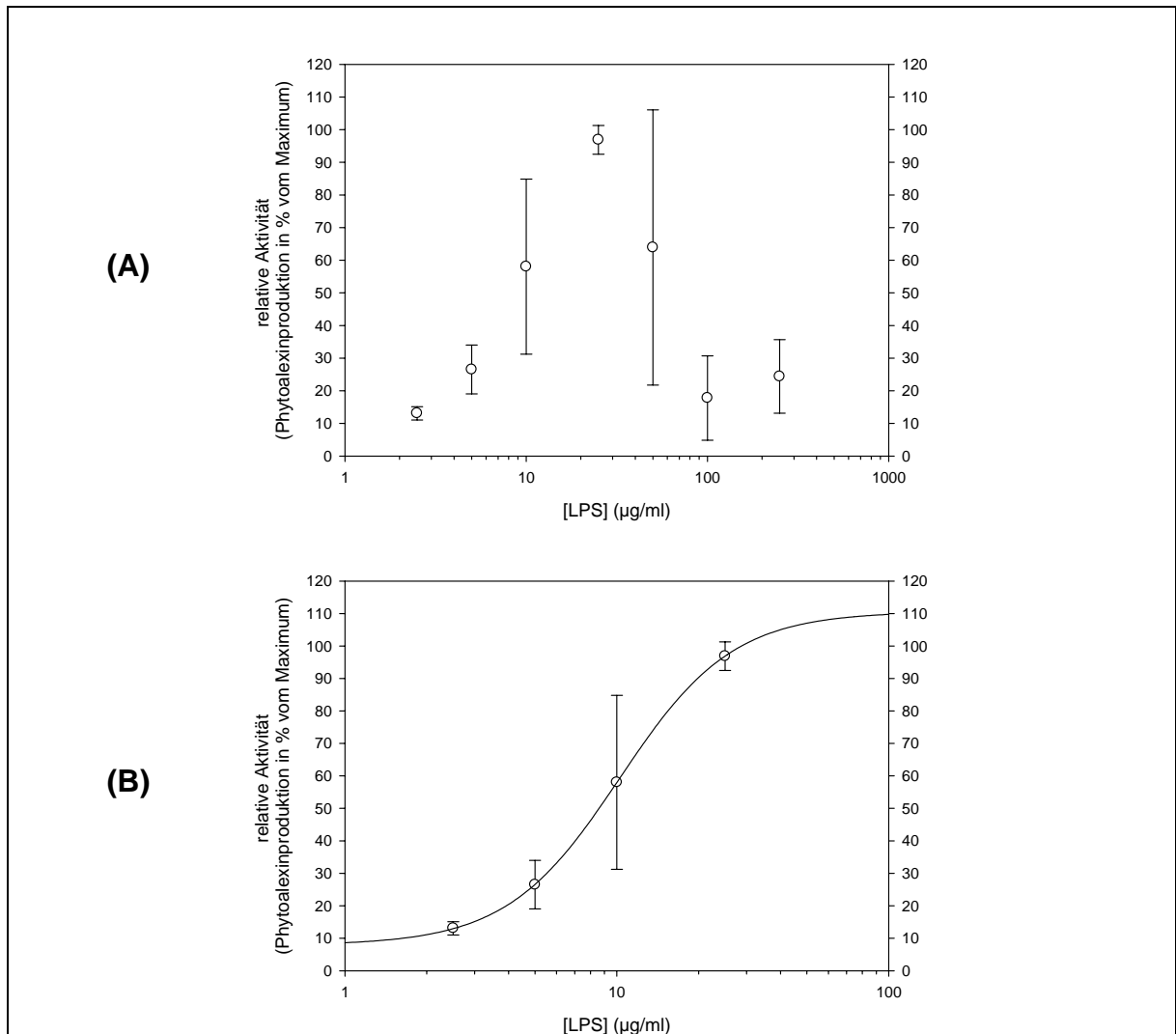


Abb. 3. Halblogarithmische Auftragung der relativen Phytoalexinproduktion gegen die LPS-Konzentration. (A) Berücksichtigung aller Messwerte. (B) Für Anpassung berücksichtigte Messwerte und Anpassung mit „Logistic“-Funktion.

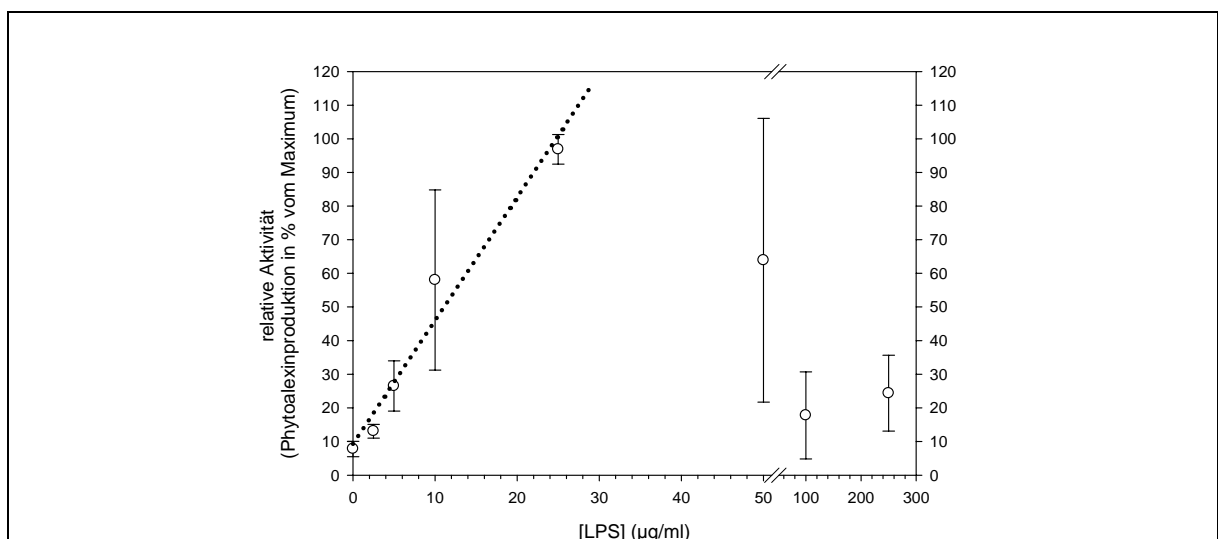


Abb. 4. Direkte Auftragung der relativen Phytoalexinproduktion gegen die LPS-Konzentration.

Die lineare Anpassung ergibt die folgenden Ergebnisse:

y_0	9.2995	± 4.1174	%
a	3.6657	± 0.3348	% $\mu\text{g}^{-1} \text{ ml}$
R	0.9324		

Für $y = 50\%$ ergibt sich ein Wert für a von $11.1 \mu\text{g/ml}$ LPS und liegt damit im Bereich des durch die „Logistic“-Funktion bestimmten Wertes.

2.C Diskussion

Mit den durchgeführten Messungen konnten die EC_{50} -Werte der durch die Elicitoren *Harpin*, *Pep-13* und *LPS* ausgelösten Phytoalexinproduktion bestimmt werden (Tabelle 6), die über die Autofluoreszenz der Phytoalexine quantifiziert wurde.

Tabelle 6. Übersicht über die bestimmten EC_{50} -Werte der verschiedenen Elicitoren.

Elicitor	EC_{50}	Fehler	relativer Fehler
Harpin	212 nM	80 nM	37.7 %
Pep-13	7.3 nM	1.4 nM	19.2 %
LPS	10.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$	2.7 $\mu\text{g} / \text{mL}$	26.5 %

Die Messwerte zeigen teilweise Schwankungen, was die in den Graphen durch Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung verdeutlicht (Abb. 1-Abb. 4) und die relativ großen Fehler in der Bestimmung der EC_{50} -Werte bedingt. Dafür können die folgenden Ursachen angeführt werden:

- Die Verteilung der Zellen auf die Petrischalen könnte ungleichmäßig geschehen sein.
- Beim Ansetzen der Verdünnungen und beim Pipettieren der Elicitoren können Fehler aufgetreten sein.
- Der nach der Inkubation entnommene Überstand war eventuell nicht zellfrei, was einerseits aufgrund von Eigenfluoreszenz von Zellbestandteilen und andererseits aufgrund von Streueffekten die Messung verfälschen könnte.

Der in diesem Test bestimmte EC_{50} -Wert der Phytoalexinbiosynthese für *Pep-13* wurde an anderer Stelle zu 31 nM bestimmt [4], der hier bestimmte Wert liegt bei ungefähr 25 % dieses Wertes.

Zusammenfassend lässt sich zu den verwendeten Elicitoren bemerken, dass diese in der Lage sind, die Phytoalexinproduktion zu stimulieren. Hervorzuheben ist auch der große Konzentra-

tionsunterschied der EC_{50} -Werte von *Pep-13* und *Harpin*, die sich um das ungefähr 30fache unterscheiden. Um diesen Umstand ausreichend zu erklären, müssten der Rezeptionsapparat der Pflanze und die nachfolgenden Signalkaskaden untersucht werden oder bekannt sein.

3 ROS-PRODUKTION

Induktion der Biosynthese von reaktiven Sauerstoffspezies durch Elicitoren – Aufnahme der Induktionskinetik

3.A Durchführung

Für diesen Versuch wurden wie im ersten Versuchsteil jeweils 2 mL der Suspension von *Petersilienzellen* verwendet und nach 30-minütiger Vorinkubation mit Elicitoren bzw. Wasser als Negativkontrolle versetzt (Doppelbestimmung).

Tabelle 7. Im Versuch verwendete Elicitoren und Elicitorendkonzentrationen

Elicitor		Konzentrationen	
Pep-13	(nM)	10	100
Harpin	(nM)	10	100
LPS	(µg / mL)	10	50
PaNie	(µM)		1

Nach jeweils 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 75, 90 und 120 Minuten wurden 50 µL der Zellsuspensionen in einer Mikrotiterplatte mit 750 µL Phosphatpuffer pH 7.9 (dieser war vorgelegt), 100 µL Kaliumferricyanid (als Katalysator) und 200 µL Luminol versetzt und anschließend sofort die Biolumineszenz bei 430 nm (Sensitivität: 198, 5 s) der oxidativen Umsetzung des Luminols gemessen.

3.B Ergebnisse

Die absoluten Biolumineszenzintensitäten wurden durch das Plattenlesegerät digital gespeichert. Die Zeitpunkte wurden durch die Überführung der ersten Probe in die Mikrotiterplatte mit vorgelegtem Kaliumphosphatpuffer definiert, auf die gleiche Entnahmereihefolge zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde nicht geachtet. Für eine Messreihe wurde jeweils ein Ansatz verwendet, sodass für die Doppelbestimmung Messreihen zweier Ansätze verglichen werden.

Tabelle 8. Ergebnisse der Induktionskinetik (unkorrigiert). (Teil I)

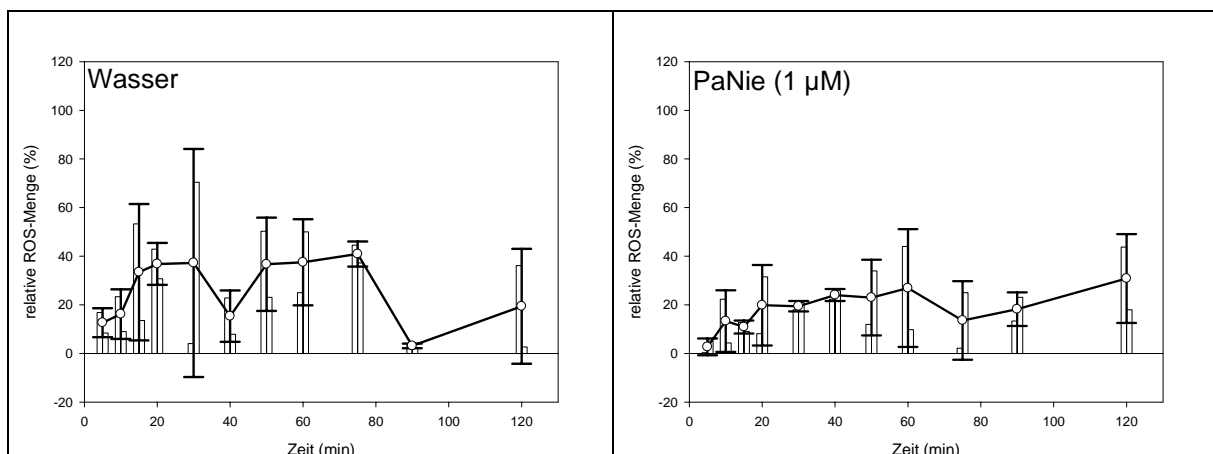
Zeit (min)	Wasser		LPS (10 µg / ml)		LPS (50 µg / µL)		PaNie (1 µM)	
5	62	31	89	1	61	104	1	19
10	86	33	94	221	36	114	82	16
15	196	50	56	108	37	49	47	33
20	158	113	53	19	70	67	30	116
30	15	259	146	67	337	96	66	77

Zeit (min)	Wasser		LPS (10 µg / ml)		LPS (50 µg / µL)		PaNie (1 µM)	
40	84	29	350	45	29	109	82	95
50	185	85	104	210	66	94	44	125
60	92	184	121	46	138	38	162	36
75	164	137	287	93	123	88	8	92
90	14	9	23	37	54	33	49	85
120	133	10	74	75	75	28	161	66

Tabelle 9. Ergebnisse der Induktionskinetik (unkorrigiert). (Teil II)

Zeit (min)	Pep-13 (10 nM)		Pep-13 (100 nM)		Harpin (10 nM)		Harpin (100 nM)	
5	4	129	162	38	5	266	136	171
10	16	12	93	67	94	221	36	114
15	190	65	145	6	117	4	163	44
20	102	18	170	245	115	17	195	196
30	148	178	74	87	34	104	50	132
40	287	176	105	164	106	44	350	104
50	58	134	70	104	141	29	274	150
60	143	226	127	262	85	36	51	99
75	160	214	368	209	127	129	111	126
90	185	123	11	156	42	87	73	173
120	183	300	304	224	69	314	179	25

Die vorliegenden Intensitäten wurden auf die maximal gemessene Intensität (*Pep-13*, 100 nM, 75 min) bezogen und als relative ROS-Menge gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 5). Auf eine Korrektur um die durch die Negativkontrolle gemessenen Intensitäten wurde verzichtet, da dadurch eine Vielzahl von negativen Werten berechnet werden würden und ein Bezug auf den Maximalwert nicht mehr möglich wäre. Darüber hinaus ist die Bestimmung des tatsächlichen Nullwertes nur schwierig möglich, denn die Mittelung aller Werte der Negativkontrollen liefert einen Mittelwert, dessen Standardabweichung 70 % des Mittelwerts selbst beträgt (mittlere Biolumineszenzintensität der Negativkontrolle: 97 ± 70).



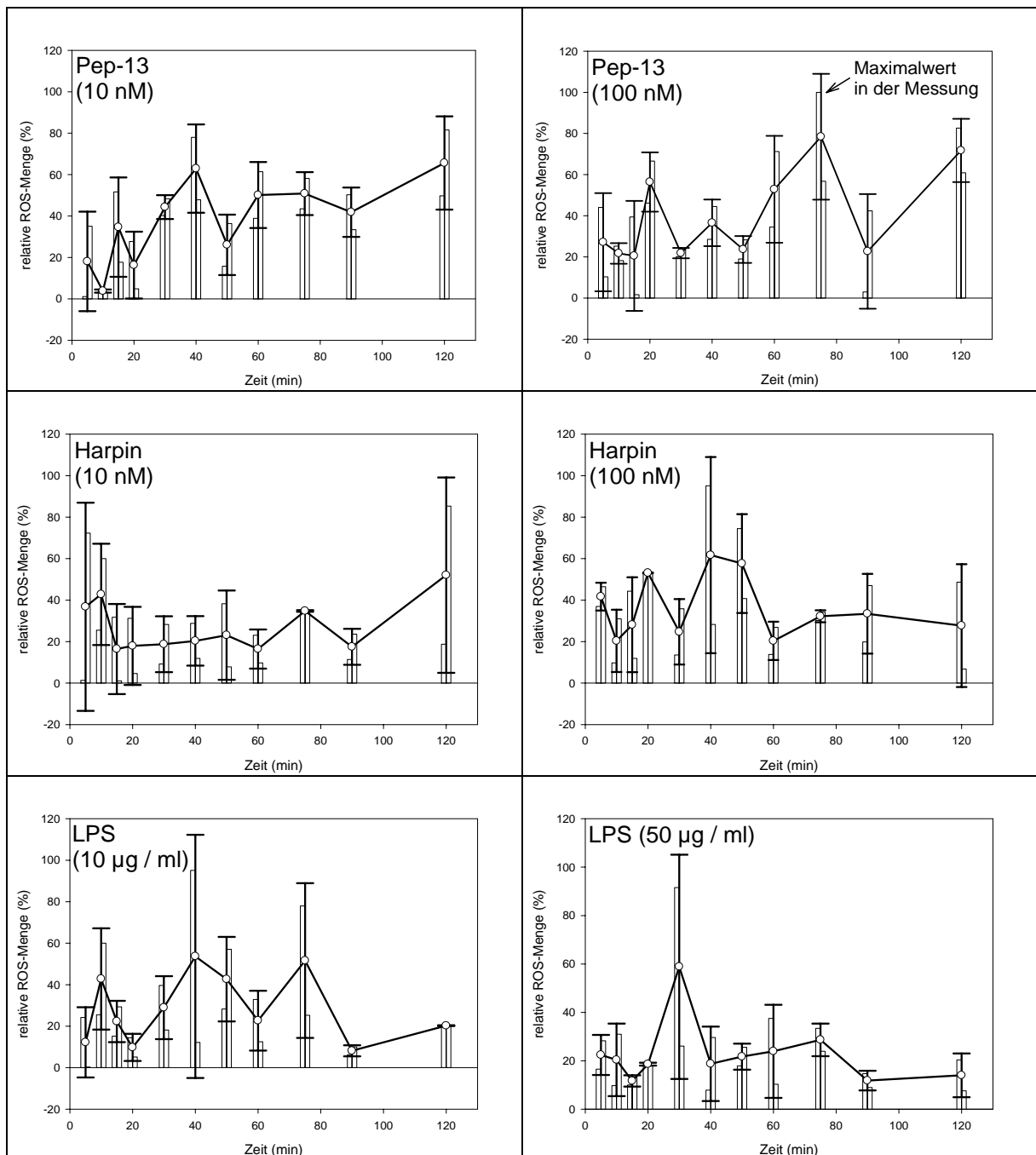


Abb. 5. Graphische Auswertung der Induktionskinetik nach Zugabe verschiedener Elicitoren.

Im Folgenden sollen die Beobachtungen zu den einzelnen Elicitoren aufgeführt werden:

- **PaNie:** Die aufgenommene Induktionskinetik zeigt keine signifikanten Unterschiede zu der Kinetik der Negativkontrolle.
- **Pep-13:** Die Kinetik mit 10 nM *Pep-13* zeigt ein Maximum nach 40 min, gegen Ende der Messung kann ein weiterer Anstieg beobachtet werden, mit 100 nM *Pep-13* zeigen sich Maxima nach 20 und 70 min.

- **Harpin:** Bei der mit 10 nM *Harpin* aufgenommenen Kinetik ist kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle erkennbar. Bei 100 nM *Harpin* findet sich ein Maximum nach 20 min, nach 40 min zeigen die Proben divergentes Verhalten. Hier könnten die beiden Messungen getrennt betrachtet werden; so würden sich Maxima bei 20 bzw. 40 min ergeben.
- **LPS:** Für die Messung mit 10 µg/mL *LPS* ergeben sich Maxima nach 10 min, 40 bzw. 50 min sowie nach 75 min, jedoch verhalten sich die Proben der Messreihen unterschiedlich. Mit 50 µg/mL *LPS* finden sich Maxima nach 30 bzw. 40 min, wenn man auch hier die Proben getrennt betrachtet.

3.C Diskussion

Die Ergebnisse zeigen eine geringe Reproduzierbarkeit. Die Negativkontrolle, die eigentlich einen konstanten, niedrigen Wert aufweisen sollte, zeigt schwankende Ergebnisse, weswegen die Messwerte der Negativkontrolle nicht als eindeutig bestimmbar „Hintergrundaktivität“ abgezogen werden konnten. Die in der Doppelbestimmung vermessenen Proben zeigen zu den jeweiligen Zeitpunkten teilweise weit auseinander liegende Messwerte, was eine gemeinsame Betrachtung dieser erschwert und aufgrund der hohen Fehlerabweichung eindeutige Aussagen über das Auftreten von Maxima relativieren muss.

Dennoch sollen die in den Ergebnissen aufgeführten Aussagen noch einmal genauerer Betrachtung unterzogen werden: Es kann vermutet werden, dass *PaNie* nicht die ROS-Produktion der Pflanze stimuliert. Bei *Pep-13* lassen sich eventuell zwei Maxima ausmachen, die bei höherer Konzentration früher auftreten (10 nM: 40 und 120 min; 100 nM: 20 und 70 min), was auf eine Verschiebung der Kurve hindeuten könnte. *Harpin* scheint bei niedriger Konzentration keine ROS-Produktion auslösen zu können, bei höherer Konzentration lässt sich ein Maximum bei 20 min (geringer Fehler) oder 40 min (größere Abweichung) finden. Die mit *LPS* vermessenen Proben zeigen besonders deutlich, dass die Proben unterschiedliches Verhalten zeigen. Dieser Umstand bedingt, dass alle Werte mit großen Fehlern belegt sind, bei einer getrennten Betrachtung der Messreihen lassen sich jedoch Maxima finden, die höchsten bei 30 und 40 min.

Eine größere Sicherheit bei der Bestimmung der ROS-Produktion hätte eine Wiederholung der Messungen gegeben. Die Zeiten der Entnahmen hätten präziser eingehalten werden können, mit Hilfe einer Mehrfachpipette hätten die Zeiten für die Zugaben der Reagentien verkürzt werden können. Eine Ungleichverteilung der Zellen auf die verschiedenen Proben könn-

te das unterschiedliche Verhalten in der Messung erklären. Auch Fehler beim Pipettieren und verunreinigte Reagentien könnten Ursache für die geringe Reproduzierbarkeit sein.

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von H_2O_2 konnte jedoch gezeigt werden, dass die Methode prinzipiell funktionierte, jedoch traten auch hier (mehr oder minder große) Abweichungen zwischen den beiden Messreihen der Doppelbestimmung auf (Abb. 6).

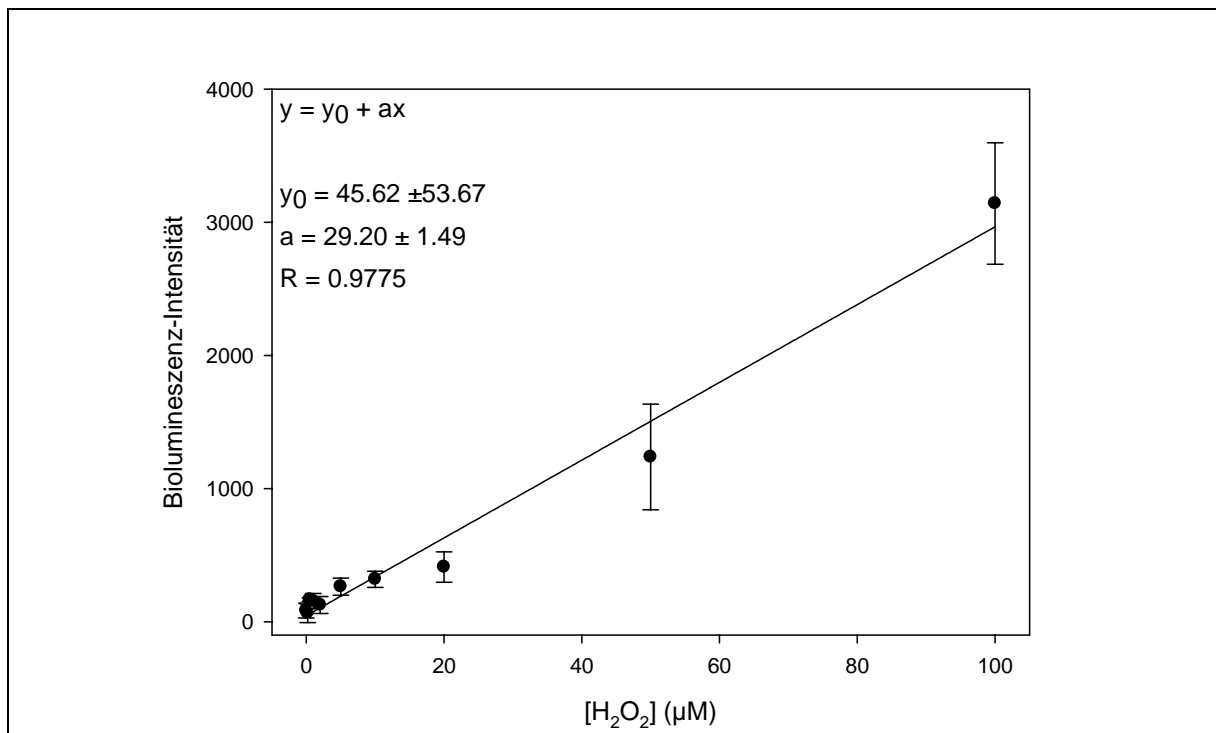


Abb. 6. Ergebnisse der Biolumineszenzmessung mit H_2O_2 .

4 ZELLTODASSAY

Induktion des Zelltodes durch Elicitoren – Identifikation aktiver/inaktiver Elicitoren und Bestimmung der Kompetitoraktivität von Elicitorfragmenten

Der Zelltodassay basiert auf der differentiellen Anfärbung von lebenden und toten Zellen: Fluoresceindiacetat (FDA) kann durch lebende Zellen aufgenommen und durch cytosolische Esterasen zu Fluorescein gespalten werden. Propidiumiodid (PI) kann durch die intakte Plasmamembran lebender Zellen nicht eindringen, es kann jedoch in tote Zellen eindringen und als interkalierende Substanz die DNA im Zellkern anfärben. Vor der Durchführung des Zelltodassays muss jedoch die Zellwand entfernt werden, sodass vor dem Versuch Protoplasten hergestellt werden müssen. Da die Farbstoffe unterschiedliche Absorptions- und Emissionseigenschaften besitzen, ist eine gleichzeitige Anfärbung von Protoplasten möglich, die Auswertung findet mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung verschiedener Filter statt.

4.A Durchführung

Die Zellen wurden nach Anleitung protoplastiert (über Nacht) und mit den in aufgeführten Elicitoren versetzt. Nach der Inkubation wurden die Protoplasten in einer Mikrotiterplatte mit den Farbstoffen (50 µg/ml Fluoresceindiacetat, 10 µg/ml Propidiumiodid) versetzt und anschließend auf mit Klebeband (zur Unterteilung) versehenen Objektträgern mikroskopiert, die Abbildungen wurden über den angeschlossenen Computer digital gespeichert.

Tabelle 10. Im Zelltodassay verwendete Elicitoren.

Elicitor	Endkonzentration	
Pep-13	(nM)	100
Harpin	(nM)	100
LPS	(µg/mL)	50
PaNie	(nM)	100
PaNie + (P5, 1 mM)	(nM)	100
PaNie + (P7, 1 mM)	(nM)	100
PsojNIP	(nM)	100

4.B Ergebnisse

Zur Darstellung des Zelltodassays wurden die Abbildungen der FDA-Färbung über die Abbildungen der PI-Färbung gelegt (Adobe Photoshop CS: Blending-Options: „Difference“, Opazität 100 %. Kanäle: nur Grün, Füll-Opazität 66 %). Es wurde keine Auszählung der Zel-

len vorgenommen. Die Frage, ob ein Elicitor die hypersensitive Zelltodreaktion auslösen kann oder nicht, soll daher nur qualitativ (semiquantitativ) beantwortet werden.

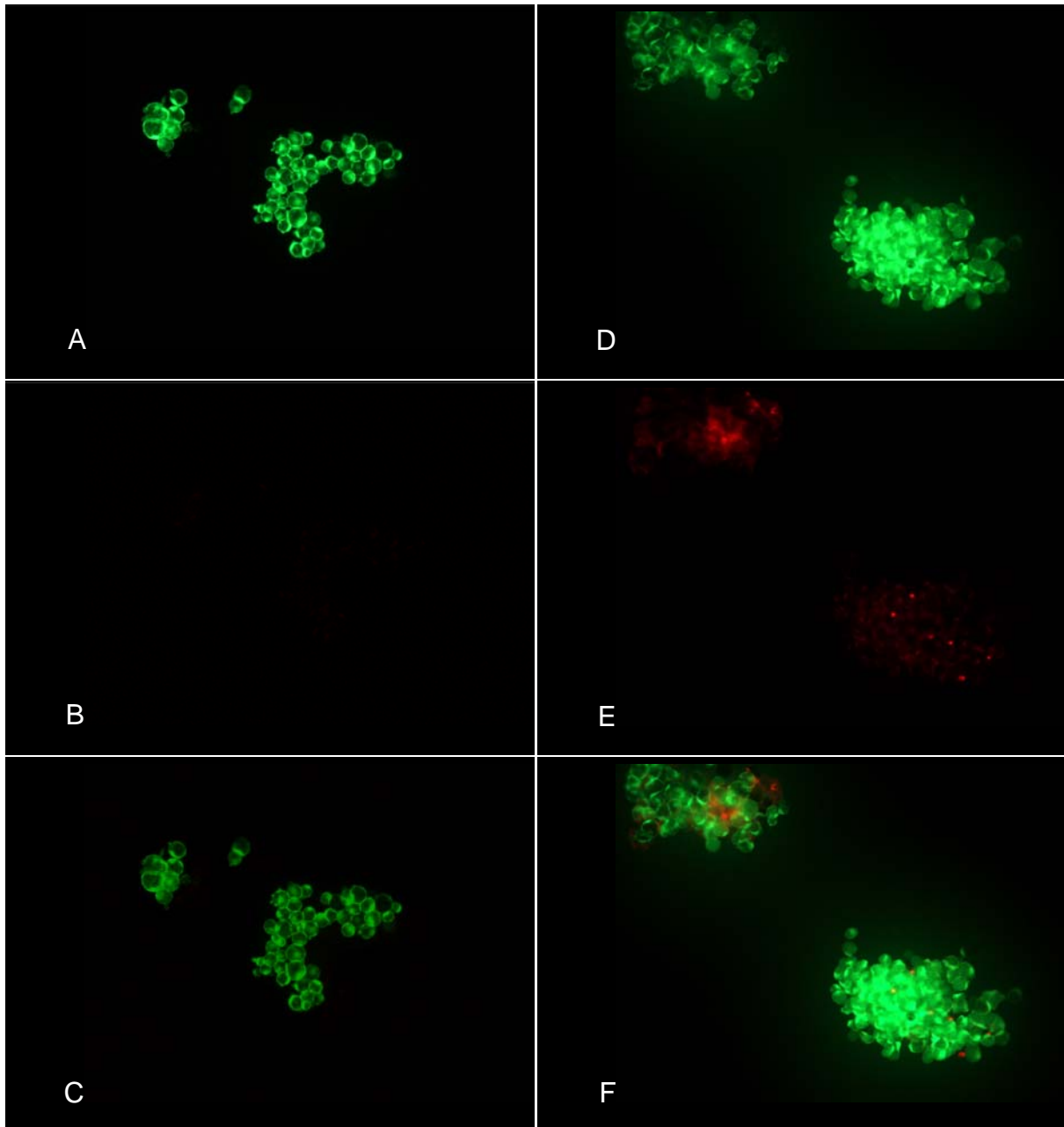


Abb. 7. Zelltodassay (A-C) ohne Zugabe von Elicitor, (D-F) nach Zugabe von *Harpin*. A und D zeigen die Aufnahmen der FDA-Färbung; B und E die PI-Färbung; C und F die Überlagerung der beiden Aufnahmen.

In der nur mit Wasser versetzten Probe finden sich ausschließlich lebende Protoplasten; so lassen sich in der Abbildung, welche die Anfärbung mit Propidiumiodid zeigt, keine angefärbten Protoplasten finden, ebenso wenig in einer weiteren Negativkontrolle (nicht abgebildet).

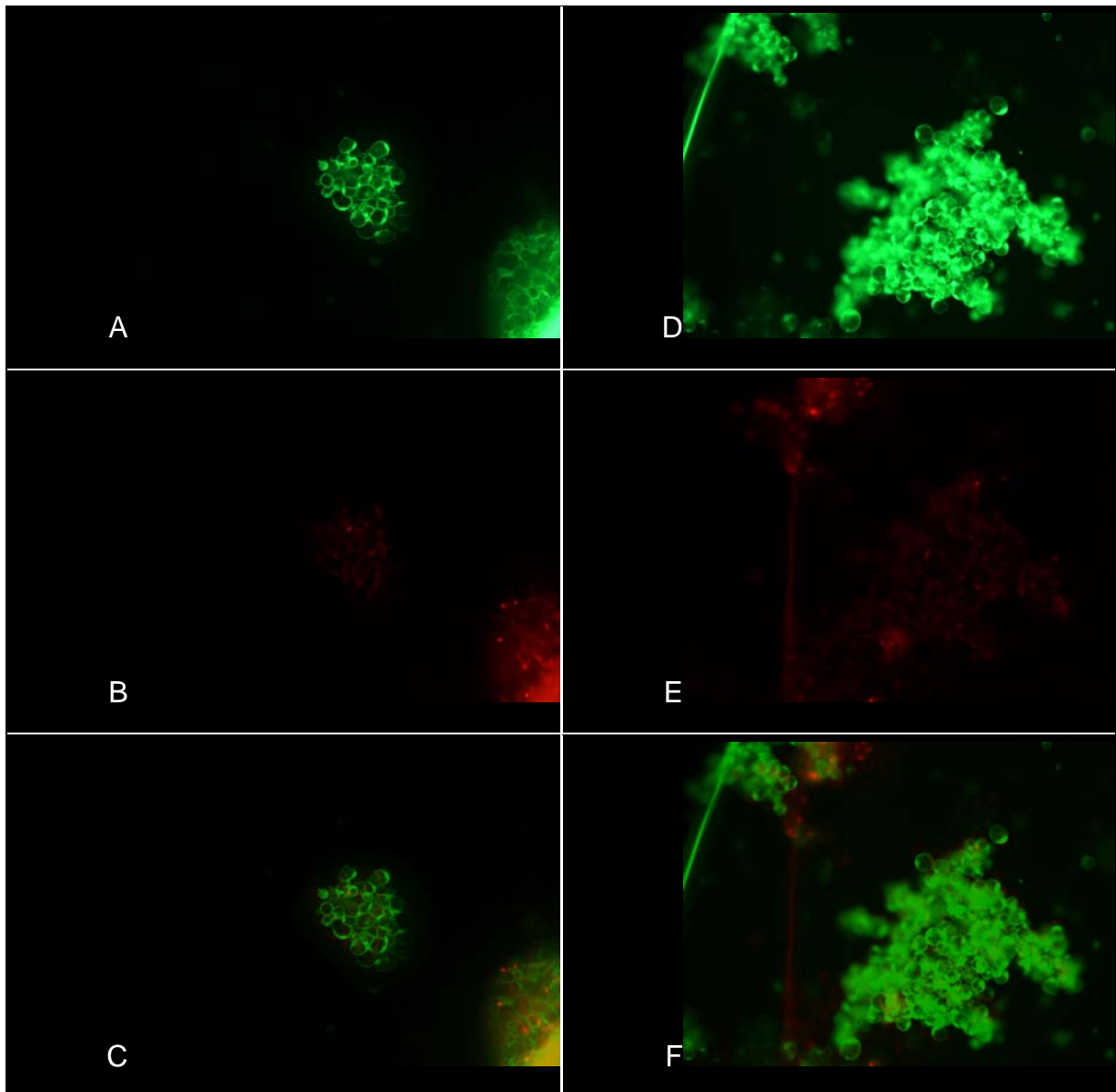


Abb. 8. Zelltodassay (A-F) nach Zugabe von Pep-13. (A, D: FDA-Färbung; B, E: PI-Färbung; C, F: Überlagerung)

Der Zelltodassay mit *Harpin* zeigt, dass im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 7, A-C) ein leicht verstärkter Zelltod zu beobachten ist (Abb. 7, D-F), in einer vergleichbaren Größenordnung tritt der Zelltod bei den Zellen auf, die mit *Pep-13* (Abb. 8) oder *LPS* (Abb. 9, A-C) versetzt wurden.

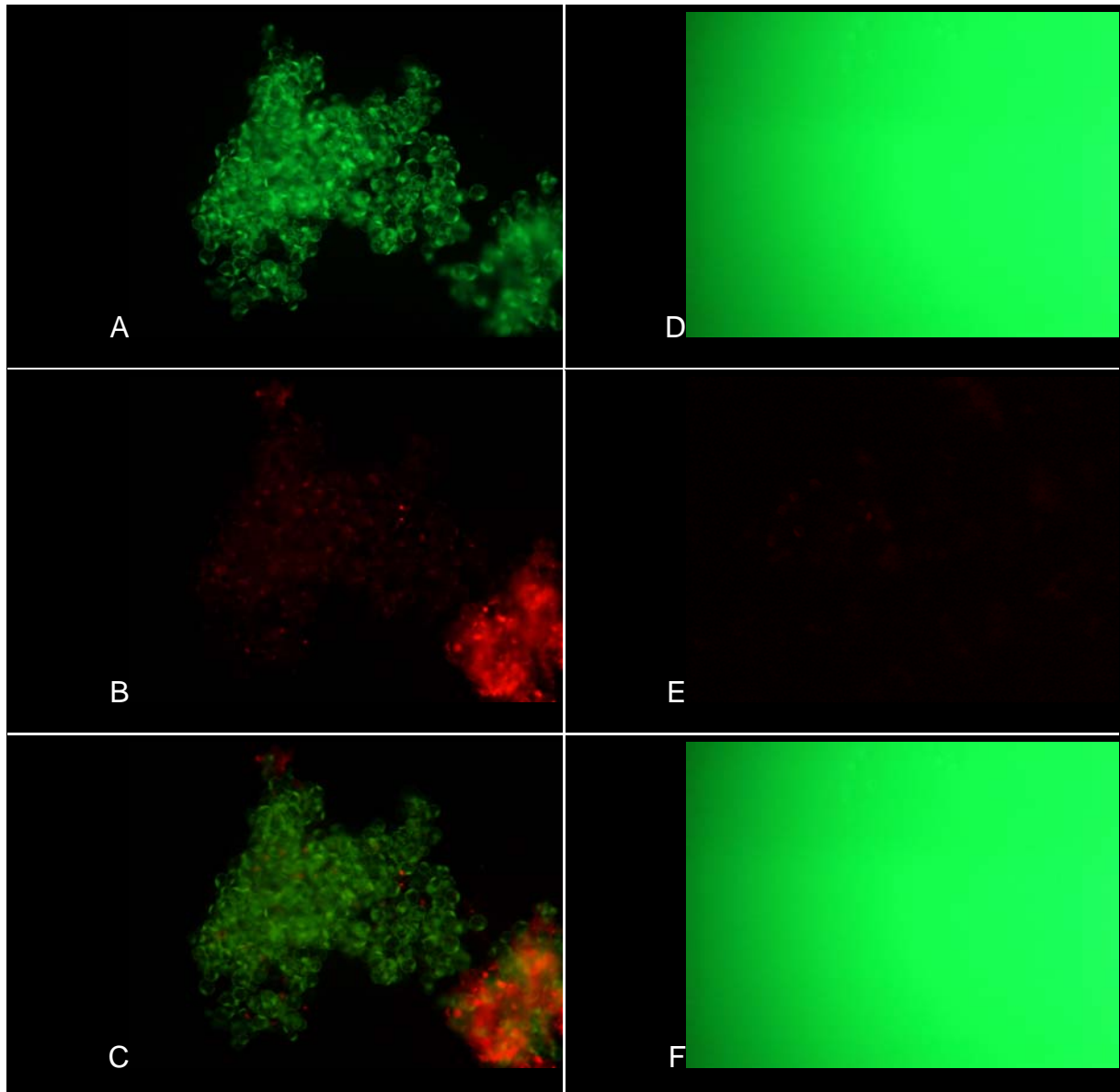


Abb. 9. Zelltodassay (A-C) nach Zugabe von LPS, (D-F) nach Zugabe von PsojNIP (A, D: FDA-Färbung; B, E: PI-Färbung; C, F: Überlagerung)

Praktisch ausschließlich tote Protoplasten treten bei *PsojNip* (Abb. 9, D-F) und *PaNie* (Abb. 10, A-C) auf. Bei *PsojNIP* sind keine lebenden Protoplasten mehr zu beobachten, auch durch Propidiumiodid anfärbbare Strukturen sind nicht (mehr?) zu erkennen. Bei *PaNie* konnten ebenfalls keine lebenden Protoplasten mehr nachgewiesen werden, jedoch sind mittels Propidiumiodid angefärbte, tote Protoplasten deutlich zu erkennen.

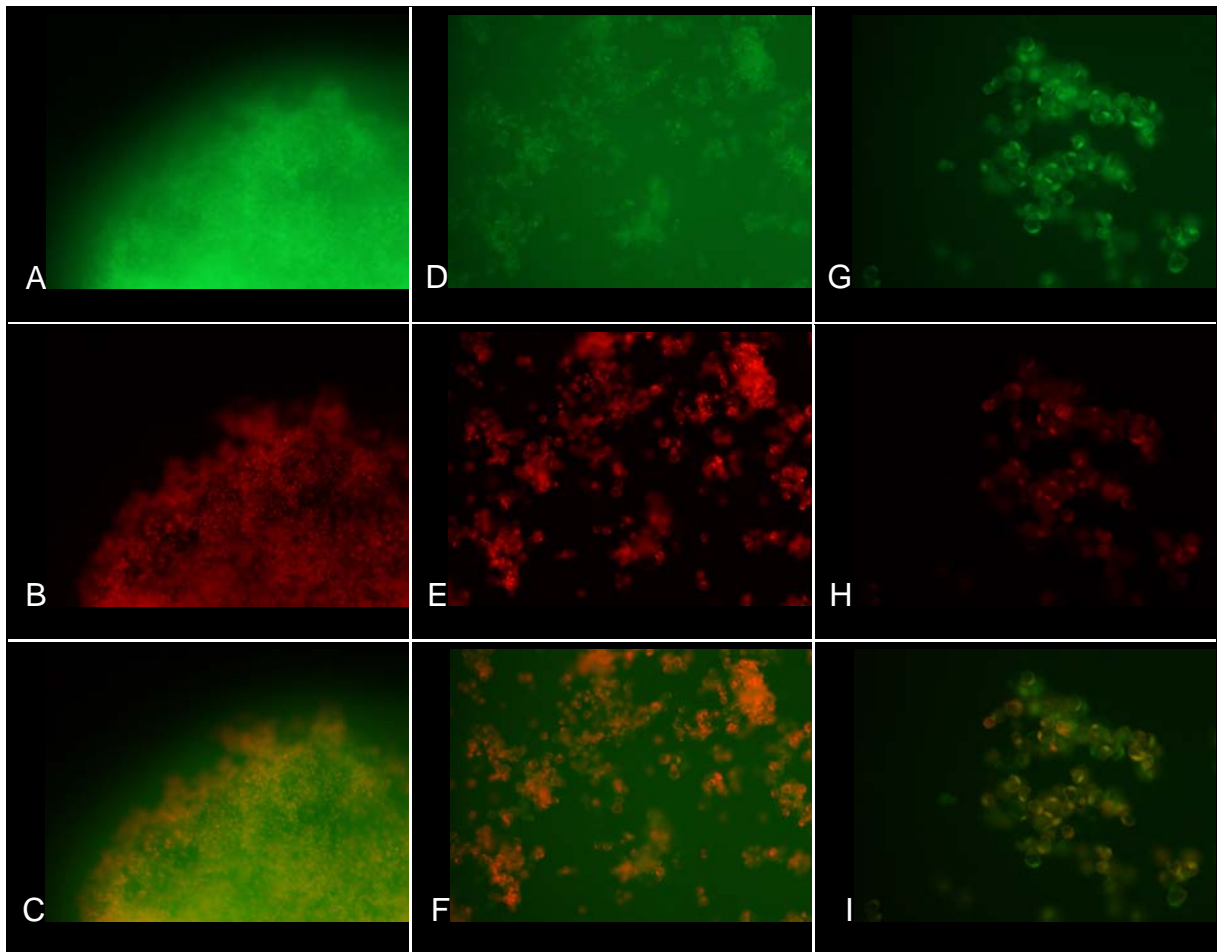


Abb. 10. Zelltodassay (A-C) nach Zugabe von *PaNie*, (D-F) nach Zugabe von *PaNie* und *P5*, (G-I) nach Zugabe von *PaNie* und *P7* (obere Reihe: FDA-Färbung, mittlere Reihe: PI-Färbung, untere Reihe: Überlagerung).

Der Zusatz der als Elicitoren inaktiven Peptidfragmente *P5* und *P7* des Elicitors *PaNie* im Überschuss neben *PaNie* scheint den Zelltod der Protoplasten zu verhindern, auf den entsprechenden Bildern lassen sich lebende Protoplasten finden (Abb. 10, D-I), wohingegen auf den Bildern, welche die Zellen zeigen, die mit *PaNie* allein inkubiert wurden, nur tote Protoplasten zu finden sind. Unterschiede zwischen den Proben mit *P5* und *P7* lassen sich nicht erkennen. Die Peptide scheinen die Fähigkeit zur Konkurrenz um eine für *PaNie* spezifische Bindungsstelle zu besitzen.

4.C Diskussion

Mit Hilfe der durchgeführten Färbung konnten lebende von toten Protoplasten gut voneinander unterschieden werden.

Es muss angemerkt werden, dass aufgrund der kleinen Zahl von parallel untersuchten Proben die *Harpin*, *LPS* und *Pep-13* zugeschriebene Fähigkeit, eine schwache hypersensitive Reakti-

on auslösen zu können, auf Ergebnissen beruht, die vermutlich im Bereich der Fehlerstreuung liegen; wahrscheinlich hätten weitere Untersuchungen gezeigt, dass die Negativkontrolle und die Proben der drei genannten Elicitoren keine signifikanten Unterschiede zeigen.

Dahingegen konnte gezeigt werden, dass *PaNie* und *PsojNIP* eine starke hypersensitive Reaktion in den eingesetzten Petersilienprotoplasten auslösen können. Auch konnte gezeigt werden, dass die Fragmente *P5* und *P7* von *PaNie* als Kompetitoren für *PaNie* aktiv sind und im Überschuss vorliegend den Zelltod verhindern können.

Aufgrund der Tatsache, dass die verwendeten, mit Klebeband versehenen Objektträger eine gründlichere Untersuchung der Proben nicht ermöglichten, muss man die gewonnenen Ergebnisse als unrepräsentativ ansehen. Weitere Sicherheit hätte eine Wiederholung des Versuchs oder eine größere Zahl von Parallelbestimmungen erbracht.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die einzelnen Versuche zur Phytoalexinproduktion, ROS-Bildung und der der hypersensitiven Zelltodreaktion konnten über das Potential der Elicitoren Aufschluss geben, die jeweiligen Abwehrreaktionen (Tabelle 11) auszulösen.

Tabelle 11. Aktivierung von Abwehrreaktionen durch verschiedene Elicitoren (Symbole: n.g.: nicht getestet; mit Klammer: uneindeutiges Ergebnis).

Elicitor	Phytoalexin- produktion	ROS-Bildung	Zelltod (Hyper- sensitive Rkt.)
Pep-13	+	(+)	○
Harpin	+	(+)	○
LPS	+	(+)	○
PaNie	n.g.	(○)	+
PsojNIP	n.g.	n.g.	+

Die Ergebnisse der Versuche waren mit Ausnahme der Messung der Induktionskinetiken der ROS-Bildung recht eindeutig (siehe dortige Diskussion).

6 BIBLIOGRAPHIE

- 1 Nurnberger T (2003) *Signalerkennungs- und Signalwandlungsprozesse bei der Auslösung von nichtkultivarspezifischen Pathogenabwehrmechanismen in Pflanzen* (Habilitationsschrift) Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 2 Lee J, Klusener B, Tsiamis G, Stevens C, Neyt C, Tampakaki a P, Panopoulos N J, Noller J, Weiler E W, Cornelis G R, Mansfield J W und Nurnberger T (2001) *HrpZPsph from the plant pathogen Pseudomonas syringae pv. phaseolicola binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore invitro*. PNAS **98**, 289-294.
- 3 Veit S, Worle J M, Nurnberger T, Koch W und Seitz H U (2001) *A Novel Protein Elicitor (PaNie) from Pythium aphanidermatum Induces Multiple Defense Responses in Carrot, Arabidopsis, and Tobacco*. Plant Physiol. **127**, 832-841.
- 4 Nurnberger T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks W, 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.