

**Protein-Phosphorylierungen im Signaltransfer zur Aktivierung des  
Alkaloidstoffwechsels in *Eschscholzia californica***

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Sven Evers

geb. am: 28.3.1965 in: Hilten

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Werner Roos, Halle/Saale
2. Prof. Dr. Matthias Gaestel, Hannover
3. Prof. Dr. Joachim Stöckigt, Mainz

Halle/Saale, den 27.08.2003

**urn:nbn:de:gbv:3-000005423**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005423>]



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	S. IV
<b>1 Einleitung</b> .....	S. 1
1.1 Pathogenabwehr in Pflanzen .....	S. 1
1.2 Nichtwirts-Resistenz und rassenspezifische Resistenz .....	S. 2
1.3 Elemente des Signaltransfers .....	S. 3
1.3.1 Elicitorperzeption .....	S. 3
1.3.2 Signalleitung und Signalwandlung .....	S. 4
1.3.2.1 G-Proteine .....	S. 4
1.3.2.2 Ionenflüsse .....	S. 5
1.3.2.3 Phospholipasen .....	S. 7
1.3.2.4 Reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid .....	S. 8
1.3.2.5 Protein-Phosphorylierungen als Signalkaskaden der Pathogenabwehr .....	S. 9
1.3.2.5.1 Rezeptorgekoppelte Protein-Kinasen .....	S. 10
1.3.2.5.2 Kalzium abhängige Protein Kinasen (CDPKs) .....	S. 10
1.3.2.5.3 MAPKs und MAPK Kaskaden .....	S. 11
1.3.2.5.4 Charakterisierung von Protein-Ser/Thr- Phosphorylierungen durch Hemmstoffe .....	S. 12
1.3.2.5.5 Protein-Tyr-Phosphorylierung .....	S. 13
1.4 Die Signalantwort: ausgelöste Abwehrreaktionen .....	S. 14
1.4.1 Oxidative burst und hypersensitiver Zelltod .....	S. 14
1.4.2 Induktion von PR-Proteinen .....	S. 15
1.4.3 Bildung von Phytoalexinen .....	S. 16
1.5 Phytoalexinproduktion in Suspensionszellen von <i>E. californica</i> nach Kontakt mit Hefe-Elicitor .....	S. 17
1.6 Ziele der Arbeit .....	S. 18
<b>2 Material und Methoden</b> .....	S. 20
2.1 Chemikalien .....	S. 20
2.2 Kultivierung der Zellen .....	S. 20
2.3 Auslösung und Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese in Batch-Kulturen .....	S. 20
2.3.1 Vorbehandlung .....	S. 20
2.3.2 Verwendung von Effektoren der Alkaloidbiosynthese .....	S. 21
2.3.3 Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese .....	S. 23
2.4 Auslösung und Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese in Mini-Kulturen .....	S. 23
2.4.1 Verfahren zur Etablierung von Mini-Kulturen .....	S. 23

2.4.2 Vorbehandlung von Zellen	S. 25
2.4.3 Verwendung von Effektoren der Alkaloidbiosynthese	S. 25
2.4.4 Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese	S. 26
2.5 Proteinbiochemische Experimente	S. 28
2.5.1 Probenahme	S. 28
2.5.2 Proteinextraktion und -quantifizierung	S. 28
2.5.3 SDS-PAGE und Westernblots	S. 29
2.5.4 Bearbeitung der digitalisierten Bilder	S. 33
2.6 Statistische Analysen	S. 34
2.7 Verwendete Software	S. 34
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>S. 35</b>
3.1 Alkaloidbiosynthese unter dem Einfluß verschiedener Effektoren in <i>E. californica</i>	S. 35
3.1.1 Entwicklung eines Testsystems auf filtrierbaren 96-er Mikrotiter-Platten	S. 36
3.1.2 Alkaloidbiosynthese in 96-er Mini-Kulturen	S. 38
3.1.2.1 Optimierung der Kultur-Bedingungen	S. 38
3.1.2.2 Bedeutung von Suspensionsvolumen und Zelldichte für die Alkaloidbiosynthese in Mini-Kulturen	S. 40
3.1.3 Aktivierung der Alkaloidbiosynthese mit weiteren Effektoren	S. 42
3.1.4 Wirkungen von Hemmstoffen der Protein-Phosphorylierung auf die Alkaloidbiosynthese von Mini-Kulturen	S. 44
3.1.4.1 Effektoren der Protein-Tyr-Phosphorylierung	S. 44
3.1.4.2 Effektoren der Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung	S. 51
3.2 Immunologischer Nachweis von Veränderungen der Protein-Phosphorylierung nach Elicitorkontakt	S. 54
3.2.1 Untersuchungen von Protein-Phosphorylierungen der löslichen Proteine	S. 54
3.2.1.1 Abhängigkeit der Protein-Phosphorylierungen von der Elicitorkonzentration	S. 58
3.2.1.2 Hemmung der elicitorausgelösten Phosphorylierung durch Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren	S. 61
3.2.1.3 Beeinflussen künstliche pH-shifts die Protein-Tyr-Phosphorylierung?	S. 64
3.2.1.4 Methyl-Jasmonat führt zu erhöhter Alkaloidbildung, löst aber keine Protein-Tyr-Phosphorylierung aus	S. 69
3.2.1.5 Übersicht Auslösung der Alkaloidbiosynthese und Protein-Phosphorylierung	S. 72
3.2.2 Tyr-Phosphorylierung an Membranproteinen	S. 73
<b>4 Diskussion</b>	<b>S. 77</b>
4.1 Auslösung des Alkaloid-Stoffwechsels in Mini-Kulturen von	

---

<i>E. californica</i> .....	S. 77
4.2 Die Auslösung des Alkaloid-Stoffwechsels in <i>E. californica</i> erfordert keine Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen .....	S. 78
4.3 Elicitorkontakt löst Protein-Tyr-Phosphorylierungen in <i>E. californica</i> aus .....	S. 81
4.4 Ausblick .....	S. 86
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	S. 88
<b>6 Literatur</b> .....	S. 90
<b>7 Anhang</b> .....	S. 98
7.1 Alkaloidquantifizierung in Mikrotiter-Platten .....	S. 98
7.2 Zellquantifizierung in Mikrotiter-Platten .....	S. 99
7.3 Strukturformeln von Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren .....	S. 100
7.4 Strukturformeln von Protein-Ser/Thr-Kinase-Inhibitoren .....	S. 101

## Abkürzungen

$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge
2,4-D	Dichlorophenoxyessigsäure
A.d.	Demineralisiertes Wasser
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
Avr	Avirulenz
CDPK	Ca <sup>2+</sup> dependent protein kinase
Cpr	Constitutive expression of <i>PR1</i>
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Deoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DTE	Dithiothreitol
EDR	Enhanced disease resistance
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylen Glycol-bis( $\beta$ -aminoethylester)-N, N, N', N'-Tetraacetic Acid
EtOH	Ethanol
ETR	Ethylen Rezeptor
Fls	Flagellin sensing
G-Protein	GTP bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosyl exchange factor
GSH	Gluthation (reduziert)
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	Hypersensitive response and pathogenesis
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
kDa	Kilodalton
LPC	Lysophostadidylcholin
LRR	Leucin rich repeat
LS	Linsmeier Skoog
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPKK Kinase
MeOH	Methanol
MES	Morpholinoethansulfonsäure
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduziert)

---

NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.A.	pro Analysis
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin Ammonium Lyase
P <sub>i</sub>	Phosphat (anorganisch)
PIP	Phosphoinositolphosphat
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositoldiphosphat
PKC	Protein Kinase C1
PLA	Phospholipase A
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethansulfonyl Fluorid
POD	Peroxidase
PR	Pathogenesis related
<i>Psg</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>
Pti	Pto interacting
pv.	Pathovar
R	Resistenz
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen
RSA	Rinder Serum Albumin
SA	Salicylsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH2	Src Homologie 2
STR	Strictosidin Synthase
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	TBS mit Tween 20
TDC	Tryptophan Dekarboxylase
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
Thr	Threonin
TYDC	Tyrosin Dekarboxylase
Tyr	Tyrosin
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Pathogenabwehr in Pflanzen

Pflanzenpathogene Mikroorganismen und Viren können durch Entzug von Nährstoffen, Okkupation der Replikationsmaschinerie oder Produktion von Toxinen erhebliche Beeinträchtigungen der pflanzlichen Vitalität bis zum Absterben infizierter Pflanzen nach sich ziehen (Dangl und Jones, 2001; Delaney, 1997; Knogge, 1998; Salmeron und Vernooij, 1998). Im Gegenzug haben Pflanzen verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt. Konstitutiv ausgeprägt sind die infektionshemmenden Elemente der Zellwand, besonders die aufgelagerte Cuticula, aber auch antimikrobielle Produkte des Sekundärstoffwechsels, insbesondere phenolische Verbindungen (Dangl und Jones, 2001; Dixon, 2001; Heath, 2000a; Knogge, 1998). Aufgrund der konstitutiven Mechanismen stellen Pflanzen für die überwiegende Zahl der Mikroorganismen keinen Wirt dar. Zur Abwehr der kleineren Zahl pflanzenpathogener Mikroorganismen werden zusätzlicher, induzierbare Abwehrmaßnahmen benötigt, ohne deren Aktivierung es zu einer kompatiblen Interaktion kommt, einer erfolgreichen Infektion der Pflanze (Baker et al., 1997; Dixon et al., 2000; Glazebrook, 2001).

Die nicht-konstitutiv ausgeprägten Abwehrreaktionen werden ausgelöst, wenn die Pflanze über Strukturen verfügt, die eine Erkennung des eindringenden Pathogens ermöglichen. Der durch Kontakt mit sogenannten Elicitoren ausgelöste Signaltransfer führt zur Aktivierung von Abwehrmaßnahmen, die einen Befall der Pflanze verhindern; die Pflanze ist resistent gegen das Pathogen, die Interaktion ist damit inkompatibel (Ebel und Mithöfer, 1998; Feys und Parker, 2000).

Die meisten Pflanzen sind gegenüber vielen Arten und Rassen von pathogenen Mikroorganismen resistent. Einige Rassen von Mikroorganismen werden aufgrund von *Avr*-Genen ("Avirulenz"-Genen) und deren Produkten von potentiellen Wirtspflanzen sehr spezifisch erkannt, sofern die Pflanze über ein zum *Avr*-Gen komplementäres *R*-Gen ("Resistenz"-Gen) verfügt. Eine hierauf beruhende Pathogenabwehr wird als rassenspezifische Resistenz bezeichnet, die von der weniger spezifischen Nichtwirts-Resistenz abgegrenzt werden kann (Dangl und Jones, 1998; Heath, 2000a; Parker et al., 2000).

Erste Anzeichen einer inkompatiblen Interaktion zeigen resistente Pflanzen bereits kurze Zeit nach der Keimung von Sporen pathogener Pilze auf der Pflanzenoberfläche. An der Infektionsstelle beginnt die Synthese reaktiver Sauerstoffverbindungen ("oxidative burst"; Bestwick et al., 1997; Dangl und Jones, 2001; Dwyer et al., 1996), gefolgt von der Bildung von Polyphenolen (Bräunung; Bolwell, 1999; García-Péres et al., 1998) und der Einlagerung zellwandverstärkender Komponenten wie Lignin (van Breusegem et al., 2001) oder Kallose (Grant und Mansfield, 1999). Durch Aktivierung weiterer Biosynthesewege des Sekundärstoffwechsels werden neben den genannten Polymeren auch vermehrt niedermolekulare, antimikrobielle Substanzen gebildet, sogenannte Phytoalexine

(Dixon, 2001; Yano et al., 1998). Auf wenige Zellen des befallenen Areal begrenzt können diese Maßnahmen bis zur hypersensitiven Reaktion führen, die ein Absterben dieser Zellen zur Folge hat (Feys und Parker, 2000; Grant und Mansfield, 1999; Heath, 2000b). Es wird angenommen, daß Pathogene damit an der weiteren Ausbreitung gehindert werden (van Breusegem et al., 2001; Yano et al., 1998), aber auch, daß hierbei freigesetzte Signalmoleküle zur Verstärkung von Abwehrreaktionen beitragen (Baker et al., 1997; Heath, 2000b).

Der Signaltransfer kann sich in intakten Pflanzen auch über größere Distanzen erstrecken und zur systemisch erworbenen Resistenz (SAR, "systemic acquired resistance") führen (Conrath et al., 2002; Delaney, 1997). Sie bewirkt auch in entfernten Organen eine Intensivierung der Abwehrreaktionen gegen nachfolgende Infektionen durch Pathogene (Feys und Parker, 2000; Oldroyd und Staskavicz, 1998). Typische Merkmale der SAR sind erhöhte Gehalte an SA ("salicylic acid"; Dong, 1998; Oldroyd und Staskavicz, 1998; Shulaev et al., 1995) sowie die Induktion von *PR*-Genen ("*Pathogenesis Related*"), deren hydrolytischen Aktivitäten teilweise antimikrobiell wirksam sind (Clarke et al., 2000; Durner et al. 1998; García-Péres et al., 1998; Penninckx et al., 1996; Xing et al., 2001).

## 1.2 Nichtwirts-Resistenz und rassenspezifische Resistenz

Die Nichtwirts-Resistenz ist die evolutionär ältere Form (Nürnberger, 1999; Ronald, 1998) und beruht auf einer vom Genotyp der Pathogen- und Pflanzenart unabhängigen Erkennung pathogener Strukturen (Heath, 2000a; Klessig et al., 2000). Sie ist in einer Pflanzenart oder -familie zur Abwehr einer jeweils bestimmten Art pflanzenpathogener Mikroorganismen gegenüber allen zugehörigen Rassen wirksam (Nürnberger, 1999). Nichtwirts-Resistenz ist in den meisten Fällen für inkompatible Interaktionen zwischen Pathogenen und Pflanzen verantwortlich (Heath, 2000a; Klessig et al., 2000; Nürnberger, 1999).

Eine inkompatible Interaktion kann im Rahmen des Gen-für-Gen Modells auch als rassenspezifische Resistenz zwischen Kultivaren einer pflanzlichen Spezies und bestimmten Rassen einer Mikroorganismenart stattfinden (Ebel und Mithöfer, 1998; Klessig et al., 2000). Die erfolgreiche Pathogenabwehr ist hierbei von korrespondierenden Genen abhängig, Produkte pflanzlicher *R*-Gene sind für die Erkennung spezifischer Pathogenrassen anhand derer *Avr*-Gene notwendig (Dixon et al., 2000; Heath, 2000b). Verfügt das Pathogen über mindestens ein *Avr*-Gen, für welches im pflanzlichen Kultivar ein korrespondierende *R*-Gen existiert, kann eine Infektion erfolgreich abgewehrt werden. Fehlen entweder *Avr*- oder *R*-Gen, bzw. sind durch eine genetisch verschiedene Variante ersetzt, kann keine Pathogenerkennung stattfinden und es kommt zu einer erfolgreichen Infektion (Dangl und Jones, 2001; Heath, 2000b; Parker et al., 2000).

Der Unterschied zwischen rassenspezifischer und Nichtwirts-Resistenz liegt im wesentlichen in der Selektivität der Pathogenerkennung (Heath, 2000a; Klessig et al., 2000). Die Mechanismen der Signalleitung (Romeis, 2001; Scheel, 1998) sowie das Arsenal der Abwehrreaktionen (Nürnberger, 1999; Klessig et al., 2000) zeigen

weitreichende Gemeinsamkeiten zwischen beiden Resistenztypen.

### 1.3 Elemente der Signaltransfers

Im folgenden werden aktuelle Kenntnisse zu den Etappen des Signaltransfers (Elicitorperzeption, Signalwandlung und -leitung und Antwortreaktionen) bei der pflanzlichen Pathogenabwehr kurz zusammengefaßt.

#### 1.3.1 Elicitorperzeption

Elicitoren können den Mikroorganismen selbst entstammen (Heath, 2000a), aber auch pflanzliche Zellwandbestandteile sein, die durch hydrolytische mikrobielle Enzyme freigesetzt werden (Ebel und Mithöfer, 1998; Mehdy et al., 1996). Der unterschiedlichen Herkunft entsprechend, gehören Elicitoren verschiedenen Substanzklassen an: Glykane (Nürnberger, 1999), Glykolipide (Heath, 2000b), Glykopeptide (Heath, 2000b), Peptide (Nühse et al., 2000) oder Proteine (Baker et al., 1997; Bogdanove und Martin, 2000; Yano et al., 1998).

Als spezifische Elicitoren der rassenspezifischen Resistenz sind Produkte der *Avr*-Gene identifiziert worden (z.B. *avrPto* in *Pseudomonas syringaea*; Martin, 1999). Sie sind teilweise nicht nur für die Auslösung pflanzlicher Abwehrreaktionen von Bedeutung (Dangl und Jones, 2001; Joosten et al., 1997), sondern können andererseits auch notwendige Virulenzfaktoren für eine erfolgreiche Infektion darstellen (Dixon et al., 2000; Grant und Mansfield, 1999; White et al., 2000). Schließlich ist es "nicht wahrscheinlich, daß Gene wie *avrPto* während der Evolution erhalten blieben, weil sie die pflanzliche Pathogenabwehr auslösen" (Bogdanove und Martin, 2000).

Die Elicitorbindung kann sowohl an der Plasmamembran (Dixon et al., 2000) als auch intrazellulär erfolgen (Sessa und Martin, 2000), letzteres erfordert einen vorherigen Transfer von Elicitoren ins pflanzliche Zytoplasma (Bogdanove und Martin, 2000). Sie erfolgt entweder an Elicitor-Bindeproteinen (Nürnberger und Scheel, 2001; Torii, 2000) oder an echten Rezeptoren (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Martin, 1999), letztere besitzen eine eigene Signaldomäne. Unter den Rezeptoren befinden sich viele Protein-Ser/Thr-Kinasen (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Sessa und Martin, 2000), was für einen phosphorylierungsabhängigen Signaltransfer spricht (Torii, 2000; Peck et al., 2001; Xing et al., 2002).

Ein wichtiges Strukturmerkmal von Elicitor-Rezeptoren sind LRRs (leucine rich repeats), extrazellulär orientierte hydrophobe Strukturen bzw. Domänen (Dangl und Jones, 2001; Torii, 2000), die wahrscheinlich an der Elicitorbindung beteiligt sind (Nürnberger und Scheel, 2001; Romeis, 2001).

Innerhalb der rassenspezifischen Resistenz haben Produkte pflanzlicher *R*-Gene wahrscheinlich eine essentielle Funktion bei der Erkennung rassenspezifischer Elicitoren (Baker et al., 1997; Ham et al., 1998; Parker et al., 2000). Dies konnte

z.B. für Xa21 aus Reis (He et al., 2000; Torii, 2000) und die im Zytoplasma lokalisierte Pto-Kinase aus Tomate gezeigt werden (Sessa und Martin, 2000). AvrPto, ein gegenüber Tomaten-Kultivaren, die das *Pto*-Gen und somit die Pto-Kinase exprimieren, zur rassenspezifischen Resistenz führender Elicitor aus *P. syringae* pv. *tomato* (Martin, 1999), wird nach Transfer in das Zytoplasma perzipiert (Sessa und Martin, 2000). Der Transfer erfolgt höchstwahrscheinlich durch Injektion mit einem bakteriellen Hrp-Sekretionssystem vom Typ III (Baker et al., 1997; Collmer, 1998; Ham et al., 1998). Im "Yeast-two-hybrid" System ist eine direkte Interaktion der Pto-Kinase mit AvrPto sowie weiteren Proteinen aus Tomate feststellbar (Innes, 1998; Romeis, 2001). Hierzu gehören Pti1 und Pti4, deren Phosphorylierung durch die Pto-Kinase zumindest *in vitro* gezeigt werden konnte (Bogdanove und Martin, 2000; Martin, 1999). Damit ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob ein funktioneller Signalkomplex *in vivo* noch die Gegenwart zusätzlicher Proteine erfordert (Oldroyd und Staskawicz, 1998; Sessa und Martin, 2000). Membranständige, rezeptorgekoppelte Protein-Ser/Thr-Kinasen konnten mittlerweile aus *Oryza sativa* (Xa 21; Torii, 2000) und *Arabidopsis thaliana* (Fls2; Gómez-Gómez und Boller, 2000) kloniert werden. Während Xa21 durch einen bisher nicht identifizierten, rassenspezifischen Elicitor aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* aktiviert wird (Romeis, 2001; Torii, 2000), löst Fls2 nach Bindung von Flagellin, einem Elicitor der Nichtwirts-Resistenz, oder einem hieraus abgeleiteten Peptid den nachfolgenden Signaltransfer aus (Peck et al., 2001; Xing et al., 2002). Die Elicitorbindung findet an beiden Rezeptoren wahrscheinlich an extrazellulären LRRs statt (Dangl und Jones, 2001; Romeis, 2001; Torii, 2000). Interessanterweise sind die entsprechenden Rezeptoren von *Xa21d* Mutanten, die durch ein frühes Stop-Kodon nur noch aus der extrazellulären Region mit der LRR-Domäne bestehen, noch zur Auslösung einer, wenn auch verminderten, Pathogenabwehr hinreichend (Torii, 2000). Der weitere Signaltransfer könnte dabei über Bindung an eine andere membrangebundene Protein-Kinase ermöglicht werden, wie es auch für den über Elicitor-Bindeproteine vermittelten Signaltransfer angenommen wird (Torii, 2000; Dangl und Jones, 2001; Nürnberger und Scheel, 2001).

### 1.3.2 Signalleitung und Signalwandlung

Nach der Elicitorbindung findet die Weiterleitung und Wandlung des Signals statt; viele der daran beteiligten Signalproteine zeigen weitreichende Homologien in Sequenz und Grundstruktur zu bekannten Signalproteinen tierischer Zellen (Baker et al., 1997; Blumwald et al., 1998; Nürnberger und Scheel, 2001).

#### 1.3.2.1 G-Proteine

Viele Rezeptoren tierischer Zellen leiten ein durch Ligandenbindung entstandenes Signal an benachbarte G-Proteine weiter (Luttrell et al., 1999). Diese Proteine, welche in den letzten Jahren auch in Pflanzenzellen identifiziert wurden (Lee und Assmann, 1998; Lein und Saalbach, 2001), liegen im inaktiven Zustand in GDP-gebundener Form vor, ihre Aktivierung führt zum Austausch von GDP gegen GTP

(Goldberg, 1998), an dem in einigen Fällen die Mitwirkung von Guanin Nukleotid Austausch Faktoren erforderlich ist (Goldberg, 1998; Sprang und Coleman, 1998). Nach GTP-Bindung leiten G-Proteine das Signal an stromabwärts im Signalgeschehen befindliche Signalproteine weiter. Daneben besitzen G-Proteine eine GTPase-Aktivität, Hydrolyse von GTP überführt diese wieder in den inaktiven, durch GDP-Bindung charakterisierten Zustand (Lee und Assmann, 1998; Sprang und Coleman, 1998).

Für die Existenz von G-Proteinen in Pflanzen gibt es inzwischen sowohl biochemische (Lein und Saalbach, 2001; Roos et al., 1999) als auch molekularbiologische Belege (Millner, 2001; Lee und Assmann, 1998). Pflanzliche G-Proteine sind wahrscheinlich an der Regulierung von Ionenkanälen (Millner, 2001; Lein und Saalbach, 2001) und Phospholipasen beteiligt (Munnik et al., 1998; Roos et al. 1999), welche auch im elicitorabhängigen Signaltransfer eingebunden sind (s. 1.3.2.2 und 1.3.2.3). Entsprechend legen verschiedene Berichte eine Beteiligung von G-Proteinen am Signaltransfer nach Elicitorkontakt nahe, entweder durch den Nachweis einer hierdurch verstärkten GTP-Bindung (Kurosaki et al., 2001) oder aufgrund der Aktivierung von Abwehrreaktionen durch Mastoparan, einem G-Protein-Stimulator (Scheel, 1998, Vera-Estrella et al., 1994). In *Sanguinaria canadensis* (Mahady et al., 1998) und *Eschscholzia californica* (Roos et al., 1999) führt Mastoparan z.B. zu erhöhter Phytoalexinproduktion. Auch in Karottenzellextrakten wurde eine erhöhte GTPase Aktivität nach Elicitorkontakt festgestellt, außerdem eine durch den G-Protein-Inhibitor Suramin verminderte Phytoalexinbiosynthese dieser Zellkulturen (Kurosaki et al., 2001).

Es bleibt aber im Detail noch ungeklärt, auf welche Weise pflanzliche G-Proteine durch externe Stimuli aktiviert werden (Blumwald et al., 1998; Kurosaki et al., 2001; Lein und Saalbach, 2001).

### 1.3.2.2 Ionenflüsse

Ionenflüsse über die Plasmamembran gehören zu den ersten meßbaren Ereignissen nach Elicitorkontakt (Blumwald et al., 1998; Roos, 2000; Heath, 2000b; Nürnberger und Scheel, 2001).

In vielen experimentellen Systemen wurde ein Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Apoplasten als essentiell für die Auslösung der Pathogenabwehr erkannt (Zimmermann et al., 1997; Heath, 2000b). Wird dieser inhibiert (Nürnberger und Scheel, 2001; Xu und Heath, 1998) oder künstlich durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophoren ausgelöst (Jabs et al., 1997; Romeis et al., 2000), so wirkt sich dies hemmend (Nürnberger und Scheel, 2001; Xu und Heath, 1998) oder stimulierend (Jabs et al., 1997; Romeis et al., 2000) auf nachfolgende Abwehrreaktionen aus. Eine Beteiligung interner  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher an der Erhöhung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erscheint durch diese Ergebnisse zwar unwahrscheinlich, kann aber nicht ausgeschlossen werden (Nürnberger und Scheel, 2001; Taylor et al., 2001).

Einer Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes kommt auch in sehr vielen anderen Signalwegen eine große Bedeutung zu, ohne daß dabei eine Aktivierung der Pathogenabwehr erfolgt (Ward et al., 1995; Lewis et al., 1997). Ähnlich wie in tierischen Untersuchungssystemen (Newman und Zahrs, 1997) scheinen auch in Pflanzen

räumliche und zeitliche Verteilungsmuster entscheidend für die korrekte zelluläre Interpretation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals zu sein (Roos, 2000; Sze et al., 2000; Walden, 1998). Dies zeigt sich an charakteristischen und unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaturen der durch ABA (Grill und Himmelbach, 1998) oder Pathogene (Xu und Heath, 1998) ausgelösten Signalleitung.

Potentielle Zielenzyme erhöhter zytoplasmatischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind z.B. Phospholipasen (Munnik et al., 1998) und pflanzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Protein-Kinasen (Harmon et al., 2000), die auch am Signaltransfer nach Elicitorkontakt beteiligt sind (Wang, 2001; Romeis, 2001; Murillo et al., 2001).

Neben einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  wurde auch ein Efflux von  $\text{K}^+$  (Harding und Roberts, 1998; Nürnberger et al., 1994; Romeis et al., 2000; Roos et al., 1998) und  $\text{Cl}^-$  wenige Minuten nach Elicitorkontakt gezeigt (Nürnberger et al., 1994; Jabs et al., 1997). Es wurde spekuliert, daß diese Ionen der Ladungsbalance des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms dienen (Jabs et al., 1997). Eine eindeutige Aussage über die Rolle von  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom im elicitorabhängigen Signalgeschehen steht noch aus, es gibt aber Hinweise dafür, daß der  $\text{K}^+$ -Efflux phosphorylierungsabhängig stattfindet (Otte et al., 2001; Romeis et al., 2000).

Noch kein einheitliches Bild zeigen die Berichte über die Rolle von pH-shifts am Signalgeschehen. In praktisch allen untersuchten Zellkulturen wird eine Alkalisierung des Mediums nach Elicitorkontakt beobachtet (Harding und Roberts, 1998; Menke et al., 1999; Nühse et al., 2000; Schaller und Oecking, 1999); diese Reaktion dient auch als einfach meßbares Kriterium für die Auslösung von Pathogen Abwehrreaktionen (Menke et al., 1999; Stratmann et al., 2000). Die externe Alkalisierung wird häufig mit einem Einstrom von Protonen in das Zytoplasma begründet (Harding und Roberts, 1998; Jabs et al., 1997; Murillo et al., 2001), u.a. weil durch Inhibition der an der Plasmamembran lokalisierten  $\text{H}^+$ -ATPase Reaktionen der Pathogenabwehr ausgelöst werden können (Lapous et al., 1998; Schaller und Oecking, 1999).

In Tabak (Matthieu et al., 1996; Lebrun-Garcia et al., 2002), Kalifornischem Goldmohn (Roos et al., 1998; Roos et al., 1999) und Reis (He et al., 1998; Kuchitsu et al., 1997) wurde eine Erhöhung intrazellulärer  $\text{H}^+$ -Konzentrationen nach Elicitorkontakt festgestellt. Dies wurde in *Nicotiana* Spezies über die Aufnahme  $^{14}\text{C}$ -markierter Benzoesäure (Matthieu et al., 1996) oder, ebenso wie in Reis (He et al., 1998), über  $^{31}\text{P}$ -NMR (Lebrun-Garcia et al., 2002; Matthieu et al., 1996) detektiert; in *E. californica* dagegen über pH-Kartierung in Einzelzellen (Roos et al., 1998; Roos et al., 1999). Während die Protonen in Tabak aus dem Apoplasten aufgenommen werden (Harding und Roberts, 1998; Mathieu et al. 1996), entstammen diese in *E. californica* der Vakuole (Roos et al., 1998, Viehweger et al., 2002). In diesen Systemen führt künstliche Ansäuerung des Zytoplasmas zur Induktion von Enzymen der Phytoalexinbildung (He et al., 1998; Lapous et al., 1998) bzw. zur Aktivierung der Alkaloidbiosynthese (Roos et al., 1998). In *E. californica* erwies sich die durch Elicitor ausgelöste zytoplasmatische Ansäuerung auch als notwendiger Schritt des Signaltransfers, dessen experimentelle Ausschaltung die Produktion von Alkaloiden verhindert (Roos et al., 1998).

Die mit dem pH-shift korrelierten Antwortreaktionen in diesen Zellkulturen sind allerdings grundsätzlich verschieden: in Tabak bzw. Reis wird nach Elicitierung ein oxidative burst (Harding und Roberts, 1998; Nishizawa et al., 1999; Viard et al., 1994) und danach die Bildung phenolischer und terpenoider Phytoalexine ausgelöst (Dixon, 2001; Lalous et al., 1998); in *E. californica* wird durch Elicitorkontakt ein von externen pH-Werten unabhängiger, intrazellulärer pH-shift ausgelöst, gefolgt von der Bildung antimikrobieller Alkaloide (Roos et al., 1998). Diese Alkaloidbildung erfordert keinen vorherigen oxidative burst (Roos et al., 1998; Färber et al., 2003).

### 1.3.2.3 Phospholipasen

Erhöhte Phospholipase-Aktivitäten wurden wiederholt nach Elicitorkontakt beobachtet (Laxalt und Munnik, 2002; Müller et al., 1993; Munnik, 2001; Roos et al., 1999; Viehweger et al., 2002; Wang, 2001). Da Phospholipasen unter der Kontrolle von G-Proteinen (Roos et al., 1999; Munnik, 2001) oder zytoplasmatischer  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen (Wang, 2001) stehen können, sind damit mögliche Anknüpfungspunkte an stromaufwärts gelegene Teile des elicitorausgelösten Signaltransfers gegeben (Munnik et al., 1998; Roos et al. 1999).

Die Aktivierung einer  $PLA_2$  führt sowohl zu freien Fettsäuren als auch zu einem erhöhten Level an Lyso-Phospholipiden (Wang, 2001). Beide Hydrolyseprodukte können in Pflanzen als "second messenger" nach Elicitorkontakt dienen.

Die freien Fettsäuren können in die Generierung weiterer signalaktiver Substanzen, wie z.B. Jasmonate, einfließen (Munnik et al., 1998; Haider et al., 2000; Weber, 2002). Ein Anstieg der Konzentration dieser Phytohormone findet in einigen Zellkulturen nach Elicitierung statt (Birkett et al., 2000; Blechert et al., 1995). Entsprechend führen mikromolare Konzentrationen von Jasmonaten oder verwandter Substanzen zu einer Erhöhung der Sekundärstoffproduktion (Blechert et al., 1995; Clarke et al., 2000; Haider et al., 2000). Jasmonate sind außerdem für die Verteidigung gegen Fraßfeinde (Birkett et al., 2000; Conconi et al., 1996) und als Bestandteil der Signalleitung nach mechanischem Streß von Bedeutung (Creelman und Mullet, 1995; Grant und Mansfield, 1999).

Weniger bekannt sind Signalwirkungen der Lyso-Phospholipide in Pflanzen. Einige Berichte sprechen jedoch dafür, daß Protein-Kinasen (Martiny-Baron und Scherer, 1989; Munnik et al., 1998) sowie die PM  $H^+$ -ATPase (Laxalt und Munnik, 2002) hierdurch aktiviert werden. In *E. californica* wird durch LPC ein  $Na^+/H^+$ -Austauschers des Tonoplasten reguliert und vermutlich zur Generierung von pH-Signalen "umfunktioniert" (Viehweger et al., 2002).

Auch eine erhöhte PLC-Aktivität wurde nach Elicitorkontakt beobachtet (Munnik, 2001; Laxalt und Munnik, 2002). Die PLC ist ein "klassisches" Enzym lipidabhängiger Signalwege in tierischen Zellen (Wang, 2001). Durch Hydrolyse von  $PIP_2$  entstehen DAG und  $IP_3$  (Munnik, 2001), diese dienen offenbar auch in Pflanzen als second messenger (Laxalt und Munnik, 2002; Wang, 2001). DAG ist in tierischen Zellen ein bekannter Aktivator der Protein-Kinase C (Blumer und

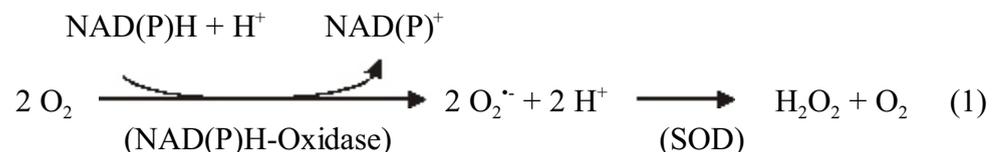
Johnson, 1994). Da in Pflanzen letztere Protein-Kinase bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Laxalt und Munnik, 2002), bleibt die Funktion von DAG in Pflanzen zunächst offen (Wang, 2001). Es wird jedoch spekuliert, daß DAG in Pflanzen zu PA phosphoryliert wird, und dies den eigentlichen hydrophoben second messenger des Lipidverbaus durch eine PLC darstellt (Laxalt und Munnik, 2002; Munnik, 2001). IP<sub>3</sub> hingegen kann pflanzliche Ca<sup>2+</sup>-Kanäle aktivieren (Wang, 2001), auf deren Bedeutung für den Signaltransfer bereits eingegangen wurde (Sze et al., 2000).

Außerdem liegen Berichte über eine erhöhte PLD-Aktivität nach Elicitorkontakt vor (Wang, 2001; Munnik, 2001). Die Aktivierung einer PLD kann ebenfalls in Abhängigkeit von G-Proteinen erfolgen (Lein und Saalbach, 2001; Wang, 2001). Dem dabei entstehenden Produkt PA wird in letzter Zeit zunehmend eine Rolle als Signalmolekül zugeschrieben (Laxalt und Munnik, 2002; Munnik, 2001), so bei der Auslösung des oxidativen burst oder der Aktivierung von MAPK Kaskaden (Laxalt und Munnik, 2002; Munnik, 2001).

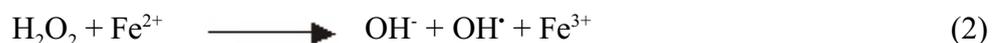
#### 1.3.2.4 Reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid

Eine der prominentesten Untersuchungsgebiete im Rahmen der pflanzlichen Pathogenabwehr ist die Generierung von ROS ("reactive oxygen species") wie O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder OH<sup>•</sup> (Bestwick et al., 1997; Klessig et al., 2000; van Breusegem et al., 2001). Es ist unstrittig, daß diese Substanzen in der Pathogenabwehr wichtige Funktionen als antimikrobielle Agentien (Bolwell, 1999; Lamb und Dixon, 1997; Jabs et al., 1997), aber auch als second messenger (Romeis et al., 2000; Van Breusegem et al., 2001; Nürnberger und Scheel, 2001) besitzen.

Beim oxidativen burst werden zunächst Superoxidanion-Radikale (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) generiert. Die Reduktion von O<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub><sup>•-</sup> erfolgt über NADPH-Oxidasen der Plasmamembran (Blumwald, 1998; Nürnberger und Scheel, 2001), die Analogien (Dwyer et al., 1996; Jabs et al., 1997; Xing et al., 1997), aber auch mechanistische Unterschiede (Bolwell, 1999; Blumwald, 1998) zur NADPH-Oxidase tierischer Zellen aufweisen. Alternativ werden auch zellwandgebundene Peroxidasen für diese Reaktion verantwortlich gemacht (Bolwell, 1999; Heath, 2000b). O<sub>2</sub><sup>•-</sup> wiederum kann spontan oder durch SODs katalysiert zu Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dismutieren:



Durch die Fenton oder Haber-Weiss Reaktion kann aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub><sup>•-</sup> unter Katalyse von Fe<sup>2+</sup> das höchst reaktive Hydroxylradikal (OH<sup>•</sup>) entstehen. Die Basisreaktion ist dabei die Disproportionierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



(Gleichungen (1) und (2) aus: Baker und Orlandi, 1995)

Oftmals sind mit der Bildung von ROS die weiter oben erwähnten Ionenflüsse korreliert (Harding und Roberts, 1998; Romeis et al., 2000). Insbesondere  $\text{Ca}^{2+}$  ist dabei sowohl notwendig (Jabs et al., 1997; Yano et al., 1998) als auch hinreichend (Jabs et al., 1997; Romeis et al., 2000) für die Auslösung des oxidativen burst. Eine weitere Regulation findet wahrscheinlich durch Protein-Phosphorylierungen statt. Protein-Ser/Thr-Kinase-Inhibitoren hemmen den oxidativen burst (Rajasekhar et al., 1999; Romeis et al., 2000), während Protein-Ser/Thr-Phosphatase-Inhibitoren stimulierend wirken (Romeis et al., 2000; Taylor et al., 2001).

Der oxidative burst zeigt einen charakteristischen 2-phasigen Verlauf (Feys und Parker, 2000; Harding und Roberts, 1998; Jabs et al., 1997), wobei ein erstes Maximum nach 10-30 Minuten, ein zweites Maximum ungefähr 3 bis 4 Stunden nach Elicitierung auftritt (Chandra et al., 1996; Harding und Roberts, 1998). Der erste Gipfel ist nicht mit der Ausbildung einer Resistenz korreliert, wie Untersuchungen im Rahmen des Gen-für-Gen Modells zeigen (Feys und Parker, 2000; Harding und Roberts, 1998; Mehdy et al., 1996).

Da die externe Applikation von Superoxid oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Suspensionszellen die Produktion von Phytoalexinen (Jabs et al., 1997) oder PR-Proteinen (Mittler et al., 1999) auslösen kann, ist auch von einer Rolle als second messenger für ROS auszugehen (Piffanelli et al., 1999; Van Breusegem et al., 2001).

Die Synthese von  $\text{NO}^{\bullet}$  kann in Pflanzen ebenfalls nach Elicitorkontakt beobachtet werden (Bolwell, 1999; Hausladen und Stamler, 1998). Die Verbindung ist auch im tierischen Signaltransfer von Bedeutung (Hausladen und Stamler, 1998; Klessig et al., 2000). Sie dient in der pflanzlichen Pathogenabwehr als second messenger, der zusammen mit SA wesentlich an der Induktion von PR-Proteinen (Durner und Klessig, 1999) und damit an der SAR beteiligt ist (Durner et al., 1998; Klessig et al., 2000). Wenn  $\text{NO}^{\bullet}$  zusammen mit  $\text{O}_2^{\bullet-}$  synthetisiert wird, kann  $\text{ONOO}^{\bullet}$  (Peroxynitrit) entstehen, welches selbst antimikrobiell wirksam ist (Bolwell, 1999; Klessig et al., 2000).

### **1.3.2.5 Protein-Phosphorylierungen in Signalkaskaden der Pathogenabwehr**

Reversible Protein-Phosphorylierungen sind ein essentieller Schritt praktisch aller bekannten Signaltransduktionswege, insbesondere solcher, die die Genexpression kontrollieren (Hardie, 1999; Kerk et al., 2002; Luan, 2002; Mundi und Schneitz, 2001). Ihr evolutionär ursprünglicher Charakter zeigt sich u.a. in den Analogien, aber auch den Unterschieden zwischen Pro- und Eukaryonten (Swanson et al., 1994; Hardie, 1999). Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, daß Protein-Phosphorylierungen auch für den pflanzlichen Signaltransfer während der Pathogen- und Stressabwehr von Bedeutung sind (Tena et al., 2001; Zhang und Klessig, 2001). So ist z.B. wenige Minuten nach Elicitorkontakt in pflanzlichen Suspensionszellen eine Zunahme der Protein-Phosphorylierung festzustellen (Ebel und Mithöfer, 1998; Grant und Mansfield, 1999; Peck et al., 2001; Viard et al., 1994).

In Eukaryonten sind vor allem zwei Gruppen von Protein-Kinasen oder -Phosphatasen bekannt; dies sind zum einen Ser/Thr-, zum anderen Tyr-spezifische Enzyme (Kerk et al., 2002; Luan, 1998). Von diesen sind in Pflanzen bisher in erster Linie Ser/Thr-spezifische Protein-Kinasen identifiziert und beschrieben worden (Hardie, 1999; Mundy und Schneitz, 2002; Shiu und Bleecker, 2001). Die wichtigsten unter ihnen sowie Hinweise für ihre Beteiligung am Signaltransfer werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### 1.3.2.5.1 Rezeptorgekoppelte Protein-Kinasen

Unter den rezeptorgekoppelten Protein-Kinasen der Pflanzen befinden sich hauptsächlich Protein-Ser/Thr-Kinasen (Hardie, 1999; He et al., 2000). Ausnahmen sind ETR1 aus *A. thaliana* oder eTAE1 aus Tomate, welche Entsprechungen prokaryotischer Protein-His-Kinasen sind (Bleecker und Schaller, 1996; Hardie, 1999). Die bereits erwähnten Signaldomänen von Fls2 (*A. thaliana*; Gomez-Gomez et al., 2001), Xa21 (*Oryza sativa*; Torii, 2000) und der Pto-Kinase (*Lycopersicon* spp.; Martin, 1999) entsprechen in ihren Sequenzen Protein-Ser/Thr-Kinasen und sind zumindest im Falle von Fls2 und Pto für die Signalleitung unverzichtbar (Martin, 1999; Gomez-Gomez et al., 2001).

Zielproteine sind im Falle der Pto-Kinase bekannt, es handelt sich um Pti1, Pti4, Pti5 und Pti6 (Innes, 1998; Martin, 1999; Bogdanove und Martin, 2000; Romeis, 2001), von diesen führt zumindest Pti1 zur Aktivierung von Abwehrreaktionen (Sessa und Martin, 2000).

#### 1.3.2.5.2 Kalzium abhängige Protein-Kinasen (CDPKs)

Eine besondere, pflanzenspezifische Gruppe (Hardie, 1999; Harmon et al., 2000) von Protein-Ser/Thr-Kinasen wird außer durch Phosphorylierung (Allwood et al., 2002; Harmon et al., 2000) auch durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  (Allwood et al., 2002; Hardie, 1999) reguliert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung erfolgt an einer "Calmodulin like domain", die die für Calmodulin typischen EF-"Hände" aufweist (Harmon et al., 2000). CDPKs werden nach Elicitorkontakt in Bohne (Allwood et al., 2002) Tabak (Nürnberger und Scheel, 2001), Tomate (Xing et al., 2002) oder Mais (Murillo et al., 2001) stimuliert. Die Aktivität dieser Protein-Kinasen ist in Tomate (White, 2002) und Bohne (Allwood et al., 2002) auch mehrere Stunden nach Elicitierung noch feststellbar. Im Gegensatz zur elicitorstimulierten Transkription in Tomate (White, 2002) scheint diese in Mais (Murillo et al., 2001) nur über wenige Minuten anzuhalten.

Insbesondere die Abhängigkeit des oxidativen burst von  $\text{Ca}^{2+}$  und Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen sprechen für eine Beteiligung von CDPKs hieran (Allwood et al., 2002; Romeis, 2001; Xing et al., 1997; Xing et al., 2002). Diese Annahme ist jedoch zumindest umstritten. So kann mit Forskolin eine CDPK-Aktivierung in den ersten 30 Minuten nach Elicitierung unterbunden werden, nicht jedoch die Produktion von ROS in dieser Zeit (Allwood et al., 2002).

Gegenwärtig kann nur für eine elicitorstimulierte CDPK aus Bohne ein Zielprotein identifiziert werden, das in den weiteren Signaltransfer zur Pathogenabwehr eingebunden ist. Mit der PAL (Allwood et al., 2002) handelt sich hierbei um das

zentrale Enzym des Phenylpropanoidstoffwechsels, welches sowohl zur Biosynthese von SA als auch zahlreicher phenolischer Phytoalexine notwendig ist (Weisshaar und Jenkins, 1998). Zielproteine elicitorunabhängig stimulierter CDPKs sind z.B. Cl-Kanäle, aber auch Aquaporine oder die Saccharosesynthetase (Hardie, 1999).

### 1.3.2.5.3 MAPKs und MAPK Kaskaden

Eine der bestuntersuchten pflanzlichen Signalmodule sind MAPKs (“mitogen activated protein kinases”), die ihrerseits durch mehrstufige Phosphorylierungskaskaden aktiviert werden (Asai et al., 2002; Tena et al., 2001). MAPKs sorgen nach ihrer eigenen Aktivierung durch Phosphorylierung nachfolgender Zielproteine an Ser- bzw. Thr-Resten (Hardie, 1999) für einen Fortgang des Signaltransfers (Keyse, 2000; Tena et al., 2001; Zwerger und Hirt, 2001). Die Einbindung einer MAPK Kaskade in den Signaltransfer ist im folgenden schematisch dargestellt:



Die Aktivierung von MAPKs durch MAPKKs erfolgt durch dualspezifische Phosphorylierung je eines konservierten Thr- und Tyr-Restes innerhalb der “Aktivierungsschleife” (Huang et al., 2000; Nühse et al., 2000; Keyse, 2000). MAPKKs werden ihrerseits von MAPKKKs durch Phosphorylierung an Ser- bzw. Thr-Resten aktiviert (Hardie, 1999; Tena et al., 2001; Zhang und Klessig, 2001). Demzufolge beginnen MAPK Kaskaden mit der Aktivierung von MAPKKKs. Letztere reagieren in tierischen Systemen auf Signale von stromaufwärts gelegenen Signalenzymen, wie G-Proteinen oder weiteren Protein-Kinasen (Daum et al., 1994; Lutrell et al., 1999; Zwerger und Hirt 2001).

Pflanzliche MAPKs werden in mehreren Spezies durch verschiedene Stimuli aktiviert (Bögre et al., 2000; Tena et al., 2001; Zwerger und Hirt 2001). Hierunter fallen osmotischer oder mechanischer Streß (León et al., 2001; Xiong et al., 2002; Zhu, 2001), verschiedene Phytohormone (Burnett et al., 2000; Zwerger und Hirt 2001), aber auch Pathogen- oder Elicitorkontakt (Asai et al., 2002; Zhang und Klessig, 2001).

Die Aktivität von MAPKs kann in “in-gel” Assays verfolgt werden (Hardie, 1999). Im Elektrophorese-Gel befindliche MAPKs können nach einem Renaturierungsschritt anhand der Phosphorylierung eines im Gel befindlichen MAPK-Substrats (“myelin basic protein”) mit ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )-ATP identifiziert werden. Dabei zeigt die Position der Markierung die elektrophoretische Mobilität der hierfür verantwortlichen Protein-Kinase an (Hardie, 1999).

Solche Untersuchungen zeigen, daß MAPKs wenige Minuten nach Elicitorkontakt durch Phosphorylierung aktiviert werden (Ligterink et al., 1997; Nühse et al., 2000; Romeis et al., 2000). Eine Einbindung in den Signaltransfer zur Auslösung von Abwehrreaktionen wird durch Experimente in transformiertem Tabak (Zhang und Liu, 2001) oder Tomaten (Xing et al., 2001) nahegelegt, in denen MAPKKs konstitutiv aktiviert sind, also keines externen Stimulus bedürfen. In diesen

Mutanten werden endogene MAPKs phosphoryliert sowie typische Reaktionen der Pathogenabwehr ausgelöst (Xing et al., 2001; Zhang und Liu, 2001).

In *A. thaliana* konnten durch Sequenzvergleich alle Komponenten von MAPK Kaskaden identifiziert werden (Zhang und Klessig, 2001). Im Genom von *A. thaliana* wurden Gene für 23 MAPKs, 9 MAPKKs und mehr als 25 MAPKKKs aufgefunden (Xing et al., 2002). Auch in dieser Spezies führt Transformation mit einer konstitutiv aktiven MAPKKK zur Auslösung von Abwehrreaktionen (Kovtun et al., 2000; Asai et al., 2002), außerdem konnte dabei erstmals die Einbindung aller Komponenten einer vollständigen MAPK Kaskade in die pflanzliche Pathogenabwehr gezeigt werden (Asai et al., 2002).

Neben diesen Resultaten gibt es auch Hinweise auf eine negative Kontrolle von Abwehrreaktionen durch MAPK Kaskaden, z.B. erhöhte Resistenz einer *MAPKKK* Mutante gegenüber Pathogenen (Frye et al., 2001). Vermutlich muß davon ausgegangen werden, daß durch Pathogenkontakt verschiedene MAPKs aktiviert werden, die Abwehrreaktionen auf unterschiedlichen Ebenen koordinieren. Mit in-gel Assays läßt sich die Aktivierung verschiedener MAPKs unterschiedlicher molekularer Massen nach Elicitorkontakt zeigen (Asai et al., 2002; Ligterink et al., 1997; Taylor et al., 2001).

Ebenso wie CDPKs (Romeis, 2001) werden auch MAPKs als notwendig für den oxidative burst angesehen (Xing et al., 1997; Taylor et al., 2001). Einige MAPKs werden jedoch eher ihrerseits von ROS aktiviert (Kovtun et al., 2000). Auch pharmakologische Experimente in Tabak (Romeis et al., 1999) sprechen gegen eine von MAPKs abhängige Auslösung des oxidative burst. Da Zielproteine pflanzlicher MAPKs noch nicht identifiziert werden konnten, sind eindeutige Aussagen über die Weiterleitung des Signals schwer zu treffen (Asai et al., 2002; Xing et al., 2002).

#### **1.3.2.5.4 Charakterisierung von Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen durch Hemmstoffe**

Die Beteiligung von Protein-Phosphorylierungen wird häufig mit Hilfe von Protein-Kinase-Inhibitoren untersucht. K-252a oder Staurosporin hemmen den oxidative burst (Romeis et al., 2000; Taylor et al., 2001; Xing et al., 1997) und hiermit korrelierte Ereignisse wie  $K^+$ -Efflux (Otte et al., 2001; Romeis et al., 2000), externe Alkalisierung (Matthieu et al., 1996; Otte et al., 2001) und Aktivierung von MAPKs (Romeis et al., 2000; Taylor et al., 2001; Zhang und Liu, 2001). Erwartungsgemäß werden damit auch später stattfindende Abwehrreaktionen inhibiert, z.B. die nach Elicitorung ausgelöste Induktion von *PR1* (Xing et al., 2001), *GST1* (Asai et al., 2002) und Phytoalexinbiosynthese (Mahady et al., 1998), bzw. Expression hierfür notwendiger Gene (Menke et al., 1999).

Experimente mit hochspezifischen Inhibitoren von MAPKs sprechen dafür, daß deren Enzymaktivität vom oxidative burst entkoppelt werden kann (Romeis et al., 1999), vergleichbares gilt für CDPKs (Allwood et al., 2002). Dies läßt darauf schließen, daß noch weitere Protein-Ser/Thr-Kinasen eine essentielle Rolle im Signaltransfer übernehmen (Asai et al., 2002). Neben rezeptorgekoppelten Protein-Ser/Thr-Kinasen kommen hierfür aber auch Mitglieder des späteren Signaltransfers in Frage (Hardie, 1999; Menke et al., 1999).

Hemmstoffe von Protein-Ser/Thr-Phosphatasen (z.B. Okadainsäure oder Calyculin A) wirken auf die komplementäre Regulationsebene der Protein-Phosphorylierung und ermöglichen damit ebenfalls Experimente zu deren Signalcharakter (Luan, 1998; MacKintosh und MacKintosh, 1994). In der pflanzlichen Pathogenabwehr zeigt sich dies durch die stimulierenden Effekte von Okadainsäure bzw. Calyculin A auf extrazelluläre Alkalisierung (Matthieu et al., 1996; Stratmann et al., 2000), oxidative burst (Matthieu et al., 1996; Taylor et al., 2001) und Aktivierung von MAPKs (Taylor et al., 2001).

#### 1.3.2.5.5 Protein-Tyr-Phosphorylierung

Die Übertragung einer Phosphatgruppe auf einen Tyr-Rest wird von einer eigenständigen Gruppe von Protein-Kinasen, den Protein-Tyr-Kinasen, katalysiert (Sun und Tonks, 1994). In tierischen Untersuchungssystemen sind Protein-Tyr-Kinasen an der Integration zahlreicher extrazellulärer Reize beteiligt (Weiss und Schlessinger, 1998; Madhani, 2001). Hierbei sind rezeptorgekoppelte Protein-Tyr-Kinasen von zentraler Bedeutung (Madhani, 2001; Cock et al., 2002). Diese komplexen Membranproteine dimerisieren nach Bindung extrazellulärer Liganden, womit eine Autophosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors ausgelöst werden. An die phosphorylierten Regionen können Proteine binden, die SH2 Domänen enthalten. Auf diese Weise werden zyttoplasmatische Faktoren an die Plasmamembran dirigiert, die dort aktiviert werden und für die weitere Propagierung des Signals sorgen (Hardie, 1999; Luttrell et al., 1999; Cock et al., 2002). Auch lösliche Protein-Tyr-Kinasen sind im tierischen Signaltransfer von Bedeutung, teilweise in enger Verbindung zu rezeptorgekoppelten Protein-Tyr-Kinasen (Ma und Huang, 1998; Cao et al., 2001).

In den pflanzlichen Untersuchungssystemen sind unter den Rezeptor-Kinasen bisher hauptsächlich Ser/Thr-spezifische Enzyme bekannt (Bleecker und Schaller, 1996; Cock et al., 2002; Hardie, 1999; Shiu und Bleecker, 2001; Torii, 2000).

Die Bedeutung Tyr-spezifischer Protein-Phosphorylierungen zeichnet sich in Pflanzen dennoch langsam ab. Dualspezifische MAPKKs und STY-Kinasen (aus Erdnuß, Rudrabhatla und Rajasekharan, 2002) sind in Pflanzen bisher die einzigen identifizierten Protein-Kinasen, die eine Übertragung von Phosphatgruppen auf Tyr-Reste katalysieren (Keyse, 2000; Luan, 2002; Rudrabhatla und Rajasekharan, 2003). Substrate von MAPKKs sind ausschließlich MAPKs, welche von MAPKKs zugleich an Thr-Resten phosphoryliert werden, daher zählen diese nicht im engeren Sinne zu den Tyr-spezifischen Protein-Kinasen (Hardie, 1999; Zhang und Liu, 2001; Zwerger und Hirt, 2001).

Aufgrund von Homologievergleichen kann auch die STY-Kinase als dualspezifische Protein-Kinase bezeichnet werden und ist somit ebenfalls nicht spezifisch für Tyr-Reste (Rudrabhatla und Rajasekharan, 2002). *In vivo* und *in vitro* konnte Auto-Phosphorylierung an Tyr-Resten festgestellt werden, während bei *in vitro* Experimenten mit myelin basic protein als Substrat vor allem eine Phosphorylierung an Thr-Resten vorhanden war. Die Auto-Phosphorylierung konnte entwicklungspezifisch, sowie nach Salz- oder Trocken-Stress festgestellt werden

(Rudrabhatla und Rajasekharan, 2002). Austausch der von Auto-Phosphorylierung betroffenen Tyr-Reste durch ortsspezifische Mutagenese führte zu einer deutlich veränderten Phosphorylierung des “myelin basic protein” an Thr-Resten, einer der wenigen direkten Hinweise für die Bedeutung von Protein-Tyr-Phosphorylierungen in Pflanzen (Rudrabhatla und Rajasekharan, 2003).

In *A. thaliana* und *Daucus carota* kommen weitere,entwicklungsspezifisch an Tyr-Resten phosphorylierte Proteine vor (Barizza et al., 1999). In Bohne und Mimose wurden daneben Protein-Tyr-Phosphorylierungen an Proteinen des Zytoskeletts gefunden (Guillén et al., 1999; Kameyama et al., 2000). In einem Fall wurden nach Pathogenkontakt auch Hinweise auf spezifische Protein-Tyr-Phosphorylierungen in pflanzlichen Zellen gefunden. Hier wurde ein hemmender Effekt von Herbimycin, einem Protein-Tyr-Kinase-Inhibitor, auf den oxidative burst demonstriert, aber auch ein direkter immunologischer Nachweis der Tyr-phosphorylierten Zielproteine durchgeführt (Rajasekhar et al., 1999). Die in den genannten Beispielen detektierten Proteine sind aufgrund ihres jeweiligen Verhaltens in der SDS-PAGE offensichtlich nicht mit aktivierten MAPKs identisch.

Weitere Hinweise auf Tyr-Phosphorylierungen in Pflanzen liefert die Existenz von Protein-Tyr-Phosphatasen im *Arabidopsis* Genom (Kerk et al., 2002; Luan, 2002). Erwartungsgemäß wird die überwiegende Mehrzahl der Protein-Phosphatasen durch Ser/Thr-spezifische Enzyme dargestellt, neben einigen dualspezifischen konnte aber auch zumindest eine Tyr-spezifische Protein-Phosphatase identifiziert werden (AtPTP1, Kerk et al., 2002). Auch die durch Protein-Tyr-Phosphatase-Inhibitoren verhinderte Schließbewegung der Spaltöffnungen nach verschiedenen Reizen in *Commelina communis* zeigt die Bedeutung von Protein-Tyr-Phosphorylierungen in der pflanzlichen Signalleitung (MacRobbie, 2002).

## 1.4 Die Signalantwort: Abwehrreaktionen

Die oben erwähnten Signalwege der Pathogenabwehr dienen zur Auslösung einer aus vielfältigen Reaktionen bestehenden, komplexen Antwort. Die einzelnen Reaktionen werden offenbar durch integrative Signalwege koordiniert (Jabs et al., 1996; Frye et al., 2001).

### 1.4.1 Oxidative burst und hypersensitiver Zelltod

Erste antimikrobiell wirksame Substanzen werden bereits während des oxidative burst generiert. ROS wirken nicht nur als second messenger, sondern stellen wegen ihrer zytotoxischen Aktivität auch eine direkte Abwehrreaktion dar (Mehdy et al., 1996; Nürnberger, 1999; Dangl und Jones, 2001; van Breusegem et al., 2001). So führen die produzierten ROS nicht nur zur verstärkten Polymerisation von Zellwandelementen (Grant und Mansfield, 1999; Jabs et al., 1996), sondern schränken auch die Verbreitung eindringender Pathogene ein (Bolwell, 1999; van Breusegem et al., 2001), z.B. ist die bakterizide Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gut bekannt

(Baker und Orlandi, 1995).

Aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaften, und da ROS auch in tierischen Zellen einen programmierten Zelltod auslösen, werden diese auch als kausaler Bestandteil des hypersensitiven Zelltods in Pflanzen nach Pathogenkontakt betrachtet (Bolwell, 1999; Heath, 2000b). Dieser führt zum Absterben von Wirtszellen in einem auf die Infektionsstelle begrenzten Areal (Collmer, 1998; Jabs et al., 1996) und erschwert damit die Ausbreitung eindringender Pathogene (Feys und Parker, 2000; Jabs et al., 1996; Heath, 2000b). Der hypersensitive Zelltod trägt einige Charakteristika einer apoptotischen Reaktion (Piffanelli et al., 1999), so die Einbindung von Cys-Proteasen (Bolwell, 1999) und die für die späte Phase der Apoptose typische Bildung von DNA-Abbauprodukten ("laddering"; Heath, 2000b). Dies weist eine Apoptose zwar nicht zweifelsfrei nach, mit dem Verlust von Cyt c aus Kürbis-Mitochondrien während des durch Hitzeschock ausgelösten Zelltods (Balk et al., 1999) wurde jedoch eine weitere apoptotischen Reaktion identifiziert, was für die Existenz eines Apoptose-Programms in Pflanzen spricht (Heath, 2000a).

Erfolgreiche pflanzliche Abwehrreaktionen gegenüber Pathogenen sind jedoch keineswegs immer mit einem hypersensitiven Zelltod korreliert. Beispiele hierfür sind die *eds* Mutanten in *A. thaliana*, in denen trotz hypersensitiver Reaktion erhöhte Anfälligkeit gegen pathogene Bakterien besteht (Rogers und Ausubel, 1997). Umgekehrt vermitteln *dnd* Mutanten von *A. thaliana* Resistenz gegen pathogene Bakterien, ohne daß eine hypersensitive Reaktion erfolgt (Yu et al., 1998; Clough et al., 2000). Auch die Phytoalexinproduktion in *E. californica* kann unabhängig von einem oxidativen Burst und einer Einschränkung der Vitalität ausgelöst werden (Roos et al., 1998). Die Bedeutung des oxidativen Burst und der hypersensitiven Reaktion für die pflanzliche Pathogenabwehr bedürfen daher weiterer Aufklärung (Dong, 1998; Heath, 2000b; Glazebrook, 2001).

#### 1.4.2 Induktion von PR-Proteinen

Dies sind Proteine, die nach Elicitorkontakt auf einem von Salicylat reguliertem Signalweg (Chivasa und Carr, 1998) induziert werden, an dem auch NO<sup>-</sup> beteiligt zu sein scheint (Klessig et al., 2000). Die Induktion von PR-Proteinen, vor allem von PR-1, gilt als Marker für die Aktivierung der Pathogenabwehr (Salmeron und Veroij, 1998; Kinkema et al., 2000; Glazebrook, 2001).

PR-Proteine werden in verschiedene Gruppen unterteilt, deren Funktion noch nicht in allen Fällen geklärt ist. Bekannt sind die Aktivitäten von PR-2 als Glukanase (E.C. 3.2.1.39), während PR-3 eine Chitinase (E.C. 3.2.1.14) darstellt (García-Pérez et al., 1998; Xing et al., 2001). Beide Enzyme können das Wachstum von Mikroorganismen beeinträchtigen (Grenier et al., 1993; Rogers und Ausubel, 1997; García-Pérez et al., 1998; Xing et al., 2001). PR-4 aus Tabak zeigt Homologien zu Hevein, einem Streß-Protein aus Kartoffeln (Friedrich et al., 1991; Grenier et al., 1993), in Gruppe 5 finden sich mit Osmotinen Thaumatin-ähnliche Proteine, sowie Proteine, mit membranpermeabilisierenden Aktivitäten (Grenier et al., 1993).

Die Bedeutung von PR-Proteinen ist an Mutanten zu erkennen, die eine veränderte

Expression der entsprechenden Gene zeigen. Pflanzen, in denen keine Expression von *PR-1* stattfindet, z.B. *npr1* ("non expression of pr1") Mutanten von *A. thaliana*, verfügen über eine verminderte Resistenz gegenüber einigen Pathogenen (Glazebrook, 1999; Kinkema et al., 2000). Die konstitutive Expression von *PR-1* in *cpr1* oder *cpr6* ("constitutive expression of pr1" bzw. "pr6") Mutanten in *A. thaliana* führt demgegenüber zu erhöhter Resistenz (Clarke et al., 2000; Glazebrook, 2001).

Untersuchungen mit Doppelmutanten zeigen andererseits auch, daß hinreichende Abwehrreaktionen auch durch andere, *PR*-Gen unabhängige Signalwege aktiviert werden können (Clarke et al., 2000; Dong, 1998; Glazebrook et al., 2001).

### 1.4.3 Bildung von Phytoalexinen

In der induzierbaren Produktion von niedermolekularen antimikrobiellen Verbindungen besteht in Pflanzen eine weitere, speziestypische Verteidigungslinie gegenüber Pathogenen (Salmeron und Vernoij, 1998; De Luca und Laflamme, 2001; Dixon, 2001). Es handelt sich hierbei um Produkte des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, die unterschiedlichen Substanzklassen zuzuordnen sind. Unter ihnen finden sich Produkte aller wichtigen Wege des Sekundärstoffwechsels, wie Alkaloide (De Luca und Laflamme, 2001), Phenylpropanoide (Scheel, 1998; Weisshaar und Jenkins, 1998) und Terpenoide (Dixon, 2001). Der strukturellen Vielfalt ungeachtet werden diese Verbindungen aufgrund ihrer Beteiligung an der Pathogenabwehr gemeinsam als Phytoalexine bezeichnet (Dixon, 2001).

Die aktivierten Stoffwechselwege zur Phytoalexinbiosynthese sind charakteristisch für einzelne Pflanzenarten oder -familien (Blechert et al, 1995; Dixon und Lamb, 1990). Eine Ausnahme ist der von Zimtsäure ausgehende Phenylpropanstoffwechsel. Über diesen Weg werden nicht nur spezifische Phytoalexine synthetisiert, sondern sehr viele weitere Sekundärstoffe, die ubiquitär in allen Pflanzen vorkommen (Dixon, 2001; Weisshaar und Jenkins, 1998). So ist die durch die Aktivität von PAL aus Phenylalanin synthetisierte Zimtsäure auch Ausgangssubstanz für die Grundbausteine der Lignifizierung (z.B. Koniferylalkohol), aber auch der Benzoessäure-Derivate, der Flavonoide, vieler Gerbstoffe und anderer pflanzlicher Phenole (Dixon, 2001; Weisshaar und Jenkins, 1998). Viele haben neben ihrer "konstitutiven" Bildung auch eine Rolle als induzierbare Abwehrmetabolite, z.B. Salicylate (Klessig et al., 2000) oder Lignin (Conrath et al., 2002).

Phytoalexine können als präformierte Substanzen vorliegen, häufig werden diese aber auch erst nach Elicitorkontakt synthetisiert (Dixon, 2001; Dixon und Lamb, 1990). Die Aktivierung der Phytoalexinbiosynthese findet oft auf transkriptioneller Ebene statt, daher wird die Expression entsprechender Gene auch als Marker der Pathogenabwehr verwendet (Armero und Tena, 2001; Haider, 1997; Mahady et al., 1998; Menke et al., 1999).

Die Bedeutung der Phytoalexine für die Pathogenabwehr ergibt sich aus ihren antimikrobiellen Wirkungen (Baker et al., 1997; Dixon, 2001; Facchini, 2001; Sato et al., 2001). Für das Terpenoid Avenicin A-1 konnte in einigen *Gramineae* Arten

dessen essentielle Rolle an einer erfolgreichen Abwehr von *Gaeumannomyces graminis* gezeigt werden (Salmeron und Verwoij, 1998). Ebenso konnte für drei verschiedene *Capsicum annuum* Kultivare gezeigt werden, daß deren rassenspezifische Resistenz gegenüber *Phytophthora capsici* mit der Produktion des Terpenoids Capsidiol korreliert ist (García-Pérez et al., 1998).

Der Signaltransfer zur Auslösung der Phytoalexinbiosynthese erfolgt in verschiedenen Spezies wahrscheinlich auf einem phosphorylierungsabhängigen Signalweg. So ist in Zellkulturen die Induktion der Biosynthese der terpenoiden Indolalkaloide von *Catharanthus roseus* (Menke et al., 1999), der Benzophenanthridin-Alkaloide in *S. canadensis* (Mahady et al., 1998) und *Papaver somniferum* (Facchini et al., 1996) sowie der Isoflavonoiden in Soja (Rajasekhar et al., 1999) sensitiv gegenüber Protein-Ser/Thr-Kinase-Inhibitoren.

### **1.5 Phytoalexinproduktion in Suspensionszellen von *E. californica* nach Kontakt mit Hefe-Elicitor**

Kultivierte Suspensionszellen des Kalifornischen Goldmohns reagieren auf Elicitorkontakt mit einer gesteigerten Produktion von Benzophenanthridin-Alkaloiden (Blechert et al., 1995; Müller et al., 1993; Roos et al., 1998; Schumacher et al., 1987). Diese Phytoalexine zeigen aufgrund ihrer Interkalation in doppelsträngige DNA, Bindung an Komponenten des Zytoskeletts sowie weiteren zellulären Strukturen antimikrobielle Aktivitäten (Haider et al., 2000; Hauschild et al., 1998; Mahady und Beecher, 1994; Schmeller, 1997) und werden in der Medizin als entzündungshemmende Substanzen verwendet (Mahady und Beecher, 1994; Schmeller, 1997).

Die Auslösung dieser Biosynthese kann durch Kontakt mit einer Elicitor-Präparation aus Zellwänden der Bäckerhefe erfolgen (Schumacher et al., 1987; Roos et al., 1998). Hohe Konzentrationen des Elicitors führen außerdem in Abhängigkeit von ROS zur Verbräunung der Zellen (Roos et al., 1998) sowie zur Synthese von Jasmonaten (Färber et al., 2003; Müller et al., 1993). Letztere sind bereits als Induktoren der Alkaloidbiosynthese bekannt (Blechert et al., 1995; Gundlach et al., 1992; Haider et al., 2000). Durch Verwendung niedriger Elicitorkonzentrationen kann die Alkaloidbiosynthese selektiv, d.h. ohne Reaktionen des oxidativen Burst oder der Jasmonatbiosynthese ausgelöst werden (Roos et al., 1998; Färber et al., 2003). Es wurde gezeigt, daß hierfür ein transienter Abfall des zytoplasmatischen pH-Wertes notwendig ist, der durch vakuoläre Protonen verursacht wird, wie aus der Kartierung intrazellulärer pH-Werte ersichtlich ist (Roos et al., 1998; Roos et al., 1999). Die Notwendigkeit der zytoplasmatischen Ansäuerung geht daraus hervor, daß bei Verhinderung dieser Reaktion durch Neutralisierung des vakuolären pH-Wertes vor Elicitorkontakt keine Alkaloidbiosynthese mehr ausgelöst werden kann (Roos et al., 1998). Die künstliche Ansäuerung des Zytoplasmas durch externe Zugabe membranpermeabler Säuren kann eine erhöhte Alkaloidbiosynthese bewirken (Küppers, 2000; Roos et al., 1998; Roos et al., 1999). Mit der Verschiebung intrazellulärer pH-Werte unterscheidet sich die elicitorausgelöste

zytoplasmatische Ansäuerung in *E. californica* sowohl von der künstlichen Ansäuerung, als auch von der in elicitierten Tabakzellen beobachteten intrazellulären Ansäuerung, welche mit einer externen Alkalisierung korreliert ist (Matthieu et al., 1996).

Einige der für den intrazellulären pH-shift und die Auslösung der Alkaloidbiosynthese in *E. californica* notwendigen Signale konnten bereits identifiziert werden:

1.: Verschiedene Resultate legen eine Aktivierung von G-Proteinen innerhalb dieses Signalweges nahe. Die Existenz dieser Proteine konnte immunologisch nachgewiesen werden (Roos et al., 1999). In Membranpräparationen wurde eine von der Elicitorkonzentration abhängige Bindung von ( $\gamma^{32}$ -S)-ATP gefunden, deren Sättigungsbereich bei Elicitorkonzentrationen liegt, die auch für die Auslösung des pH-shifts und der Alkaloidbiosynthese sättigend sind (Gesell, 2001).

2.: Nach Elicitorkontakt ist der Anstieg einer PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Ganzzellen und in Präparationen der isolierten Plasmamembran nachweisbar (Hollstein, 2001; Nitzsche, 2001; Roos et al., 1999; Schwartze, 2001). Dieser ist mit einem transienten Peak eines PLA<sub>2</sub>-Produktes, des Lysophospholipids LPC, korreliert (Viehweger et al., 2002). Dieses putative Signalmolekül bewirkt *in situ* einen transienten Eflux von Protonen aus der Vakuole (Viehweger et al., 2002), der in Dauer und Ausmaß dem pH-shift in elicitorbehandelten Ganzzellen (Roos et al., 1998) ähnlich ist. Sehr wahrscheinlich wird durch LPC ein Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher am Tonoplasten aktiviert (Viehweger et al., 2002).

Insgesamt gesehen sprechen die bisherigen Ergebnisse für einen Signalweg, der nach Kontakt eines Glykoprotein-Elicitors mit einem unbekanntem Rezeptor ein G-Protein und nachfolgend eine PLA<sub>2</sub> in der Plasmamembran aktiviert. Der resultierende Anstieg an LPC löst an der Vakuole den für den weiteren Signaltransfer notwendigen Ausstrom von Protonen aus.

Es ist jedoch unklar, wie dieses pH-Signal weitergeleitet wird und ob Protein-Phosphorylierungen als downstream-Effekte beteiligt sind. Diese Frage ist von Interesse, da in anderen Systemen der phosphorylierungsabhängige oxidative burst zumeist eine zentrale Rolle bei der Auslösung von Pathogenabwehr-Reaktionen einnimmt. Dieser ist jedoch für den pH-abhängigen Signalweg, der in *E. californica* zur Alkaloidbiosynthese führt, nicht notwendig (Roos et al., 1998).

## 1.6 Ziele der Arbeit

Zu Beginn der Arbeit war noch nicht geklärt, wie der elicitorausgelöste pH-shift in *E. californica* in den weiteren Signalweg zur Aktivierung der Alkaloidbiosynthese eingebunden ist, und ob Protein-Phosphorylierungen hierfür eine Rolle spielen. Da in anderen *Papaveraceae* die elicitorabhängige Biosynthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden sensitiv gegenüber Protein-Kinase-Inhibitoren ist (Facchini et al., 1996; Mahady et al., 1998), könnte ein solcher Signaltransfer auch in *E. californica* vorliegen. Die Annahme einer durch zytosolische Ansäuerung regulierten Protein-Phosphorylierung wird auch durch MAPKs aus Tabak, die durch

zytoplasmatische Ansäuerung aktivierbar sind (Tena und Renaudin, 1998; Lebrun-Garcia et al., 2002), gestützt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung von Protein-Kinasen am pH-abhängigen Signaltransfer zur Aktivierung der Alkaloidbiosynthese in *E. californica* untersucht werden.

Hierfür sollte der Effekt spezifischer Protein-Kinase-Inhibitoren auf die Alkaloidbiosynthese untersucht werden, mit denen auch zwischen Protein-Ser/Thr- oder -Tyr-Kinasen unterschieden werden sollte. Durch zeitlich versetzte Applikation der Inhibitoren sollten "Zeitfenster" beteiligter Protein-Kinasen sichtbar werden. Ebenso sollte auch bei einer Auslösung der Alkaloidbiosynthese durch künstliche Ansäuerung durch Einsatz von Protein-Kinase-Inhibitoren die Positionierung beteiligter Protein-Kinasen am Signaltransfer überprüft werden.

Aufgrund mangelnder Erfahrungswerte über geeignete Protein-Kinase-Inhibitoren für die Untersuchung der Alkaloidbiosynthese in *E. californica* sollte zunächst ein breit angelegtes Inhibitor-screening durchgeführt werden. Um hierbei einen hohen Probendurchsatz zu erreichen, sollte zunächst eine Methode zur Untersuchung der Alkaloidbiosynthese in Mini-Kulturen auf 96-er Mikrotiter-Platten entwickelt werden. Der auf diese Weise erreichbare Probendurchsatz soll dann die Durchführung einer hinreichenden Anzahl von Parallelansätzen ermöglichen, womit die Ergebnisse einer aussagefähigen statistischen Analyse unterzogen werden können sowie teure Inhibitoren zu vertretbaren Kosten einsetzbar sind. Zur Durchführung von Experimenten mit zeitlich befristetem Effektorkontakt sollte dieses System außerdem einen mehrfachen Medienwechsel ermöglichen.

Festgestellte Effekte von Protein-Kinase-Inhibitoren auf die Alkaloidbiosynthese sollten sich unter anderem an einem veränderten Protein-Phosphorylierungsmuster zeigen lassen. Hierbei sollte durch Verwendung phosphospezifischer Antikörpern zwischen an Ser- oder Thr-, bzw. an Tyr-Resten phosphorylierten Proteinen unterschieden werden.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche elicitorabhängig phosphorylierten Proteine tatsächlich an der Weiterleitung des Signals zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese benötigt werden, sollte die Protein-Phosphorylierung auch bei Auslösung des Signaltransfers durch zytoplasmatische Ansäuerung, sowie unter Bedingungen eines verhinderten zytoplasmatischen pH-shifts untersucht werden. Diesem Zweck sollte auch ein Vergleich der unter Verwendung von Protein-Kinase-Inhibitoren zu gewinnenden Resultate mit dem immunologisch zu detektierenden Phosphorylierungsmuster dienen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Alle verwendete Grundchemikalien waren von p.A. Qualität.

Aprotinin und der Proteasen Inhibitor Cocktail stammten von Boehringer Mannheim (Mannheim). AG 18, AG 82, AG 99, AG 126, bpv(phen), Erbstatin-Analogen Genistein, Herbimycin, K-252a, Leupeptin Hemisulfat, Ocadainsäure, Phenylarsenoxid, Piceatannol und PP2 stammten von Calbiochem (San Diego; USA). Buttersäure, Pivalinsäure und Staurosporin wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen, Bafilomycin von Sigma und Calbiochem. Die Antikörper Anti-Phospho-Tyr IgG (Maus; Klon py99) und Anti-Maus-IgG POD wurden von von Santa Cruz (Santa Cruz, USA); Anti-Phospho-Ser IgM (Maus, Klon 16B4); Anti-Phospho-Thr IgG (Maus, Klon 14B3); Anti-Maus-IgM POD von Calbiochem bezogen. Der Molekulargewicht Größenstandard stammte von Bio-Rad (Hercules, USA).

### 2.2 Kultivierung der Zellen

Suspensionszellen von *E. californica* wurden bei 24°C, 5 -6  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  Dauerlicht auf einem Kreisschüttler bei 100 U/min in LS-Medium (s.u.) kultiviert.

LS-Medium:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ : 20,6 mM;  $\text{KNO}_3$ : 18,8 mM;  $\text{CaCl}_2$ : 3,0 mM;  $\text{MgSO}_4$ : 1,5 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,25 mM;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : 0,1 mM;  $\text{MnSO}_4$ : 0,1 mM;  $\text{ZnSO}_4$ : 30,0  $\mu\text{M}$ ; KJ: 5,0  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ : 1,0  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$ : 0,1  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CoCl}_2$ : 0,15  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ : 0,2  $\mu\text{M}$ ;  $\text{FeSO}_4$ : 0,1 mM; Thiamin-HCl (Vitamin B1): 1,2  $\mu\text{M}$ ; 2,4-D: 1,0 mM; Naphtylelessigsäure: 1,2  $\mu\text{M}$ ; myo-Inosit: 0,5 mM; Saccharose: 88 mM. pH: 6,0 (KOH).

### 2.3 Auslösung und Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese in Batch-Kulturen

#### 2.3.1 Vorbehandlung

Nach einer Kulturdauer von 3 - 5 Tagen wurden Zellen über ein 200-mesh Nylon Filter geerntet, in frischem phosphatfreien LS Medium auf ungefähr die vorherige Kulturdichte resuspendiert und jeweils 5 ml auf 25 ml Erlenmeyer Kolben verteilt. Nach Aliquotierung wurden die Zellen zur Äquilibrierung für 20 Minuten ohne weitere Eingriffe belassen.

Daneben wurde auch ein 75%-iges phosphatfreien Nährmediums verwendet.

LS-P:	wie LS-Medium, jedoch ohne $\text{KH}_2\text{PO}_4$
75% LS-P:	0,75 Vol. LS-P + 0,25 Vol. A.d.

### 2.3.2 Verwendung von Effektoren der Alkaloidbiosynthese

*Elicitorbehandlung:* Bei  $t = 0$  wurden vorbehandelten Zellsuspensionen  $1 \mu\text{g/ml}$  Hefe-Elicitor aus einer Stammlösung von  $1 \text{mg/ml}$  zugesetzt ( $t = 0$ ).

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen bei  $t = 30$  Minuten 2-mal mit  $5 \text{ml}$  phosphatfreiem Nährmedium gewaschen und in diesem Medium anschließend wieder ungefähr auf das Ausgangsvolumen resuspendiert; Kontrollzellen wurden bis auf Elicitorzugabe analog behandelt. Anschließend sowie nach einer folgenden Kulturdauer von  $20$  Stunden wurden Alkaloide und Trockenmassen bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.3).

*Behandlung mit permeablen Säuren:* Bei  $t = 0$  wurden vorbehandelte Zellsuspensionen mit  $4 \text{mM}$  Pivalinsäure aus einer Stammlösung ( $100 \text{mM}$ ,  $\text{pH } 5,0$ ) versetzt, Kontrollzellen erhielten in analoger Weise Zitronensäure. Waschschrte wurden bei  $t = 25$  Minuten durchgeführt, erfolgten jedoch ebenso wie die weitere Kultivation wie für die Elicitorbehandlung beschrieben.

*Behandlung mit Bafilomycin:* Bafilomycin wurde aus der Stammlösung ( $1,6 \text{mM}$  in DMSO) zunächst in LS-P auf  $16 \mu\text{M}$  verdünnt und diese Lösung mit Ultraschall ( $5$  Sekunden bei  $1/10$  Schall und  $70 \%$  Intensität mit einem Ultraschallstab von Bandelin, Berlin: Stab HD 70 mit Horn VW 70) bei  $4^\circ\text{C}$  behandelt.  $1 \text{ml}$  hiervon wurden bei  $t = 0$  mit  $1 \text{ml}$  vorbehandelter, auf die 2-fache Zelldichte resuspendierter Zellsuspension versetzt (Endkonzentration:  $8 \mu\text{M}$ ;  $0,5 \%$  DMSO), Kontrollzellen wurden entsprechend mit DMSO behandelt. Waschschrte und weitere Kultivation erfolgten wie für die Behandlung mit permeablen Säuren beschrieben.

*Methylaminbehandlung:*  $5 \text{ml}$  Zellsuspension wurden bereits  $20$  Minuten vor Überführung in frisches phosphatfreies Nährmedium  $80 \text{mM}$  Methylamin,  $5 \text{mM}$  MES,  $\text{pH } 7,4$  aus der Stammlösung zugesetzt. Nach Abtrennung vom alten Medium wurden solche Zellen in frischem Medium mit ebenfalls  $80 \text{mM}$  Methylamin (s.o.) resuspendiert und dann wie methylaminfreie Zellen als Kontrollzellen oder mit Elicitor behandelt.

*Methyl-Jasmonatbehandlung:* Methyl-Jasmonat wurde aus der Stammlösung ( $1 \text{M}$  in DMSO) zunächst in LS-P auf  $3 \text{mM}$  verdünnt und diese Lösung wie für Bafilomycin beschrieben mit Ultraschall behandelt. Bei  $t = 0$  wurden  $4,5 \text{ml}$  vorbehandelter Zellsuspension  $0,5 \text{ml}$  hiervon zugegeben (Endkonzentration  $300 \mu\text{M}$ ;  $0,03 \%$  DMSO), Kontrollzellen wurden entsprechend mit DMSO behandelt. Waschschrte und weitere Kultivation erfolgten wie für die Behandlung mit Elicitor beschrieben.

*Verwendung von Genistein:* Genistein wurde aus der Stammlösung ( $50 \text{mM}$  in

DMSO) zunächst in LS-P auf 250  $\mu\text{M}$  verdünnt, wie für Bafilomycin beschrieben mit Ultraschall behandelt und 0,5 ml hiervon bei  $t = -5$  Minuten 4,5 ml vorbehandelter Zellsuspension zugesetzt (Endkonzentration 25  $\mu\text{M}$ , 0,05 % DMSO). Zellsuspensionen ohne Genistein wurde entsprechend DMSO zugesetzt, die Suspensionen wurden dann mit Elicitor oder wie Kontrollzellen behandelt. Für eine Behandlung mit Genistein bei  $t = 24$  Stunden wurde analog verfahren und die Alkaloidgehalte bei  $t = 0$  sowie nach 24 und 48 Stunden bestimmt.

*Verwendung weiterer Effektoren:* Weitere Effektoren wurden den vorbehandelten Zellsuspensionen direkt aus den Stammlösungen bei  $t = -5$  Minuten in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt (DMSO  $\leq 0,5$  %). Effektorfreien Zellsuspensionen wurde entsprechend DMSO zugesetzt, die Suspensionen wurden dann mit Elicitor oder wie Kontrollzellen behandelt.

Die Elicitorpräparation erfolgte nach Schumacher et al. (1987) aus frischer, kommerziell erhältlicher Bäcker-Hefe (DHW "Gold", Deutsche Hefe-Werke, Nürnberg). Abweichend wurde nur die erste ethanolische pH-Fällung verwendet.

Stammlösungen (Lösungsmittel in Klammern):

AG 18:	100 mM (DMSO)	
AG 82:	100 mM (DMSO)	
AG 126:	100 mM (DMSO)	
Bafilomycin:	1,6 mM (DMSO)	
Genistein:	50 mM (DMSO)	
Hefe-Elicitor:	1 mg/ml (A.d.)	
Herbimycin:	10 mM (DMSO)	
K-252a:	1 mM (DMSO)	
Methylamin:	1,2 M (75 mM MES)	pH 7,4
Methyl-Jasmonat:	1 M (DMSO)	
Okadainsäure:	120 $\mu\text{M}$ (A.d.)	
Pivalinsäure:	100 mM (A.d.)	pH 5,0
Staurosporin:	6 mM (DMSO)	
Zitronensäure:	100 mM (A.d.)	pH 5,0

### 2.3.3 Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese

0,5 ml Zellsuspension wurden in ausgewogenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 0,5 ml 36 mM HCl in Methanol für 20 Minuten bei 40° C und 850 U/min (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) extrahiert. Alkaloide im Überstand wurden nach 20 minütiger Zentrifugation bei 16.000 g fluorometrisch am Spektrofluorometer (Rf-5000 von Shimadzu, Kyoto, Japan) bei  $\lambda_{\text{ex}}$ : 470 nm und  $\lambda_{\text{em}}$ : 570 nm gemessen, die Quantifizierung der Werte erfolgte über eine Sanguinarin Eichkurve (nicht dargestellt).

Trockengewichte wurden aus den verbleibendem Pellets nach nochmaligem Waschen mit 0,5 ml Ethanol und anschließender Trocknung (3 Stunden, 80° C) auf einer Analysenwaage (R-160-P-\*D1, Sartorius, Göttingen) bestimmt.

Aus Alkaloidkonzentration und Trockenmasse wurden die spezifischen Alkaloidgehalte zu Beginn und am Ende des Versuches ermittelt, die Alkaloidbiosynthese über den Versuchszeitraum wird durch die Differenz der Werte dargestellt.

## 2.4 Auslösung und Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese in Mini-Kulturen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die eine 20-stündige Kultivierung von Suspensionszellen in 96-fach Mikrotiter-Platten und eine Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese erlaubt. Hierdurch finden bis zu 96 unabhängige Kulturen auf einer ca 8 x 12 cm messenden Mikrotiter-Platte Platz. Diese Art der Suspensionskultur wird im folgenden Mini-Kultur genannt.

Für Vergleiche von Mini- und Batch-Kulturen wurden gleichbehandelte Batch-Kulturen nach der 20-stündigen Alkaloidbiosynthese gemeinsam mit den Mini-Kulturen auf freigehaltenen Kompartimenten der Mikrotiter-Platten quantifiziert.

### 2.4.1 Verfahren zur Etablierung von Mini-Kulturen

*Verwendete Mikrotiter-Platten:* Es wurden kommerziell erhältliche Platten aus Styrol mit Zellulose-Mischester Filter und einer Porengröße von 0,45  $\mu\text{m}$ , sowie Mikrotiter-Platten aus Styrol bzw. Barex/TiO<sub>2</sub> mit hydrophilem Durapore Filter und 0,65  $\mu\text{m}$  Porengröße verwendet (Millipore, ). Sie wurden entweder unbehandelt oder nach vorheriger Spülung mit A. d., 1% BSA in A. d., DMSO oder 70% EtOH eingesetzt.

In erster Linie kamen jedoch zwei Spezialanfertigungen aus V-2 A Stahl mit variablen Filtermaterialien zum Einsatz. Eine der beiden V2-A Stahl-Platten wurde nachträglich mit Titan-Nitrid beschichtet. Für diese Mikrotiter-Platten wurden als Filter hydrophile Duraporemembranen (0,65  $\mu\text{m}$  Porengröße), hydrophobe Duraporemembranen (0,8  $\mu\text{m}$  Porengröße) und Isoporefilter (0,65  $\mu\text{m}$  Porengröße) von Millipore sowie glasfaserverstärkte Teflonfilter mit 5  $\mu\text{m}$  Porengröße von

Schleicher & Schuell (Dassel) verwendet.

Zur Hydrophilisierung von Isopore- bzw. Teflonfilter wurden 100 µl Methanol oder Tween 20 (0,001 %) verwendet und anschließend 2-mal mit 100 µl A.d. ausgewaschen.

Bei Versuchen mit Füllkörpern wurden Glasperlen als Suspension zugegeben ( $\leq 106 \mu\text{m}$ ; 0,25 g/ml; je Kompartiment 100 µl).

*Verwendete Schüttelmaschinen:* Das Kultur-System wurde waagrecht auf einem Kreisschüttler (KS 500, IKA, Staufen) oder senkrecht auf einem Horizontalschüttler (HS 500, IKA) bewegt. Bei senkrechter Orientierung wurden die Kompartimente der Mikrotiter-Platte mit Biofilm (Heraeus Instruments, Hanau) verschlossen. Daneben kam ein Gradierschüttler (THYR 2, MLW, Ilmenau) zum Einsatz.

Kreisschüttler: 0; 50 U/min

Horizontalschüttler: 0; 50; 100; 250 Hub/min

Gradierschüttler: Stufe 1; 4; 10.

*Kulturmedien:* Neben den in Abschnitt 2.3 erwähnten Medien wurden für Mini-Kulturen Nährmedien mit unterschiedlichen Gesamt-Saccharose-Konzentration bzw. mit Ficoll verwendet (Dichte und Osmolarität in Klammern).

1/4 LS-P; 0,75 % Saccharose: (1,00 g/ml; 46 mOsm)	0,25 Vol. LS-P 0,75 Vol. A.d.
1/4 LS-P; 2,25 % Saccharose: (1,01 g/ml; 90 mOsm)	0,25 Vol. LS-P 0,038 Vol. Saccharose, 40 % 0,713 Vol. A.d.
1/4 LS-P; 4,75 % Saccharose: (1,02 g/ml; 163 mOsm)	0,25 Vol. LS-P 0,1 Vol. Saccharose, 40 % 0,656 Vol. A.d.
1/4 LS-P; 5,25 % Saccharose: (1,03 g/ml; 177 mOsm)	0,25 Vol. LS-P 0,113 Vol. Saccharose, 40 % 0,637 Vol. A.d.
1/2 LS-P; 5% Ficoll: (1,03 g/ml; 92 mOsm)	0,5 Vol. LS-P 0,125 Vol. Ficoll, 20 % 0,375 Vol. A.d.

*Variationen des Kultivationsvolumens:* Nach Filtration der Zellsuspension wurden die zurückgehaltenen Zellen mit unterschiedlichen Volumina an Nährmedien resuspendiert:

-Bei Resuspension auf das Ausgangsvolumen: 110 µl Medium

-Bei Erhöhung der Kulturdichte: 24; 12 oder 6 µl Medium. Bei dieser Versuchseinstellung wurden die Mini-Kulturen ohne Bewegung auf einer erhöhten Ebene eines Gefäßes kultiviert, dessen Bodenbereich mit A.d. gefüllt war.

### 2.4.2 Vorbehandlung von Zellen

Nach einer Kulturdauer von 3 - 5 Tagen wurden Zellen über ein 200-mesh Nylon Filter geerntet und in frischem phosphatfreiem Nährmedium auf ungefähr die vorherige Kulturdichte resuspendiert. Je Kompartiment wurden 100  $\mu\text{l}$  Suspension einpipettiert, zur Äquilibration für 20 Minuten ohne weitere Behandlung belassen und erst danach mit Effektoren behandelt (s.u.).

### 2.4.3 Verwendung von Effektoren der Alkaloidbiosynthese

Die Verwendung von Effektoren erfolgte mit Mini-Kulturen in jeweils mindestens 8 gleichzeitig untersuchten Suspensionen. Durchgeführte Waschschritte erfolgten gemeinsam für alle auf einer Mikrotiter-Platte befindlichen Mini-Kulturen. Hierfür wurden diese durch Unterdruck mit der Absaugereinheit Event 4160 (Eppendorf) und einer daran angeschlossenen leistungsfähigen Membranpumpe (MP 3002, Saskia Hochvakuum- und Labortechnik GmbH, Illmenau) simultan filtriert. Bei dieser Prozedur war darauf zu achten, daß:

- die Medien aus allen Kompartimenten gleichmäßig abfiltriert werden
- allzu harsche Filtrationsbedingungen vermieden werden.

*Elicitorbehandlung:* Bei  $t = 0$  wurden 100  $\mu\text{l}$  vorbehandelter Zellsuspension 20  $\mu\text{l}$  einer in Nährmedium auf 6  $\mu\text{g/ml}$  verdünnten Lösung des Hefe-Elicitors zugesetzt. Wurde im Experiment außer dem Hefe-Elicitor ein weiterer Effektor verwendet, so erfolgte die Zugabe des Hefe-Elicitors durch 10  $\mu\text{l}$  einer in LS-P auf 12  $\mu\text{g/ml}$  verdünnten Elicitorlösung. Kontrollzellen erhielten die gleichen Volumina elicitorfreien Mediums.

Bei  $t = 30$  Minuten wurden zunächst 100  $\mu\text{l}$  phosphatfreies Nährmedium zugefügt, anschließend das gesamte Medium abgesaugt (s.o.) und 2-mal mit 150  $\mu\text{l}$  frischem Medium gewaschen. Bevor die Zellen hierin resuspendiert wurden (s. 2.4.1), wurde die Unterseite der Mikrotiter-Platte mit Folie (Millipore) abgeklebt, um ein Auslaufen zu verhindern. Nach der anschließenden, 20-stündigen Kultivationsdauer wurden Alkaloide und Zellen quantifiziert (s. 2.4.4).

*Behandlung mit permeablen Säuren:* 100  $\mu\text{l}$  vorbehandelte Zellsuspension erhielten bei  $t = 5$  Minuten 20  $\mu\text{l}$  einer in LS-P auf 24 mM eingestellten Pivalinsäure Lösung (Endkonzentration: 4 mM; pH 5,0). Wurde im Experiment außer Pivalinsäure ein weiterer Effektor verwendet, so erfolgte die Zugabe von Pivalinsäure durch 10  $\mu\text{l}$  einer in LS-P auf 48 mM eingestellten Lösung. Kontrollzellen wurden in analoger Weise mit Zitronensäure behandelt. Waschschritte bei  $t = 30$  Minuten und weitere Kultivierung erfolgten wie für die Elicitorbehandlung beschrieben.

*Behandlung mit Bafilomycin:* Bafilomycin wurde aus der Stammlösung (16  $\mu\text{M}$  in DMSO) zunächst in NL-P auf 48  $\mu\text{M}$  verdünnt und diese Lösung mit Ultraschall (mit Ultraschallstab 5 Sekunden bei 1/10 Schall und 70 % Intensität bei 4°C)

behandelt. 100  $\mu$ l vorbehandelter Zellsuspension wurden 20  $\mu$ l hiervon bei  $t = 0$  zugesetzt (Endkonzentration: 8  $\mu$ M; 0,5 % DMSO), Kontrollzellen wurden entsprechend mit DMSO behandelt. Waschschrirte und weitere Kultivatiun erfolgten wie für die Elicitorbehandlung beschrieben.

*Methyl-Jasmonatbehandlung:* Methyl-Jasmonat wurde aus der Stammlösung zunächst in LS-P auf 1,8 mM verdünnt und diese Lösung wie für Bafilomycin beschrieben mit Ultraschall behandelt. 100  $\mu$ l vorbehandelter Zellsuspension wurden 20  $\mu$ l hiervon bei  $t = 0$  zugesetzt (Endkonzentration: 300  $\mu$ M; 0,03 % DMSO), Kontrollzellen wurden entsprechend mit DMSO behandelt. Waschschrirte und weitere Kultivatiun erfolgten wie für die Elicitorbehandlung beschrieben.

*Verwendung weiterer Effektoren:* Weitere Effektoren wurden zunächst in LS-P auf das 12-fache der im Ergebnisteil angegebenen Endkonzentration verdünnt und 100  $\mu$ l vorbehandelter Zellsuspension zu  $t = -5$  Minuten 10  $\mu$ l hiervon zugesetzt. Effektorfreie Zellsuspensionen wurden entsprechend mit DMSO behandelt. Aktivierung des Signaltransfers zu  $t = 0$ , bzw. Kontrollbehandlung, Waschschrirte und weitere Kultivatiun erfolgten wie für die Behandlung mit Elicitor bzw. Pivalinsäure beschrieben.

Auch bei Verwendung mehrerer Effektoren lagen DMSO Konzentrationen in Zellsuspensionen nicht über 0,5 %. Die Stammlösungen für AG 18, AG 82, AG 126, Bafilomycin, Hefe-Elicitor, Herbimycin, K-252a, Methyl-Jasmonat, Okadainsäure, Pivalinsäure, Staurosporin und Zitronensäure sind in Abschnitt 2.2 beschrieben.

Stammlösungen (Lösungsmittel war DMSO, für bpv(phen) wurde A. d. verwendet):

AG 99:	100 mM	Phenylarsenoxid:	33 mM
bpv(phen):	100 mM	Piceatannol:	100 mM
Erbstatin-Analog:	50 mM	PP2:	5 mM

#### 2.4.4 Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese

Zur Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese wurde der auf die Zellmenge bezogene Alkaloidgehalt von Zellextrakten bestimmt.

*Alkaloidextraktion und -quantifizierung:*

A) bei 120  $\mu$ l-Mini-Kulturen: Zellsuspension wurde für 20 Minuten mit 120  $\mu$ l Extraktionsmedium extrahiert, durch Unterdruckfiltration wurde der Extrakt auf Mikrotiter-Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt. Hiervon wurden 50  $\mu$ l auf lichtundurchlässigen Mikrotiter-Platten (Micro fluor mit U-Boden von Dynex,

Chantilly, USA) im Biolinx fluorolite mrx 1000 Fluoreszenz-Mikrolesegerät (Dynex) bei  $\lambda_{\text{ex}}$ : 490 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 570 nm und 7 V Lampenspannung fluorometrisch gemessen. Die Quantifizierung der Werte erfolgte durch Vergleich mit einem Sanguinarin Standard (s. 7.1).

*B) bei 12  $\mu\text{l}$ -Mini-Kulturen:* Bei Versuchen mit einem Wechsel des Mediums wurden in 12  $\mu\text{l}$  Medium resuspendierte Zellen für 20 Minuten mit 120  $\mu\text{l}$  80 % EtOH, 36 mM Essigsäure versetzt und extrahiert. Messung und Quantifizierung der Alkaloide erfolgten wie beschrieben.

*Zellquantifizierung:* Zur Bestimmung der Zellmenge wurden Propidium-Jodid bzw. Sanguinarin verwendet, beide Fluorophore binden an Nukleinsäuren und ließen sich auf die für Alkaloide beschriebene Weise wieder extrahieren.

Die Zellen wurden nach Alkaloidextraktion mit 200  $\mu\text{l}$  A.d. gewaschen und die Zellpellets nachfolgend für 20 Minuten mit 100  $\mu\text{l}$  Sanguinarin (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 20 % DMSO) oder 180  $\mu\text{l}$  Propidium-Jodid (0,5 mM in 20 mM MES, pH 7) inkubiert. Hierauf erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 200  $\mu\text{l}$  A.d., danach wurde mit den zuvor für die Alkaloidextraktion verwendeten Medien extrahiert. Die Fluoreszenz wurde im Falle der Zellquantifizierung mit Sanguinarin ebenso gemessen wie die Alkaloidfluoreszenz. Bei Verwendung von Propidium-Jodid wurden ebenfalls 50  $\mu\text{l}$  des Extraktes auf Mikrotiter-Platten im Fluoreszenz-Mikrolesegerät bei  $\lambda_{\text{ex}}$ : 535 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 630 nm und einer Spannung von 4,0 V gemessen.

Zur Kalibrierung der Methoden (s. 7.2) wurden Suspensionen unterschiedlicher Kulturdichte auf der Mikrotiter-Platte und parallel mit einer Wägung des Trockengewichts (s. 2.3.3) quantifiziert.

In ersten Experimenten erfolgte die Extraktion der Alkaloide mit Extraktionsmedium E, Färbung der Zellen mit Sanguinarin und anschließende Extraktion ebenfalls mit Extraktionsmedium E. Für folgende Experimente wurden die Extraktionsmedien A), B), C) oder D) sowie zur Zellquantifizierung Propidium-Jodid verwendet.

Extraktionsmedium A):	36 mM HCl in MeOH
Extraktionsmedium B):	36 mM Ameisensäure in EtOH
Extraktionsmedium C):	36 mM Essigsäure in EtOH
Extraktionsmedium D):	36 mM Essigsäure in 80 % EtOH
Extraktionsmedium E):	4 % SDS in A.d.
Sanguinarin Lösung:	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sanguinarin in 20 % DMSO
Propidium-Jodid Lösung:	0,5 mM Propidium-Jodid in 20 mM MES, pH 7

## 2.5 Proteinbiochemische Experimente

### 2.5.1 Probenahme

3-5 Tage alte Zellsuspensionen wurden wie bereits beschrieben mit verschiedenen Effektoren behandelt. Zu den angegebenen Zeiten wurden 1 ml Zellsuspension entnommen, über eine Glasfritte mit Papierfilter (Niederschlag Filtrak FN 7; Weißenborn) abgesaugt und mit 10 ml eisgekühltem A.d. gewaschen (bei Verwendung von Bafilomycin: 0,5 ml; für Membranpräparationen: 3 ml Suspension, 2-mal mit 10 ml eisgekühltem A. d. gewaschen). Die Zellpellets wurden sofort in Aluminiumfolie verpackt und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren.

Von den behandelten Suspensionen wurden 5 ml (Bafilomycin: 1 ml) zur Quantifizierung der Alkaloidbiosynthese (siehe Kapitel 2.3.3) für 20 Stunden weiterkultiviert.

### 2.5.2 Proteinextraktion und -quantifizierung

Gefrorene Zellpellets wurden in eiskaltem Lysispuffer (0,3 ml oder 1 ml für Membranpräparationen) aufgetaut, resuspendiert und bei 6°C mit einem Ultraschallstab 5-mal 5 Sekunden bei 1/10 Beschallung und 60% Leistung lysiert, anschließend wurden die Lysate 30 Min bei ~800 U/min geschüttelt (6°C). Nach Zentrifugation der Lysate bei 4°C zunächst für 50 Min bei 500 g und weitere 15 Minuten bei 10.000 g wurde als Überstand der Gesamtproteinextrakt gewonnen. Dieser wurde entweder für SDS-PAGE und Immunoblots verwendet, oder er wurde zur Anreicherung der mikrosomalen Membranfraktion weiterverarbeitet. Hierzu wurde der Gesamtproteinextrakt 60 Minuten in einer Ultrazentrifuge (TL-100 Ultrazentrifuge mit Rotor TL-100.4 von Beckman Instruments, Palo Alto, USA) bei 60.000 g, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 µl Lysispuffer resuspendiert, 5 µl hiervon wurden mit 10 µl Lysispuffer verdünnt und für die Proteinbestimmung verwendet.

Proteinbestimmung, abgewandelt nach Bradford (1976): 3 µl Gesamtproteinextrakt, verdünnte mikosomale Fraktion oder RSA-Standards in Lysispuffer wurden für 20 Minuten mit 150 µl Bradfordreagenz auf einer 96-fach Mikrotiter-Platte inkubiert. Die anschließende Messung der Farbreaktion erfolgte im MRX Mikrolesegerät (Dynex) bei 590 nm, die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit RSA-Standards quantifiziert.

Gesamtproteinextrakte wurden mit Lysispuffer auf 1 mg/ml Protein eingestellt und vor einer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Resuspendierte Membranproteine wurden ebenfalls vor einer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Mikrosomalen Fraktionen (20 µl, eisgekühlt) wurden erst direkt vor der elektrophoretischen Trennung mit 20 µl Lysispuffer, 4 % SDS, 80°C verdünnt, die Proteine 20 Minuten bei 40°C extrahiert und mit Lysispuffer, 2 % SDS, 40°C auf ~1 mg/ml Protein eingestellt.

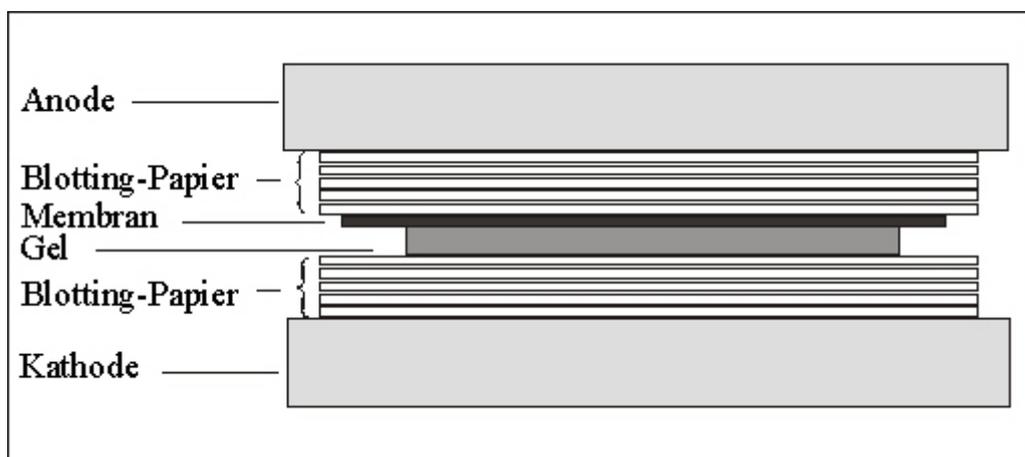
Bradfordreagenz:	100 mg Coomassie blue r-250 in 50 ml EtOH + 100 ml Phosphorsäure (85 %) mit A. d. auf 600 ml auffüllen, filtrieren + 100 ml Glycerol mit A. d. auf 1000 ml auffüllen
SDS-Probenlösung:	0,3 Vol. SDS, 20 % 0,3 Vol. $\beta$ -Mercaptoethanol 0,4 Vol. Glycerol, 80 % + etwas Bromphenolblau
Lysispuffer:	Tris, 50mM; DTE: 5 mM; GSH: 10 mM; KCl: 20 mM; EDTA: 2 mM; EGTA: 2 mM; PMSF: 1 mM; NaF: 4 mM; NaVO <sub>4</sub> : 4 mM; Saccharose: 15 %; Polyclar: 1 %; Aprotinin, bzw. Leupeptin: 10 mg/ml; Proteasen Inhibitor Cocktail: 1 Tablette/25 ml pH: 7,4 (KOH)
Lysispuffer, 4 % SDS:	100 mg SDS in 2,5 ml Lysispuffer
Lysispuffer, 2 % SDS:	1 ml Lysispuffer + 1 ml Lysispuffer, 4 % SDS

### 2.5.3 SDS-PAGE und Westernblots

30  $\mu$ l des Gesamtproteinextraktes (1 mg/ml) wurden mit 6  $\mu$ l SDS-Probenlösung für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, Membranproteine 20 Minuten bei 40°C. 1  $\mu$ l des Molekulargewicht Größenstandards (low-range, Bio-Rad) wurde mit 3  $\mu$ l SDS-Probenlösung und 16  $\mu$ l A.d. verdünnt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Hiervon wurden 10  $\mu$ l, bzw 1  $\mu$ l des Größenstandards, auf 13,5 %-, 15 %- oder 16,5 %-Gelen in Anlehnung an das Verfahren von Laemmli (1970) bei 110 V; 50 mA für 2 - 2.5 Stunden elektrophoretisch in Minigelsystemen (Biometra, Göttingen, oder Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) getrennt. Nach dem Lauf wurden die Gele markiert und konnten auf Nitrozellulose (Amersham-Pharmazia, UK, Buckinghamshire) transferiert werden.

Der Transfer auf Nitrozellulose-Membranen (high bond, Amersham-Pharmazia) erfolgte durch das "semi-dry"-Verfahren in einer Blotting-Apparatur (Renner, Darmstadt). Hierfür wurden auf der anodischen wie auf der kathodischen Seite jeweils 5 Lagen Blotting-Papier (Schleicher & Schuell) verwendet. Für die Kathode verwendetes Blotting-Papier wurde zuvor mit Kathodenpuffer durchtränkt, darauf folgt das Gel, welches zuvor für 5 Minuten in Anodenpuffer äquilibriert wurde. Direkt auf das Gel wurde die zuvor in Anodenpuffer getränkte Nitrozellulose-Membran plaziert, hierauf das in Anodenpuffer getränkten Blotting-Papier; den Abschluß bildete die Anode. Eine schematisierte Darstellung zeigt Abb. 1. Der

Elektrotransfer wurde bei  $1 \text{ mA/cm}^2$  und  $110 \text{ mV}$  für ca 2,5 Stunden durchgeführt. Zur Visualisierung der geblotteten Proteine wurde die Membran 20 Minuten bei leichter Bewegung in Fast Green Lösung inkubiert. Durch 3- bis 5-maliges Spülen mit A.d. wurde der Hintergrund entfärbt und das Proteinmuster anschließend mit einer Digitalkamera (Camedia E-10; Olympus, Tokyo, Japan) aufgenommen. Die Nitrozellulose-Membran wurde für 10 Minuten in  $0.2 \text{ M NaOH}$  und 3-maliges Waschen mit A.d. für 5 Minuten entfärbt, sowie die freien Proteinbindungsstellen mit Blockpuffer über Nacht im Kühlschrank abgesättigt. Die Blots standen danach für die Dekoration mit Antikörpern zur Verfügung.



**Abb. 1.** Schematisierte Darstellung der Blotting-Apparatur.

Die unteren 5 Lagen Blotting-Papier wurden vor Zusammenbau für 5 Minuten in Kathodenpuffer eingelegt, das Gel, die Nitrozellulose-Membran und die oberen 5 Lagen Blotting-Papier in Anodenpuffer. Negative Ladungen wandern hier von unten nach oben.

*Nachweis der Protein-Tyr-Phosphorylierung:* Primäre Antikörper ( $0,2 \mu\text{g/ml}$  in Blockpuffer; Klon py99; Santa Cruz) wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung mit der Nitrozellulose-Membran inkubiert. Nachfolgend wurde 4-mal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Sekundäre Antikörper (Anti-Maus-IgG, POD Konjugat; Santa Cruz) wurden  $1:5000$  in Blockpuffer verdünnt und mit der Nitrozellulose-Membran für 25 Min bei  $37^\circ\text{C}$  unter Bewegung inkubiert. Nachfolgend wurde 4-mal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und die gebundenen Antikörper über eine Luminol gekoppelte Peroxidase-Reaktion visualisiert.

*Nachweis der Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung:* Es wurde eine Kombination von Anti-Phospho-Ser und Anti-Phospho-Thr Antikörpern (Klon 16B4 und 14B3; beide von Calbiochem) verwendet (jeweils  $0,1 \mu\text{g/ml}$  in Blockpuffer). Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit beiden Antikörpern erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung. Nachfolgend wurde 4-mal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Sekundäre Antikörper wurden  $1:5.000$  (Anti-

Maus-IgG, POD Konjugat; Santa Cruz) bzw. 1:10.000 (Anti-Maus-IgM, POD Konjugat; CN-Biosciences) in Blockpuffer verdünnt. Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit beiden sekundären Antikörpern erfolgte unter Bewegung für 25 Minuten bei 37°C. Nachfolgend wurde 4-mal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und die gebundenen Antikörper über eine luminolgekoppelte Peroxidasereaktion visualisiert.

*Visualisierung der Antikörperbindung:* Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem ECL-System (NEN, Boston, USA). 8 ml Luminol-Reagenz wurden mit gleichem Volumen Verstärker-Reagenz vermischt (für jeden Versuch neu angesetzt) und die antikörperdekoriierte Nitrozellulose-Membran hiermit bei leichter Bewegung für 1 Minute bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde vorsichtig mit Zellstoff entfernt, die Nitrozellulose-Membran in Klarsichtfolie verpackt und auf einem Film (Kodak Biomax 1, EastmanKodak company, Rochester, USA) für 45 Minuten exponiert. Der Film wurde für 5 Minuten in gebrauchsfertiger Entwicklerlösung (GBX-Entwickler, EastmanKodak company) entwickelt und die Reaktion in A. d. gestoppt. Fixierung des Films erfolgte für 5 Minuten in gebrauchsfertiger Fixierlösung (GBX-Fixierer, EastmanKodak company), anschließend wurde mit A. d. gewaschen. Die belichteten und entwickelten Filme wurden mit einer digitalen Kamera photographiert.

*Wiederholte Antikörper-Reaktionen auf einer Nitrozellulose-Membran:* Um identische Western Blots mit verschiedenen primären Antikörpern zu testen, wurden die Antikörper der ersten Immunreaktion in "Stripping"-Puffer bei 50°C für 30 Minuten von der Membran entfernt. Nach 6-maligem waschen in 1x TBS-T und erneuter Blockierung (s.o.) stand die Nitrozellulose-Membran für eine weitere Immunreaktion zur Verfügung. Die Eignung des Verfahrens ist an Abb. 14 ersichtlich.

*Quantifizierung der Signale:* Um die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Immunoblots mit Proteinextrakten aus gleichbehandelten Zellsuspensionen zu verbessern, wurden die resultierenden relativen Signalstärken der Fast Green- bzw. Antikörper-Reaktionen der interessierenden Banden auf die (im Proteinnachweis und in Immunoblots detektierte) 30 kDa Bande des Molekulargewicht Größenstandards (Bio-Rad, Low-Range; 1 µl) bezogen. Unterschiede, die auf ungleiche Beladung des Gels, bzw. ungleiche Effizienz des Elektrotransfers beruhen, wurden korrigiert, indem die relativierten Meßwerte für Banden aus Immunoblots auf die entsprechenden Meßwerte für Banden der Proteindetektion bezogen wurden.

*Ermittlung der an Tyr-Resten phosphorylierten Proteine:* Bei Western Blots von Membranproteinen wurden auch bei ausschließlicher Verwendung des Zweitantikörpers starke Signale in fast allen Protein-Banden erhalten, die im Phospho-Tyr Nachweis positiv reagierten. Zur Erkennung und Quantifizierung der tatsächlich an Tyr-Resten phosphorylierten Protein-Banden wurde jeweils die auf unspezifischer Bindung beruhende Signalintensität subtrahiert.

Dazu wurde zuerst die Bindung des Zweitantikörpers und die resultierende Signalstärke gemessen und nach dessen Entfernung derselbe Blot in der "richtigen" Reihenfolge (zunächst Inkubation mit dem Phospho-Tyr-spezifischen Antikörper und nachfolgend mit dem Zweitantikörper) erneut detektiert. Vor der Differenzbildung zwischen dem Gesamtsignal und dem unspezifischen Signal wurde für jede Bande mit einem t-Test untersucht, ob zwischen diesen quantifizierten Signalen ein signifikanter Unterschied besteht ( $p < 0,05$ ). Typische Streuungsmaße für die Quantifizierung der entsprechenden Signale wurden mit einem Dot Blot von Membranproteinen erhalten, in denen diese entweder nur mit Zweitantikörper oder, nach Stripping Reaktion, zusätzlich mit Erstantikörper gemessen wurden. Es wurden nur solche Protein-Banden der Western Blots weiterbearbeitet, in denen ein signifikant höheres Signal bei zusätzlicher Verwendung des Erstantikörpers vorhanden war.

Zur Analyse löslicher Proteine war keine solche Korrektur erforderlich, da die untersuchten Protein-Banden nur in Anwesenheit des Phospho-Tyr-spezifischen Antikörpers zu einem Signal führten.

Verwendete Medien:

SDS-Lösung:

20 % SDS

Trenngelpuffer:

2,0 M Tris-HCl, pH 8,0

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Elektrodenpuffer:

0,38 M Glycin

0,05 M Tris, pH 8,7

Sammelgel:

0,14 Vol. Acrylamid/Bisacrylamid (30% / 0,8%)

0,25 Vol. Sammelgelpuffer

0,595 Vol. A. d.

0,005 Vol. SDS, 20 %

0,008 Vol. Ammoniumpersulfat, 10 %

0,002 Vol. TEMED

Trenngel, 13,5 %:

0,45 Vol. Acrylamid/Bisacrylamid (30% / 0,8%)

0,2 Vol. Trenngelpuffer

0,34 Vol. A. d.

0,005 Vol. SDS, 20 %

0,005 Vol. Ammoniumpersulfat, 10 %

0,001 Vol. TEMED

## Trenngel, 15 %:

0,5 Vol. Acrylamid/Bisacrylamid (30% / 0,8%)  
0,2 Vol. Trenngelpuffer  
0,39 Vol. A. d.  
0,005 Vol. SDS, 20 %  
0,005 Vol. Ammoniumpersulfat, 10 %  
0,001 Vol. TEMED

## Trenngel, 16,5 %:

0,55 Vol. Acrylamid/Bisacrylamid (30% / 0,8%)  
0,2 Vol. Trenngelpuffer  
0,24 Vol. A. d.  
0,005 Vol. SDS, 20 %  
0,005 Vol. Ammoniumpersulfat, 10 %  
0,001 Vol. TEMED

## Anodenpuffer:

0,3 M Tris  
20 % MeOH

## Kathodenpuffer:

25 mM Tris  
40 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure  
20 % MeOH

## TBS-T:

20 mM Tris  
650 mM NaCl  
0,1 % Tween 20; pH 7,6

## Blockpuffer:

1 % RSA in TBS-T

## Fast green Lösung:

0,2 % fast green  
1,0 % Essigsäure  
50 % MeOH

## Gebrauchsfertige Entwicklerlösung:

GBX-Entwicklerflüssigkeit 1:4,6 in A.d. verdünnt

## Gebrauchsfertige Fixierlösung:

GBX-Fixierflüssigkeit 1:4,6 in A.d. verdünnt

### 2.5.4 Bearbeitung der digitalisierten Bilder

Die digitalisierten Bilder der Fast Green Proteindetektion und der belichteten Filme wurden in Corel PhotoPaint nachbearbeitet. Zu quantifizierende Bilder erhielten eine leichte Kontrastverstärkung durch eine ca 20 %-ige Verstärkung der Intensität und eine ca. 20 %-ige Verminderung der Helligkeit. Abgebildete Western Blots wurden im Helligkeit/Kontrast/Intensität-Menü bis zur Erlangung maximaler Signal-Rausch-Verhältnisse bearbeitet. Quantifizierung von Protein-Banden erfolgte in Gelscan 5.0

im “valey-to-valey” Modus.

In Fällen, in denen Banden nicht gut genug voneinander getrennt waren, um sie einzeln zu quantifizieren, wurden diese gemeinsam gemessen.

## 2.6 Statistische Analysen

Für vergleichende statistische Analysen wurden gepaarte t-Test, ungepaarte t-Tests und ANOVA (“analysis of variance”) durchgeführt. Diese Methoden machen eine Aussage ob voneinander verschiedene Verteilungen von Meßwerten zweier oder mehrerer Varianten auf einem statistischem Rauschen beruhen. Als Maß hierfür dient die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ , “probability”). Oft wird bei  $p < 0,05$  (5 %) von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen. Manchmal wird diese Ausschlußgrenze auch auf  $p < 0,01$  oder  $p < 0,1$  festgelegt.

In einem t-Test werden zwei Gruppen miteinander verglichen. In der ungepaarten Variante wird überprüft, ob die Mittelwerte beider Gruppen in Relation zur Schwankungsbreite der Werte-Verteilungen hinreichend weit voneinander entfernt sind, um den Unterschied als signifikant zu bezeichnen.

Bei einem gepaartem t-Test werden die Differenzen korrespondierender Wertepaare zweier Gruppen untersucht, von denen eine Gruppe eine zusätzliche Behandlung erfahren hat. Ist der Mittelwert der Differenzen unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite der Werte-Verteilung dieser Differenzen hinreichend weit von “0” verschieden, liegt zwischen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied vor. Werden mehrere Gruppen mit t-Tests analysiert, steigt die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Resultate, da bei 20 t-Tests,  $p < 0,05$ , mit einer deutlich über 5 % liegenden Wahrscheinlichkeit von zumindest einem falsch positiven Resultat ausgegangen werden kann. Dieser Fehler wird durch ANOVA korrigiert. Da hierbei aber nur ermittelt wird, ob zwischen den Gruppen ein Unterschied besteht, nicht aber zwischen welchen, muß noch ein nachgeschalteter Test durchgeführt werden. Bei der Methode nach Tukey werden Signifikanzniveaus für alle signifikant unterschiedlichen Wertepaare angegeben.

## 2.7 Verwendete Software

Alle Graphiken und statistischen Analysen wurden in graphpad prism 3.0 (graphpad software) angefertigt, notwendige Berechnungen wurden zuvor in Quattropro 7 (Corel Corporation) durchgeführt. Bildmaterial wurde in Photopaint 8 bearbeitet und gegebenenfalls mit Gelscan 5.0 (Laboffice) gemessen. Für die Darstellung von Abbildungen wurde Coreldraw 8 (Corel) verwendet.

### 3 Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellsuspensionen reagieren auf kurzzeitigen Kontakt mit Hefe-Elicitor (Glykoprotein-Präparation aus Bäckerhefe) mit einer Überproduktion von Benzophenanthridin-Alkaloiden (Blechert et al., 1995; Roos et al., 1998 und 1999). Dieser Zellantwort geht eine transiente Ansäuerung des Zytoplasmas voraus, welche durch einen Efflux vakuolärer Protonen zustandekommt. Dieses Ereignis findet bereits wenige Minuten nach Elicitorkontakt statt und ist ein notwendiger Schritt der Signalkette (Roos et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung von Protein-Phosphorylierungen für diesen Signalweg untersucht. Protein-Phosphorylierungen können an der Auslösung transienter pH-Änderungen beteiligt sein (Matthieu et al., 1996); ebenso können pH-Signale über die die Aktivierung von Protein-Kinasen weitergeleitet werden (Lebrun-Garcia et al., 2002; Tena und Renaudin, 1998; Schaller und Oecking, 1999). Schwerpunkte der im folgenden vorgestellten Arbeiten waren einerseits die Effekte von Protein-Kinase- und -Phosphatase-Inhibitoren auf die Alkaloidproduktion und andererseits die Verfolgung der Protein-Phosphorylierung während des Signaltransfers mit immunologischen Methoden.

#### 3.1 Alkaloidbiosynthese unter dem Einfluß verschiedener Effektoren in *E. californica*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Alkaloidbiosynthese erstmals in miniaturisierten Suspensionskulturen in filtrierbaren 96-fach Mikrotiter-Platten untersucht. Das 96-er Format ermöglicht einen hohen Probandendurchsatz und damit eine verbesserte statistische Absicherung der Ergebnisse sowie eine Kostenersparnis beim Einsatz teurer Effektoren, da für eine einzelne Mini-Kultur nur ein Suspensionsvolumen von 120 µl benötigt wird.

Eine Maßstabsverkleinerung zur Untersuchung des Sekundärstoffwechsel pflanzlicher Zellsuspensionen gelang bisher nur bis zum 24-er Mikrotiter-Format (Haider et al., 2000). Die Vorteile hinsichtlich Probandendurchsatz und Volumenminimierung können jedoch durch Verwendung des 96-er Formats wesentlich gesteigert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Verfahren zur Untersuchung der Alkaloidbiosynthese in Mikrotiter-Platten dieses Formats entwickelt und zur Untersuchung des Signaltransfers eingesetzt. Da für verschiedene Experimente ein Austausch des Mediums während der Kultivationszeit erforderlich ist, wurden Mikrotiter-Platten mit Filterböden verwendet, auf diese Weise können Medien durch Unterdruck abgesaugt werden.

### 3.1.1 Entwicklung eines Testsystems auf filtrierbaren 96-Well Mikrotiter-Platten

Bei der Etablierung eines Mini-Kultur-Systems müssen die spezifischen Eigenschaften kleiner Kulturvolumina (kleines Oberflächen/Volumen-Verhältnis, spezifische Rand-Effekte, Gasaustausch, geringe Zellbewegung etc.) soweit optimiert werden, daß sie keinen limitierenden Einfluß auf das Versuchsergebnis gewinnen.

Ausgangsmaterial für die Entwicklung des Mini-Kultur-Systems waren einerseits kommerziell erhältliche filtrierfähige 96-er Mikrotiter-Platten aus Kunststoff und andererseits zwei speziell angefertigte 96-er Systeme aus V2-A Stahl. In jeder Minikultur, d.h. in der Zellsuspension jedes einzelnen Kompartiments wurden der Alkaloidgehalt (fluorimetrisch) und die Zellmenge (über den DNA-Gehalt, fluorimetrisch) bestimmt (s. 2.4.4). Als Vergleichsmaßstab dienten die entsprechenden Daten aus Zellsuspensionen in 5 ml-Batch-Kulturen.

Das angestrebte Kultivationsystem sollte

- eine möglichst einfache Quantifizierung von Alkaloidbildung und Zellzahl
  - die Auslösung der Alkaloidbildung und eine ca 20-stündige Kultivationsphase sowie
  - einen Medienwechsel während des Experiments
- ermöglichen. Kultur- und Extraktionsmedien sollten sich durch einfaches Absaugen wieder auswaschen lassen.

Zunächst wurde versucht, Mini-Kulturen auf kommerziell erhältlichen Mikrotiter-Platten aus Kunststoff zu etablieren. Zwar ließen die kultivierten Suspensionen eine elicitorabhängige Aktivierung der Alkaloidbiosynthese erkennen, meist konnte nach Elicitorkontakt jedoch nur ein geringer Anstieg der Alkaloidbiosynthese gegenüber Kontrollzellen beobachtet werden.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht war die Alkaloidbildung der Kontrollzellen gegenüber den zum Vergleich untersuchten Batch-Kulturen erhöht. Insgesamt war die verbleibende, auf den Hefe-Elicitor zurückführbare Reaktivität zu gering, um darauf Experimente zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese aufzubauen.

Im Rahmen einer parallel durchgeführten Diplomarbeit wurde gezeigt, daß das Plastikmaterial verschiedener kommerzieller Mikrotiter-Filtrationssysteme (Barex/TiO<sub>2</sub> und Polystyrol, mit Durapore Filter) auf Zellsuspensionen in Erlenmeyer-Kolben einen ähnlichen Effekt ausüben, d.h. verminderte Elicitorwirkung bei erhöhtem Kontrollniveau der Alkaloidbildung (Leschke, 1997). Dieser Effekt konnte weder durch Auswaschen noch durch Beschichtung mit RSA eliminiert werden. Auch in anderen Arbeitsgruppen wurden toxische Effekte auf den pflanzlichen Stoffwechsel durch kommerziell erhältliche Filtrationssysteme beobachtet (E. Weiler, pers. Kommunikation).

Alkaloidgehalte [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ TM] von Mini-Kulturen auf kommerziell erhältlichen Filtrationssystemen im Vergleich mit Batch-Kulturen				
Versuch	Mini-Kulturen		Batch-Kulturen	
	Kontrolle	Elicitor	Kontrolle	Elicitor
I)	0,32 (0,05)	0,26 (0,03)	0,23 (0,03)	0,64 (0,11)
II)	0,44 (0,24)	0,59 (0,08)	0,29 (0,07)	0,96 (0,14)
III)	0,21 (0,02)	0,26 (0,05)	0,25 (0,03)	0,89 (0,15)

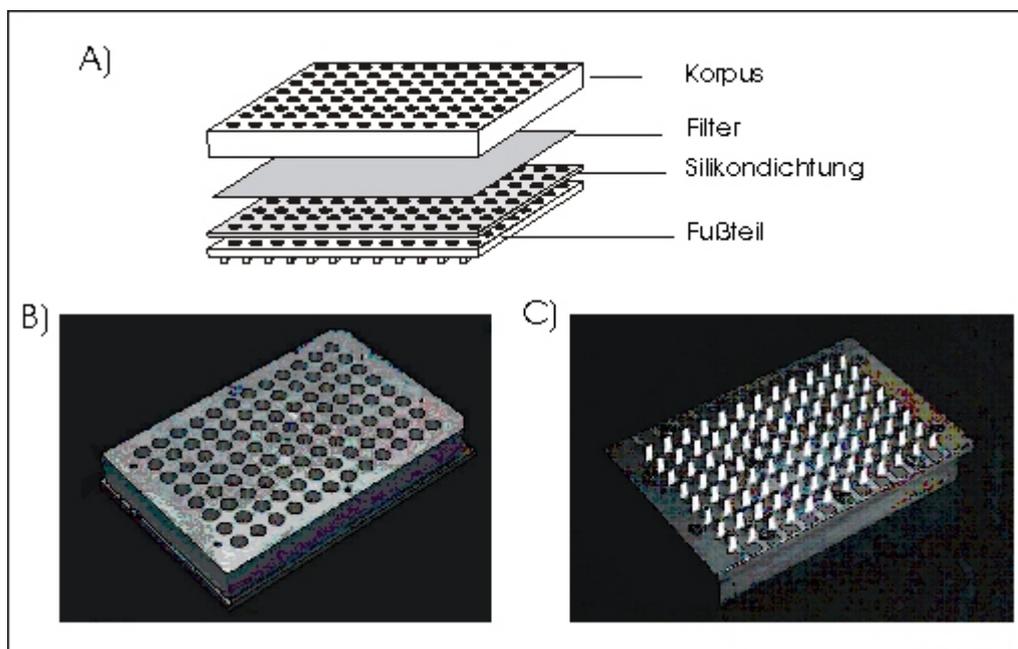
**Tab. 1.** Einfluß eines kommerziellen Mikrotiter-Filtrationssystems aus Kunststoff auf die Alkaloidbiosynthese in *E. californica*

Filtrierte und in LS-P resuspendierte Zellsuspensionen wurden zu 100  $\mu\text{l}$  je Kompartiment bzw. 5 ml je Erlenmeyer-Kolben verteilt; und wie in 2.4.3 bzw. 2.3.2 für Mini- sowie Batch-Kulturen beschrieben mit 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Elicitor behandelt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen entweder auf 96-er Mikrotiter-Platten oder in Erlenmeyer-Kolben für 20 Stunden kultiviert, die Alkaloidquantifizierung erfolgte im 96-er Maßstab; s. 2.4.4. I, II, III: Spezifische Alkaloidgehalte als Mittelwerte mit Standardabweichungen (in Klammern; n = 6 bis 8) von Mini- und Standard-Kulturen aus drei unterschiedlichen Experimenten.

Um dennoch die Vorzüge von Mini-Kulturen nutzen zu können, wurde eine Mikrotiter-Platte aus V2-A Stahl konstruiert und in der Werkstatt speziell angefertigt. V2-A Stahl gilt als äußerst beständiges Material und hat sich für biologische Anwendungen bewährt.

Eine Darstellung des Ensembles zeigt Abb. 2. Diese Anfertigung erlaubt die Verwendung verschiedener Filtermaterialien. Da für den gesamten analytischen Teil mehrere Wasch-, Bindungs-, und Extraktionsschritte notwendig sind, müssen die verwendeten Filtermaterialien dauerhaft belastbar sein. Durapore-Filter neigten im Verlauf der Quantifizierungen zunehmend zu Undichtigkeiten, glasfaserverstärkte Teflon-Filter hielten dagegen der mechanischen Beanspruchung nicht stand (nicht dargestellt). Isopore-Filter erwiesen sich als die erste Wahl und zeigten, ebenso wie Teflon-Filter, auch auf die Alkaloidproduktion von *E. californica* keine ungünstigen Einwirkungen.

Mit dieser Anordnung wurden die toxischen Effekte des Plastikmaterials nicht beobachtet. Ein typisches Ergebnis bei Verwendung von 120  $\mu\text{l}$  Zellsuspension war eine Erhöhung des Alkaloidgehaltes nach Elicitorgabe um ca. 70 % gegenüber Kontrollzellen; in Batch-Kulturen aus der selben Kultivationscharge wurde dagegen eine Verdoppelung des Alkaloidgehaltes beobachtet (nicht dargestellt). Wegen der leicht verminderten Reaktivität nach Elicitorkontakt war eine Optimierung der Mini-Kulturen erforderlich (s. 3.1.2.1).



**Abb. 2.** Filtrierfähige, mehrteilige Mikrotiter-Platte aus V-2 A Stahl.

A) Schematische Darstellung des Ensembles, B) Ansicht von oben und C) Ansicht von unten auf die zusammengebaute Platte. Korpus und Fußteil enthalten 96 Bohrungen, die sich im Fußteil stark verjüngen. Ein zwischen diesen Teilen liegender Filter bildet den Boden der Kompartimente. Zusätzlich wird eine Silikondichtung mit Aussparungen für die Kompartimente zwischen Fußteil und Filter eingelegt. Das Ensemble wird durch zwölf Schrauben zusammengehalten.

### 3.1.2 Alkaloidbiosynthese in 96-er Mini-Kulturen

#### 3.1.2.1 Optimierung der Kulturbedingungen

Erste Optimierungsschritte zur Entwicklung von Mini-Kulturen wurden ohne Wechsel des Kulturmediums durchgeführt, indem Zellsuspensionen (mit oder ohne Elicitor behandelt) in die Kompartimente pipettiert wurden. Der Einfluß verschiedener Parameter auf die Alkaloidbiosynthese der Mini-Kulturen wurde mit Batch-Kulturen verglichen.

Eine Kultivation der Mini-Kulturen auf Schüttelmaschinen erwies sich als nicht sinnvoll, da durch Schüttelgeschwindigkeiten, welche die Sedimentation der Zellen verhinderten, eine Alkaloidbiosynthese auch in Abwesenheit des Elicitors ausgelöst wurde (nicht dargestellt).

Um ein Absetzen der Zellen auch in nichtbewegten Zellsuspensionen zu verhindern, wurde durch Zusatz von Ficoll oder Saccharose die Dichte des Mediums erhöht. Zur Vermeidung hyperosmotischer Bedingungen durch erhöhte Saccharose-Konzentrationen wurde ein 25 %-iges Nährmedium verwendet (d.h. im osmotischem Druck um 137 mOsm auf 46 mOsm reduziert; 0,75 % Saccharose).

Die Zugabe von 5% Ficoll zum Nährmedium führte jedoch nicht zu einer erhöhten Reaktivität auf den Hefe-Elicitor, sondern auch zu erhöhten Alkaloidgehalten in Kontrollzellen (nicht dargestellt). Dagegen führte der Zusatz von Saccharose zu einer ähnlichen Reaktion auf Elicitorgaben wie in Batchkulturen (Tab. 2).

Einfluß steigender Saccharose-Konzentration auf die Alkaloidgehalte [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ TM] von Mini-Kulturen und Batch-Kulturen .					
Saccharose-Zusatz	Osmolarität	Mini-Kulturen (je 120 $\mu\text{l}$ )		Batch-Kulturen (je 5 ml)	
		Kontrolle	Elicitor	Kontrolle	Elicitor
0,0 %	45,8 mOsm	0,39 (0,04)	0,45 (0,03)	0,28 (0,02)	0,41 (0,03)
1,5 %	89,6 mOsm	0,33 (0,04)	0,50 (0,03)	0,28 (0,03)	0,47 (0,02)
4,0 %	162,6 mOsm	0,26 (0,02)	0,46 (0,03)	0,25 (0,01)	0,48 (0,04)
4,5 %	177,2 mOsm	0,34 (0,05)	0,66 (0,07)	0,23 (0,02)	0,58 (0,02)

**Tab. 2.** Auslösung der Alkaloidbiosynthese nach Elicitorkontakt und Einfluß der Saccharose-Konzentration.

Zellsuspensionen wurden in 25 % LS-P mit unterschiedlichen Saccharose-Konzentrationen resuspendiert, und wie in 2.3.2 beschrieben mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Elicitor behandelt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen entweder auf 96-er Mikrotiter-Platten oder in Erlenmeyer-Kolben für 20 Stunden kultiviert, die Alkaloidquantifizierung erfolgte im 96-er Maßstab; s. 2.4.4. Dargestellt sind Alkaloidgehalte als Mittelwerte mit Standardabweichungen (in Klammern; n = 6 bis 8)

Die positive Wirkung der um mehrere Prozent erhöhten Saccharosekonzentration kann auf der Erhöhung der Dichte des Mediums, des osmotischen Drucks oder einem verbesserten Angebot an C-Quellen beruhen. Um den entscheidenden Einflußfaktor zu ermitteln, wurde der Einfluß der Saccharose-Konzentration auch in Batch-Kulturen überprüft.

Die Ergebnisse in Tab. 2 zeigen, daß eine Erhöhung der Saccharose-Konzentrationen um 1,5 bis 4,5 % (entsprechend osmotischen Drucken von ca 90 - 180 mOsm im Medium) eine elicitorabhängige Alkaloid-Biosynthese in Mini-Kulturen erlaubt. Sowohl niedrige als auch hohe Saccharose-Konzentrationen verursachen eine Erhöhung der Alkaloidbildung ohne Elicitorkontakt. Bei einer Zugabe von 4 % Saccharosegehalt zeigen Mini-Kulturen die relativ geringsten Alkaloidgehalte nach Kontrollbehandlung sowie einen deutlichen Anstieg nach Elicitorkontakt. Die Alkaloidgehalte entsprechen unter diesen Bedingungen am besten denen von gleichbehandelten Batch-Kulturen (s. Tab. 2).

Die durch den Saccharose-Zusatz bedingten Erhöhungen der Osmolarität bewegen sich im Rahmen des osmotischen Druckes der Nährlösung; ein Wechsel von Nährmedien in einem Verdünnungsbereich von 25 % bis 100 % löst keinen erkennbaren Anstieg der Alkaloidbildung aus.

Die limitierende Bedeutung der Saccharoseversorgung für die Alkaloidbiosynthese wurde prinzipiell bereits von Leschke (1997) festgestellt. Für alle weiteren Experimente diente deshalb 25 % LS-P mit zusätzlich 4 % Saccharose als Kultivationsmedium für Minikulturen.

### **3.1.2.2 Bedeutung von Suspensionsvolumen und Zelldichte für die Alkaloidbiosynthese in Mini-Kulturen**

Aufbauend auf den bisherigen Resultaten wurde das System weiter optimiert, um einen Austausch von Kultur- bzw. Extraktionsmedien zu ermöglichen.

Um ein Absaugen des Mediums ohne wesentliche mechanische Beanspruchung der Zellen zu erreichen, mußte das zunächst hydrophobe Filtermaterial Isopore vor der Verwendung durch kurzen Kontakt mit Methanol oder 0,001 % Tween-20 hydrophilisiert werden. Allerdings neigten die so vorbehandelten Filter während einer 20-stündigen Kultivation mit Mini-Kulturen (120 µl) zu Undichtigkeiten, welche zu ungleichen Kulturbedingungen in den einzelnen Kompartimenten führten. Nur in relativ wenigen Mini-Kulturen fand eine Alkaloidbildung statt, was auf unzureichende Nährstoffversorgung und/oder Gasaustausch nach dem Medienwechsel hinweist. Mikroskopische Beobachtungen zeigten, daß offenbar viele der einmal abgesaugten Zellen am Boden hafteten und nicht mehr resuspendiert werden konnten (nicht dargestellt). Dies konnte auch durch den Einsatz eines Vibrationsschüttlers nicht grundsätzlich verbessert werden: zur vollständigen Resuspension war ein Energieeintrag erforderlich, der die Alkaloidbiosynthese bereits ohne vorherigen Elicitorkontakt auslöste.

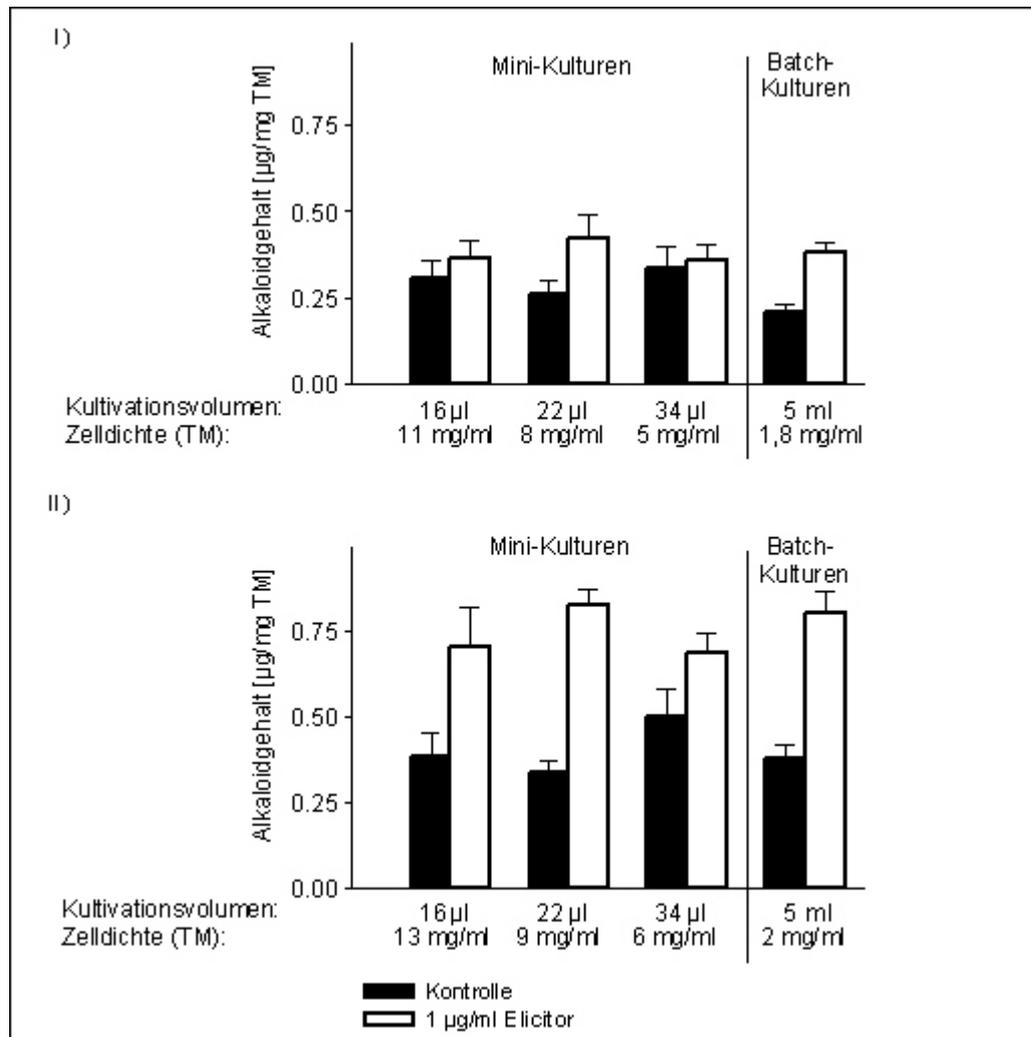
Nach zahlreichen weiteren negativen Tests (u.a. durch Einsatz von Füllkörpern, senkrechter Orientierung der Mikrotiter-Platte auf einem Horizontalschüttler oder Versuche, die Zellen durch schwingvolle Zugabe des Nährmediums zu resuspendieren) erwies sich die Verminderung des Kultivationsvolumens auf einen Optimalwert als die Methode der Wahl. Hierbei wurde die Flüssigkeitssäule über den Zellen minimiert und auf Schüttelbewegungen gänzlich verzichtet. Damit wurde zugleich die Gefahr des Auslaufens über die 20-stündige Kultivationsdauer beseitigt. Wegen der kurzen Diffusionswege erschien es möglich, den Gasaustausch auch in ruhenden Zellen zu gewährleisten. Um ein Austrocknen der Mini-Kulturen unter diesen Bedingungen zu vermeiden, wurden die Mikrotiter-Platten mit den Mini-Kulturen in einem Gefäß kultiviert, dessen Bodenbereich mit Wasser befüllt war.

Aus Abb. 3 geht hervor, daß bei einer Trockenmasse von ungefähr 0,2 mg Zellen ein Kultivationsvolumen von 22 µl eine optimale Elicitierung der Alkaloidbildung ermöglicht. Ein geringeres Volumen (16 µl; höhere Zelldichten) wird dabei eher toleriert als ein höheres Volumen (34 µl, niedrigere Zelldichten).

Eine Konsequenz des verminderten Kultivationsvolumens ist die sehr hohe Zelldichte in den Mini-Kulturen, d.h. für die gleiche Zellzahl stehen im Vergleich zu Batch-Kulturen nur ca. 1/5 der Flüssigkeit zur Verfügung. Derartige Suspensionen enthalten praktisch keine unabhängig von den Zellen bewegte Flüssigkeit mehr.

Solche Bedingungen gewährleisten offenbar bei einem optimalen Verhältnis von

Zellzahl und Suspensionsvolumen noch eine ausreichende Wasser- und Nährstoffversorgung. Dies erscheint plausibel, da Zellen in den Geweben einer höherer Pflanze in einem ähnlich engen Kontakt stehen.



**Abb. 3.** Elicitorausgelöste Alkaloidbiosynthese: Einfluß von Kultivationsvolumen und Zelldichte. 100 µl Zellsuspension je Kompartiment wurden wie in 2.4.3 beschrieben mit 1 µg/ml Elicitor oder als Kontroll suspension behandelt und in den angegebenen Volumina Nährmedium für Mini-Kulturen (25 % LS-P + 4 % Saccharose) resuspendiert. Zellen der selben Ausgangssuspension sind zum Vergleich als Batch-Kulturen behandelt worden; s. 2.3.2. Die Mikrotiter-Platten mit den Mini-Kulturen wurden dann für 20 Stunden in wassergesättigter Atmosphäre bei 24 °C kultiviert; s. 2.4.1. Zur Quantifizierung der Alkaloide wurde das Suspensionsvolumen durch Zugabe von Nährmedium wieder auf 120 µl erhöht und mit 120 µl 36 mM Essigsäure in EtOH extrahiert; die Zellquantifizierung erfolgte mit Propidium-Jodid (s. 2.4.4). I) Ausgangssuspension mit geringer Biosynthesekapazität, II) Ausgangssuspension mit hoher Biosynthesekapazität. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen, n = 7 bis 8.

### 3.1.3 Aktivierung der Alkaloidbiosynthese mit weiteren Effektoren

In Batch-Kulturen kann eine Alkaloidbiosynthese auch durch andere Signale als den Hefe-Elicitor ausgelöst werden. Hierzu gehören u.a. eine experimentelle transiente Ansäuerung des Zytoplasmas (etwa durch kurzzeitige Inkubation mit Pivalinsäure, Roos et al., 1998) oder eine Behandlung mit Methyl-Jasmonat (Blechert et al., 1995; Haider et al., 2000). Beide Varianten wurden zu vergleichenden Tests der Reaktionsfähigkeit von Mini-Kulturen und Batch-Kulturen eingesetzt.

Die Auslösung der Alkaloidbiosynthese durch transiente Ansäuerung ist für den späteren Einsatz des Mini-Kultur-Systems von besonderer Bedeutung, da der pH-shift einen Zwischenschritt der Signalkette darstellt und damit unterschieden werden kann, ob andere Signalereignisse vor oder nach diesem pH-shift ablaufen (s. 3.1.4.1).

Eine kurze Behandlung mit Pivalinsäure führt auch in Mini-Kulturen zu einer Erhöhung der Alkaloidbiosynthese. Diese erreicht bei einer Konzentration von 4 mM Pivalinsäure ungefähr 2/3 der durch Elicitorkontakt bewirkten Produktion (Abb. 4).

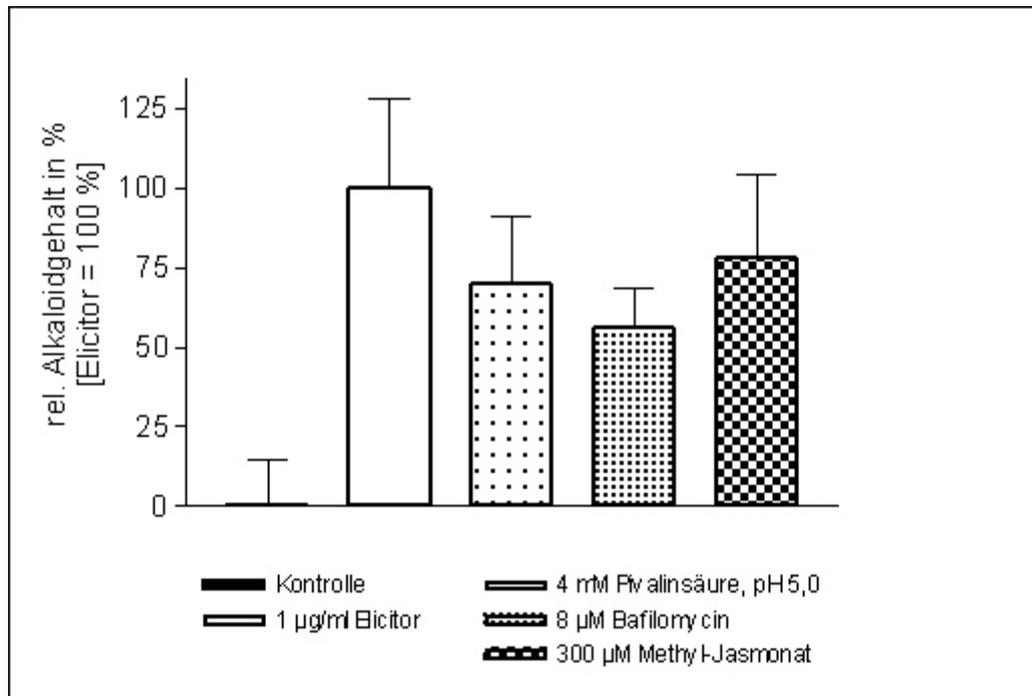
Mit Hilfe von Bafilomycin, einem Inhibitor der vakuolären  $H^+$ -ATPase, (Bowman et al., 1988; Dröse et al., 1993; Maeshima, 2001) kann ein Efflux vakuolärer Protonen ins Zytosol ausgelöst und damit auch die Herkunft der Protonen den natürlichen Verhältnissen angenähert werden (Roos et al., 1998). Dieser Inhibitor kann wegen des hohen Preises sinnvollerweise nur in Mini-Kulturen eingesetzt werden.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht, führt die Inhibierung der vakuolären  $H^+$ -ATPase durch 8  $\mu$ M Bafilomycin tatsächlich zu einer Erhöhung des Alkaloidgehaltes gegenüber Kontrollzellen. Diese Erhöhung ist mit der durch Pivalinsäure ausgelösten Alkaloidbiosynthese (Influx externer Protonen) vergleichbar.

Ebenso führt eine Behandlung mit Methyl-Jasmonat zu einer Erhöhung der Alkaloidbiosynthese in Mini-Kulturen, wie Abb. 4 zu entnehmen ist.

Diese Resultate belegen, daß in Mini-Kulturen die Alkaloidbiosynthese durch die gleichen Effektoren aktiviert und untersucht werden kann wie in Batch-Kulturen. Die Reaktionen von Mini-Kulturen auf diese Effektoren entsprechen auch quantitativ denjenigen von Batch-Kulturen (Blechert et al., 1995; Roos et al., 1998; Färber et al., 2003). Somit kann die Alkaloidbiosynthese in Mini-Kulturen:

- 1. nach Elicitorkontakt mit der Aktivierung des vollständigen Signalweges
- 2. nach Behandlung mit Pivalinsäure oder Bafilomycin durch Aktivierung eines verkürzten Signalweges, ausgehend von einer zytoplasmatischen Ansäuerung
- 3. durch Methyl-Jasmonat auf einem von pH-shifts unabhängigen Signalweg ausgelöst werden.



**Abb. 4.** Auslösung der Alkaloidbiosynthese durch verschiedene Effektoren.

100 µl vorbehandelte Zellsuspension je Kompartiment wurden wie in 2.4.3 beschrieben mit 1 µg/ml Elicitor, 4 mM Pivalinsäure (pH 5,0), 8 µM Bafilomycin, 300 µM Methyl-Jasmonat oder als Kontroll suspension behandelt und in 12 µl Nährmedium für Mini-Kulturen (25 % LS-P + 4 % Saccharose) resuspendiert. Bei Versuchen mit Pivalinsäure, Bafilomycin sowie Methyl-Jasmonat erhielten die Kontrollen 4 mM Zitronensäure (pH 5), 0,5 % DMSO bzw. 0,03 % DMSO, respektive. Nach weiteren 20 Stunden Kultivierung in wassergesättigter Atmosphäre (s. 2.4.1) wurden die Alkaloidgehalte bestimmt; s. 2.4.4. Diese sind auf die Differenz zwischen Kontrollzellen und elicitorbehandelten Zellen skaliert (= 100 %) und als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt (n ≥ 19).

Abschließend läßt sich feststellen, daß mit der Etablierung von Mini-Kulturen in 96-er Mikrotiter-Platten ein experimenteller Fortschritt erreicht wurde, da sie nicht nur die Auslösung der Alkaloidbiosynthese und deren Quantifizierung, sondern auch den Austausch des Außenmediums und damit die transiente Einwirkung von Effektoren und Inhibitoren potenzieller Signalprozesse für einen definierten Zeitraum ermöglichen. Dabei wurde erstmals gezeigt, daß die Nährstoffversorgung und der Gasaustausch von Suspensions-Kulturen bei optimaler Feuchtigkeitzufuhr auch ohne Bewegung in einem Nährmedium in einem für die Alkaloidbiosynthese erforderlichem Umfang aufrechterhalten werden kann.

### 3.1.4 Wirkungen von Hemmstoffen der Protein-Phosphorylierung auf die Alkaloidbiosynthese von Mini-Kulturen

Wie schon in 1.3.2.5 dargestellt, sind Änderungen des Phosphorylierungszustandes von Signalproteinen essentielle Elemente des Informationstransfers in vielen Signalketten und deshalb auch bei der Elicitierung der Alkaloidbiosynthese zu erwarten. Um Anhaltspunkte für die Position von Protein-Phosphorylierungen innerhalb der elicitorausgelösten Signalkette zur Alkaloidbiosynthese zu finden, wurden zunächst die Effekte verschiedener Protein-Kinase- oder -Phosphatase-Inhibitoren untersucht.

#### 3.1.4.1 Effektoren der Protein-Tyr-Phosphorylierung

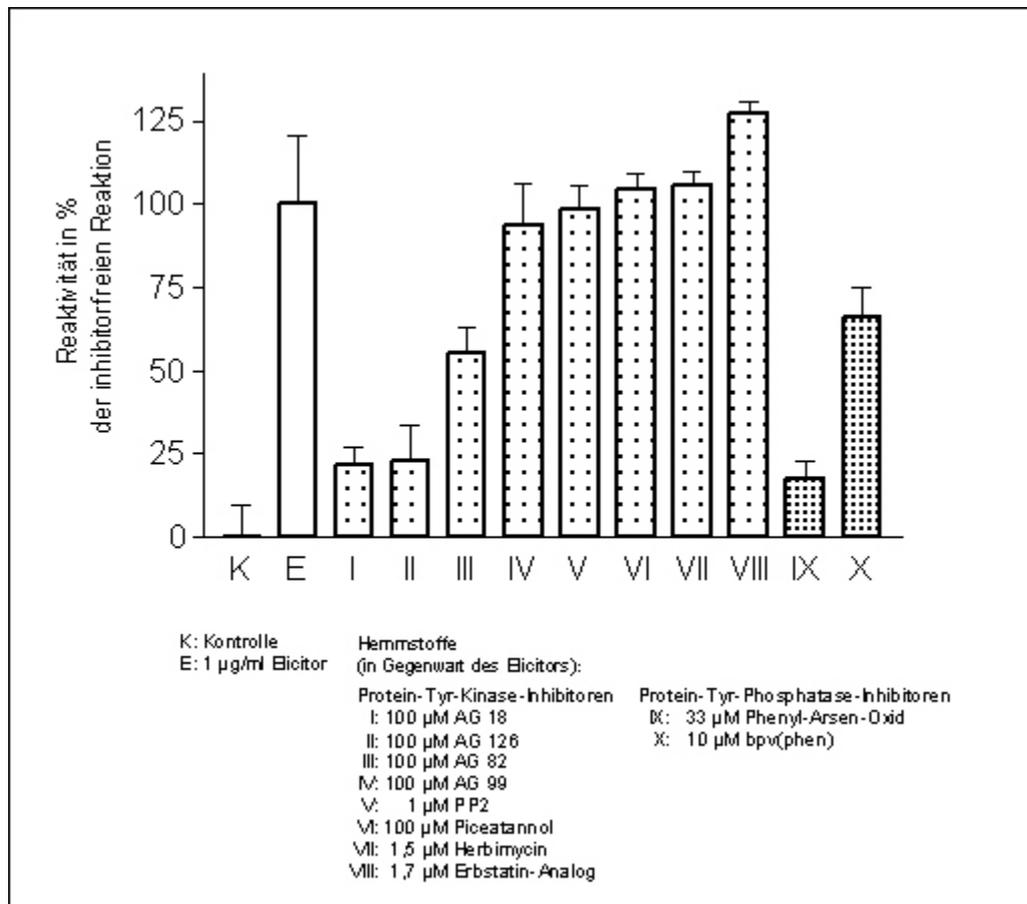
Zur Prüfung auf Protein-Tyr-Phosphorylierungen wurden Mini-Kulturen 5 Minuten vor Elicitorkontakt mit Inhibitoren von Protein-Tyr-Kinasen oder -Phosphatasen vorbehandelt und die anschließende Alkaloidproduktion gemessen.

Wie aus Abb. 5 hervorgeht, sind die Tyrphostine AG 18, AG 126 und AG 82 potente Inhibitoren des Elicitor-Effekts auf die Alkaloidbildung, während z.B. Herbimycin, ein Hemmstoff des oxidative burst in Soja (Rajasekhar et al., 1999), in unserer Zellkultur keine Veränderung der Alkaloidbiosynthese nach Elicitorkontakt bewirkt. Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen entsprechen ungefähr denjenigen, für die in anderen pflanzlichen Zellsuspensionen - sofern bisher verwendet - inhibierende Effekte beschrieben worden sind (Barizza et al., 1999; Rajasekhar et al., 1999).

Die gleichgerichteten Wirkungen von Protein-Kinase- und -Phosphatase-Inhibitoren (s. Abb. 5) lassen vermuten, daß beide Enzymklassen für den elicitorausgelösten Signaltransfer benötigt werden.

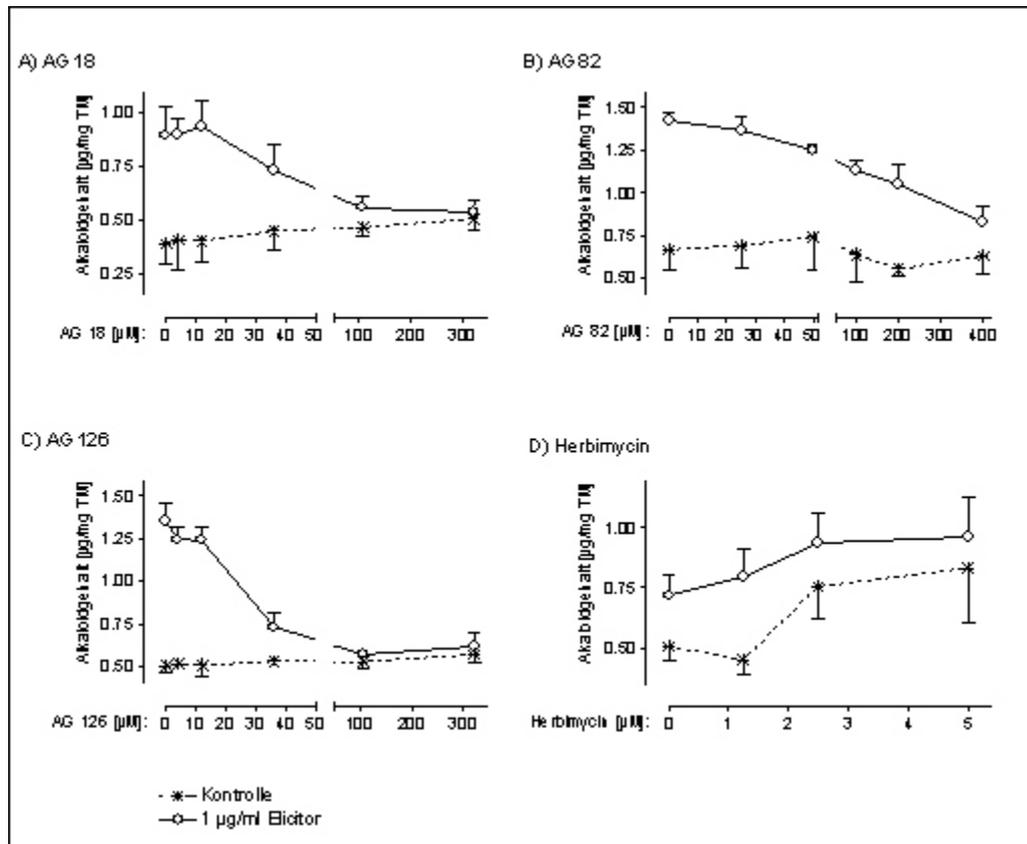
Die Effekte der Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren AG 18, AG 82, AG 126 und Herbimycin wurden im folgenden genauer charakterisiert. Zur Feststellung der Konzentrationsabhängigkeit ihrer Wirkung wurden diese Verbindungen den Mini-Kulturen 5 Minuten vor Elicitorkontakt zugesetzt und nach 1 Stunde zusammen mit dem Hefe-Elicitor wieder ausgewaschen.

Aus Abb. 6 ist ersichtlich, daß Tyrphostine trotz ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten (s. 7.3; Abb. 26) deutliche Unterschiede in der inhibitorischen Potenz aufweisen, wie die zur halbmaximalen Hemmung notwendigen Konzentrationen (ca. 100  $\mu\text{M}$  bei AG 82 und 20 bis 40  $\mu\text{M}$  bei AG 18 und AG 126), aber auch die in Abb. 5 gezeigte Wirkungslosigkeit von AG 99 auf die elicitorausgelöste Zellantwort zeigen. Herbimycin führt dagegen bei Konzentrationen bis 5  $\mu\text{M}$  nicht zu einer Unterbindung der Alkaloidbiosynthese, sondern zu deren Aktivierung (Abb. 6D). Höhere Konzentrationen an Herbimycin wurden nicht verwendet, da für diesen Inhibitor in Soja-Zellsuspensionen ein  $\text{IC}_{50}$  Wert von 0,84  $\mu\text{M}$  ermittelt wurde (Hemmung des oxidative burst, Rajasekhar et al., 1999).



**Abb. 5.** Wirkungen von Effektoren der Protein-Tyr-Phosphorylierung auf die elicitorausgelöste Alkaloidbiosynthese

100 µl vorbehandelte Zellsuspension je Kompartiment erhielten 10 µl Inhibitorlösungen, bzw. DMSO ( $\leq 0,5\%$ ), bei  $t = -5$  Minuten. Zugabe von 10 µl Nährlösung oder 1 µg/ml Elicitor bei  $t = 0$ , Auswaschen der Effektoren bei  $t = 60$  Minuten und Resuspension in 12 µl Nährmedium erfolgten wie in 2.4.3 beschrieben. Nach 20 Stunden Kultivation in wassergesättigter Atmosphäre (s. 2.4.1) wurden die Alkaloidgehalte bestimmt (s. 2.4.4). Diese sind auf die Differenz zwischen Kontrollzellen und elicitorbehandelten Zellen (= 100 %) skaliert und als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt ( $n \geq 7$ ). Die durch AG 18, AG 126, AG 82, bpv(phen) und Phenyl-Arsen-Oxid bewirkten Effekte erwiesen sich beim ANOVA Test als signifikant ( $p < 0,01$ ;  $n \geq 7$ ). In den verwendeten Konzentrationen hatten die Inhibitoren keinen Effekt auf die Alkaloidgehalte von Kontrollzellen (nicht dargestellt).



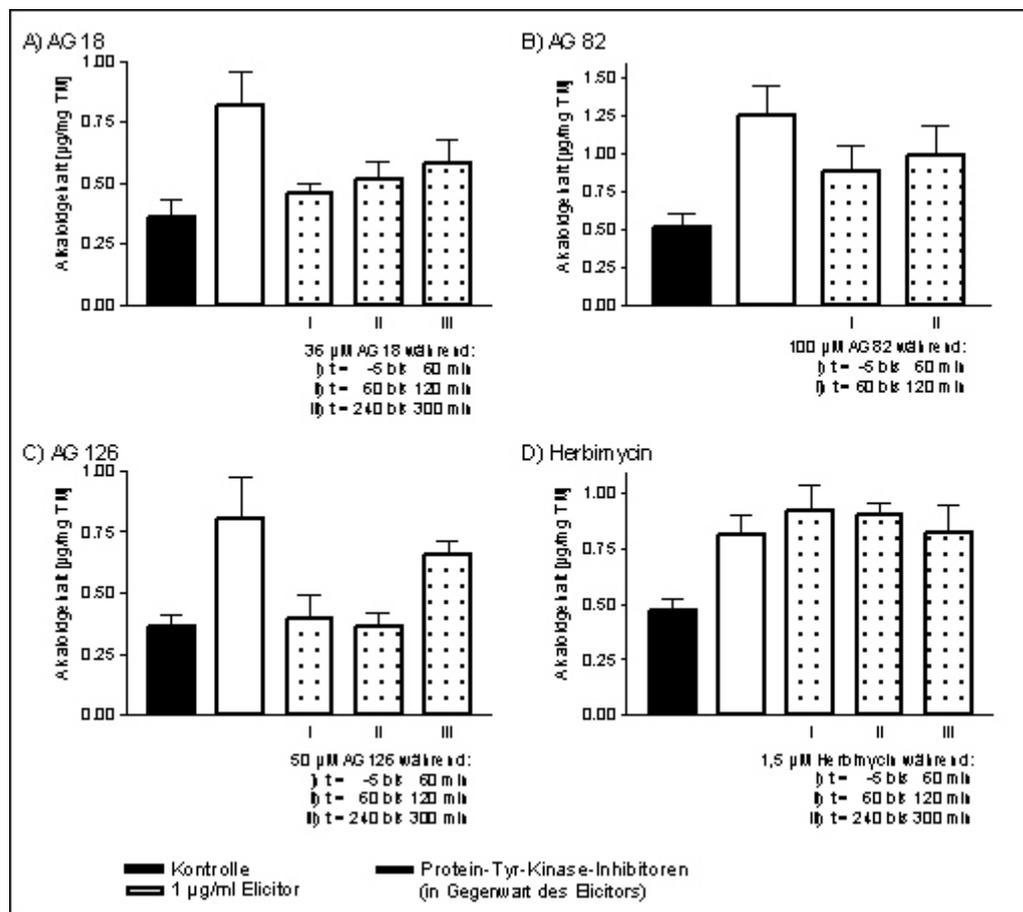
**Abb. 6.** Einfluß von Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren auf die Alkaloidbiosynthese.

100 µl vorbehandelte Zellsuspension je Kompartiment erhielten 10 µl Inhibitorlösungen, bzw. DMSO ( $\leq 0,5\%$ ), bei  $t = -5$  Minuten. Zugabe von 10 µl Nährlösung oder 1 µg/ml Elicitor bei  $t = 0$ , Auswaschen der Effektoren bei  $t = 60$  Minuten und Resuspension in 12 µl Nährmedium erfolgten wie in 2.4.3 beschrieben. Nach 20 Stunden Kultivation in wassergesättigter Atmosphäre (s. 2.4.1) wurden die Alkaloidgehalte bestimmt (s. 2.4.4), diese sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt ( $n \geq 7$ ).

Um die von einer Protein-Tyr-Phosphorylierung abhängigen Prozesse zeitlich in den Signalweg nach Elicitorkontakt eingliedern zu können, wurden die Effekte einiger der vorgestellten Inhibitoren in Abhängigkeit vom Zugabezeitpunkt gemessen.

Sind AG 18, AG 82 oder AG 126 während oder bis zu 2 Stunden nach Elicitorkontakt anwesend, führen sie zu einer starken Verminderung der Alkaloidbiosynthese (Abb. 7). 4 Stunden nach Elicitorkontakt bewirken dagegen identische Konzentrationen an AG 18 oder AG 126 einen deutlich geringeren Hemmeffekt. (Abb. 7A und 7C). Inhibierende Effekte durch Herbimycin sind dagegen zu keiner Zeit feststellbar (Abb. 7D).

Das relativ frühe Wirkungsoptimum von AG 18 oder AG 126 spricht dafür, daß Protein-Tyr-Kinasen vor allem in den ersten beiden Stunden nach Elicitorkontakt am Signaltransfer beteiligt sind.



**Abb. 7.** Hemmung der elicitorausgelösten Alkaloidbiosynthese durch Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren.

100 µl vorbehandelte Zellsuspension je Kompartiment erhielten durch Zugabe von 10 µl Effektorlösung die angegebenen Inhibitorkonzentrationen bzw. DMSO ( $\leq 0,1$  %) bei  $t = -5$  Minuten. Zugabe von weiteren 10 µl Effektorlösung mit bzw. ohne Hefe-Elicitor (Endkonzentration: 1 µg/ml) erfolgte bei  $t = 0$ . Bei  $t = 10$  Minuten wurde das Medium abgesaugt, und die Mini-Kulturen in diesem Zustand bis  $t = 60$  Minuten in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Bei  $t = 60$  Minuten wurden die Mini-Kulturen gewaschen und durch Zugabe von 12 µl Nährmedium resuspendiert. Für eine spätere, 1-stündige Inhibitorbehandlung ab  $t = 60$  bzw. 240 Minuten wurde das Suspensionsvolumen zuvor durch Zugabe von Nährmedium auf ca. 110 µl erhöht, die Zugabe von Inhibitoren bzw. DMSO, Wasch- und Resuspensionsschritte erfolgten dann wie oben beschrieben. Nach weiteren 20 Stunden Kultivation in wassergesättigter Atmosphäre (s. 2.4.1) wurden die Alkaloidgehalte bestimmt (s. 2.4.4), diese sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt ( $n \geq 7$ ). Die Effekte von AG 18, AG 82 oder AG 126 gegenüber elicitierten Suspensionen ohne Inhibitor erwiesen sich beim ANOVA Test als signifikant ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$  bei AG126 bei  $t = 240$  bis 300 Minuten;  $n \geq 7$ ). Die gegenüber einer Zugabe bei  $t = -5$  Minuten geringeren Effekte von AG 18 und AG 126 bei Zugabe ab  $t = 240$  Minuten erwiesen sich beim ANOVA Test ebenso als signifikant ( $p < 0,001$ ;  $n \geq 7$ ). Effekte auf Kontrollzellen waren nicht festzustellen (nicht dargestellt).

Um zu klären, ob die für den elicitorabhängigen Signaltransfer benötigten Protein-Tyr-Kinasen vor oder nach dem pH-shift aktiviert werden, wurde die Wirkung ausgewählter Hemmstoffe unter zwei Bedingungen verglichen:

- a) nach Elicitorkontakt (Signalweg von Beginn an aktiviert)
- b) nach künstlicher Ansäuerung mit Pivalinsäure (Signalweg beginnt downstream vom pH shift).

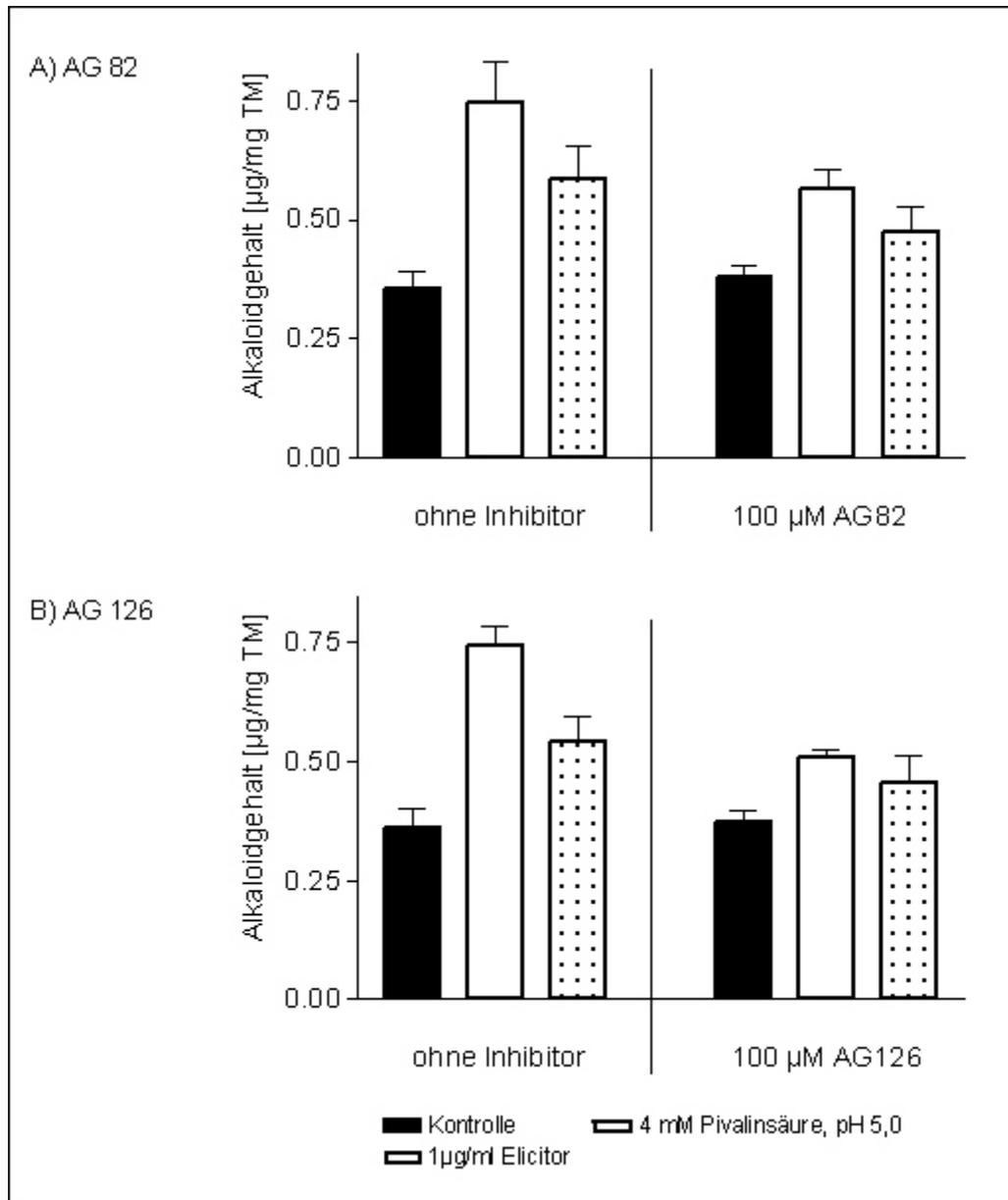
Wie aus Abb. 8 hervorgeht, sind die inhibierenden Wirkungen von AG 82 und AG 126 auf die durch beide Methoden stimulierte Alkaloidproduktion bereits nach 30-minütiger Behandlung erkennbar und sind ungefähr gleich stark. Damit sollten die Protein-Tyr-Phosphorylierungen zeitlich nach dem pH shift lokalisiert sein.

Neben den bereits genannten Inhibitoren wurde bereits vor Etablierung der Mini-Kulturen die Wirkung des Protein-Tyr-Kinase-Inhibitors Genistein auf die elicitorausgelöste Alkaloidbiosynthese in Batch-Kulturen untersucht. Hierfür wurden Zellen 5 Minuten vor Kontakt mit dem Hefe-Elicitor mit 25  $\mu$ M Genistein inkubiert. Der Elicitor wurde nach 30 Minuten zusammen mit Genistein wieder ausgewaschen. Dabei zeigte sich eine starke Hemmung der elicitorausgelösten Alkaloidbiosynthese (Abb. 9).

Um zu überprüfen, ob diese Wirkung von Genistein tatsächlich auf einer Inhibierung des Signaltransfers beruht, wurde die Alkaloidbiosynthese über 48 Stunden gemessen. Außerdem wurden Vergleichssuspensionen erst 24 Stunden nach Elicitorkontakt mit Genistein behandelt.

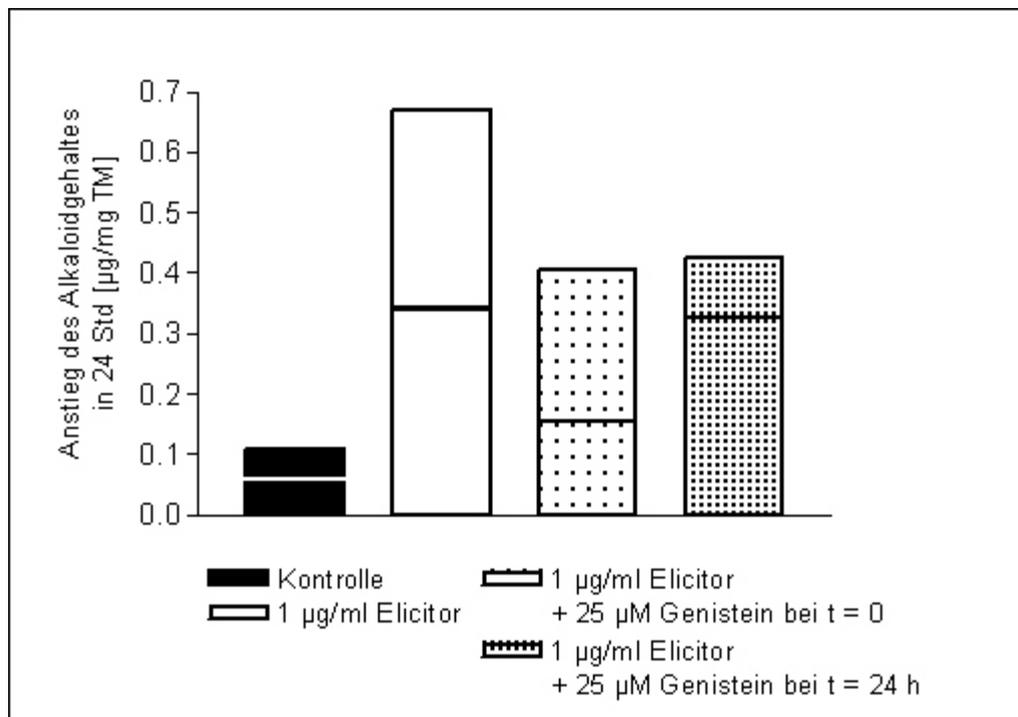
Abb. 9 zeigt, daß der Elicitorkontakt zu einer mindestens 48 Stunden anhaltenden Alkaloidbiosynthese führt. Genistein inhibiert die elicitorausgelöste Alkaloidbiosynthese nicht nur bei einer Zugabe zum Versuchsstart, sondern auch bei einer 24 Stunden nach Elicitorkontakt erfolgenden Zugabe, also zu einem Zeitpunkt, zu dem das Signal bereits in erhöhte Alkaloidbiosynthese umgesetzt ist. Elicitierte Zellen, die zu Beginn des Versuches mit Genistein behandelt wurden, zeigen im Zeitraum von 24 - 48 Stunden eine Alkaloidbiosynthese, die sich der von inhibitorfreien Zellen annähert. Auf elicitorfreie Zellen hatte die Anwesenheit von Genistein keinen Einfluß (nicht dargestellt).

Genistein besitzt also auch unabhängig vom Signaltransfer inhibierende Eigenschaften auf die Biosynthese von Alkaloiden und ist daher zu dessen Untersuchung nicht geeignet.



**Abb. 8** Auslösung der Alkaloidbiosynthese durch Elicitorkontakt oder künstliche zytosolische Ansäuerung, Einfluß von AG 82 oder AG 126.

100 µl vorbehandelter Zellsuspension erhielten durch Zugabe von 10 µl Effektorlösung bei  $t = -5$  Minuten die angegebenen Hemmstoffe, bzw. DMSO ( $\leq 0,1\%$ ). Zugabe von 10 µl einer weiteren Effektorlösung, mit bzw. ohne Elicitor erfolgte bei  $t = 0$ , bei Pivalinsäure bei  $t = 5$  Minuten. Bei  $t = 30$  Minuten wurde das Medium abgesaugt, Zellen 2-mal mit 150 µl Nährmedium gewaschen und in 12 µl Nährmedium resuspendiert. Nach 20 Stunden Kultivation in wassergesättigter Atmosphäre (s. 2.4.1) wurden die Alkaloidgehalte bestimmt (s. 2.4.4), diese sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt ( $n \geq 7$ ). Die durch Zugabe von AG 82 und AG 126 verminderte Alkaloidbiosynthese gegenüber mit Elicitor oder Pivalinsäure behandelten Suspensionen ohne Inhibitor erwiesen sich beim ANOVA Test als signifikant ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$  bei AG82 und Pivalinsäure;  $n \geq 7$ ).

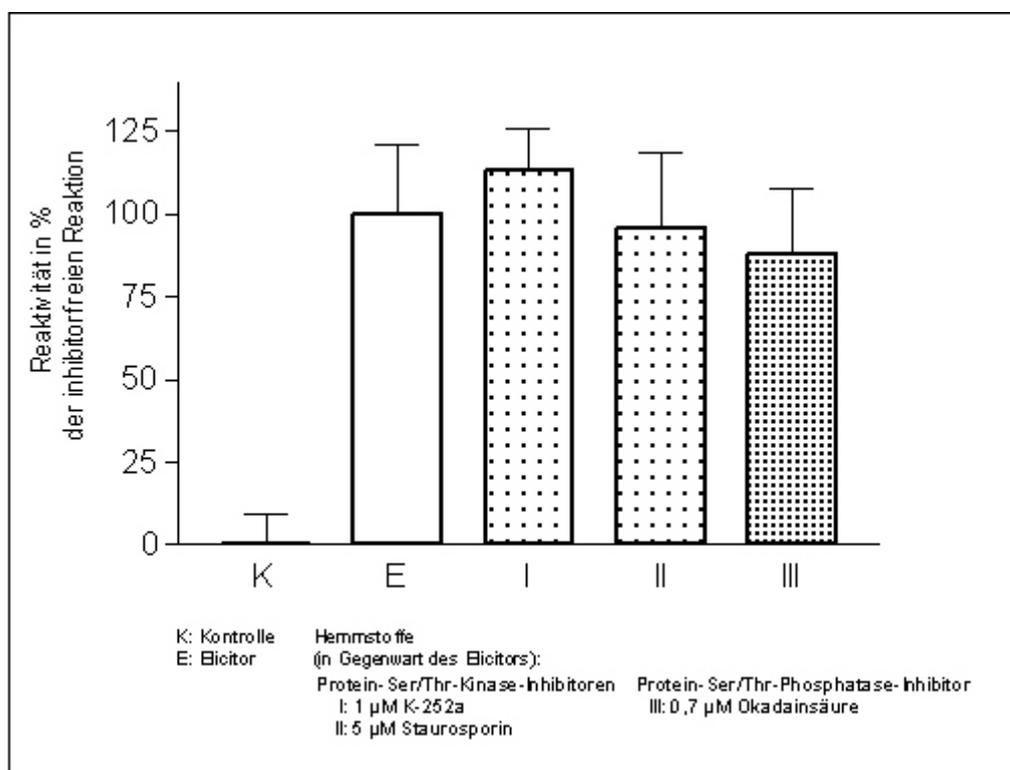


**Abb. 9.** Langzeiteffekte von 25  $\mu\text{M}$  Genistein auf die Alkaloidbiosynthese in Batch-Kulturen. Vorbehandelte Zellsuspensionen wurden für 35 Minuten mit 25  $\mu\text{M}$  Genistein, bzw. DMSO (0,25 %), entweder von  $t = -5$  bis  $t = 30$  Minuten oder von  $t = 24$  bis  $t = 24,5$  Stunden behandelt, Kontakt mit Hefe-Elicitor erfolgte bei  $t = 0$ . Bei  $t = 30$  Minuten, sowie  $t = 24,5$  Stunden wurden die Effektoren ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in Erlenmeyer-Kolben für weiterkultiviert. Proben für die Untersuchung der Alkaloidgehalte (siehe Abschnitt 2.3.3) wurden bei  $t = 0$ , sowie bei  $t = 24$  und 48 Stunden entnommen, Zuwachsraten von  $t = 0$  bis 24 Stunden (untere Säulenhälfte) sowie von  $t = 24$  bis 48 Stunden (obere Säulenhälfte) sind als Mittelwerte dargestellt ( $n = 4$ , Standardabweichungen: 0,16 - 0,22  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , außer Kontrolle: 0,06  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Auf die Alkaloidproduktion von nicht elicitierten Zellsuspensionen hatte Genistein keinen Einfluß (nicht dargestellt).

### 3.1.4.2 Effektoren der Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung

Sind auch Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen für die elicitorausgelöste Alkaloidbiosynthese von Bedeutung? Zur Beantwortung dieser Frage wurden Mini-Kulturen 5 Minuten vor bis 1 Stunde nach Elicitierung mit Inhibitoren von Protein-Ser/Thr-Kinasen oder -Phosphatasen behandelt und deren Effekt auf die Auslösung der Alkaloidbiosynthese verfolgt.

Wie aus Abb. 10 hervorgeht, sind K-252a, Staurosporin und Okadainsäure ohne Wirkung auf die frühen Signalereignisse zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese.

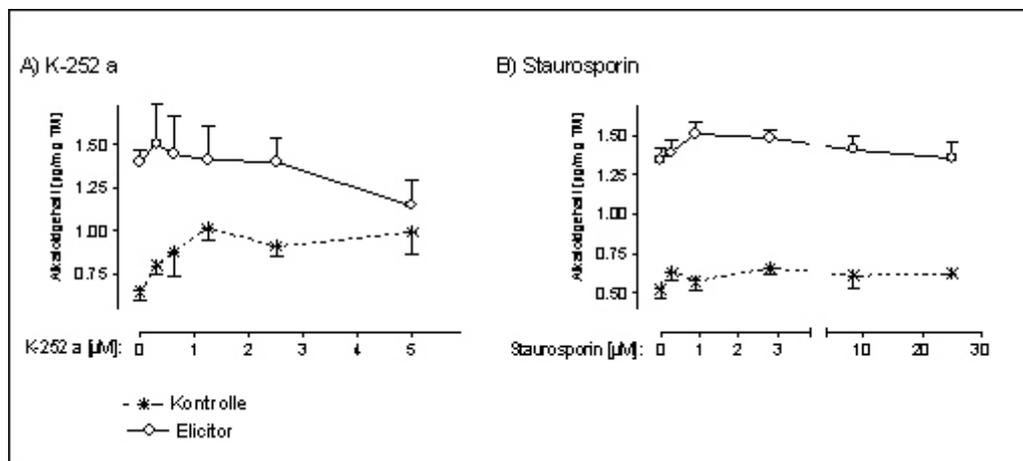


**Abb. 10.** Wirkungen von Effektoren der Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung auf die elicitorausgelöste Alkaloidbiosynthese.

100 µl vorbehandelte Zellsuspension erhielten 10 µl Inhibitorlösungen, bzw. DMSO ( $\leq 0,5\%$ ), bei  $t = -5$  Minuten. Zugabe von 10 µl Nährlösung oder Elicitor (Endkonzentration: 1 µg/ml) bei  $t = 0$  Auswaschen der Effektoren bei  $t = 60$  Minuten und Resuspension in 12 µl Nährmedium erfolgten wie in 2.4.3 beschrieben. Nach 20 Stunden Kultivation in wassergesättigter Atmosphäre (s. 2.4.1) wurden die Alkaloidgehalte bestimmt (s. 2.4.4). Diese sind auf die Differenz zwischen Kontrollzellen und elicitorbehandelten Zellen (= 100 %) skaliert und als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt ( $n \geq 7$ ). In den verwendeten Konzentrationen hatten die Inhibitoren keinen Effekt auf die Alkaloidgehalte von Kontrollzellen.

Da Staurosporin in anderen pflanzlichen Suspensionskulturen teilweise erst bei deutlich höheren Konzentrationen Effekte zeigt (25  $\mu\text{M}$  in Soja zur Inhibierung von MAPKs und oxidative burst, Taylor et al., 2001), wurden Staurosporin und K-252a auch in höheren Konzentrationen eingesetzt.

Auch bei recht hohen Konzentrationen von bis zu 27  $\mu\text{M}$  werden durch Staurosporin keine Effekte auf die Alkaloidbiosynthese bewirkt (Abb. 11B). Auch K-252a führt zu keiner Verminderung der Alkaloidbiosynthese von Mini-Kulturen nach Kontakt mit Hefe-Elicitor (Abb. 11A). K-252a unterscheidet sich jedoch durch die Erhöhung der Alkaloidbiosynthese in Zellen ohne Elicitorkontakt von Staurosporin (Abb. 11).

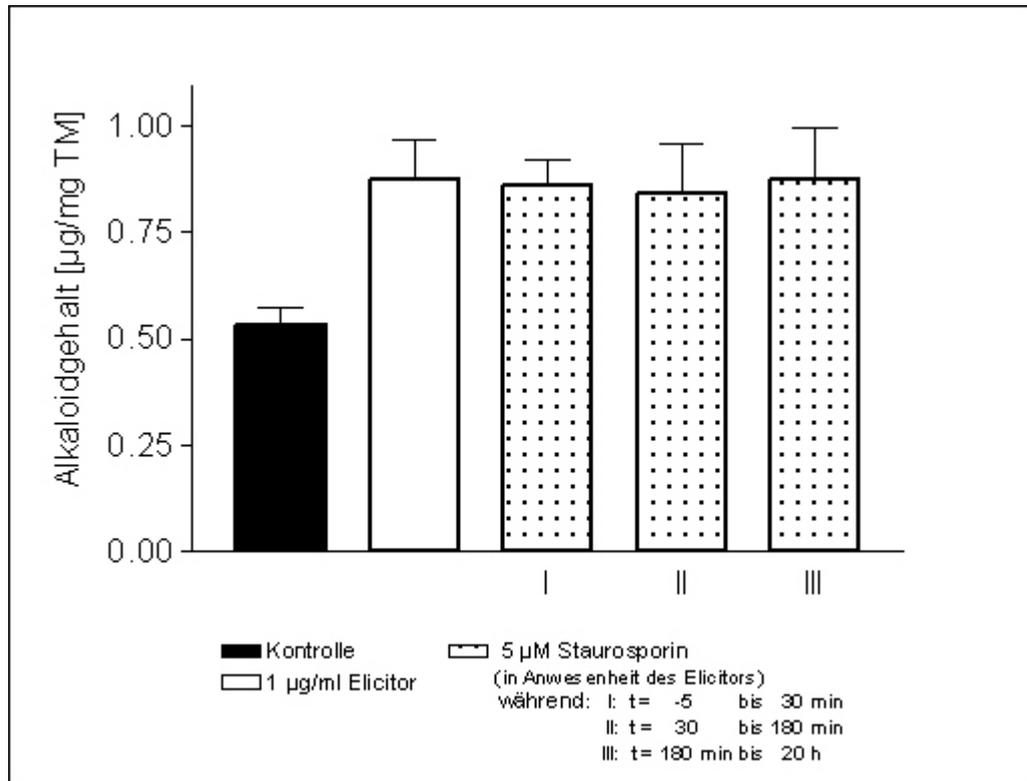


**Abb. 11.** Einfluß von von Protein-Ser/Thr-Kinase-Inhibitoren auf die Alkaloidbiosynthese 100  $\mu\text{l}$  vorbehandelte Zellsuspension je Kompartiment erhielten 10  $\mu\text{l}$  Inhibitorlösungen, bzw. DMSO ( $\leq 0,5\%$ ), bei  $t = -5$  Minuten. Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Nährlösung oder Elicitor (Endkonzentration: 1  $\mu\text{g/ml}$ ) zu  $t = 0$ , Auswaschen der Effektoren zu  $t = 60$  Minuten und Resuspension in 12  $\mu\text{l}$  Nährmedium erfolgten wie in 2.4.3 beschrieben. Nach 20 Stunden Kultivation (s. 2.4.1) in wassergesättigter Atmosphäre (s. 2.4.1) wurden die Alkaloidgehalte bestimmt (s. 2.4.4), diese sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt ( $n \geq 6$ ).

Weitere Experimente zeigen, daß Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen auch zu späteren Zeitpunkten des Signaltransfers unwahrscheinlich sind:

In Abb. 12 ist zu erkennen, daß 5  $\mu\text{M}$  Staurosporin zu keinem Zeitpunkt zwischen Elicitorgabe und dem Auftreten der Alkaloide inhibierenden Wirkungen auf die Auslösung der Alkaloidbiosynthese von Mini-Kulturen ausübt.

Da Staurosporin und K-252a Protein-Ser/Thr-Kinase-Inhibitoren mit breitem Spektrum sind, erscheint eine Beteiligung dieser Protein-Kinasen an der Elicitorierung der Alkaloidbiosynthese in *E. californica* wenig wahrscheinlich



**Abb. 12.** Inhibition der elicitorausgelöste Alkaloidbiosynthese durch Staurosporin

100 µl vorbehandelte Zellsuspension je Kompartiment wurden in den angegebenen Zeiträumen mit 5 µM Staurosporin bzw. DMSO (0,1 %) behandelt, Elicitorkontakt erfolgte bei  $t = 0$ . Bei  $t = 10$  Minuten wurde das Medium abgesaugt und die Mini-Kulturen in diesem Zustand bis  $t = 30$  Minuten wie beschrieben kultiviert. Bei  $t = 30$  Minuten wurden die Mini-Kulturen gewaschen und resuspendiert, sowie wie in Abb. 7 beschrieben, einer nachfolgende Inhibitorbehandlung unterzogen. Nach 20 Stunden Kultivation (s. 2.4.1) in wassergesättigter Atmosphäre (s. 2.4.1) wurden die Alkaloidgehalte bestimmt (s. 2.4.4), diese sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt,  $n \geq 7$ . Auf die Alkaloidproduktion von nicht elicitierten Zellsuspensionen hatte Staurosporin keinen Einfluß (nicht dargestellt).

## 3.2 Immunologischer Nachweis von Veränderungen der Protein-Phosphorylierung nach Elicitorkontakt

Die bisher gezeigten Wirkungen von Protein-Kinase-Inhibitoren auf die elicitorausgelöste Alkaloidbiosynthese legen eine Beteiligung von Protein-Tyr-Phosphorylierungen am Signaltransfer nahe. Dagegen wurden keine Anhaltspunkte für Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen nach Elicitorgabe gefunden. Zur Prüfung dieser Befunde wurden im folgenden immunologische Nachweise zur Charakterisierung von Veränderungen im Protein-Phosphorylierungsmuster in *E. californica* durchgeführt.

Dabei wurden vor allem lösliche, später auch mit Detergens extrahierte Proteine nach 1-dimensionaler SDS-PAGE auf Nitrozellulose geblotted und mit Antikörpern detektiert, welche an Tyr-, Ser- oder an Thr-Resten phosphorylierte Proteine erkennen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte über sekundäre Antikörper, welche mit Peroxidase konjugiert waren und damit über eine Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht werden konnten (s. 2.5).

### 3.2.1 Untersuchungen von Protein-Phosphorylierungen der löslichen Proteine

Die durch den Hefe-Elicitor ausgelösten Veränderungen der Protein-Phosphorylierung wurden zunächst in einem Proteinextrakt untersucht, welcher nach Zellaufschluß und Entfernung der Mitochondrien (10 000 g Zentrifugation) erhalten wurde. In diesem Proteinextrakt sind überwiegend lösliche Proteine des Zytoplasmas zu erwarten, wie durch einen Vergleich mit den aus dem mikrosomalen Pellet solubilierten Proteinen zu erkennen ist (vgl. Abb. 13A, B mit 25A, B).

In Extrakten aus elicitierten und Kontrollzellen wurde nach SDS-PAGE durch Westernblots das aktuelle Protein- und Phosphorylierungsmuster analysiert. Zur Kontrolle der Zellantwort auf den Elicitorkontakt wurde parallel dazu in Zellen aus derselben Suspension die Rate der Alkaloidbiosynthese bestimmt.

Abb. 13 zeigt typische auf diese Weise erhaltene Westernblots und eindimensionale Proteinmuster. Veränderungen der Antikörperbindung wurden ausschließlich bei Einsatz von Phospho-Tyr-spezifischen Antikörpern gefunden.

Zwei Protein-Banden bei 49 und 46 kDa zeigen kurz nach Elicitorkontakt einen transienten Anstieg der Tyr-Phosphorylierung (Abb. 13B). Nach 4 Stunden sind beide Banden in der Immunreaktion nicht mehr zu erkennen, aber als Protein-Banden weiterhin mit Fast Green nachweisbar, d.h. die entsprechenden Proteine befinden sich wieder im unphosphorylierten Ausgangszustand. Da sie weder vor dem Elicitorkontakt noch in Kontrollzellen phosphoryliert sind, findet deren Tyr-Phosphorylierung offenbar nach Kontakt mit dem Hefe-Elicitor *de novo* statt.

Die Proteinmenge aller mit Fast Green nachweisbaren Banden (Abb. 13A) zeigt in diesem Zeitraum keine wesentliche Veränderung, die auf Änderungen der Neusynthese oder des Abbaus hindeuten würde.

Beim Einsatz von Phospho-Ser- oder -Thr-spezifischen Antikörpern ist eine deutlich größere Zahl von phosphorylierten Proteinen bereits im Grundzustand erkennbar, wie Abb. 13C zeigt. Dies ist ein deutlicher Unterschied zur geringen Protein-Tyr-Phosphorylierung in Kontrollzellen. Die Intensität der Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung wird nach Elicitorkontakt jedoch nicht sichtbar verändert.

Diese, auch in Kontrollzellen detektierten, an Ser- oder Thr-Resten phosphorylierten Protein-Banden haben nicht dieselbe elektrophoretische Mobilität wie diejenigen, in denen nach Elicitorkontakt Tyr-Phosphorylierung auftritt, wie eine genaue Vermessung der Position der Banden zeigt. Damit ist die Anwesenheit von Proteinen unwahrscheinlich, welche gleichzeitig an Tyr-Resten und Ser- oder Thr-Resten phosphoryliert sind.

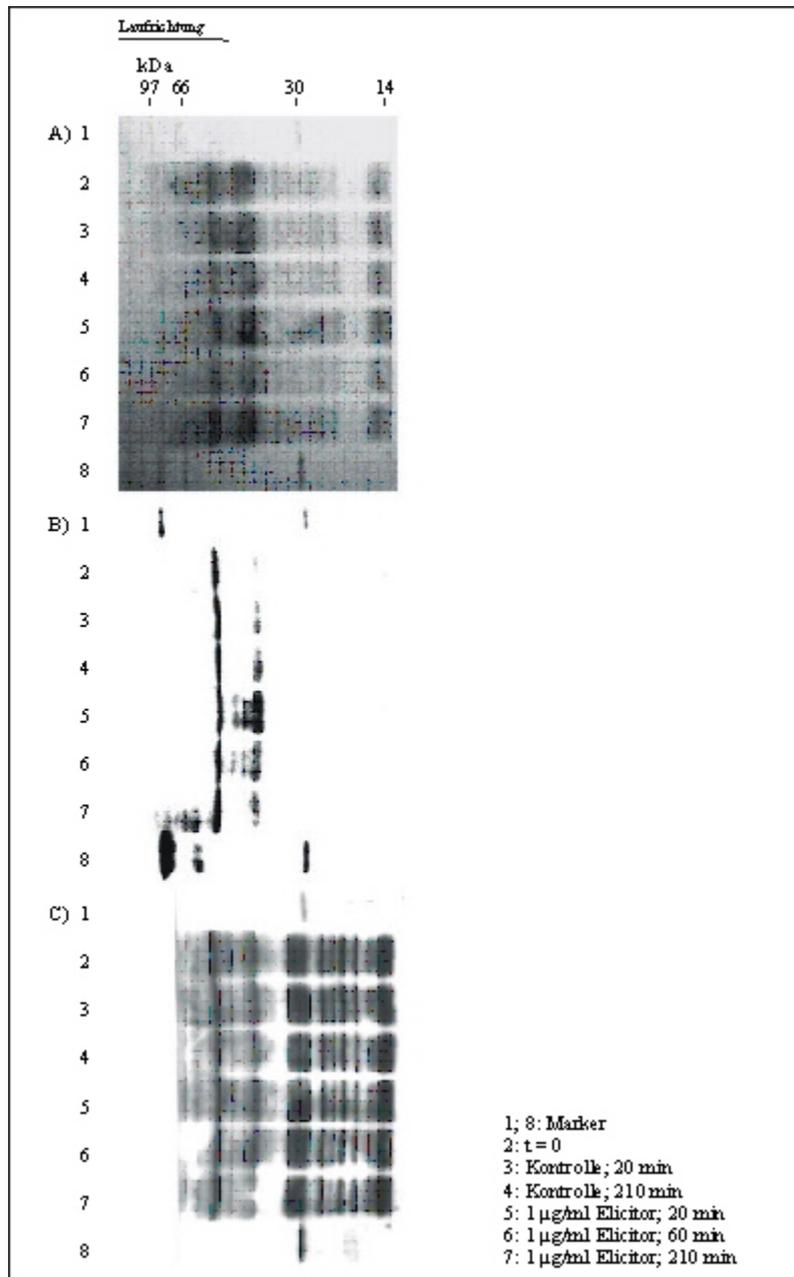
Der beobachtete Anstieg der Protein-Tyr-Phosphorylierung tritt in zeitlicher Nähe zu dem pH-shift auf, welcher für den elicitorabhängigen Signaltransfer zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese essentiell ist: der Abfall des pH-Wertes im Zytoplasma ist ungefähr 2 Minuten nach Elicitorkontakt nachweisbar, erreicht nach 10 Minuten seinen Höhepunkt und ist nach 30 Minuten weitgehend kompensiert (Roos et al., 1998).

Um die Frage zu klären, ob die Protein-Tyr-Phosphorylierungen vor oder nach dem pH-shift beginnen, wurde deren zeitlicher Verlauf nach Elicitorkontakt innerhalb verschiedener Testperioden genauer überprüft (s. z.B. Abb. 14). Dabei erwies sich der elicitorabhängige Anstieg der Tyr-Phosphorylierung stets gut reproduzierbar. Ihr zeitlicher Verlauf ist in Abb. 15 dargestellt. Der zeitliche Verlauf der Protein-Tyr-Phosphorylierung nach Elicitorkontakt läßt erkennen, daß in beiden elicitorresponsiblen Protein-Banden (49 und 46 kDa) frühestens nach 10 Minuten ein Anstieg der Tyr-Phosphorylierung erkennbar ist. Die stärksten Signale entstammen Proteinen aus Proben, welche 20 Minuten nach Elicitorkontakt extrahiert wurden. (Abb. 15).

Diese Daten weisen darauf hin, daß 10 - 20 Minuten nach Elicitorkontakt mindestens 2 Proteine transient an Tyr-Resten phosphoryliert werden. Die quantitative Prüfung durch ANOVA Analyse bestätigt, daß Proben, die 20 Minuten nach Elicitierung entnommen wurden, signifikant höhere Phosphorylierungssignale zeigen ( $p < 0,05$ ) als jene, die zur gleichen Zeit aus Kontroll Suspensionen bzw. vor dem Elicitorkontakt entnommen wurden. Eine Phosphorylierung beider Protein-Banden ist 3 Minuten nach Elicitorkontakt jedoch noch nicht erkennbar, zu einer Zeit also, in der der pH-shift bereits nachweisbar ist.

Die immunologisch erfaßbare Menge der an Ser- oder Thr-Resten phosphorylierten Proteine war, trotz experimenteller Schwankungen zwischen verschiedenen Zellchargen (s. Abb. 13C, Abb. 14C), nicht signifikant beeinflusst von der Wirkung des Elicitors.

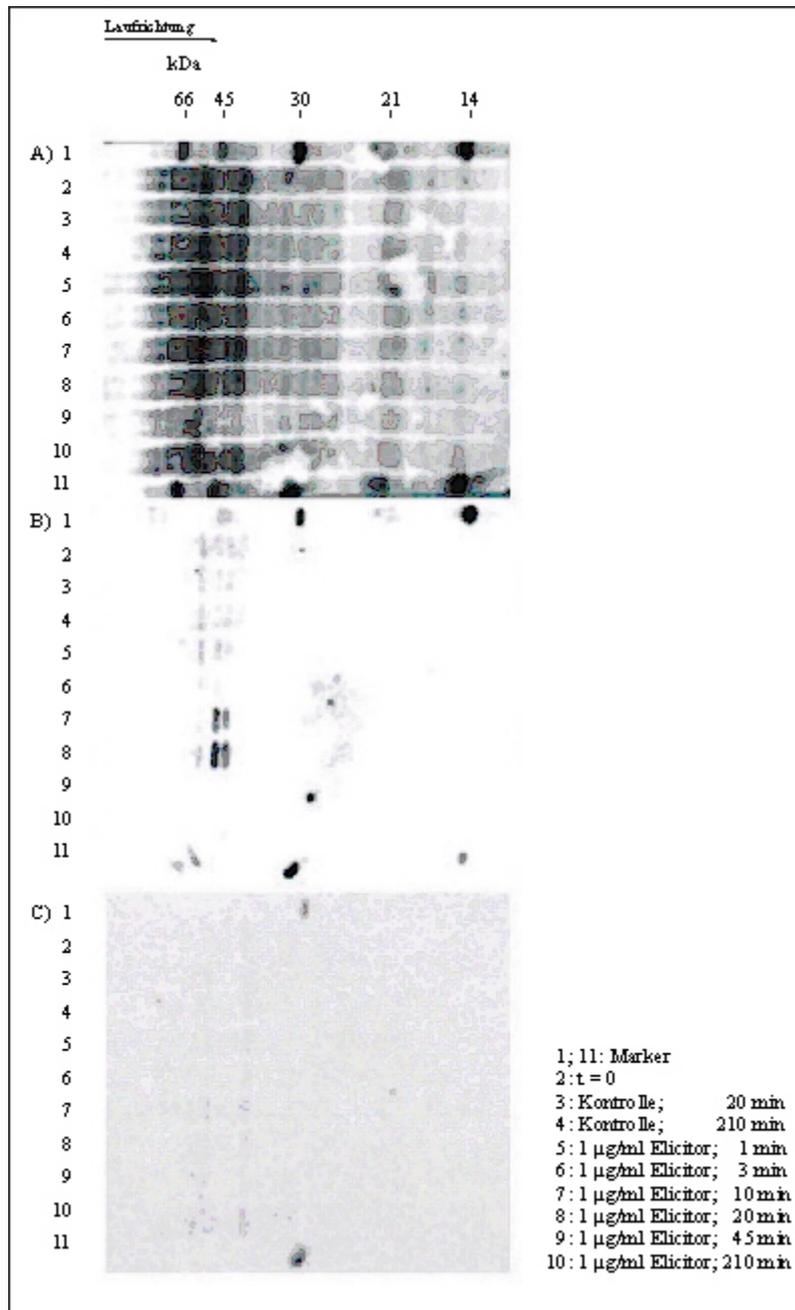
Anhand der Alkaloidbiosynthese konnte sichergestellt werden, daß der Signaltransfer im jeweiligen Experiment tatsächlich erfolgreich vom Elicitor bis zur Zellantwort führte (s. Text zu Abb. 13, 14 und 15).



**Abb. 13.** Zeitlicher Ablauf der Protein-Phosphorylierung in Kontrollzellen und nach Elicitorkontakt (Gesamtproteinextrakt, lange Zeitintervalle).

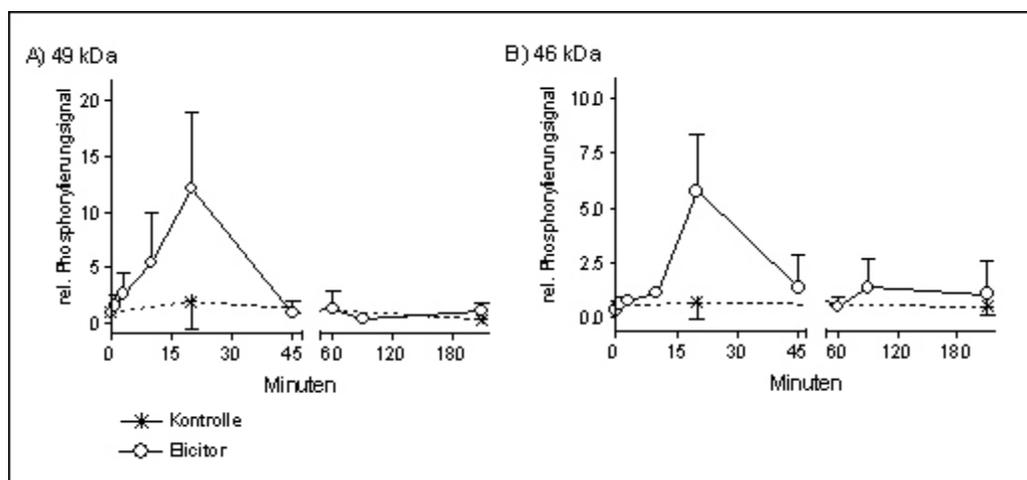
Zellsuspensionen wurden wie in 2.3 beschrieben mit 1 µg/ml Elicitor oder als Kontroll suspension behandelt. Unmittelbar vor Elicitorzusatz ( $t = 0$ ) und zu den angegebenen Zeiten wurden Proben zur Proteinextraktion entnommen; s. 2.5.1 und 2.5.2. SDS-PAGE in einem 15 %-igen Gel (je Spur ~ 10 µg Protein), Westernblot und Nachweisreaktionen erfolgten wie in Abschnitt 2.5.3 dargestellt.

A) Proteindetektion mit Fast Green; B) und C) Signale der Antikörperreaktionen: B) Phospho-Tyr-Protein Nachweis C) gekoppelter Phospho-Ser/Thr-Protein Nachweis. Parallel dazu wurde die Alkaloidbiosynthese derselben Suspensionen in 20 Stunden bestimmt (s. 2.3.3): Kontrolle: 0,01 µg/mg TM; Elicitor: 0,65 µg/mg TM.



**Abb. 14.** Zeitlicher Ablauf der Protein-Phosphorylierung nach Elicitorkontakt und in Kontrollzellen (Gesamtproteinextrakt, kurze Zeitintervalle).

Zellsuspensionen wurden wie in 2.3 beschrieben mit 1 µg/ml Elicitor oder als Kontroll suspension behandelt. Unmittelbar vor Elicitorzusatz ( $t = 0$ ) und zu den angegebenen Zeiten wurden Proben zur Proteinextraktion entnommen; s. 2.5.1 und 2.5.2. SDS-PAGE in einem 13,5 %-igen Gel (je Spur ~ 10 µg Protein), Westernblot und Nachweisreaktionen erfolgten wie in Abschnitt 2.5.3 dargestellt. A) Proteindetektion mit Fast Green; B) und C) Signale der Antikörperreaktionen: B) Phospho-Tyr-Protein Nachweis C) gekoppelter Phospho-Ser/Thr-Protein Nachweis. Parallel dazu wurde die Alkaloidbiosynthese derselben Suspensionen in 20 Stunden bestimmt (s. 2.3.3): Kontrolle: -0,05 µg/mg TM; Elicitor: 0,98 µg/mg TM.



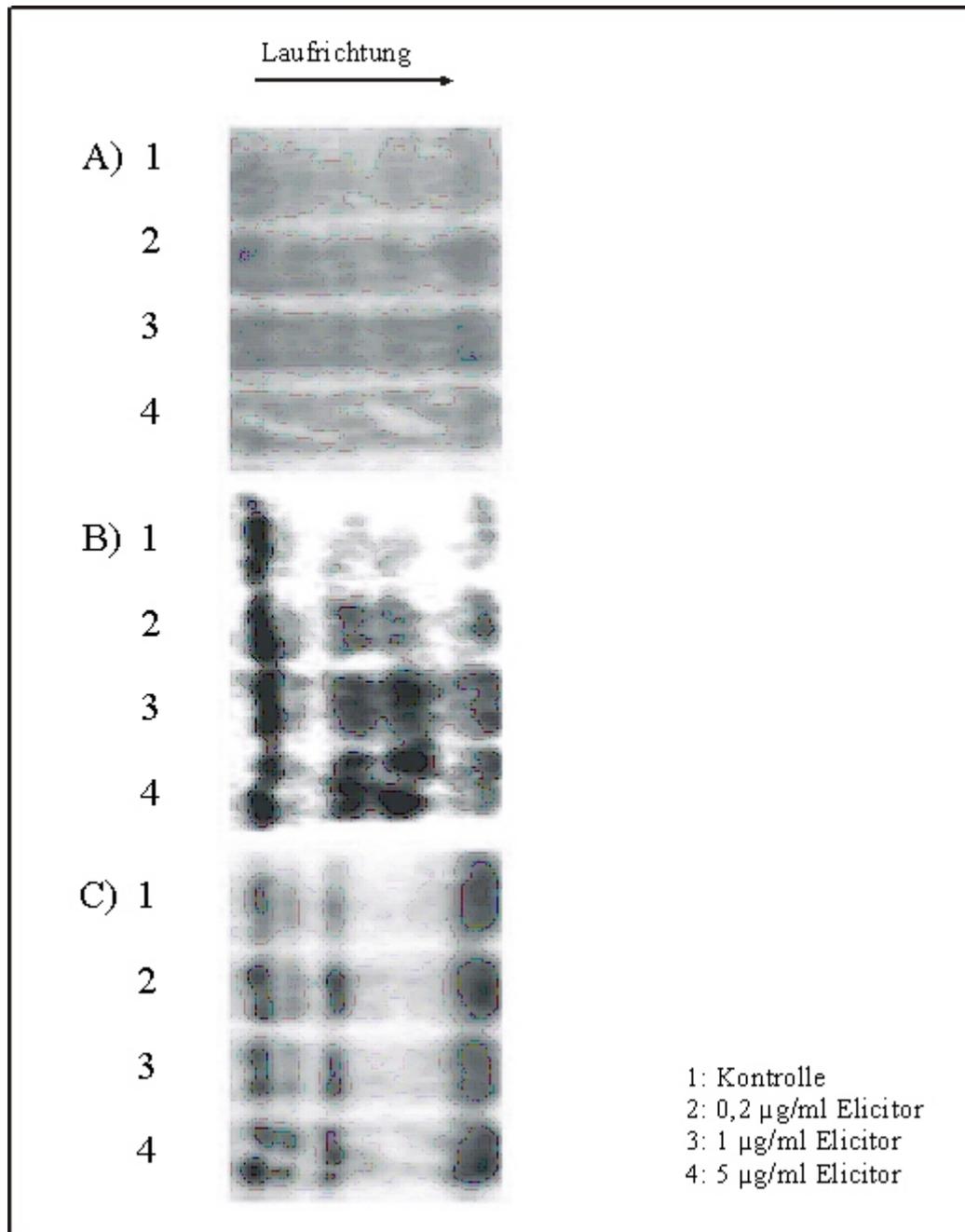
**Abb. 15.** Quantifizierte Protein-Tyr-Phosphorylierung nach Kontakt mit Hefe-Elicitor und in Kontrollzellen.

Die Behandlung von Zellsuspensionen, Probenentnahme zu den angegebenen Zeiten, Proteinextraktion, SDS-PAGE, Immunreaktionen sowie die Quantifizierung der Protein-Tyr-Phosphorylierung erfolgten wie beschrieben; s. 2.3 und 2.5. Quantifizierter zeitlicher Verlauf der Protein-Tyr-Phosphorylierung A) in der 49 kDa Bande; B) in der 46 kDa Bande. Die Alkaloidbiosynthese derselben Suspensionen in 20 Stunden (s. 2.3.3): Kontrolle:  $0,00 \pm 0,07$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  TM, Elicitor:  $0,72 \pm 0,27$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  TM (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

### 3.2.1.1 Abhängigkeit der Protein-Phosphorylierungen von der Elicitor-konzentration

Auf der Suche nach einem möglichen Zusammenhang zwischen den elicitorausgelösten Ereignissen "Alkaloidbiosynthese" und "Protein-Tyr-Phosphorylierung" wurde die Abhängigkeit beider Reaktionen von der Elicitor-konzentration untersucht. Hierfür wurden Protein-Phosphorylierung und Alkaloidbildung in Kulturen quantifiziert, die jeweils mit unterschiedlichen Elicitor-konzentrationen behandelt worden waren.

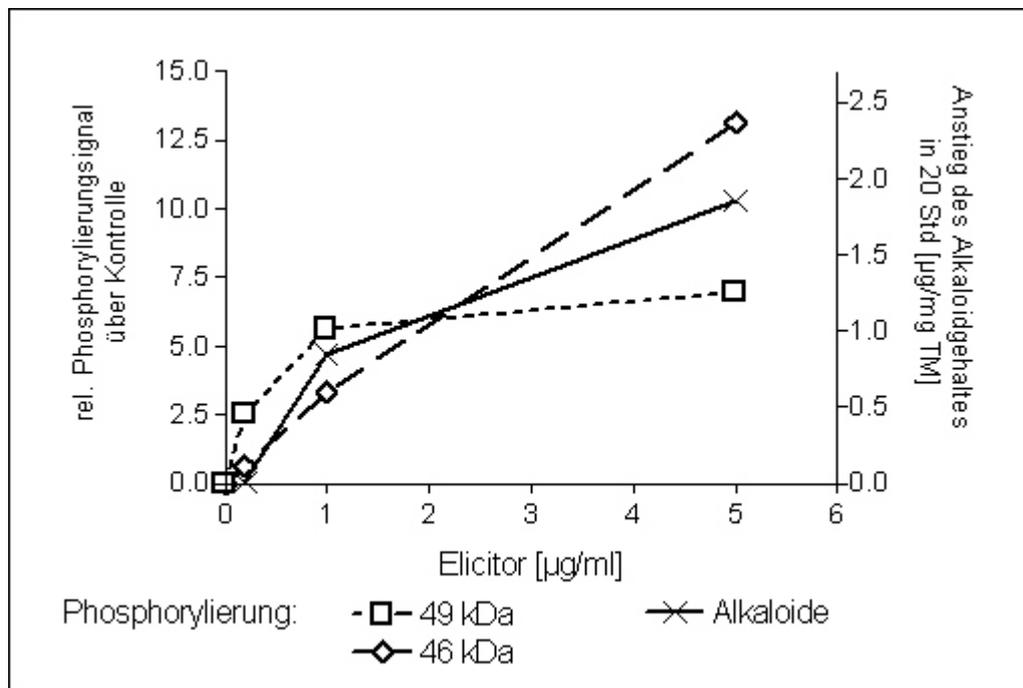
Wie aus Abb. 16/1B und 16/2 hervorgeht, ist das Ausmaß der Tyr-Phosphorylierung von Proteinen in der 49 kDa Bande bei Elicitor-konzentrationen von ungefähr  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  bereits in einem Sättigungsbereich. Dies entspricht etwa der Abhängigkeit des pH-shifts und der Alkaloidbiosynthese von der Elicitor-konzentration (Roos et al., 1998; Abb. 16/2). Die Intensität der 46 kDa Bande wird dagegen noch bis zu Elicitor-konzentrationen von  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  gesteigert (Abb. 16/1B und 16/2). Weitere als die bereits vorgestellten Protein-Banden von 46 und 49 kDa erfahren im eingesetzten Elicitor-konzentrationsbereich keine Veränderung in ihrem Phosphorylierungsgrad. Eine Phosphorylierung der 46 und 49 kDa Protein-Banden an Ser- oder Thr-Resten ist auch bei höheren Elicitor-konzentrationen als  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  nicht erkennbar (Abb. 16/1C)



**Abb. 16/1.** Protein-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Elicitorkonzentration.

Die Behandlung der Zellsuspensionen mit 1 µg/ml Elicitor bei  $t = 0$  erfolgte wie in 2.3 dargestellt. Probenentnahme bei  $t = 20$  Minuten, Proteinextraktion, SDS-PAGE, Westernblot und Nachweisreaktionen erfolgten wie in Abschnitt 2.5 beschrieben. Der dargestellte Ausschnitt beinhaltet den Größenbereich von 40 - 55 kDa.

A) Proteindetektion mit Fast Green; B) und C) Signale der Antikörperreaktionen: B) Phospho-Tyr-Protein Nachweis C) gekoppelter Phospho-Ser/Thr-Protein Nachweis.



**Abb. 16/2.** Abhängigkeit von Alkaloidbiosynthese und Protein-Tyr-Phosphorylierung von der Elicitorkonzentration.

Die Quantifizierung der in Abb. 16/1 dargestellten Protein-Tyr-Phosphorylierung (Anstieg über Kontrollwerte) erfolgte wie in Abschnitt 2.5 angegeben, die Alkaloidbiosynthese wurde wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind Werte aus einem von zwei sich entsprechenden Versuchen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit der 49 kDa Bande Protein(e) gefunden wurden, deren Tyr-Phosphorylierung die gleiche Abhängigkeit von der Elicitorkonzentration aufweist wie die Auslösung der Alkaloidbiosynthese. Dagegen erfordert die maximale Phosphorylierung der Proteine in der 46 kDa Bande offenbar höhere Elicitorkonzentrationen. Auch bei Elicitorkonzentrationen von 5  $\mu\text{g/ml}$ , welche bereits zu Reaktion des oxidative burst führen (Roos et al., 1998), kann in diesen Protein-Banden keine zusätzliche Phosphorylierung an Ser- oder Thr-Resten detektiert werden.

### 3.2.1.2 Hemmung der elicitorausgelösten Phosphorylierung durch Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren

Die Auffindung von Tyr-phosphorylierten Proteinen in elicitorbehandelten Zellen ist gut mit den in Abschnitt 3.1.4.1 gezeigten Wirkungen von Inhibitoren von Protein-Tyr-Kinasen auf die Alkaloidbiosynthese vereinbar. Es stellte sich deshalb die Frage, ob diese Inhibitoren tatsächlich den Phosphorylierungsgrad der elicitorresponsiblen Protein-Banden beeinflussen.

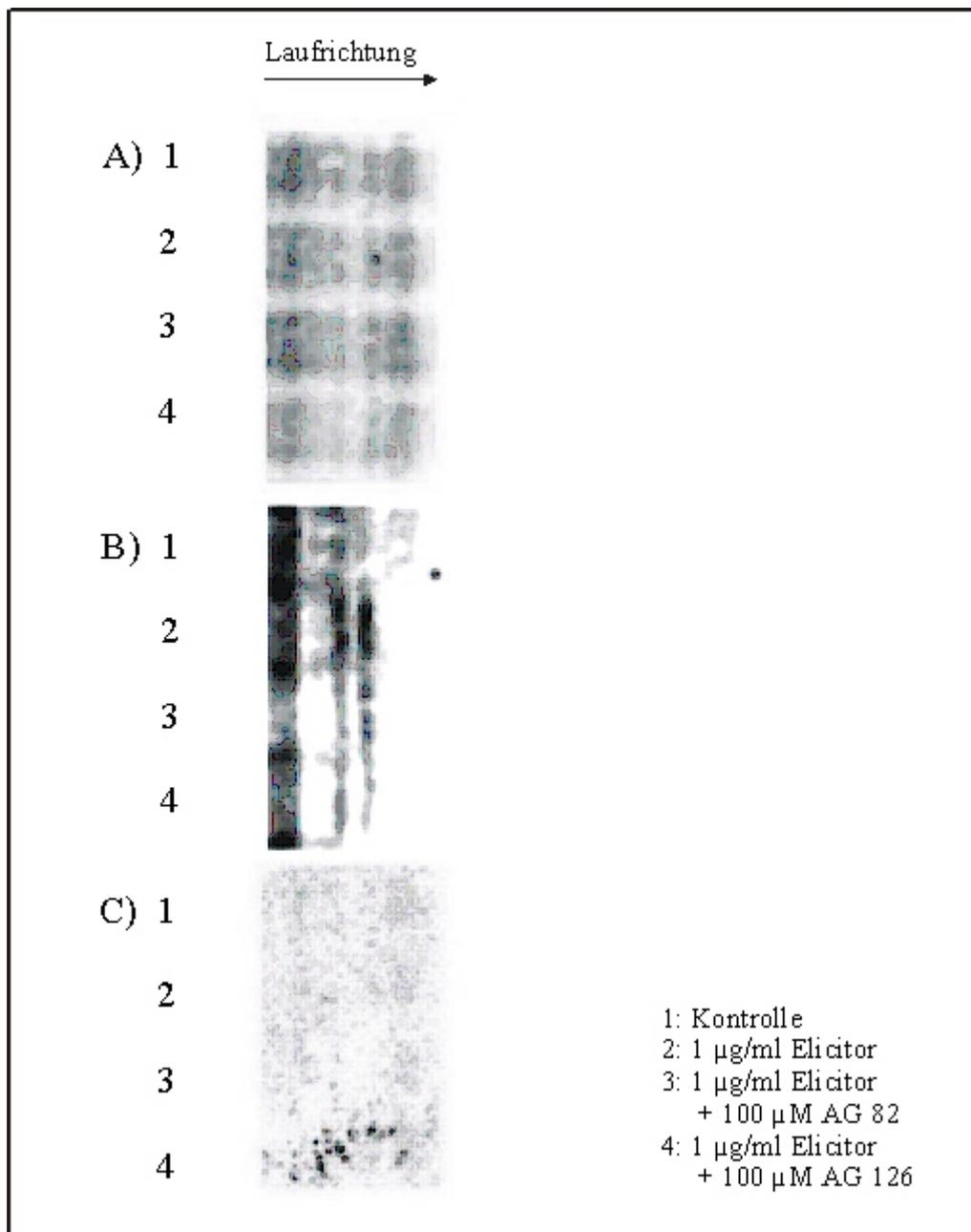
Hierfür wurden Zellsuspensionen untersucht, denen 5 Minuten vor Elicitorkontakt Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren zugesetzt wurden, und mit inhibitorfreien Varianten verglichen.

Abb. 17/1 zeigt, daß AG 82 oder AG 126 die erwartete Hemmwirkung auf die Protein-Tyr-Phosphorylierung ausüben. Die Quantifizierung dieser Befunde in Abb. 17/2 zeigt, daß Protein-Tyr-Phosphorylierung und Alkaloidbiosynthese nach Elicitorkontakt durch beide Inhibitoren in vergleichbarer Stärke verringert werden. Für AG 82 konnte die Hemmung beider Ereignisse auch statistisch gesichert werden; die Hemmwirkung von AG 126 wurde nur in zwei Experimenten überprüft, in denen jeweils ein ähnlicher Effekt wie bei AG 82 vorhanden war.

Auf das Wachstum der Zellsuspensionen haben die Inhibitoren dagegen keinen Einfluß, wie an der Zunahme der Trockenmasse erkennbar ist (Abb. 17/2C).

Die Wirkung der Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren weist also darauf hin

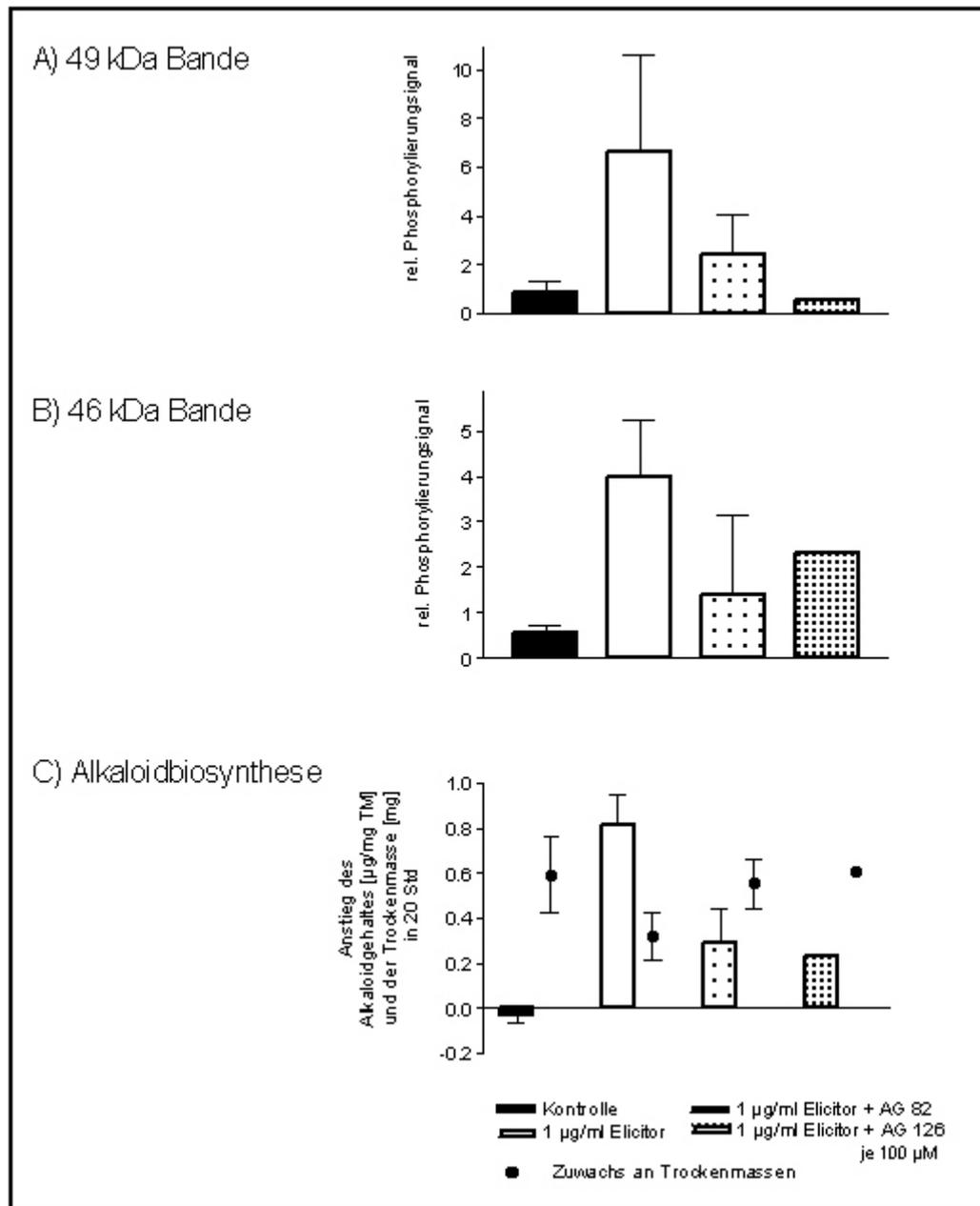
- daß die in den Immunoblots gemessenen Intensitäten tatsächlich von Tyr-phosphorylierten Proteinen ausgehen und
- daß die Wirkung der Inhibitoren auf die Alkaloidbiosynthese mit ihrem Effekt auf Protein-Tyr-Kinasen zumindest vereinbar ist.



**Abb. 17/1.** Hemmung der elicitorausgelösten Protein-Tyr-Phosphorylierung durch Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren.

Inkubation mit AG 82, AG 126 (oder 0,1 % DMSO) erfolgte von  $t = -5$  Minuten, Elicitorkontakt von  $t = 0$  bis  $t = 30$  Minuten; s. 2.3. Probenentnahme bei  $t = 20$  Minuten, Proteinextraktion, SDS-PAGE, Westernblot und Nachweisreaktionen erfolgten wie in Abschnitt 2.5 beschrieben.

A) Proteindetektion mit Fast Green; B) und C) Signale der Antikörperreaktionen: B) Phospho-Tyr-Protein Nachweis C) gekoppelter Phospho-Ser/Thr-Protein Nachweis.



**Abb. 17/2.** Quantifizierte Darstellung der Effekte von Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren auf Protein-Tyr-Phosphorylierung und Alkaloidbiosynthese.

Die Quantifizierung der in Abb. 17/1 dargestellten Protein-Tyr-Phosphorylierungen, sowie die Alkaloidbiosynthese derselben Suspensionen erfolgten wie in 2.5 und 2.3.3 beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $n = 3$ ; AG 126: einer von zwei einander entsprechenden Versuchen). A); B) Tyr-Phosphorylierung der 49 kDa und 46 kDa Protein-Banden. Effekt von AG 82 in der 49 kDa Bande:  $p < 0,1$ ; in der 46 kDa Bande:  $p < 0,05$  (gepaarter t-Test,  $n = 3$ ). C) Alkaloidbiosynthese und Wachstum derselben Suspensionen in 20 Stunden. Effekt von AG 82 auf die Alkaloidbiosynthese:  $p < 0,1$  (gepaarter t-Test,  $n = 3$ ).

### 3.2.1.3 Beeinflussen künstliche pH-shifts die Protein-Tyr-Phosphorylierung?

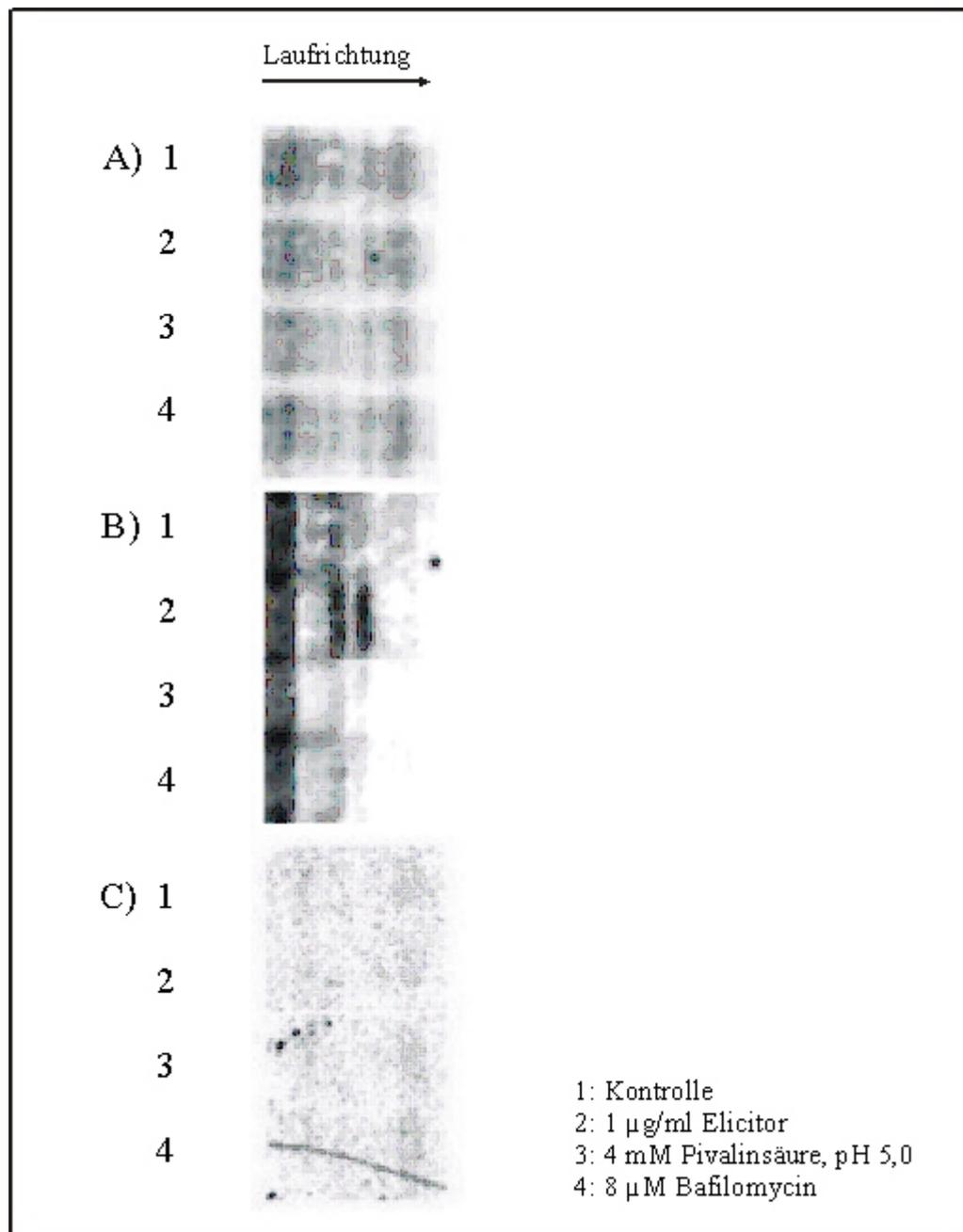
Wie bereits erwähnt, spielt ein transients Abfall des zytoplasmatischen pH-Wertes für die Auslösung der Alkaloidbiosynthese in *E. californica* eine wichtige Rolle. Diese Aussage wird u.a. dadurch untermauert, daß in Zellsuspensionen eine kurzzeitige Ansäuerung des Zytoplasmas durch permeable Säuren die Überproduktion von Alkaloiden bewirkt. Umgekehrt kann durch Behandlung mit Methylamin der pH-Wert der Vakuole bis auf den Wert des Zytoplasmas erhöht werden; nach dem so erzwungenen Verlust des vakuolären Protonenpools sind weder pH-shift noch Alkaloidbiosynthese nach Elicitorkontakt möglich (Roos et.al., 1998). Beide Versuchseinstellungen ermöglichen also "gain of function" und "loss of function" Experimente auf physiologischer Ebene. Die Wirkung dieser Säure- bzw. Base-Behandlung auf die Protein-Phosphorylierung und Alkaloidbiosynthese wurde im folgenden vergleichend untersucht.

*A) Künstliche Ansäuerung:* Um zu klären, ob die nach Elicitorkontakt beobachteten Protein-Tyr-Phosphorylierungen durch die zytoplasmatische Ansäuerung ausgelöst wird, wurde ein künstlicher pH-Abfall entweder durch eine Behandlung mit Pivalinsäure oder mit Bafilomycin, einem Inhibitor der V-ATPase (Bowman et al., 1988), ausgelöst. Durch Pivalinsäure kommt es zu einer Ansäuerung mit externen Protonen, während Bafilomycin eine Ansäuerung des Zytoplasmas mit vakuolären Protonen bewirkt. Außerdem wurden unbehandelte und elicitierte Zellsuspensionen als Vergleichsbasis untersucht.

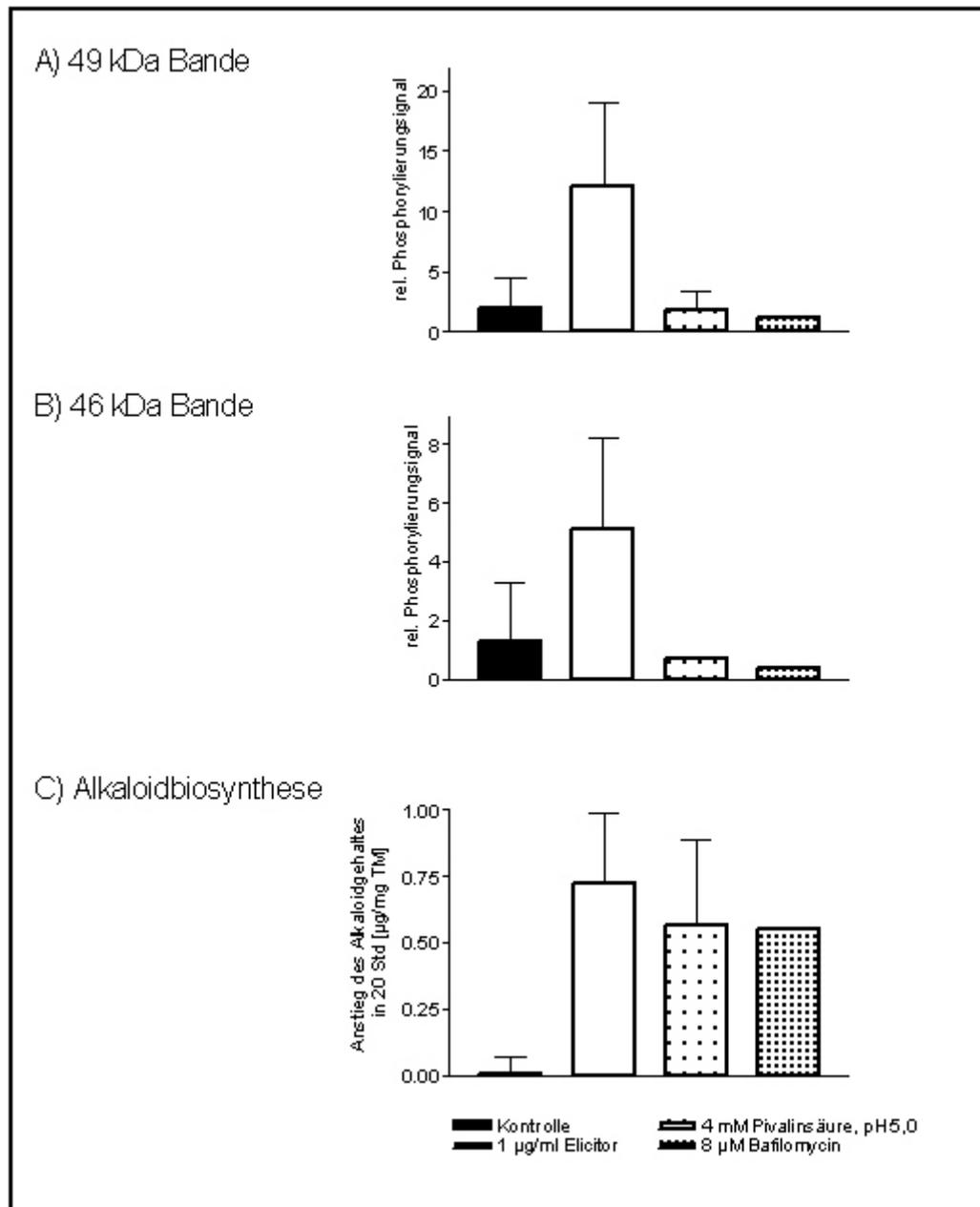
In den beiden nach Elicitorkontakt phosphoryliert vorliegenden Protein-Banden (s.o.) ist nach artifiziellen pH-shifts durch Behandlung mit Pivalinsäure- oder Bafilomycin zur betrachteten Zeit keine Tyr-Phosphorylierung erkennbar (Abb. 18/1B und 18/2). Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen wurden durch diese Manipulationen der zellulären pH-Werte ebenfalls nicht beeinflußt (Abb. 18/1C). Die Alkaloidbiosynthese konnte dagegen sowohl durch Elicitor als auch durch Pivalinsäure oder Bafilomycin ausgelöst werden (Abb. 18/2), d.h. ein pH-Signal wurde durch diese Behandlungen in hinreichender Stärke ausgelöst.

*B) Elicitierung in Gegenwart von Methylamin:* Um zu überprüfen, ob die durch Elicitorkontakt ausgelöste Protein-Phosphorylierung etwa unabhängig von einer intrazellulären Ansäuerung stattfinden, wurden Zellen auf Protein-Phosphorylierung untersucht, bei denen der Elicitorkontakt unter Bedingungen stattfand, die eine intrazelluläre Ansäuerung verhindern. Dies ist nach der Neutralisation des vakuolären H<sup>+</sup>-Pools mit Methylamin der Fall (Roos et al. 1998).

Auch in Gegenwart von Methylamin können nach Elicitorkontakt sowohl in der 46 kDa als auch in der 49 kDa Bande Tyr-phosphorylierte Proteine nachgewiesen werden. Die Stärke des Signals ist gegenüber den nicht mit Methylamin behandelten Suspensionen unvermindert (Abb. 19/1B und 19/2). Im Gegensatz zur Protein-Tyr-Phosphorylierung ist eine Auslösung der Alkaloidbiosynthese in Zellen, die mit Methylamin behandelt worden sind, durch den Hefe-Elicitor nicht mehr möglich (Abb. 19/2C).

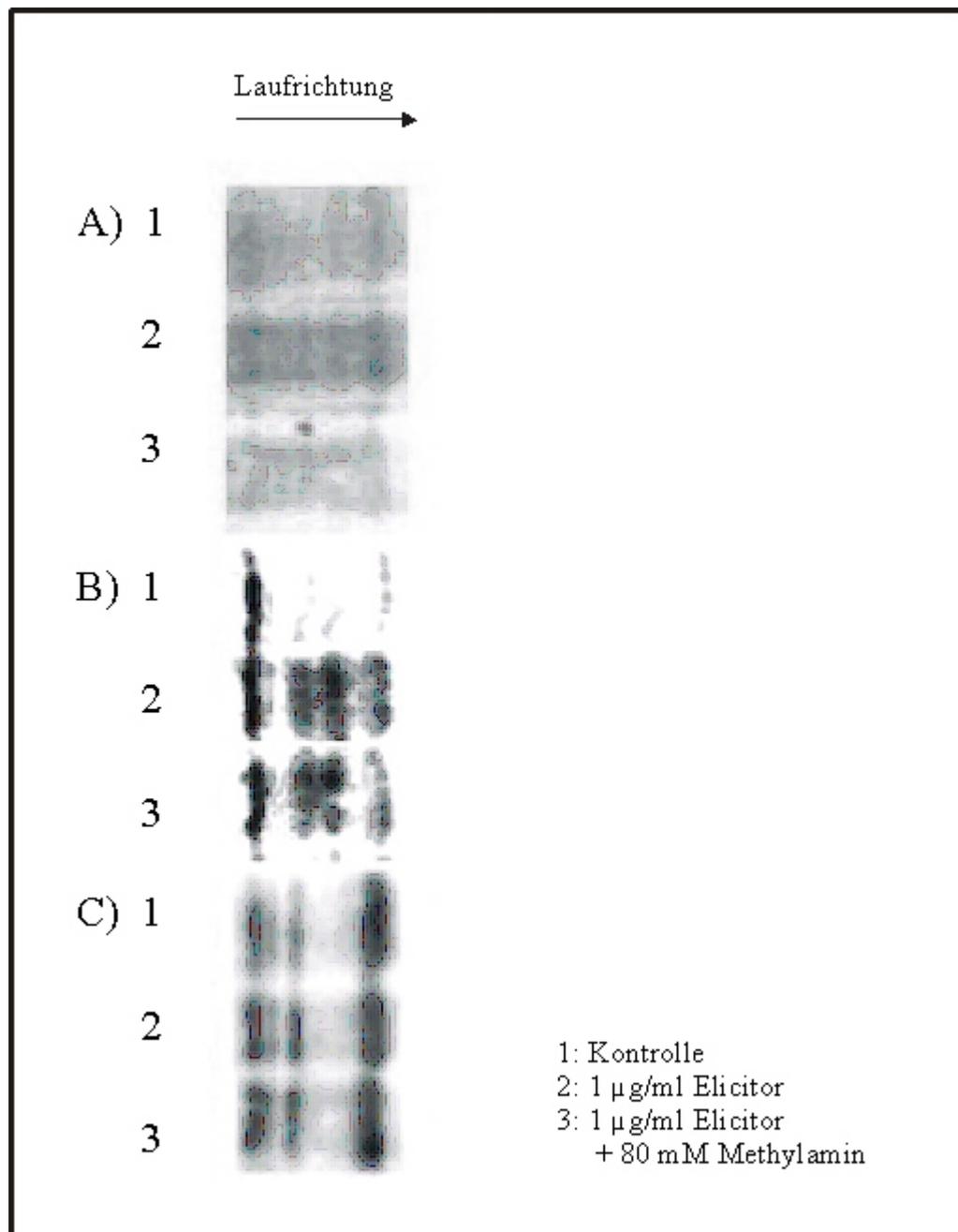


**Abb. 18/1.** Protein-Phosphorylierung nach Elicitorkontakt oder künstlicher Ansäuerung. Behandlung mit Elicitor oder Pivalinsäure erfolgten wie in Abschnitt 2.3.2 angegeben. Probenentnahme bei  $t = 20$  Minuten, Proteinextraktion, SDS-PAGE, Westernblot und Nachweisreaktionen erfolgten wie in Abschnitt 2.5 beschrieben. A) Proteindetektion mit Fast Green; B) Phospho-Tyr-Protein Nachweis C) gekoppelter Phospho-Ser/Thr-Protein Nachweis.

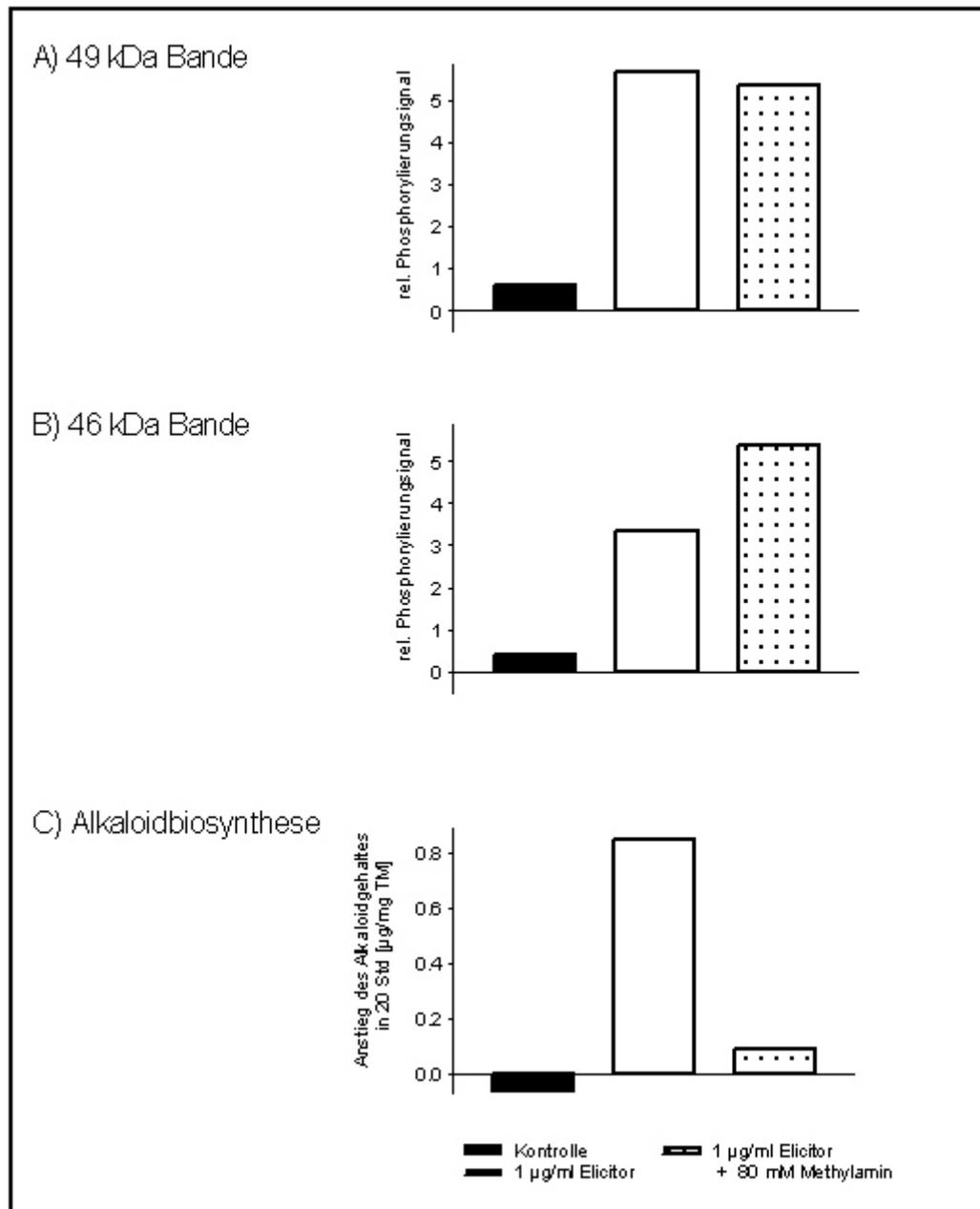


**Abb. 18/2.** Quantifizierte Darstellung für die Effekte von elicitorausgelösten und künstlichen pH-shifts auf Protein-Tyr-Phosphorylierung und Alkaloidbiosynthese.

Die Quantifizierung der in Abb. 19/1 dargestellten Protein-Tyr-Phosphorylierungen erfolgte wie in Abschnitt 2.5 angegeben, die Alkaloidbiosynthese und Trockenmassen wurde wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (Kontrolle, Elicitor: n = 9; Pivalinsäure: n = 3, es wurden nur Suspensionen verwendet, in denen die Alkaloidbiosynthese mindestens 50 % der durch Elicitor ausgelösten entsprach; Bafilomycin: einzelner Versuch). A); B) Tyr-Phosphorylierung der 49 kDa und 46 kDa Protein-Banden. B) Alkaloidbiosynthese derselben Suspensionen in 20 Stunden.



**Abb. 19/1.** Effekt von Methylamin auf Protein-Phosphorylierungen nach Elicitorkontakt. Kontrollbehandlung, Elicitorkontakt sowie Behandlung mit Methylamin erfolgten wie in Abschnitt 2.3.2 angegeben. Probenentnahme bei  $t = 20$  Minuten, Proteinextraktion, SDS-PAGE, Westernblot und Nachweisreaktionen erfolgten wie in Abschnitt 2.5 beschrieben. A) Proteindetektion mit Fast Green; B) Phospho-Tyr-Protein Nachweis C) gekoppelter Phospho-Ser/Thr-Protein Nachweis.



**Abb. 19/2.** Quantifizierte Darstellung der Effekte von Methylamin auf die elicitorausgelöste Protein-Tyr-Phosphorylierung und Alkaloidbiosynthese.

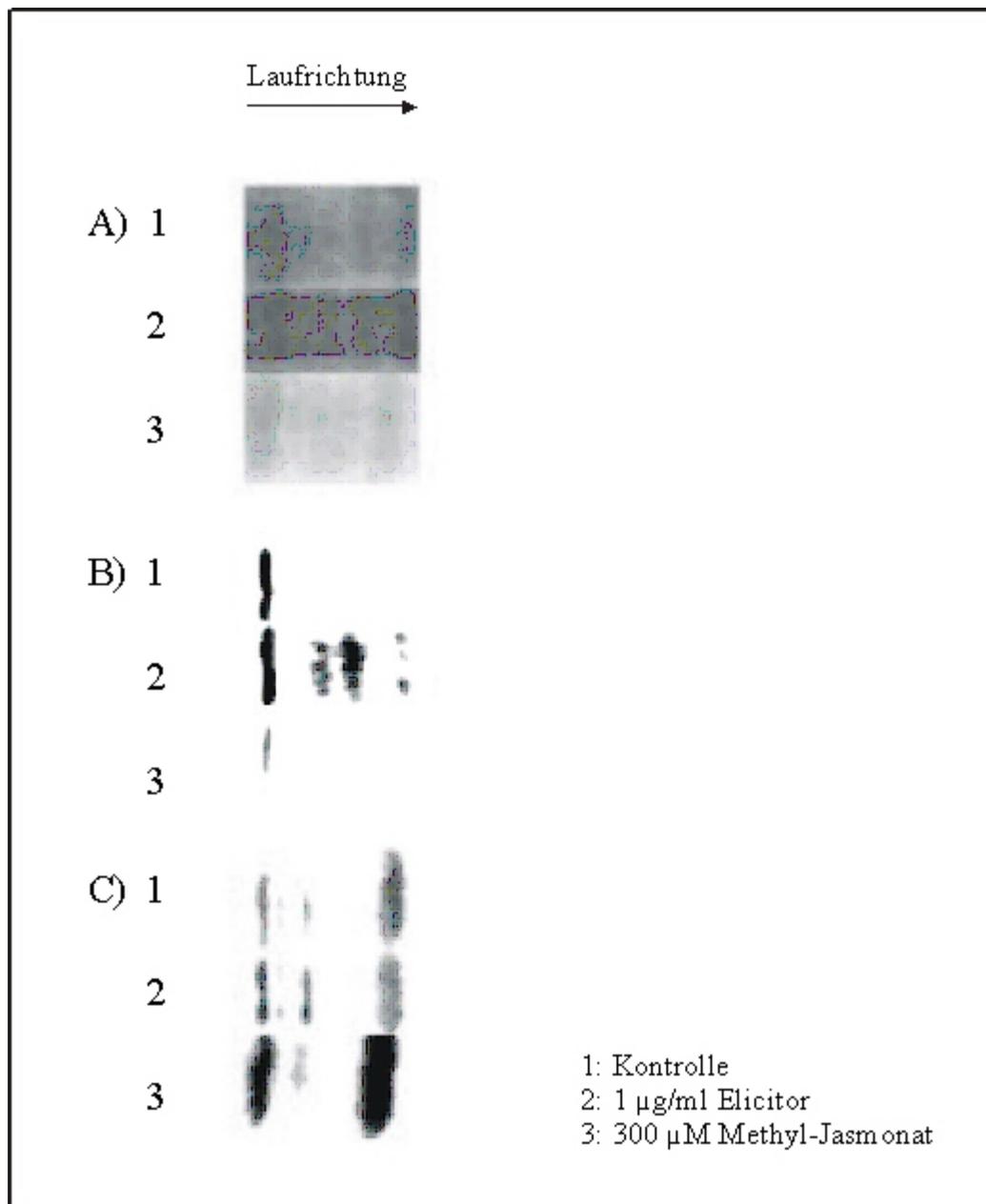
Die Quantifizierung der in Abb. 19/1 dargestellten Protein-Tyr-Phosphorylierungen erfolgte wie in Abschnitt 2.5 angegeben, die Alkaloidbiosynthese und Trockenmassen wurde wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben bestimmt. Dargestellt ist ein typischer von drei Versuchen. A); B) Tyr-Phosphorylierung der 49 kDa und 46 kDa Protein-Banden. C) Alkaloidbiosynthese in 20 Stunden.

#### **3.2.1.4 Methyl-Jasmonat führt zu erhöhter Alkaloidbildung und löst Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung aus**

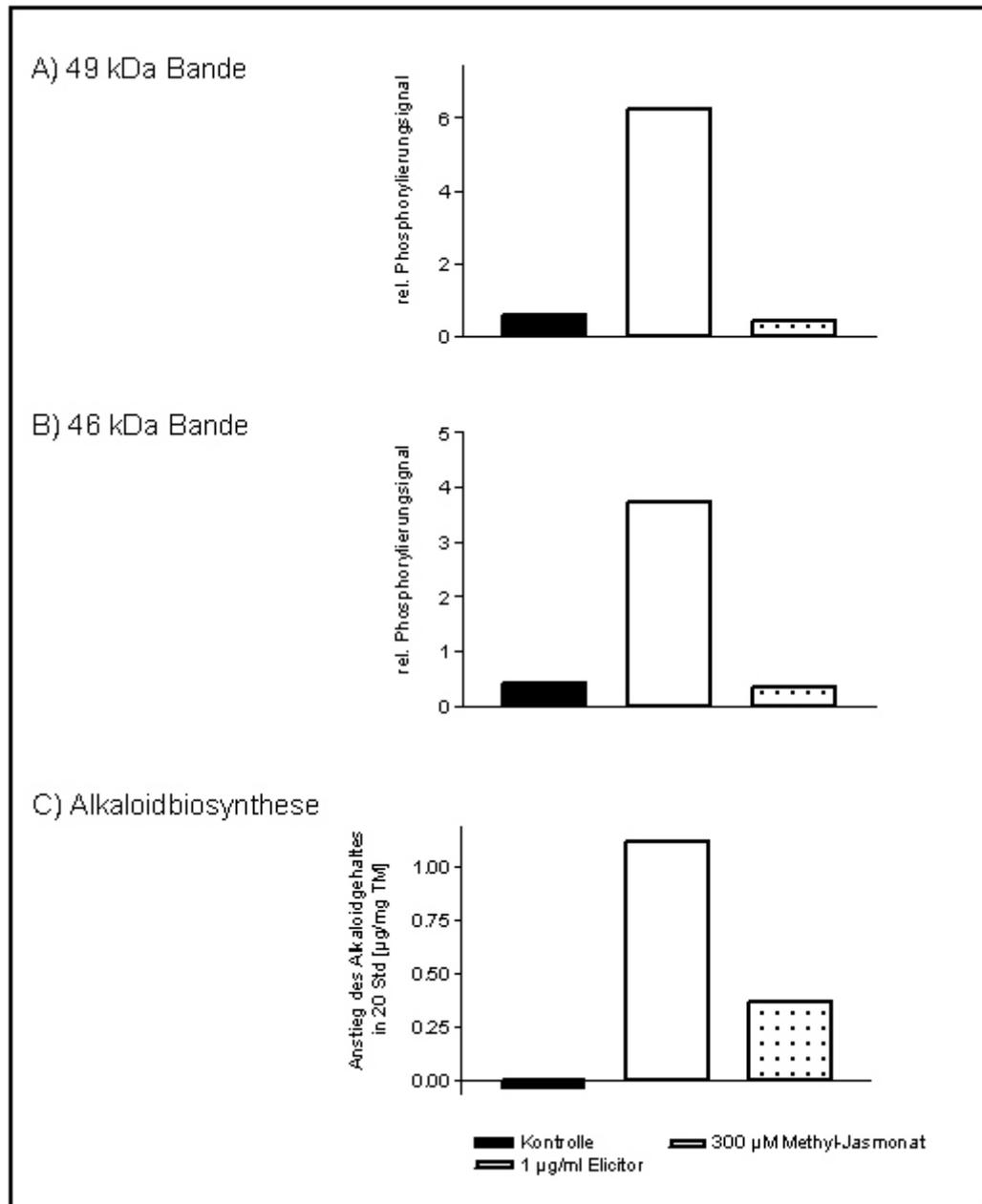
Da die beobachtete Protein-Tyr-Phosphorylierung zwar durch den Hefe-Elicitor ausgelöst wird, jedoch nicht der durch pH-Shifts ausgelösten Alkaloidbiosynthese zugeordnet werden kann (s. Kap. 3.2.1.3), stellte sich die Frage, ob andere externe Signale, welche auf alternativen Wegen zur Alkaloidbiosynthese führen, eine von pH-Shifts unabhängige Protein-Tyr-Phosphorylierung auslösen. Daher wurden auch Zellsuspensionen untersucht, in denen die Alkaloidbildung durch Methyl-Jasmonat induziert wurde.

Wie aus Abb. 20/1B hervorgeht, kann in diesen Zellen keine Veränderung der Protein-Tyr-Phosphorylierung festgestellt werden. Dennoch wird durch die verwendete Jasmonatkonzentration Alkaloidbiosynthese ausgelöst, wenn auch in einem etwas geringeren Umfang als nach Elicitorkontakt (Abb.20/2C). Unter dem Einfluß von Jasmonat konnte eine Zunahme der Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung erkannt werden (Abb. 20/1C). Die hiervon betroffenen Proteine lassen sich aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität im 1-d-Gel von den nach Elicitorkontakt an Tyr-Resten phosphorylierten Proteinen unterscheiden (Abb. 20/1B und 20/1C).

Die Resultate deuten darauf hin, daß die durch Hefe-Elicitor bzw. Methyl-Jasmonat aktivierten Signalwege sich zumindest in der frühen Phase voneinander unterscheiden. Die nach Elicitorkontakt auftretenden Protein-Tyr-Phosphorylierungen sind eine spezifische Reaktion auf den Hefe-Elicitor, scheinen jedoch zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese nicht notwendig zu sein (siehe Abb. 22, sowie Abb. 20/2 und Abb. 21/2). Dagegen löst Jasmonat eine Ser/Thr-Phosphorylierung anderer Protein aus. Dieser Befund unterstreicht andere Daten der Arbeitsgruppe, die ebenfalls auf Unterschiede in der durch Elicitor oder Jasmonat ausgelösten Signalkette hinweisen (Färber et al., 2003).



**Abb. 20/1..** Effekt von Methyl-Jasmonat auf Protein-Phosphorylierungen. Kontrollbehandlung, Elicitorkontakt sowie Behandlung mit Methyl-Jasmonat erfolgten wie in Abschnitt 2.3.2 angegeben. Probenentnahme bei  $t = 20$  Minuten, Proteinextraktion, SDS-PAGE, Westernblot und Nachweisreaktionen erfolgten wie in Abschnitt 2.5 beschrieben. A) Proteindetektion mit Fast Green; B) Phospho-Tyr-Protein Nachweis C) gekoppelter Phospho-Ser/Thr-Protein Nachweis.



**Abb. 20/2.** Quantifizierte Darstellung für die Auswirkungen des Hefe-Elicitors bzw. Methyl-Jasmonat auf Protein-Tyr-Phosphorylierung und Alkaloidbiosynthese.

Die Quantifizierung der in Abb. 19/1 dargestellten Protein-Tyr-Phosphorylierungen erfolgte wie in Abschnitt 2.5 angegeben, die Alkaloidbiosynthese und Trockenmassen wurde wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben bestimmt. Dargestellt ist ein typischer von drei Versuchen. A); B) Tyr-Phosphorylierung der 49 kDa und 46 kDa Protein-Banden. C) Alkaloidbiosynthese in 20 Stunden. Dargestellt ist einer von zwei einander entsprechenden unabhängigen Versuchen. A) Tyr-Phosphorylierung in elicitorresponsiblen Protein-Banden. B) Alkaloidbiosynthese in 20 Stunden.

### 3.2.1.5 Übersicht: Auslösung der Alkaloidbiosynthese und Protein-Phosphorylierung

Zusammenfassend läßt sich aus den zuletzt dargestellten Experimenten folgender Zusammenhang zwischen Elicitorbehandlung, Protein-Tyr-Phosphorylierung und Alkaloidbiosynthese feststellen:

- 1) zwei Protein-Banden zeigen ca. 20 Minuten nach Kontakt mit Hefe-Elicitor eine transiente Phosphorylierung ausschließlich an Tyr-Resten;
- 2) Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren hemmen die elicitorausgelösten Ereignisse "Protein-Tyr-Phosphorylierung" und "Alkaloidbiosynthese";
- 3) eine experimentelle Ansäuerung des Zytoplasmas durch Bafilomycin oder mit permeablen Säuren ist zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese hinreichend, führt jedoch nicht zur Tyr-Phosphorylierung der elicitorresponsiblen Proteine;
- 4) eine Unterbindung des elicitorausgelösten pH-shifts mit Methylamin verhindert die Alkaloidbiosynthese, nicht jedoch die elicitorausgelöste Protein-Tyr-Phosphorylierung;
- 5) diese Phosphorylierung tritt nach Behandlung mit Methyl-Jasmonat nicht auf. Stattdessen werden Ser/Thr-phosphorylierte Proteine beobachtet.

### 3.2.2 Tyr-Phosphorylierung an Membranproteinen

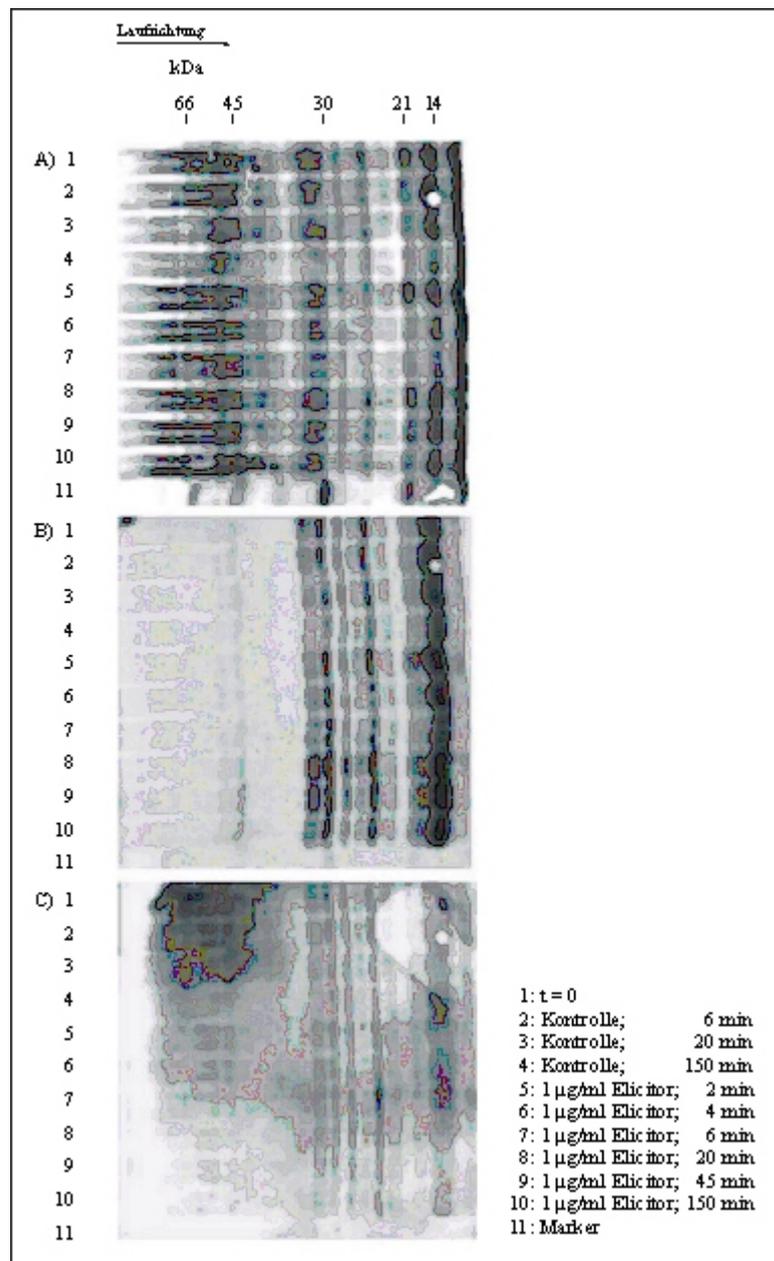
Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die vorangegangenen Experimenten im wesentlichen mit löslichen Proteinen durchgeführt wurden. Viele Membranproteine wurden in der Analyse des Gesamtproteinextraktes nicht erfaßt, da die Bedingungen für die Aufarbeitung des Proteinextrakts (SDS-Konzentration, Temperatur, Fehlen geeigneter Detergentien) vermutlich keine optimale Ausbeute an Membranproteinen in einer für die SDS-PAGE geeigneten Form erlauben. Dafür spricht, daß die aus der Membranfraktion extrahierbaren Proteine (s.u.) in dem bisher verwendeten "Gesamtproteinextrakt" nicht oder nur in sehr geringer Intensität nachweisbar waren.

Deshalb wurden Membranproteine speziell aus dem mikrosomalen Pellet extrahiert (s. 2.5.2) und wie bisher beschrieben auf ihre Tyr-Phosphorylierung untersucht.

Dabei ergab sich zunächst ein experimentelles Problem: wie in Abb. 21/1 ersichtlich ist, binden mit Ausnahme einer Bande bei 45 kDa alle Protein-Banden, welche mit dem Anti-Phospho-Tyr Antikörper reagieren, den Zweitantikörper auch ohne vorherige Inkubation mit dem Phospho-Tyr-spezifischen Antikörper. Die Stärke der unspezifischen Signale lag aber in den meisten Fällen unter der Signalstärke, die durch aufeinanderfolgende Bindung von Erst- und Zweitantikörpern erreicht wird. Daher konnte zur Erkennung und Quantifizierung der tatsächlich an Tyr-phosphorylierten Banden die auf unspezifischer Bindung des Zweitantikörpers beruhende Signalintensität subtrahiert werden (s. 2.6).

Ein klarer Effekt des Hefe-Elicitors auf die Tyr-Phosphorylierung der Membranproteine ist nur schwer zu belegen, da Tyr-phosphorylierte Proteine auch in Kontrollzellen vorhanden sind und die noch zu geringe Probenzahl keine detaillierte statistische Behandlung zuläßt. Dennoch ist in einer Protein-Bande von ca. 45 kD feststellbar, daß nahezu alle Meßwerte der phosphospezifischen Immunreaktion elicierter Zellen über den vergleichbaren Werten aus Kontrollzellen liegen (s. Abb. 21/2A). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß der Hefe-Elicitor einen Anstieg der Tyr-phosphorylierung dieser Membranproteine bewirkt. Ähnliches gilt für die Proteine der 31 kDa Bande (Abb. 21/2B), während für die nur als Doppelbande auswertbaren Proteine von 18 und 19 kDa kein eindeutiger Trend in der Veränderung der Protein-Tyr-Phosphorylierung nach Elicitorbehandlung erkennbar ist. Eine erfolgreiche Auslösung des Signaltransfers durch den Hefe-Elicitor wird an der Alkaloidbiosynthese ersichtlich (s. Abb. 21/2D).

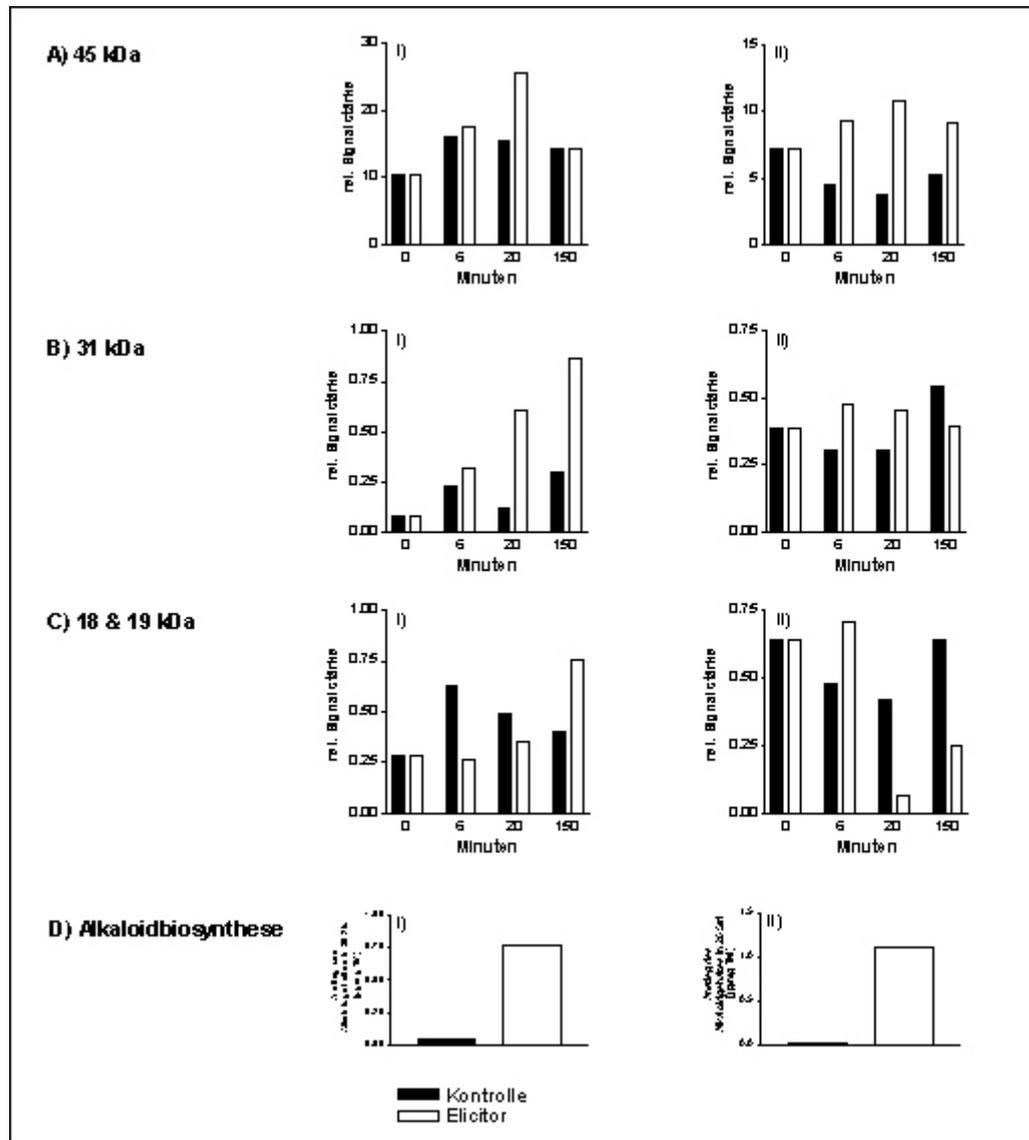
Insgesamt wird erkennbar, daß sich die Proteine aus Membranfraktionen hinsichtlich ihres Phosphorylierungsverhaltens deutlich von Proteinen des Gesamtextraktes unterscheiden. Bereits in nicht-stimulierten Zellen liegen einige Membranproteine im Tyr-phosphorylierten Zustand vor, nach Elicitorkontakt findet also keine *de novo* Tyr-Phosphorylierung von zuvor nicht phosphorylierten Proteinen statt, wie dies für den Gesamtextrakt gezeigt werden konnte. Nach Elicitorbehandlung kann das Signal gegenüber Kontrollzellen jedoch bis auf das 3-fache gesteigert werden.



**Abb. 21/1.** Phosphorylierung von Membranproteinen aus *E. californica* in Kontrollzellen und nach Elicitorkontakt.

Zellsuspensionen wurden wie in 2.3 beschrieben mit 1 µg/ml Elicitor oder als Kontroll suspension behandelt. Unmittelbar vor Elicitorzusatz ( $t = 0$ ) sowie zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und hieraus die Membranfraktionen gewonnen. Aus diesen wurden die Membranproteine mit Lysispuffer + 2 % SDS für 20 Minuten bei 40°C extrahiert; s. 2.5.2. SDS-PAGE in einem 15 %-igen Gel (je Spur ~ 10 µg Protein), Westernblot und Nachweisreaktionen erfolgten wie in Abschnitt 2.5.3 dargestellt.

A) Proteindetektion mit Fast Green; B) und C) Signale der Antikörperreaktionen: B) Phospho-Tyr-Protein Nachweis C) gekoppelter Phospho-Ser/Thr-Protein Nachweis. Parallel dazu wurde die Alkaloidbiosynthese derselben Suspensionen in 20 Stunden bestimmt (s. 2.3.3): Kontrolle: 0,06 µg/mg TM; Elicitor: 0,68 µg/mg TM.



**Abb. 21/2.** Quantifizierte Tyr-Phosphorylierung von Membranproteinen und Alkaloidbiosynthese in Kontrollzellen und nach Kontakt mit Hefe-Elicitor aus zwei Versuchen.

Die Behandlung von Zellen und Extrakten erfolgte wie in Abb. 21/1. Es wurden nur Protein-Banden ausgewertet, in denen bei Verwendung des Primär-Antikörpers ein deutlich höheres Signal vorhanden ist, als bei ausschließlicher Verwendung des Sekundär-Antikörpers. Hierzu wurden anhand eines Immunodotblots mit mehreren identischen Proben typische Streuungsmaße für die Signalstärken der einzelnen Immunreaktionen (Sekundär-Antikörper allein oder in Kombination mit Primär-Antikörper) ermittelt. Diese Streuungsmaße wurden auf die gemessenen Intensitäten der einzelnen Protein-Banden für die jeweilige Immunreaktion übertragen und für jede Protein-Bande einzeln mittels t-Test überprüft, ob von einem Unterschied zwischen der Intensität des unspezifischen Signals und des Gesamtsignals ausgegangen werden kann (Signifikanzniveau: 5 %). Nach Abzug des unspezifischen Anteils am Gesamtsignal wurde die weitere Quantifizierung wie für lösliche Proteine beschrieben durchgeführt; s. 2.5.3. I bis III) Tyr-Phosphorylierung von Membranproteinen: I) 45 kDa-Bande ; II) 31 kDa-Bande; III) 18 & 19 kDa-Doppelbande. IV) Alkaloidbiosynthese derselben Suspensionen in 20 Stunden; s. 2.3.3.

Diese Resultate können zwar noch nicht als eindeutiger Beweis für eine Wirkung des Elicitors auf die Tyr-Phosphorylierung von Membranproteinen gewertet werden, machen jedoch eine Beteiligung dieses Vorgangs am Signaltransfer wahrscheinlich. Diese Punkte zusammen lassen eine weitere Suche nach Tyr-Phosphorylierungen von Membranproteinen nach Elicitorkontakt unter verbesserten methodischen Bedingungen sinnvoll erscheinen.

## 4 Diskussion

Im Signaltransfer von Pflanzen ist die Beteiligung verschiedener Protein-Ser/Thr-Kinasen gut untersucht (Hardie, 1999), während die Kenntnisse über Protein-Tyr-Phosphorylierungen in der pflanzlichen Signalleitung noch sehr begrenzt sind (Kerk, 2002; Luan, 2002).

Vor diesem Hintergrund sind die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Resultate zur selektiven Tyr-Phosphorylierung bestimmter Proteine sowie die Wirkung von Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren auf die Induktion der Alkaloidbiosynthese ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Protein-Tyr-Phosphorylierung in Pflanzen. Um die Wirkung einer großen Zahl von Protein-Kinase-Inhibitoren auf die elicitorausgelöste Überproduktion von Alkaloiden testen zu können, mußte zunächst ein geeignetes Untersuchungssystem etabliert werden.

### 4.1 Auslösung des Alkaloid-Stoffwechsels in Mini-Kulturen von *E. californica*

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, daß mit Nährmedium benetzte Zellsuspensionen von *E. californica* als Mini-Kulturen in den Kompartimenten einer 96-er Mikrotiter-Platte bei geringen Schichtdicken auch ohne Schüttelbewegung über mindestens 24 h kultiviert werden können. Bisher galt die Bewegung suspendierter Pflanzenzellen im Medium als notwendige Voraussetzung für deren Kultivierung. Das hier etablierte Verfahren erlaubt die Auslösung der Alkaloidbildung als Zellantwort auf den Elicitorkontakt in ruhenden Zellaggregaten und eliminiert damit störende Einflüsse von mechanischem Streß bei der Schüttelbewegung.

Zugleich konnte mit diesem Untersuchungssystem ein problemloser Austausch des Nährmediums vorgenommen werden und damit ein zeitlich begrenzter Kontakt mit beliebigen Effektoren ermöglicht werden. Unter solchen Bedingungen wurde eine Auslösung der Alkaloidbiosynthese durch verschiedene Signale (Hefe-Elicitor, Jasmonat, zytoplasmatische pH shifts) ähnlich wie in "normalen" Suspensions-Kulturen bewirkt, ebenso konnte die Signalantwort durch spezifische Inhibitoren erwartungsgemäß unterdrückt werden.

Mit Mini-Kulturen werden somit Experimente zur Wirkung chemischer Effektoren des Signaltransfers auf den Alkaloidstoffwechsel mit hohem Probendurchsatz, ökonomisch vertretbarem Aufwand sowie solider statistischer Dokumentation ermöglicht.

Auf diese Weise konnte z.B. durch Verwendung des V-ATPase Inhibitors Bafilomycin gezeigt werden, daß ein Efflux vakuolärer Protonen in das Zytoplasma hinreichend für die Auslösung der Alkaloidbiosynthese ist. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, die sich aus der Wirkungsweise von Bafilomycin (Bowman et al., 1988; Maeshima, 2001) und aus mikroskopischen Experimenten mit *in situ*-Vakuolen (Viehweger et al., 2002) in Kombination mit vorangegangenen Untersuchungen über den pH-abhängigen Signalweg in *E. californica* ergeben

(Roos et al., 1998).

#### **4.2 Die Aktivierung des Alkaloid-Stoffwechsels in *E. californica* erfordert keine Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung**

Die Auslösung der Alkaloidbiosynthese durch einen Glykoprotein-Elicitor aus Hefe wird von Hemmstoffen der Protein-Tyr-Phosphorylierung, nicht aber von Hemmstoffen der Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung gestoppt. Diese Ergebnisse wurden durch den immunologischen Nachweis des Auftretens Tyr-phosphorylierter Proteine kurz nach Elicitorkontakt erhärtet. Eine elicitorausgelöste Ser/Thr-Phosphorylierung konnte dagegen auch mit immunologischen Mitteln nicht in nennenswertem Umfang gefunden werden.

Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, weil die Phosphorylierung von Proteinen an Ser- oder Thr-Resten im Rahmen der Pathogenabwehr in zahlreichen Pflanzenspezies gut dokumentiert ist. Die weitaus meisten Hinweise stammen aus der Anwendung von spezifischen Hemmstoffen dieses Phosphorylierungstyps, vor allem Staurosporin und K-252a, welche zahlreiche elicitorausgelöste Reaktionen verhindern, u.a. den  $K^+$ -Efflux (in Tabak und Kichererbse, Romeis et al., 2000; Otte et al., 2001), die externe Alkalisierung (in Bohne, Tabak und Kichererbse, Blechert et al., 1995; Matthieu et al., 1996; Otte et al., 2001), den oxidative burst (in Soja, Tabak und Kichererbse; Taylor et al., 2001; Romeis et al., 2000; Otte et al., 2001), die Aktivierung von MAPKs (in Soja und Tabak, Taylor et al., 2001; Romeis et al., 2000) oder die Jasmonatbiosynthese (in Bohne und *Catharantus roseus*, Blechert et al., 1995; Menke et al., 1999).

Übereinstimmend mit diesen Daten können mit den Protein-Ser/Thr-Phosphatase-Inhibitoren Calyculin A und Cantharidin Ereignisse, welche sonst nach Elicitorkontakt eintreten, wie der  $K^+$ -Efflux (in Tabak und Kichererbse, Romeis et al., 2000; Otte et al., 2001), die externe Alkalisierung (in Tomate und Kichererbse, Stratmann et al., 2000; Otte et al., 2001) sowie der oxidative burst (in Kichererbse, Tabak und Soja, Otte et al., 2001; Romeis et al., 2000; Taylor et al., 2001) und die Aktivierung von MAPKs (in Soja, jedoch nicht in Tabak, Taylor et al., 2001; Romeis et al., 2000) aktiviert werden.

Damit wird die Beteiligung eines Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Zyklus von Proteinen an Ser- oder Thr-Resten für eine große Gruppe von Signalereignissen sehr wahrscheinlich.

Bei näherer Betrachtung wird klar, daß es sich dabei meist um Elemente einer Signalkaskade handelt, die zur hypersensitiven Reaktion führt. Ein wichtiger Schritt hierzu ist die Generierung von ROS (Bolwell, 1999; Dangl und Jones, 2001; Heath, 2000b; Piffanelli et al., 1999), die zu den oben genannten Aktivitäten gehört, welche von Effektoren von Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen beeinflussbar sind. Auch die anderen genannten Reaktionen, wie der  $K^+$ -Efflux und die externe Alkalisierung finden in Tabak (Romeis et al., 2000; Harding und Roberts, 1998), Petersilie (Jabs et al., 1997) oder Kichererbse (Otte et al., 2001) in enger Korrelation mit dem

oxidative burst statt.

Auch die Auslösung der Phytoalexinbiosynthese wird durch Protein-Ser/Thr-Kinase-Inhibitoren gehemmt. In *Sanguinaria canadensis* wurde dies z.B. durch den direkten Einfluß von Staurosporin auf die Elicitierung der Phytoalexinproduktion gezeigt (Mahady et al., 1998).

In *C. roseus* oder *Glycine max* wurden die Effekte von K-252a auf der Ebene der Genregulation überprüft. In *C. roseus* sind hiervon die Transkription von Genen der Tryptophan Dekarboxylase (*TDC*) und der Strictosidin Synthase (*STR*) betroffen (Menke et al., 1999). Beide Enzyme sind an der Produktion von terpenoiden Indolalkaloiden beteiligt (Facchini, 2001). In *G. max* hingegen wird durch K-252a die Transkription des *PAL*-Gens inhibiert (Rajasekhar et al., 1999), womit das zentrale Enzym des Phenylpropanoid Stoffwechsels getroffen wird (Weisshaar und Jenkins, 1998).

In einigen Fällen besteht offenbar ein enger regulatorischer Zusammenhang zwischen der Ausbildung des oxidative burst und der Phytoalexinbiosynthese. Dafür spricht z.B., daß in Soja beide Prozesse durch identische Konzentrationen von K-252a gehemmt werden (Rajasekhar et al., 1999).

Die bisher identifizierten und wahrscheinlich am Signaltransfer in Pflanzenzellen beteiligten Protein-Ser/Thr-Kinasen lassen sich im wesentlichen 3 Klassen zuordnen:

- Elicitor-Rezeptoren mit Protein-Ser/Thr-Kinasen als Signaldomäne. Ein Beispiel ist die Pto-Kinase in Tomate, die nach Kontakt mit ihren Liganden (avrPto) einen oxidative burst auslöst (Sessa und Martin, 2000).
- Enzyme der MAPK Kaskade. Verschiedene Inhibitoren, die eine Aktivierung von MAPKs in Soja verhindern, führen auch zu einer Unterbindung des oxidative burst (Taylor et al., 2001).
- Ca<sup>2+</sup>-abhängige Proteinkinasen (CDPKs) werden in Tabak durch den Inhibitor W7 (ein Naphtylsulfonamid) ebenso wie die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies gehemmt (Romeis et al., 2000).

Die Aktivierung dieser Protein-Ser/Thr-Kinasen sollte in jedem Fall zu einem vermehrten Auftreten von Proteinen, die an Ser- oder Thr-Resten phosphoryliert sind, führen. Das Fehlen solcher Proteine, zusammen mit den fehlenden Effekten von Hemmstoffen der Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung in dem hier untersuchten System der Pathogenabwehr von *E. californica* ist daher ein starker Hinweis darauf, daß die ubiquitäre Signalkaskade zur hypersensitiven Reaktion nicht abläuft, wenn sehr niedrige Elicitorkonzentrationen und damit der pH-abhängige Signalweg benutzt werden (s.u.). Allerdings kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß mit den hierzu verwendeten Antikörpern nicht sämtliche an Ser- oder Thr-Resten phosphorylierten Proteine detektiert werden (Xing et al., 2002) oder diese Proteine nur während sehr kurzer Zeiträume auftreten.

Bei einer Aktivierung der Alkaloidbiosynthese durch Methyl-Jasmonat, welche über einen alternativen Signalweg stattfindet (Färber et al., 2003), konnte dagegen eine erhöhte Phosphorylierung von Proteinen an Ser- oder Thr-Resten detektiert werden.

Eine Aktivierung von Protein-Ser/Thr-Kinasen durch Methyl-Jasmonat wird auch für *C. roseus* postuliert, da K-252a die durch Jasmonat induzierbare Expression der Tryptophan Dekarboxylase und der Strictosidin Synthase inhibiert (Menke et al., 1999).

Zusammengenommen sprechen die Resultate somit dafür, daß in *E. californica* Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen zwar an bestimmten Signalwegen beteiligt sein können, jedoch nicht für den über zytoplasmatische pH-shifts ablaufenden Signalweg zur Aktivierung der Alkaloidbiosynthese benötigt werden.

Die Resultate zum Fehlen der Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung nach Elicitorkontakt stimmen gut mit anderen Befunden aus unserer Arbeitsgruppe überein (Roos et al. 1998, Färber et al. 2003), welche eine vom oxidative burst unabhängige Auslösung der Alkaloidbiosynthese in *E. californica* belegen. Die wichtigsten Argumente hierfür sind:

- niedrige Elicitorkonzentrationen (bis 1 µg/ml des verwendeten Glykoproteins) führen zu einer fast maximalen Alkaloidbiosynthese, ohne einen Anstieg von Jasmonat oder andere typische Reaktionen im Umfeld des oxidative burst auszulösen, wie z.B. K<sup>+</sup>-Efflux, externe Alkalisierung und Bildung von Polyphenolen (Roos et al., 1998).
- bei hohen Elicitorkonzentrationen wird, neben K<sup>+</sup>-Efflux und externer Alkalisierung, eine Verbräunung der Zellsuspension ausgelöst. Letztere Reaktion wird offenbar durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkt, da sie durch Gegenwart von Katalase im Kulturmedium verhindert wird. Die Zugabe von Katalase hat jedoch keinen Einfluß auf die Alkaloidbiosynthese (Roos et al., 1998).
- nur hohe Elicitorkonzentrationen (> 5 µg/ml) führen zu einem Anstieg von Jasmonat (Färber et al., 2003). Methyl-Jasmonat seinerseits löst bei externer Zugabe einen deutlichen Anstieg der Alkaloidbildung aus (Gundlach et al., 1992; Haider et al., 2000; Färber et al., 2003). Die Unabhängigkeit der durch Jasmonate einerseits und niedrige Elicitorkonzentrationen andererseits ausgelösten Signalereignisse wird auch dadurch belegt, daß Zugabe von Methyl-Jasmonat nicht zu einem pH-shift führt (Färber et al., 2003). Niedrige Elicitorkonzentrationen lösen einen pH-shift, jedoch nicht die Produktion von Jasmonaten aus.
- der Kontakt mit Elicitor oder Methyl-Jasmonat verursacht eine Desensibilisierung der Alkaloidantwort auf einen nachfolgenden Kontakt. Durch Elicitor wird eine Desensibilisierung der Zellantwort (Alkaloidbildung) gegenüber einem zweiten Elicitorkontakt, nicht jedoch gegenüber einer nachfolgenden Behandlung mit Methyl-Jasmonat bewirkt. Findet der Erstkontakt dagegen mit Methyl-Jasmonat statt, wird eine nachfolgende Behandlung mit Methyl-Jasmonat nicht mehr mit einer weiteren Steigerung der Alkaloidbiosynthese beantwortet, wohl aber ein nachfolgender Elicitorkontakt (Färber et al., 2003). Dieses Verhalten legt ebenfalls getrennte Signalwege nahe.

### 4.3 Elicitorkontakt löst Protein-Tyr-Phosphorylierungen in *E. californica* aus

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals für *Eschscholzia*-Zellen die elicitorabhängige Phosphorylierung löslicher und membranständiger Proteine an Tyr-Resten gefunden. Diese Reaktion wurde aus anderen pflanzlichen Pathogenabwehr-Systemen bisher nur selten berichtet.

In Soja Zellkulturen findet ungefähr 30 Minuten nach Infiltration mit *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* (*Psg*) eine Phosphorylierung von Proteinen an Tyr-Resten statt. Diese Reaktion kann zusammen mit einem nachfolgendem oxidative burst durch frühzeitige Behandlung mit dem Protein-Tyr-Kinase-Inhibitor Herbimycin, der oxidative burst auch durch den Protein-Ser/Thr-Kinase-Inhibitor K-252a verhindert werden (Rajasekhar et al., 1999). Letzteres ist ein Hinweis auf hieran beteiligte MAPKs, die in Soja durch Elicitierung aktiviert und durch K-252a gehemmt werden können (Taylor et al., 2001).

Die Auslösung der Protein-Tyr-Phosphorylierungen und deren zeitlicher Verlauf zeigt weitere Unterschiede zum *Eschscholzia*-Untersuchungssystem. In Soja wurden die Protein-Tyr-Phosphorylierungen und der oxidative burst nicht direkt durch Zusatz einer Elicitorpräparation ausgelöst, sondern finden erst 3 - 4 h nach Infiltration mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *glycinae* statt. In dieser Zeit werden wahrscheinlich erst Elicatoren durch das Pathogen produziert, was die Einordnung der in diesem Zeitraum ausgelösten Protein-Tyr-Phosphorylierungen in den Ablauf des Signaltransfers erschwert (Rajasekhar et al., 1999).

In *E. californica* werden Protein-Tyr-Phosphorylierungen dagegen bereits wenige Minuten nach Zugabe des verwendeten Hefe-Elicitor ausgelöst, außerdem wurden für die Elicitierung Bedingungen gewählt, unter denen keine Synthese reaktiver Sauerstoffspezies stattfindet (Roos et al., 1998). Aus den elektrophoretischen Mobilitäten der in Soja gefundenen Tyr-phosphorylierten Proteine geht hervor, daß diese den in *E. californica* aufgefundenen und spezifisch an Tyr-Resten phosphorylierten Proteinen nicht gleichen.

Auch die jeweils beteiligten Protein-Tyr-Kinasen scheinen unterschiedlich zu sein, da Herbimycin zwar in Soja, nicht aber in *Eschscholzia* zu einer Unterbindung von Abwehrreaktionen führt. Die in *Eschscholzia* auf Zellantwort und Protein-Tyr-Phosphorylierung wirksamen Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren aus der Substanzklasse der Tyrphostine wurden in Soja-Kulturen leider nicht eingesetzt.

Diese Differenzen mögen vor allem darin begründet sein, daß in Soja wahrscheinlich der "allgemeine" Weg zur Aktivierung der hypersensitiven Reaktion aktiviert wurde, während im hier verwendeten *Eschscholzia*-System ein selektiv zur Alkaloidbiosynthese führender Signalweg untersucht wird.

Weitere Berichte über während der Pathogenabwehr ausgelöste Protein-Tyr-Phosphorylierungen entstammen Arbeiten, in denen die Aktivierung von MAPKs untersucht wurde. Der zeitliche Verlauf der Aktivierung und die elektrophoretischen Mobilitäten einiger MAPKs (z.B. in Petersilie, Ligterink et al., 1997; in Soja, Taylor

et al., 2001; in Tabak, Romeis et al., 1999 oder in *Arabidopsis*, Asai et al., 2002; Nühse et al., 2000) entsprechen ungefähr den in *E. californica* nach Elicitierung ausgelösten Protein-Tyr-Phosphorylierungen. Allerdings ist, wie bereits dargelegt (s. 1.3.2.5.3), zur Aktivierung von MAPKs außer der Phosphorylierung eines Tyr-Restes gleichzeitig eine durch dieselbe MAPKK katalysierte Thr-Phosphorylierung notwendig (Hardie, 1999; Zhang und Liu, 2001; Zwerger und Hirt, 2001). Proteine, die nach Elicitierung gleichzeitig an Tyr- und Thr-Resten phosphoryliert werden, konnten jedoch in *E. californica* immunologisch nicht nachgewiesen werden. Außerdem spricht die Unwirksamkeit der in anderen Spezies gegenüber MAPKs wirksamen Protein-Kinase-Inhibitoren (z.B. Staurosporin in Tabak, Romeis et al., 2000 oder K-252a in Soja, Taylor et al., 2001) im *Eschscholzia*-System dafür, daß hier keine MAPKs zur Aktivierung der Alkaloidbiosynthese notwendig sind.

Die bis heute dokumentierten Protein-Tyr-Phosphorylierungen erfolgen nicht ausschließlich an MAPKs. Offenbar werden auch Proteine des Zytoskeletts an Tyr-Resten phosphoryliert. Dies gilt für Profilin in *Phaseolus vulgaris* (Guillén et al., 1999) und Aktin in *Mimosa pudica* (Kameyama et al., 2002). In letzterem Fall wurde eine solche Phosphorylierung im Ruhezustand festgestellt, mechanische Reizung führt zur typischen Blattbewegung sowie zur Dephosphorylierung von Aktin. Da Veränderungen im Zytoskelett auch für die Generierung des oxidativen Bursts notwendig sein könnten (Heath, 2000b), ist somit eine Möglichkeit für die Einbindung von an Tyr-Resten phosphorylierten Proteinen in die pflanzliche Pathogenabwehr gegeben.

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Signalweg führt jedoch nicht zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies; inwieweit Veränderungen des Zytoskeletts auch unabhängig von einem oxidativen Burst an der Aktivierung der Pathogenabwehr beteiligt sind, ist noch ungeklärt.

Profilin sind mit 14 kDa wesentlich kleiner als die in der vorliegenden Arbeit aufgefundenen an Tyr-Resten phosphorylierten Proteine. Demgegenüber verfügt Aktin über eine molekulare Masse von ca. 45 kDa, dies liegt im Bereich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten, an Tyr-Resten phosphorylierten Proteine. In weiteren Arbeiten könnte daher überprüft werden, ob Aktin in *E. californica* einer elicitorabhängigen Tyr-Phosphorylierung unterliegt.

Aus Erdnuß wurde mit der STY-Kinase eine an Tyr-Resten phosphorylierte, dualspezifische Protein-Kinase mit einer apparenten Masse von ca. 50 kDa isoliert (Rudrabhatla und Rajasekharan, 2002). Das Enzym ist nicht mit einer MAPK identisch und stellt ein weiteres Indiz für die Bedeutung von Protein-Tyr-Phosphorylierungen im pflanzlichen Signaltransfer dar. Die STY-Kinase wird mehrere Stunden nach Salz- oder Trockenstress über Auto-Phosphorylierung an Tyr-Resten aktiviert, was deren Aktivität als Protein-Tyr-Kinase *in vivo* nachweist. Weitere Substrate aus Erdnuß wurden nicht untersucht (Rudrabhatla und Rajasekharan, 2003).

Die molekulare Größe dieser Kinase stimmt zwar ungefähr mit der größeren der in der vorliegenden Arbeit aufgefundenen, an Tyr-Resten phosphorylierten Protein-Bande überein, die unterschiedlichen ausgelösten Signalwege (Pathogenabwehr in

*Eschscholzia*, osmotischer Streß in Erdnuß) sowie die Aktivierungskinetiken lassen eine Verbindung zwischen den beiden experimentellen Systemen jedoch eher unwahrscheinlich erscheinen.

Tatsächlich scheint es sich also bei der in *E. californica* aufgefundenen Protein-Tyr-Phosphorylierung um eine Reaktion zu handeln, die sehr spezifisch nach Kontakt mit dem Hefe-Elicitor stattfindet, nicht jedoch z.B. in Methyl-Jasmonat-behandelten Kulturen.

Ein Anstieg von endogenem Jasmonat erfolgt in dieser Zellkultur erst bei Elicitorkonzentrationen, die auch eine externe Alkalisierung bewirken (Färber et al., 2003; Roos et al., 1998), wohingegen die Protein-Tyr-Phosphorylierungen bereits bei Konzentrationen stattfinden, die zur selektiven Auslösung der Alkaloidbiosynthese führen. Höhere Elicitorkonzentrationen (5 µg/ml) führen zu zusätzlichen Reaktionen im Umfeld des oxidative burst (Roos et al., 1998) ohne die Alkaloidbiosynthese oder die Protein-Tyr-Phosphorylierung nennenswert weiter zu steigern.

Letztere Reaktion findet also in einer vergleichbaren Konzentrationsabhängigkeit vom Hefe-Elicitor statt, wie die pH-abhängige Auslösung der Alkaloidbiosynthese. Die gleichsinnige Wirkung der Tyrphostine auf die Alkaloidbiosynthese und die festgestellte Protein-Tyr-Phosphorylierung spricht ebenso für die Beteiligung dieser Proteine an der Auslösung der Alkaloidbiosynthese.

Trotz dieser weitgehenden Gemeinsamkeiten zwischen den durch Elicitorkontakt ausgelösten Ereignissen "Protein-Tyr-Phosphorylierungen" und "Alkaloidbiosynthese" wurde nach experimenteller Ansäuerung des Zytoplasmas keine Protein-Tyr-Phosphorylierung zum Untersuchungszeitpunkt festgestellt (s. 3.2.1.3).

Es bleibt zwar nicht ausgeschlossen, daß sich der zeitliche Verlauf einer Protein-Tyr-Phosphorylierung nach künstlicher Ansäuerung des Zytoplasmas von der durch Elicitorkontakt ausgelösten Reaktion unterscheidet und daher zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten nicht detektierbar war. Der ähnliche zeitliche Verlauf der durch Elicitor oder permeable Säuren ausgelösten Ansäuerung des Zytoplasmas (Roos et al., 1998) spricht jedoch ebenso gegen diese Annahme wie eine nach Elicitorkontakt unverminderten Protein-Tyr-Phosphorylierung unter dem Einfluß von Methylamin - wenn also durch Elicitorkontakt weder eine Ansäuerung des Zytoplasmas noch die Alkaloidbiosynthese ausgelöst werden kann (Roos et al., 1998).

Somit können Protein-Tyr-Phosphorylierung und Alkaloidbiosynthese voneinander unabhängig stattfinden (s. 3.2.1.3) und die nach Elicitorkontakt transient an Tyr-Resten phosphorylierten Proteine von 46 bzw. 49 kDa werden wahrscheinlich nicht für die Auslösung der Alkaloidbiosynthese benötigt.

Da deren Phosphorylierung ausschließlich nach Elicitorkontakt zu beobachten war, nicht jedoch nach anderen Signalen, die zur Aktivierung der Alkaloidbiosynthese führen, sind diese Proteine offensichtlich an einer weiteren, spezifisch durch den Elicitor ausgelösten Reaktion beteiligt.

Dies könnte die durch niedrige Elicitorkonzentrationen ausgelöste Deaktivierung

gegenüber einem nachfolgendem Elicitorkontakt (Färber et al., 2003) sein. Da der Angriffspunkt der Densensibilisierung bisher noch nicht bekannt ist, ist eine Beteiligung der aufgefundenen Tyr-phosphorylierten Proteine hieran zumindest denkbar. Es ist auch nicht auszuschließen, daß die aufgefundenen Protein-Tyr-Phosphorylierungen an der Wiedererlangung des vor Elicitorkontakt vorhandenen pH-Gradienten zwischen Zytoplasma und Vakuole beteiligt sind.

Weitere Informationen über den untersuchten Signalweg entstammen den vorgestellten Experimenten mit Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren. Von den verwendeten Inhibitoren aus der Substanzklasse der Tyrphostine waren ausschließlich die  $\alpha$ -Cyano-Cinnamitrile (AG 18, AG 82, AG 126) wirksam. Dagegen führte AG 99, ein  $\alpha$ -Cyano-Cinnamid-Analogen zu AG 18, nicht zu einer Einschränkung der durch Elicitorkontakt ausgelösten Überproduktion von Alkaloiden (s. 7.3, Abb. 26). Die durch die  $\alpha$ -Cyano-Cinnamitrile inhibierten Protein-Tyr-Kinasen sind jedoch noch unbekannt.

Die Wirkungen von AG 82 und AG 126 auf die elicitorausgelösten Protein-Tyr-Phosphorylierungen machen deutlich, daß diese in pflanzlichen Zellen bisher selten verwendete Klasse von Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren in derselben, auch in anderen Untersuchungen eingesetzten Konzentration (Barizza et al., 1999) die Alkaloidbiosynthese tatsächlich über eine Inhibierung von Protein-Tyr-Kinasen beeinflussen.

Die über einen längeren - aber begrenzten - Zeitraum nach Elicitierung zu beobachtende Wirkung der Tyrphostine auf die Alkaloidbiosynthese spricht dafür, daß eine oder mehrere am Signalgeschehen beteiligten Protein-Tyr-Kinasen ungefähr bis 4 Stunden nach Elicitorkontakt aktiv sind.

Dagegen lagen die immunologisch detektierten, transient an Tyr-Resten phosphorylierten Proteine bereits lange vorher wieder im nicht-phosphorylierten Zustand vor. Dies läßt darauf schließen, daß weitere transient an Tyr-Resten phosphorylierte Proteine existieren sollten, die mit der verwendeten Methodik in der löslichen Proteinfraction jedoch nicht detektierbar sind. Diese Schlußfolgerung geht auch aus der Inhibierbarkeit der durch künstliche Ansäuerung ausgelösten Alkaloidbiosynthese hervor, da nach einer solchen Behandlung immunologische keine vermehrte Detektion Tyr-phosphorylierter Proteine möglich war.

Möglicherweise werden durch die verwendeten Tyr-spezifischen Antikörper nicht alle an Tyr-Resten phosphorylierten Proteine erkannt (Xing et al., 2002), oder die betroffenen Proteine sind in einer zu geringen Menge vertreten, um mit den verwendeten Antikörpern nachgewiesen werden zu können

Auf Ebene der Protein-Ser/Thr-Phosphorylierung sind lang anhaltenden Aktivitäten von Protein-Kinasen nach Elicitorkontakt bereits beschrieben worden. Hier sind vor allem CDPKs zu nennen, die in Bohne und Tomate bis 4 Stunden nach Elicitierung in aktivem Zustand aufgefunden wurden (Allwood et al., 2002; White, 2002).

Auch die Untersuchung der Fraktion der Membranproteine lieferte Hinweise auf weitere nach Elicitorkontakt an Tyr-Resten phosphorylierte Proteine (s. 3.2.2), jedoch sind die Resultate aufgrund der eingeschränkten Anzahl von Untersuchungen

statistisch noch nicht ausreichend abgesichert, um die Bedeutung phosphorylierter Membranproteine am Signalgeschehen abschließend nachzuweisen.

Aus anderen Systemen gibt es weitere Hinweise für Membranproteine, die an Tyr-Resten phosphoryliert sein könnten, so kann in Erdnuß der  $K^+$ -Efflux aus Vakuolen mit Protein-Tyr-Phosphatase-Inhibitoren deutlich vermindert werden (MacRobbie, 2002). Hierbei wurde jedoch nicht untersucht, welche(s) Protein(e) tatsächlich von einer Protein-Tyr-Phosphorylierung betroffen ist. Interessanterweise findet im tierischen System eine Endozytose von ROMK1, einem  $K^+$ -Kanal, statt, wenn dieser an Tyr-Resten phosphoryliert ist. Die Endozytose ist hier ebenfalls sensitiv gegenüber Protein-Tyr-Phosphatase-Inhibitoren (Sterling et al., 2002).

Die funktionelle Bedeutung von Tyr-phosphorylierten Membranproteinen in Pflanzen ist jedoch noch nicht geklärt.

Insgesamt sprechen die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultate deutlich für die Existenz von Protein-Tyr-Kinasen in *E. californica* und deren Aktivierung nach Elicitorkontakt:

Verschiedene, an Tyr-Resten phosphorylierte Proteine wurden in der löslichen Fraktion aufgefunden, vorläufige Daten lassen auch in der Membranfraktion solche Proteine erkennen. Zwar können die angesprochenen Proteine der löslichen Fraktion zur Zeit nicht in den Signalweg zur Aktivierung der Alkaloidbiosynthese eingeordnet werden, die Verwendung von Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren lieferte aber weitere Erkenntnisse über den Signaltransfer.

Die Eignung einiger dieser Inhibitoren wird an ihrer starken Wirkung auf die elicitorausgelöste Protein-Tyr-Phosphorylierung ersichtlich; der ebenfalls vorhandener Effekt auf die Signalantwort spricht damit für die Existenz weiterer, an Tyr-Resten phosphorylierter Proteine.

Die detektierten Proteine der löslichen Fraktion gehören dagegen einem weiteren elicitorausgelösten Signalweg an, der Protein-Tyr-Phosphorylierungen beinhaltet, aber vermutlich unabhängig von der Alkaloidbiosynthese ist.

#### 4.4 Ausblick

Durch die Detektion Tyr-phosphorylierter Proteine in *E. californica*, die Etablierung von Mini-Kulturen und die somit ermöglichte Auffindung von in *E. californica* wirksamen Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren sowie deren Überprüfung mit *in vivo* Phosphorylierungsassays sind Voraussetzungen zur weiteren Untersuchung von Protein-Tyr-Phosphorylierung und anderer Signalprozesse in *E. californica* geschaffen worden.

Für weiterführende Arbeiten erscheinen folgende Ansatzpunkte vordringlich: Zunächst ist die Identität und Signalfunktion der detektierten, löslichen Proteine mit Massen von 46 und 49 kDa aufzuklären. Nach 2-dimensionaler elektrophoretischer Trennung könnten die Proteinspots isoliert werden. Durch Peptidverdau und massenspektroskopische Untersuchung der Fragmente kann eine Identifizierung von Proteinen erfolgen und hierüber auf deren Funktion geschlossen werden (Peck et al., 2001). Auf diesem Wege können auch die letzten Unsicherheiten hinsichtlich der Identität der Tyr-phosphorylierten Proteinen als MAPKs ausgeräumt werden. Weiter könnte eine Überprüfung der Wirkung von AG 82 und AG 126 gegenüber der durch Elicitorkontakt ausgelösten Desensibilisierung hinsichtlich eines nochmaligen Elicitorkontakt (Färber et al., 2003) Hinweise liefern, ob die genannten Proteine hieran beteiligt sein könnten.

Außerdem sind aufgrund der vorgestellten Resultate weitere an Tyr-Resten phosphorylierte Proteine, die am Signaltransfer beteiligt sind, zu erwarten. Diese aufzufinden und zu identifizieren ist von erheblicher Bedeutung für die weitere Aufklärung des pH-abhängigen Signaltransfers in *E. californica*. Solche Proteine könnten sowohl in der löslichen als auch in der Membranfraktion enthalten sein. Zur weiteren Untersuchung beider Fraktionen sind jedoch die methodischen Voraussetzungen zu optimieren.

Proteine der löslichen Fraktion bedürfen zumindest einer Anreicherung, beispielsweise über eine vorgeschaltete Immunpräzipitation mit Anti-Phospho-Tyr Antikörpern, bevor diese einer immunologischen Detektion mit denselben Antikörpern zugänglich sind. Alternativ hierzu sind Phospho-Protein Anreicherungskits kommerziell erhältlich, die auf der negativen Ladung der Phosphatreste basieren. Damit könnten auch in geringerer Konzentration vorhandene regulatorische Proteine mit höherer Wahrscheinlichkeit erfaßt werden. Auch durch Verwendung Phospho-Tyr-spezifischer Antikörper mit anderer Bindungsspezifität könnte eine Detektion weiterer an Tyr-Resten phosphorylierter Proteine ermöglicht werden.

Insbesondere für die Membranfraktion kann es vorteilhaft sein, anstelle des gewählten Detektionssystems über Zweitantikörper die Interaktion zwischen Biotin und Avidin bzw. Streptavidin zu nutzen. Biotinylierte phosphospezifische Antikörper sind ebenso erhältlich wie mit Peroxidasen konjugierte Bindungspartner. Neben dem beschrittenen immunologischen Ansatz kann zur Analyse des Phospho-Proteoms auch eine radioaktive Markierung mit  $^{32}\text{P}$  und Phospho-

Aminosäureanalyse durchgeführt werden (Guillén et al., 1999; Nühse et al., 2000; Xing et al., 2002), um Unsicherheiten über die Bindungsspezifität von Antikörpern auszuschließen. Der Vorteil ist auch für die Untersuchung von Membranproteinen offensichtlich, da diese vor allem durch die Affinität des Zweitantikörpers gegenüber einigen Membranproteinen erschwert wurde (s. 3.2.2).

Neben der Identifizierung weiterer an Tyr-Resten phosphorylierter Proteine ist insbesondere die Suche nach den hierfür verantwortlichen Protein-Tyr-Kinasen attraktiv. Hierbei wäre es von großem Vorteil, wenn bereits Kenntnisse über deren Substrate vorliegen. In diesem Falle können Zellaufschlüssen gegenüber diesem Substrat, bzw. einem hieraus abgeleiteten Peptid auf die Phosphorylierungsaktivität überprüft werden. Ein solcher Aktivitätstest ist eine notwendige Voraussetzung zur Etablierung einer auf chromatographischen Methoden beruhenden Aufreinigung und Identifizierung der gesuchten Protein-Tyr-Kinasen.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Mini-Kulturen können weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Alkaloidbiosynthese wesentlich effizienter gestalten. So können neben Protein-Kinase-Inhibitoren auch andere gegen potentielle Signalproteine gerichtete spezifische Hemmstoffe zur Untersuchung des Signaltransfers verwendet werden.

Mini-Kulturen sind auch eine ideale Basis für andere Untersuchungen, die einen hohen Probendurchsatz erfordern. So findet die Alkaloidbiosynthese nicht nur nach Elicitorkontakt, sondern auch in Abhängigkeit verschiedener weiterer Stressoren statt. Für ein "screening" nach solchen Signalmolekülen können Mini-Kulturen ein geeignetes System mit hohem Probendurchsatz darstellen.

Das System läßt sich prinzipiell auch dahingehend weiterentwickeln, neben Sekundärstoffen auch Proteine oder Nukleinsäuren aus pflanzlichen Mini-Kulturen unter Bedingungen eines hohen Probendurchsatzes zu extrahieren.

## 5 Zusammenfassung

- Suspensionszellen von *E. californica* können als Mini-Kulturen in 96-er Mikrotiter-Platten unter optimierten Bedingungen über einen Zeitraum von mindestens 20 Stunden kultiviert werden. Optimal ist dabei eine ruhende Kultur bei geringer Schichtdicke und Benetzung mit einem kleinem Volumen eines geeigneten Kulturmediums. Den Zellen zugesetzte Effektoren können durch Absaugen des Mediums zu beliebigen Zeiten wieder ausgewaschen werden. Dieses Untersuchungssystem ermöglicht Experimente über den zur Aktivierung des Sekundärstoffwechsel notwendigen Signaltransfer mit einem hohen Probendurchsatz. Die Vorteile des hohen Probendurchsatzes bedeuten eine Verminderung des Aufwandes bei der Untersuchung der Effekte einer Vielzahl von Effektoren in mehreren Parallelen mit einer soliden statistischen Dokumentation.
- Protein-Tyr-Kinasen sind an einem durch niedrige Elicitorkonzentrationen ausgelösten Signalweg zur Aktivierung der Alkaloidbiosynthese beteiligt. Verschiedene Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren aus der Substanzklasse der Tyrphostine vermindern die elicitorausgelöste Überproduktion von Alkaloiden. Dies kann nicht mit einer allgemeinen Beeinträchtigung des Stoffwechsels durch diese Inhibitoren erklärt werden, da deren Wirkung bei einer 4 Stunden nach Elicitorkontakt erfolgenden Zugabe deutlich geringer als bei frühzeitiger Zugabe ist.
- Die für den Signaltransfer benötigten Protein-Tyr-Kinasen werden durch zytoplasmatische Ansäuerung aktiviert. Die für den elicitorabhängigen Signaltransfer notwendige zytoplasmatische Ansäuerung kann experimentell auch durch Behandlung mit permeablen Säuren ausgelöst werden. Die hierdurch aktivierte Alkaloidbiosynthese ist ebenso durch Tyrphostine hemmbar wie die durch Elicitorkontakt hervorgerufene Reaktion. Überdies kann die Alkaloidbiosynthese auch noch nach dem elicitorausgelöstem pH-shift durch Tyrphostine vermindert werden.
- Elicitorkontakt löst eine transiente Tyr-Phosphorylierung löslicher Proteine von 46 und 49 kDa aus, die Konzentrationsabhängigkeit folgt dabei ungefähr derjenigen von pH-shift und Alkaloidbiosynthese. Diese Phosphorylierung wird ebenso wie die Alkaloidbiosynthese durch Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren aus der Substanzklasse der Tyrphostine deutlich vermindert. Damit ist von der Existenz bisher nicht identifizierter Protein-Tyr-Kinasen in *E. californica* auszugehen.
- Die bisher nachgewiesenen, an Tyr-Resten phosphorylierten löslichen Proteine sind wahrscheinlich nicht am pH-abhängigen Signaltransfer zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese beteiligt. Eine künstliche Ansäuerung bewirkt zwar eine Aktivierung der Alkaloidbiosynthese in *E. californica*, eine Phosphorylierung

der nach Elicitorkontakt an Tyr-Resten phosphorylierten Proteine wird hierdurch jedoch nicht ausgelöst. Umgekehrt wird durch eine experimentelle Verhinderung des elicitorausgelösten pH-shifts der Signaltransfer zur Aktivierung der Alkaloidbiosynthese unterbunden, nicht aber die elicitorausgelöste Protein-Tyr-Phosphorylierung.

- Neben den aufgefundenen Proteinen sollten noch weitere Proteine einer Protein-Tyr-Phosphorylierung unterliegen. Dies geht daraus hervor, daß Protein-Tyr-Kinase-Inhibitoren auch unter Bedingungen, unter denen bisher keine an Tyr-Resten phosphorylierten Proteine gefunden wurden (z.B. 1 bis 2 Stunden nach Elicitorkontakt oder nach künstliche Ansäuerung), eine Verminderung der Alkaloidbiosynthese bewirken.
- Auch Membranproteine der *E. californica*-Zellkultur werden an Tyr-Resten phosphoryliert. Einige der Proteine unterliegen sehr wahrscheinlich einer elicitorabhängigen Regulation in ihrem Phosphorylierungsgrad.
- Methyl-Jasmonat führt zur Alkaloidbiosynthese, ohne die nach Elicitorkontakt beobachtete Protein-Tyr-Phosphorylierung zu bewirken. Statt dessen nehmen Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen zu. Diese Unterschiede sprechen für getrennte Signalwege, welche durch niedrige Elicitorkonzentrationen oder Jasmonate ausgelöst werden. Sie finden auch auf anderen Ebenen ihre Entsprechungen, wie andere Resultate unserer Arbeitsgruppe zeigen, z.B. Unterschieden in der Desensibilisierung, der Abhängigkeit der Jasmonat- und Alkaloidbildung von der Elicitorkonzentration und der selektiven Auslösung von pH-shifts nach Elicitorkontakt (Färber et al., 2003).
- Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen sind am pH-abhängigen Signalweg zur Alkaloidbildung nicht beteiligt. Sowohl durch spezifische Inhibitoren als auch durch immunologische Detektion von an Ser- oder Thr-Resten phosphorylierten Proteinen konnten keine Hinweise für Protein-Ser/Thr-Phosphorylierungen während des elicitorausgelösten Signaltransfers in *E. californica* erhalten werden.

Die verwendete Zellkultur von *E. californica* ist damit ein ausgezeichnetes Untersuchungssystem zur weiteren Analyse der in Pflanzen noch nicht umfassend untersuchten Protein-Tyr-Phosphorylierung und deren Bedeutung für Signalprozesse, speziell im Rahmen der Pathogenabwehr.

## 6 Literatur

- Allwood, E. G., Davies, D. R., Gerrish, C. und Bolwell, G. P. (2002), *Plant Mol. Biol.* 49, 533-544.
- Armero, J. und Tena, M. (2001), *Plant Sci.* 161, 791-798.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M. und Sheen, J. (2002), *Nature* 415, 977-983.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskavicz, B. und Dinesh-Kumar, S. P. (1997), *Science* 276, 726-733.
- Baker, C. J. und Orlandi, E. W. (1995), *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321.
- Balk, J., Leaver, C.J. und McCabe, P. F. (1999), *FEBS Lett.* 463, 151-154.
- Barizza, E., Lo Schiavo, F., Terzi, M. und Filippini, F. (1999), *FEBS Lett.* 447, 191-194.
- Bestwick, C. S., Brown, I. R., Bennett, M. H. R. und Mansfield, J. W. (1997), *Plant Cell* 9, 209-221.
- Birkett, M. A., Campbell, C. A. M., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A., Martin, J. L., Matthes, M., Napier, J. A., Petterson, J., Pickett, J. A., Poppy, G. M., Pow, E. M., Pye, B. J., Smart, L. E., Wadhams, G. H., Wadhams, L. J. und Woodcock, C. M. (2000), *Procl. Nat. Acad. Sci USA* 97, 9329-9334.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T. M., Mueller, M. J., Xia, Z.-Q. und Zenk, M. H. (1995), *Procl. Nat. Acad. Sci USA* 92, 4099-4105.
- Blecker, A. B. und Schaller, G. E. (1996), *Plant Physiol.* 111, 653-660.
- Blumer, K. J. und Johnson, G. L. (1994), *TIBS* 19: 236-240.
- Blumwald, E., Aharon, G. S., und Lam, B. C.-H. (1998), *Trends Plant Sci.* 3, 342-346.
- Bogdanove, A. J. und Martin, G. B. (2000), *Procl. Nat. Acad. Sci USA* 97, 8836-8840.
- Bögre, L., Meskiene, I., Heberle-Bors, E. und Hirt, H. (2000), *Plant Mol. Biol.* 43, 705-718.
- Bolwell, G. P. (1999), *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 287-294.
- Bowman, E. J., Siebers, A. und Altendorf, K. (1988), *Procl. Nat. Acad. Sci USA* 85, 7972-7976.
- Burnett, E. C., Desikan, R., Moser, R. C. und Neill, S. J. (2000), *J. Exp. Bot.* 51, 197-205.
- Bradford, M.M. (1976). *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cao, C., Ren, X., Kharbanda, S., Koleske, A., Prasad, K. V. S. und Kufe, D. (2001), *J. Biol. Chem.* 276, 11465-11468.
- Chandra, S., Martin, G. B. und Low, P. S. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13393-13397.

- Chivasa, S. und Carr, J. P. (1998), *Plant Cell* 10, 1489-1498.
- Clarke, J. D., Volko, S. M., Ledford, H., Ausubel, F. M. und Dong, X. (2000), *Plant Cell* 12, 2175-2190.
- Clough, S. J., Fengler, K. A., Yu, I-C., Lippok, B., Smith, Jr., R. K. and Bent, A. F. (2000), *Procl. Nat. Acad. Sci USA* 97, 9323-9328.
- Cock, J. M., Vanoosthuysse, V. und Gaude, T. (2002), *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 230-236.
- Collmer, A. (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 329-335.
- Conconi, A., Miquel, M., Browse, J. A. und Ryan, C. A. (1996), *Plant Physiol.* 111, 797-803.
- Conrath, U., Pieterse, C. M. J. und Mauch-Mani, B. (2002), *Trends Plant Sci.* 7, 1-7.
- Creelman, R. A. und Mullet, J. E. (1995), *Procl. Nat. Acad. Sci USA* 92, 4114-4119.
- Dangl, J. und Jones, J. D. G. (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 285-287.
- Dangl, J. L. und Jones, J. D. G. (2001), *Nature* 411, 826-832.
- Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H.-W., Troppmair, J. und Rapp, U. R. (1994), *Trends Biol. Sci.* 19, 474-479.
- Delaney, T. P. (1997), *Plant Physiol.* 113, 5-12.
- De Luca, V. und Laflamme, P. (2001), *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 225-233.
- Dixon, M. S., Golstein, C., Thomas, C. M., van der Biezen, E. A. und Jones, J. D. G. (2000), *Procl. Nat. Acad. Sci USA* 97, 8807-8814.
- Dixon, R. A. (2001), *Nature* 411, 843-847.
- Dixon, R. A. und Lamb, C. J. (1990), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 339-367.
- Dong, X. (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 316-323.
- Dröse, S., Bindseil, K. U., Bowman, E., Siebers, A., Zeeck, A. und Altendorf, K. (1993), *Biochem.* 32, 3902-3906.
- Durner, J., Wendehenne, D. und Klessig, D. F. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10328-10333.
- Durner, J. und Klessig, D. F. (1999), *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 369-374.
- Dwyer, S. C., Legendre, L., Kow, P. S. und Leto, T. L. (1996), *Biochim. Biophys. Acta*, 1289, 231-237.
- Ebel, J. und Mithöfer, A. (1998), *Planta* 206, 335-348.
- Facchini, P. J., Johnson, Al G., Poupart, J. und De Luca, V. (1996), *Plant Physiol.* 111, 687-697.
- Facchini, P. J. (2001), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 29-66.
- Färber, K., Schumann, B., Miersch, O. und Roos, W. (2003), *Phytochem.* 62, 491-500
- Feys, B. J. und Parker, J. E. (2000), *Trends Gen.* 16, 449-455.

- Friedrich, L., Mayer, M., Ward, E., Ryals, J. (1991), *Mol. Gen. Genet.* 230: 113-119.
- Frye, C. A., Tang, D. und Innes, R. W. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 373-378.
- García-Pérez, M. D., Egea, C. und Candela, M. E. (1998), *Physiol. Plant.* 103, 527-533.
- Gesell, A. (2001), Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie, Universität Halle-Wittenberg.
- Glazebrook, J. (1999), *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 280-286.
- Glazebrook, J. (2001), *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 301-308.
- Goldberg, J. (1998), *Cell* 95, 237-248.
- Gómez-Gómez, L. und Boller, T. (2000), *Mol. Cell* 5, 1003-1011.
- Gómez-Gómez, L., Bauer, Z. und Boller, T. (2001), *Plant Cell* 13, 1155-1163.
- Grant, M. und Mansfield, J. (1999), *Curr Opin. Plant Biol.* 2, 312-319.
- Grenier, J., Potvin, C. und Asselin, A. (1993), *Plant Physiol.* 103, 1277-1283.
- Grill, E. und Himmelbach, A. (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 412-418.
- Guillén, G., Valdéz-Lópes, V., Noguez, R., Olivares, J., Rodríguez-Zapata, L. C., Pérez, H., Vidalí, L., Villanueva, M. A. und Sánchez, F. (1999), *Plant J.* 19, 497-508.
- Gundlach, H. Müller, M. J., Kutchan, T. M. und Zenk, M. H. (1992), *Procl. Nat. Acad. Sci USA* 89, 2389-2393.
- Haider, G., von Schrader, T., Füßlein, M., Blechert, S. und Kutchan, T. M. (2000), *Biol. Chem.* 381, 741-748.
- Ham, J. H., Bauer, D. W., Fouts, D. E. und Collmer, A. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10206-10211.
- Hardie, D. G. (1999), *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 50, 97-131.
- Harding, S. A. und Roberts, D. M. (1998), *Planta* 206, 253-258.
- Harmon, A. C., Gribskov, M. und Harper, J. F. (2000), *Trends Plant Sci.* 5, 154-159.
- Hauschild, K., Pauli, H. H. und Kutchan, T. M. (1998), *Plant Mol. Biol.* 36, 473-478.
- Hausladen, A. und Stamler, J. S. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10345-10347.
- He, D.-J., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N. und Minami, E. (1998), *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 1167-1174.
- He, Z., Wang, Z.-Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P. und Chory, J. (2000), *Science* 288, 2360-2363.
- Heath, M. C. (2000a), *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 315-319.
- Heath, M. C. (2000b), *Plant Mol. Biol.* 44, 321-334.
- Hollstein, P. (2001), Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie, Universität Halle-

- Wittenberg.
- Huang, Y., Li, H., Gupta, R., Morris, P. C., Luan, S. und Kieber, J. J. (2000), *Plant Physiol* 122, 1301-1310.
- Innes, R. W. (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 299-304.
- Jabs, T., Tschöpe, T., Colling, C., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4800-4805.
- Jabs, T., Dietrich, R. A. und Dangl, J. L. (1996), *Science* 273, 1853-1856.
- Joosten, M. H. A. J., Vogelsang, R., Cozijnsen, T. J., Verberne, M. C. und De Wit, P. J. G. M. (1997), *Plant Cell* 9, 367-379.
- Kameyama, K., Kishi, Y., Yoshimura, M., Kanzawa, N. und Sameshima, M. (2000), *Nature* 407, 37.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S. und Gribskov, M. (2002), *Plant Physiol.* 129, 908-925
- Keyse, S. M. (2000), *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 186-192.
- Kinkema, M., Fan, W. und Dong, X. (2000), *Plant Cell* 12, 2339-2350.
- 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. und Silva, H. (2000), *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 97, 8849-8855.
- Knogge, W. (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 324-328.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G. und Shenn, J. (2000), *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 97, 2940-2945.
- Kuchitsu, K., Yazaki, Y., Sakano, K., und Shibuya, N. (1997), *Plant Cell Physiol.* 38, 1012-1018.
- Küppers, M. (2001), Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie, Universität Halle-Wittenberg.
- Kurosaki, F., Yamashita, A. und Arisawa, M. (2001), *Plant Sci.* 161, 273-278.
- Lamb, C. J. und Dixon, R. A. (1997), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-271.
- Laemmli, U. K. (1970), *Nature* 227, 680-685.
- Lapous, D., Matthieu, Y., Guern, J. und Lauriere, C. (1998), *Planta* 205, 452-458.
- Laxalt, A. M. und Munnik, T. (2002), *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 1-7.
- Lebrun-Garcia, A., Chiltz, A., Gout, E., Bligny, R. und Pugin, A. (2002), *Planta* 214, 792-797.
- Lee, Y.-R. J. und Assmann, S. M. (1999), *Plant Mol. Biol.* 40, 55-64.
- Lein, W. und Saalbach, G. (2001), *Biochim. Biophys. Acta* 1530, 172-183.
- León, J., Rojo, E. und Sánchez-Serrano, J. J. (2001), *J. Exp. Bot.* 52, 1-9.
- Leschke, G. (1997), Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie, Universität Halle-Wittenberg.
- Lewis, B. D., Karlin-Neumann, G., Davis, R. W. und Spalding, E. P. (1997), *Plant Physiol.* 114, 1327-1334.

- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H. und Scheel, D. (1997), *Science* 276, 2054-2057.
- Luan, S. (1998), *Trends Plant Sci.* 3, 271-275.
- Luan, S. (2002), *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 99, 11567-11569.
- Luttrell, L. M., Daaka, Y. und Lefkowitz, R. J. (1999), *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 177-183.
- Ma, Y.-C. und Huang, X.-Y. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12197-12201.
- MacKintosh, C. und MacKintosh, R. (1994), *Trends Biol. Sci.* 19, 444-448.
- MacRobbie, E. (2002), *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 99, 11963-11968.
- Madhani, H. D. (2001), *Cell* 106, 9-11.
- Maeshima, M. (2001), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 469-497.
- Mahady, G. B. und Beecher, C. W. W. (1994), *Planta Med.* 60, 553-557.
- Mahady, G. B., Liu, C. und Beecher, C. W. W. (1998), *Phytochemistry* 48, 93-102.
- Martin, G. B. (1999), *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 273-279.
- Martiny-Baron, G. und Scherer, G. F. E. (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 18052-18059.
- Matthieu, Y., Lapous, D., Thomine, S., Lauriere, C. und Guern, J. (1996), *Planta* 199, 416-424.
- Mehdy, M. C., Sharma, Y. K., Sathasivan, K. und Bay, N. W. (1996), *Physiol Plant.* 98, 365-374.
- Menke, F. L. H., Parchmann, S., Mueller, M. J., Kijne, J. W. und Memelink, J. (1999), *Plant Physiol.* 119, 1289-1296.
- Millner, P. A. (2001), *New Phytol.* 151, 165-174.
- Mittler, R., Lam, E., Shulaev, V. und Cohen, M. (1999), *Plant Mol. Biol.* 39, 1025-1035.
- Nishizawa, Y., Kawakami, A., Hibi, T., He, D.-Y., Shibuya, N. und Minami, E. (1999), *Plant Mol. Biol.* 39, 907-914.
- Müller, M. J., Brodschelm, W., Spannagl, E. Und Zenk, M. H. (1993), *Procl. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 7490-7494.
- Mundy, J. und Schneitz, K. (2002), *Trends Plant Sci.* 7, 54-55.
- Munnik, T., Irvine, R. F., und Musgrave, A. (1998), *Biochim. Biophys. Acta* 1389, 222-272.
- Munnik, T. (2001), *Trends Plant Sci.* 6, 227-233.
- Murillo, I., Jaeck, E., Cordero, J. und Segundo, B. S. (2001), *Plant Mol. Biol.* 45, 145-158.
- Newman, E. A. und Zahrs, K. R. (1997), *Science* 275: 844-847.
- Nitzsche, A. (2001), *Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie, Universität Halle-Wittenberg.*
- Nühse, T. S., Peck, S. C., Hirt, H. und Boller, T. (2000), *J. Biol. Chem.* 275, 7521-7526.

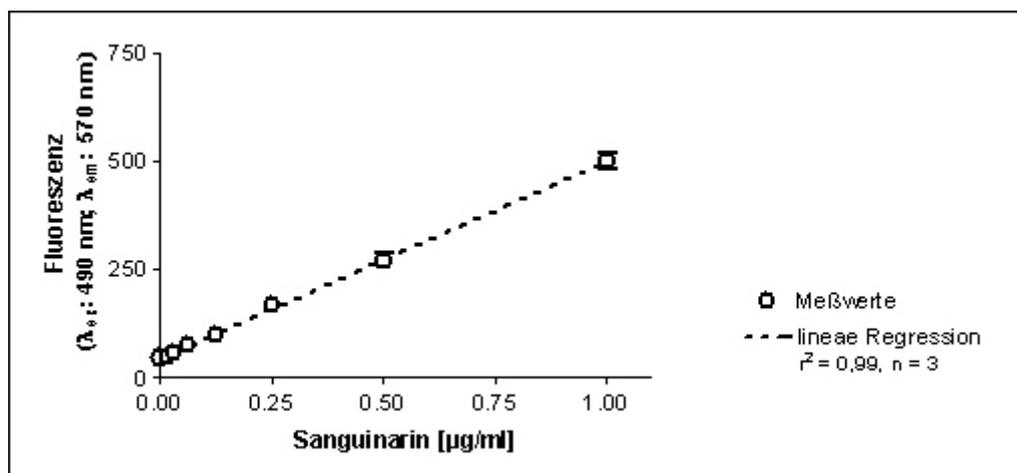
- Nürnbergger, T. und Scheel, D. (2001), Trends Plant Sci. 6, 372-379.
- Nürnbergger, T. (1999), Cell. Mol. Life Sci. 55, 167-182.
- Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1994), Cell 78, 449-460.
- Oldroyd, G. E. D. und Staskavicz, B. J. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 10300-10305.
- Otte, O, Pachten, A., Hein, F. und Barz, W. (2001), Z. Naturforsch. 56, 65-76.
- Parchmann, S., Gundlach, H. und Müller, M. J. (1997), Plant Physiol. 115, 1057-1064.
- Parker, J. E., Feys, B. J., van der Biezen, E. A., Noël, L., Aarts, N., Austin, M. J., Botella, M. A., Frost, L. N., Daniels, M. J. und Jones, J. D. G. (2000) Mol. Plant Pathol. 1, 17-24.
- Peck, S.C., Nühse, T. S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F. und Boller, T. (2001), Plant Cell 13, 1467-1475.
- Penninckx, I. A. M. A., Eggermont, C., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Métraux, J.-P., Manners, J. M. und Broekaert, W. F. (1996), Plant Cell 8, 2309-2323.
- Piffanelli, P., Devoto, A. und Schulze-Lefert, P. (1999) Curr. Opin. Plant Biol. 2, 295-300.
- Rajasekhar, K. R., Lamb, C. und Dixon, R. A. (1999) Plant Physiol. 120, 1137-1146.
- Rogers, E. E. und Ausubel, F. M. (1997), Plant Cell 9, 305-316.
- Romeis, T. (2001), Curr. Opin. Plant Biol. 4, 407-414.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D. F., Hirt, H. und Jones, J.D.G. (1999), Plant Cell 11, 273-287.
- Romeis, T., Tang, S., Hammond-Kosack, K., Piedras, P., Blatt, M. und Jones, J. D. G. (2000), Mol. Plant Pathol. 1, 3-8.
- Ronald, P. C. (1998), Curr. Opin. Plant Biol. 1, 294-298.
- Roos, W. (2000), Planta 210, 347-370.
- Roos, W., Evers, S., Hieke, M., Tschöpe, M. und Schumann, B. (1998), Plant Physiol. 118, 349-364.
- Roos, W., Dordschbal, B., Steighardt, J., Hieke, M., Weiss, D. und Saalbach, G. (1999), Biochim. Biophys. Acta 1448, 390-402.
- Rudrabhatla, P. und Rajasekharan, R (2002), Plant Physiol. 130, 380-390.
- Rudrabhatla, P. und Rajasekharan, R (2003), J. Biol. Chem., *in press*.
- Salmeron, J. M. und Vernoij, B. (1998), Curr. Opin. Plant Biol. 1, 347-352.
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K.; Choi, K.-B., Morishige, T., Fujimoto, H. und Yamada, Y. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 367-372.
- Schaller, A. und Oecking, C. (1999), Plant Cell 11, 263-272.
- Scheel, D. (1998), Curr. Opin. Plant Biol. 1, 305-310.

- Schmeller, T. (1997), *Bioforum* 20, 73-75.
- Schumacher, H.-M., Gundlach, H., Fiedler, F. und Zenk, M. H. (1987), *Plant Cell Rep.* 6, 410-413.
- Schwartze, W. (2001), Diplomarbeit Fachbereich Pharmazie, Universität Halle-Wittenberg.
- Sessa, G. und Martin, G. B. (2000), *Microbes Infect.* 2, 1591-1597.
- Shiu, S.-H. und Bleecker, A. B. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10763-10768
- Shulaev, V., León, J. und Raskin, I. (1995), *Plant Cell* 7: 1691-1701.
- Sprang, S. R. und Coleman, D. E. (1998), *Cell* 95, 155-158.
- Sterling, H., Lin, D.-H., Gu, R.-M., Dong, K., Hebert, S.C. und Wang, W.-H. (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 4317-4323.
- Stratmann, J., Scheer, J. und Ryan, C. A. (2000), *Procl. Nat. Acad. Sci USA* 97, 8862-8867.
- Sun, H. und Tonks, N. K. (1994) *Trends Biol. Sci.* 19, 480-485.
- Swanson, R. V., Alex, L. A. und Simon, M. I. (1994), *Trends Biol. Sci.* 19, 485-491
- Sze, H., Liang, F., Hwang, I., Curran, A. C. und Harper, J. F. (2000) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 433-462.
- Taylor, A. T. S., Kim, J. und Low, P. S. (2001), *Biochem. J.* 355, 795-803.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W.-L. und Sheen, J. (2001), *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 392-400.
- Tena, G. und Renaudin, J.-P. (1998), *Plant J.* 16, 173-182.
- Torii, K. U. (2000), *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 361-367.
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F., Inzé, D. (2001), *Plant Sci.* 161, 405-414.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B. Higgins, V. J. und Blumwald, E. (1994), *Plant Physiol.* 104, 209-215.
- Viard, M.-P., Martin, F., Pugin, A., Ricci, P. und Blein, J.-P. (1994), *Plant Physiol.* 104, 1245-1249.
- Viehweger, K., Dordschbal, B. und Roos, W. (2002) *Plant Cell* 14, 1509-1525.
- Walden, R. (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 419-423.
- Wang, X. (2001), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 211-231.
- Ward, J. M., Pei, Z.-M. und Schroeder, J. I. (1995) *Plant Cell* 7, 833-844.
- Weber, H. (2002), *Trends Plant Sci.* 7, 217-224.
- Weiss, A. und Schlessinger, J. (1998), *Cell* 94, 277-280.
- Weisshaar, B. und Jenkins, G I. (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 251-257.
- White, P. J. (2002) *Trends Plant Sci.* 7, 148.
- White, F., Yang, B., und Johnson, L. B. (2000) *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 291-298.

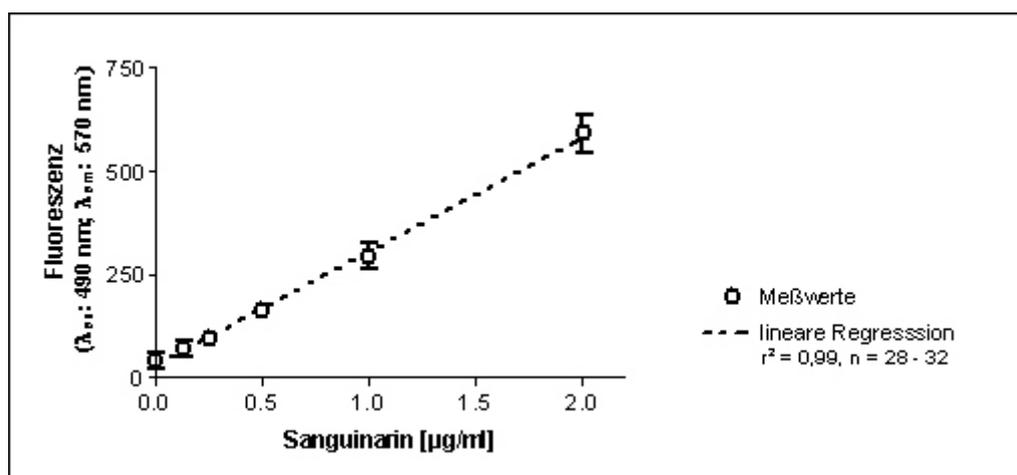
- Xing, T., Malik, K., Martin, T. und Miki, L. M. (2001), *Plant Mol. Biol.* 46, 109-120.
- Xing, T., Quellet, T. und Miki, B. L. (2002), *Trends Plant Sci.* 7, 224-230.
- Xing, T., Higgins, V. J. und Blumwald, E. (1997), *Plant Cell* 9, 249-259.
- Xiong, L., Schumaker, K. S. und Zhu, J.-K. (2002), *Plant Cell (Supplement)*, S165-S183.
- Xu, H. und Heath, M. C. (1998), *Plant Cell* 10, 585-597.
- Yano, A., Suzuki, K., Uchimiya, H., Shinshi, H. (1998), *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 115-123.
- Yu, I-C., Parker, J. und Bent, A. F. (1998), *Procl. Nat. Acad. Sci USA* 95, 7819-7824.
- Zhang, S. und Klessig, D. F. (2001), *Trends Plant Sci.* 6, 520-527.
- Zhang, S. und Liu, Y. (2001), *Plant Cell* 13, 1877-1889.
- Zhu, J.-K. (2001) *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 401-406.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.-M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. und Scheel, D. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2751-2755.
- Zwerger, K. und Hirt; H. (2001), *Biol. Chem.* 382, 1123-1131.

## 7 Anhang

### 7.1 Alkaloidquantifizierung in Mikrotiter-Platten

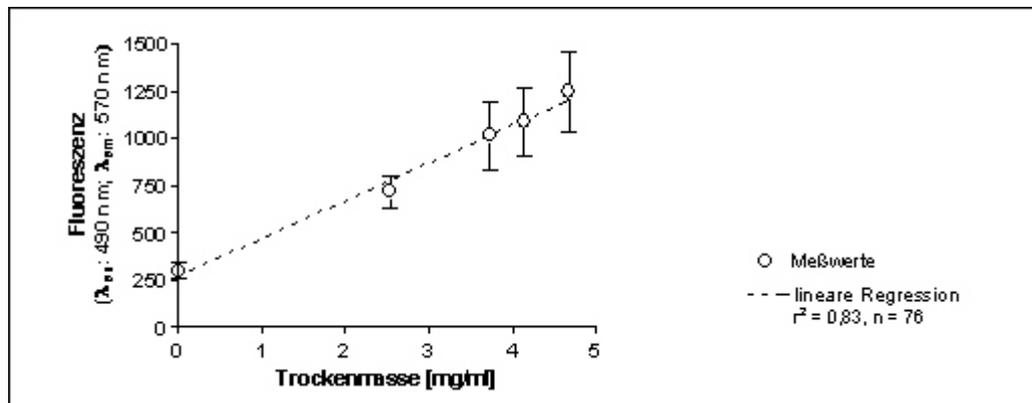


**Abb. 22.** Bestimmung von Sanguinarin in SDS in 96-er Mikrotiter-Platten. Sanguinarin wurde zu 1  $\mu\text{g/ml}$  in LS-P, 2 % SDS gelöst und in diesem Medium in einer 1:2 Verdünnungsreihe auf die angegebenen Konzentrationen eingestellt. 50  $\mu\text{l}$  je Kompartiment wurden auf einer geeigneten Mikrotiter-Platte im Fluoreszenz-Mikrolesegerät ( $\lambda_{ex}$ : 490 nm,  $\lambda_{em}$ : 570 nm; 7,0 V) gemessen. Dargestellt sind gegen die Sanguinarin-Konzentration aufgetragene Mittelwerte mit Standardabweichungen und die resultierende Regressionsgerade.

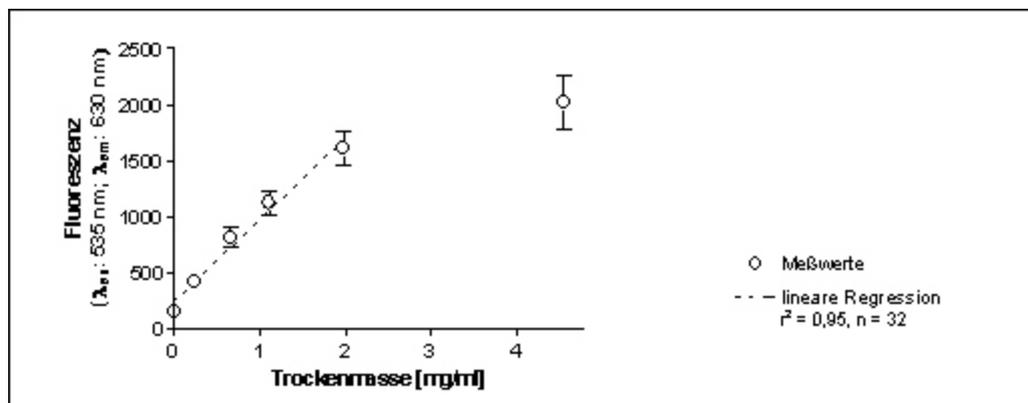


**Abb. 23.** Bestimmung von Sanguinarin in Essigsäure/EtOH in 96-er Mikrotiter-Platten. Sanguinarin wurde zu 2  $\mu\text{g/ml}$  in 36 mM Essigsäure, 80 % EtOH gelöst und in diesem Medium in einer 1:2 Verdünnungsreihe auf die angegebenen Konzentrationen eingestellt. 50  $\mu\text{l}$  je Kompartiment wurden auf einer geeigneten Mikrotiter-Platte im Fluoreszenz-Mikrolesegerät ( $\lambda_{ex}$ : 490 nm,  $\lambda_{em}$ : 570 nm; 7,0 V) gemessen. Dargestellt sind gegen die Sanguinarin-Konzentration aufgetragene Mittelwerte mit Standardabweichungen und die resultierende Regressionsgerade.

## 7.2 Zellquantifizierung in Mikrotiter-Platten



**Abb. 24.** Bestimmung der Zellmenge mit Sanguinarin in 96-er Mikrotiter-Platten. Zellsuspensionen wurden in Nährmedium auf verschiedene Dichten eingestellt, die Trockenmassen aus jeweils 0,5 ml bestimmt (s. 2.3.3; X-Achse) und parallel dazu dieselben Zellsuspension als Mini-Kulturen quantifiziert (120 µl je Kompartiment; Y-Achse): Alkaloidextraktion mit 2 % SDS und Waschschrte erfolgten wie in 2.4.4 angegeben. Nach anschließender 25 minütiger Inkubation mit 20 µg/ml Sanguinarin in 20 % DMSO wurde 2-mal mit 100 µl A.d. gewaschen, Extraktion erfolgte für 25 Minuten in 2 % SDS. Der Extrakt wurde filtriert und hiervon 50 µl je Kompartiment im Fluoreszenz-Mikrolesegerät ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 490 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 570 nm; 7,0 V) gemessen. Dargestellt sind gegen die Trockenmasse aufgetragene Mittelwerte mit Standardabweichungen und die resultierende Regressionsgerade.

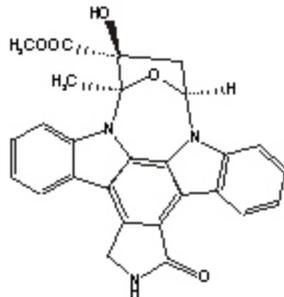


**Abb. 25.** Bestimmung der Zellmenge mit Propidium-Jodid in 96-er Mikrotiter-Platten. Zellsuspensionen wurden in Nährmedium auf verschiedene Dichten eingestellt, die Trockenmassen aus jeweils 0,5 ml bestimmt (s. 2.3.3; X-Achse) und parallel dazu dieselben Zellsuspension als Mini-Kulturen quantifiziert (120 µl je Kompartiment; Y-Achse): Alkaloidextraktion mit 36 mM Essigsäure, 80 % EtOH und Waschschrte erfolgten wie in 2.4.4 angegeben. Nach anschließender 25 minütiger Inkubation mit 0,5 mM Propidium-Jodid in 20 mM MES, pH 7,0 wurde 2-mal mit 100 µl A.d. gewaschen, Extraktion erfolgte für 25 Minuten in 36 mM Essigsäure, 80 % EtOH. Der Extrakt wurde filtriert und hiervon 50 µl je Kompartiment im Fluoreszenz-Mikrolesegerät ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 535 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 630 nm; 4,0 V) gemessen. Dargestellt sind gegen die Trockenmasse aufgetragene Mittelwerte mit Standardabweichungen und die resultierende Regressionsgerade.

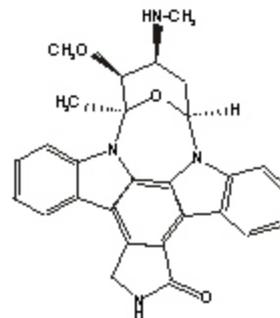


### 7.4 Strukturformeln von Protein-Ser/Thr-Kinase-Inhibitoren

K-252a



Staurosporin



**Abb. 27.** Strukturformeln verwendeter Protein-Ser/Thr-Kinase-Inhibitoren.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich mich erstmalig um die Erlangung des Dokortitels bewerbe, die Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken inhaltlich oder wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Kriftel, August 2003

Sven Evers

## **Danksagung**

Zum Abschluß möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während dieser Arbeit motivierten und unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt hierbei meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. W. Roos. Nicht nur für die Überlassung dieses überaus interessanten und herausfordernden Themas und seine herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, sondern auch für zahlreiche Ideen sowie erhellende und ermutigende Diskussionen, ohne die ich die "dunkle Phase" der Experimente nicht so einfach überwunden hätte.

Natürlich möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bedanken.

Insbesondere möchte ich hier Frau Dr. Katrin Viehweger nennen, ihr immenser Arbeitseinsatz für die gesamte Arbeitsgruppe ermöglichte auch mir, meine Arbeit mit Motivation voranzubringen. Nicht vergessen sei ferner weder ihre herzliche Art, die die Laborwelt in ein freundliches Licht tauchte, noch die manchmal durchaus das Fundament des naturwissenschaftlichen verlassenden Unterhaltungen.

Auch an Frau Margit Hieke geht ein dickes "Dankeschön", was wäre unser Goldmohn ohne sie, und wir ohne unseren Goldmohn?

Unbedingt zu erwähnen ist hier auch unser großartiger Mechanikermeister, Herr Reese. Er scheute keine Mühen, mir zwei filtrierbare Mikrotiter-Platten aus unangenehm zähen V2-A Stahl anzufertigen und somit zum erfolgreichen Abschluß dieser Arbeit beizutragen.

Für die in langen Jahren gewährte Unterstützung, Solidarität und Hilfestellungen verschiedenster Art, auf die ich hier nicht im Detail eingehen kann, möchte ich mich auch bei meinen Eltern herzlich bedanken.

Meinen Freunden möchte ich für all die schönen Momente und gemeinsame Freude danken, die Kraft hieraus hat mich auch im Labor beflügelt. Aber auch dafür, mich wenn es sein mußte, Labor oder Schreibtisch zu überlassen.

Und natürlich danke ich unserer Zellkultur, die sich nicht mehr als Diva aufführte, als zwingend notwendig.

Mein Dank geht außerdem an die DFG, die die vorliegende Arbeit im Rahmen des SFB369 finanziert und somit ermöglicht hat.

## **Lebenslauf**

### **persönliche Daten**

Name: Sven Evers  
geboren: 28.3.1965 in Hilten, Niedersachsen  
Familienstand: ledig

### **Ausbildung**

1971 - 1973	Grundschule Eschborn
1973 - 1975	Grundschule Hofheim
1975 - 1977	Förderstufe Hofheim
1977 - 1981	Gesamtschule Hofheim
1981 - 1984	Gymnasiale Oberstufe, Hofheim
1984 - 1987	Studium der allgemeinen Betriebswirtschaftslehre an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt, Beendigung mit Vordiplom
1989 - 1995	Studium der Biologie an der Universität Hamburg
1995 - 1996	Diplomarbeit im Institut für allgemeine Botanik der Universität Hamburg bei Herrn Prof. Dr. M. Böttger, Thema: "Untersuchungen zur transplasmamembranen Redoxaktivität an atmungsdefizienter Bäckerhefe ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )"

### **Zivildienst**

1987 - 1988 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Hofheim

### **Promotion**

1996 - 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Halle-Wittenberg, Abteilung molekulare Zellphysiologie bei Herrn Prof. Dr. W. Roos, Erarbeitung einer Promotionsarbeit, Thema: "Protein-Phosphorylierungen im Signaltransfer zur Aktivierung des Alkaloidstoffwechsels in *Eschscholzia californica*"

seit 15.4.2002 Produktspezialist bei Merck Biosciences GmbH, Schwalbach

### **Publikationen und wissenschaftliche Beiträge:**

- Evers, S. (1996). "Untersuchungen zur transplasmamembranen Redoxaktivität an atmungsdefizienter Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*)", Diplomarbeit im Studienfach Biologie, Universität Hamburg, Institut für allgemeine Botanik, Abt. Pflanzenphysiologie.
- Roos, W., Evers, S., Hieke, M., Tschöpe, M. und Schumann, B. (1998). "Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridin alkaloids", *Plant Physiol.* 118, 349-364.
- Evers, S., Schumann, B., Hieke, M. und Roos, W. (1998). "Shifts of intracellular pH-distribution act as a signal during elicitation of alkaloid-biosynthesis in cultured cells of *Eschscholtzia californica*", *Archiv der Pharmazie* 1998/3, suppl., Vortrag auf dem European Graduate Student Meeting der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Frankfurt/Main 1998.
- Evers, S., Hieke, M., Schumann, B. und Roos, W. (1998). "A pH controlled signal chain leads to the elicitation of alkaloid-biosynthesis in cultured cells of *Eschscholtzia californica*", P2c.26, Tagungsband der Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bremen 1998.
- Evers, S., Hieke, M., Schumann, B. und Roos, W. (1998). "Effects of protein kinase inhibitors on the expression of benzophenanthridin alkaloid-biosynthesis in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*", Vortrag auf dem 2. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop des Instituts für Pflanzenbiochemie Halle/S., 1998.