

Alkaloide als Toxine und Signale bei der pathogenen Interaktion zwischen Pilz- und Pflanzenzelle



Dissertation
angefertigt am Fachbereich Pharmazie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
zur Erlangung des
akademischen Grades
Doktor rerum naturalium

von Katrin Färber
geb. am 3.09.1971

1. Gutachter: Prof. Dr. habil W. Roos
2. Gutachter: Prof. Dr. habil J. Miersch
3. Gutachter: Prof. Dr. habil U. Gräfe

Tag der Verteidigung: 6.11.2002

Berlin, den 21.07.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004285

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004285>]

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CFDA	5-Carboxy-fluoresceindiacetat-acetoxymethylester
cpm	count per minute
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DTE	Dithioerythriol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
LPC	Lysophosphatidylcholin
mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
NL	Nährlösung, nach: Linsmaier und Skoog, 1965 [152]
NL-P	Nährlösung, nach: Linsmaier und Skoog, 1965 [152] minus Phosphat
NP40	Nonidet P40
OD	Optische Dichte
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNAseinhinibitor	Ribonukleaseinhibitor
SD	Standardabweichung
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	4
1.1. Grundreaktionen der pflanzlichen Pathogenabwehr	4
1.2. Die Induktion von Abwehrmechanismen	5
1.2.1. Ubiquitäre, frühe Abwehrreaktionen	6
1.2.2. Die Induktion der Phytoalexinbildung	11
1.3. Die Benzophenanthridin-Biosynthese in <i>Eschscholzia californica</i>	13
1.3.1. Ablauf der Biosynthese	13
1.3.2. Signalmechanismen zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese	16
1.4. Ziel der vorliegenden Arbeit	21
2. Ergebnisse und Diskussion	22
2.1. Ausgangspunkt: Wo akkumulieren die Benzophenanthridin-Alkaloide in den Zellen der Suspensionskultur?	22
2.1.1. Die Toxizität der Benzophenanthridin-Alkaloide	22
2.1.2. Kompartimentierung und Export von Benzophenanthridinen	23
2.2. Optimierte Elicitierung von Eschscholzia-Zellkulturen	29
2.2.1. Optimaler Elicitierungszeitpunkt	29
2.2.2. Einfluss von Phosphat	31
2.3 feedback-Effekte der gebildeten Alkaloide auf ihre Biosynthese	31
2.3.1. Einfluss der Benzophenanthridin-Alkaloide auf ihre eigene Biosynthese	31
2.3.1.1. Alkaloidwirkung vor Elicitorkontakt	32
2.3.1.2. Alkaloidwirkung während Elicitorkontakt	34
2.3.1.3. Alkaloidwirkung nach Elicitorkontakt	34
2.3.1.4. Wirkung ausgewählter Benzophenanthridine auf mRNA- und Proteinebene	37
2.4. Desensibilisierung der Phytoalexinantwort und alternative Signalwege	39
2.4.1. Kurzzeitige oder ständige Anwesenheit des Elicitors	40
2.4.2. Einmalige oder wiederholte Elicitorgabe	41

2.4.3.	Einsatz alternativer Signale zur Auslösung der Benzophenanthridin-Biosynthese	43
2.4.3.1.	Die Wirkung ausgewählter Signale bei Erstkontakt	48
2.4.3.2.	Die Wirkung ausgewählter Signale bei Zweitkontakt	49
2.5.	mRNA- und Proteinstmuster unter dem Einfluss verschiedener Signale der Alkaloidbildung	54
2.5.1.	Einfluss der Benzophenanthridin-Alkaloide auf die <i>in vitro</i> Translation	54
2.5.2.	Einfluss ausgewählter Signale zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese auf das Protein- und mRNA-Spektrum	60
2.5.2.1.	Experimentelle Vorgehensweise	60
2.5.2.2.	Vergleich von mRNA und exprimierten Proteinen nach Einwirkung verschiedener Signale	66
2.5.2.3.	Leistungsfähigkeit und Grenzen des verwendeten 2D-Analyse-Verfahrens	77
3.	Material und Methoden	79
3.1.	Kultivierung von <i>Eschscholzia californica</i>	79
3.2.	Inokulation von <i>Eschscholzia</i>-Kulturen	80
3.3.	Präparation des Hefeelicitors	80
3.4.	Elicitierung von <i>Eschscholzia californica</i>	80
3.5.	Bestimmung der Benzophenanthridin-Alkaloide	82
3.5.1.	Extraktion	83
3.5.2.	Messung	83
3.5.3.	Extraktion und Reinigung	83
3.6.	Quantifizierung der Zellzahl	84
3.6.1.	Bestimmung der Trockenmasse	84
3.6.2.	Bestimmung der Zellaggregate	84
3.7.	Bestimmung des osmotischen Druckes des Nährmediums	84
3.8.	Sammlung und Lagerung der <i>Eschscholzia</i>-Zellen	85
3.9.	Isolation von mRNA	85
3.10.	Isolation von Proteinen	86
3.11.	Reinigung von Proteinen	87
3.12.	Proteinbestimmung	88
3.13.	<i>In vitro</i> Translation	88

3.13.1.	Reaktionsansatz	88
3.13.2.	Auswertung	88
3.14.	Probenvorbereitung für die elektrophoretische Auftrennung	89
3.14.1.	1D-SDS-Gelelektrophorese	89
3.14.2.	2D-SDS-Gelelektrophorese	89
3.15.	Elektrophoretische Methoden	90
3.15.1.	1D-SDS-Elektrophorese	90
3.15.1.1.	Fixierung des 1D-SDS-Gels	90
3.15.1.2.	Trocknen des 1D-SDS-Gels	90
3.15.1.3.	Detektion der radioaktiven Proteine auf dem 1D-Gel	90
3.15.2.	Probenvorbereitung für die IEF	91
3.15.3.	2D-Gelelektrophorese	91
3.15.3.1.	Isoelektrische Fokussierung	91
3.15.3.2.	SDS-Gelelektrophorese	92
3.15.3.3.	Visualisierung der Ergebnisse aus der 2D-Gelelektrophorese	93
3.15.3.3.1.	Coomassie-Färbung	93
3.15.3.3.2.	Detektion der radioaktiven Proteine auf dem 2D-Gel	93
3.15.3.4.	Gelelektrophoretische Auswertung	94
3.16.	Massenspektrometrische Analyse	94
3.16.1.	MS-Datenbanken	95
4.	Zusammenfassung	96
5.	Anregungen zur Weiterführung	100
6.	Anhang	101
7.	Literaturverzeichnis	143

Danksagung

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

1. Einleitung

1.1. Grundreaktionen der pflanzlichen Pathogenabwehr

Wirts- und Nicht-Wirts-Resistenz

Pflanzen sind in ihren Ökosystemen dem ständigen Angriff von Fraßfeinden, vor allem phytopathogenen Mikroorganismen und Herbivoren, ausgesetzt.

Aufgrund ihrer sessilen Lebensform haben sie im Laufe der Evolution sowohl morphologische als auch biochemische Abwehrmechanismen ausgebildet.

Pflanzen sind in der Lage, Resistenzen gegenüber pathogenen Mikroorganismen zu entwickeln. Dabei unterscheidet man zwischen Wirts- und Nicht-Wirts-Resistenz. Wirtsresistenz beruht auf Reaktionen, die durch den Kontakt Rassen-spezifischer pathogener Mikroorganismen bzw. Elicitoren (Proteine, Glykoproteine oder Polysaccharide des Pathogens) mit spezifischen Pflanzenproteinen (Rezeptoren) ausgelöst werden. Die Erkennung des Pathogens kann an der Zelloberfläche oder intrazellulär erfolgen, die daran beteiligten Proteine sind Produkte der sogenannten Resistenz-Gene. Die vom Pathogen gebildeten Elicitor-Proteine werden durch Avirulenz-Gene codiert. Nur beim Vorhandensein beider, gegenseitig spezifischer Proteine kommt eine Abwehrreaktion zustande (Gen-für-Gen-Hypothese; [73]). Die Wirtsresistenz ist sowohl vom Genotyp des Pathogens als auch von der Wirtspflanze abhängig. Die monogen determinierten Phänotypen der Resistenz seitens der Pflanze und der Avirulenz seitens des Pathogens sind in der Regel (semi)dominant. Daraus leitete de Witt 1997 [45] die inzwischen verifizierte Hypothese ab, dass in diesen Fällen R-Genprodukte Rezeptoren für *avr*-Genprodukte sind. Inzwischen konnte in einigen Fällen die rassenspezifische Elicitorwirkung bestimmter *avr*-Genprodukte gezeigt werden [80, 117, 133, 202, 233, 241].

Die Nicht-Wirts-Resistenz, das evolutionär ältere Schutzsystem, beruht auf der Erkennung verschiedener Pathogene oder Elicitoren. Diese erfolgt hier durch weniger selektive, hochaffine Rezeptoren der Plasmamembran. Als Antwort erfolgt u.a. die Bildung mehrerer, nicht Pathogen-spezifischer Produkte, die eine Besiedelung der Pflanze mit einer Vielzahl potenzieller Pathogene verhindert. Einige Pathogene sind in der Lage, die pflanzliche Abwehr durch spezifische Pathogenitätsfaktoren auszuschalten, zu verzögern oder unschädlich zu machen [197] und damit potenzielle Wirte zu besiedeln.

Eine solche Form der Wirt-Pathogen-Interaktion bezeichnet man als kompatibel, wenn sie zugunsten des Pathogens verläuft [93]. Die inkompatible Form der Wirt-Pathogen-Interaktion verläuft dagegen zugunsten des Wirtes. Das ist der Fall, wenn dieser entweder die speziellen Erfordernisse der Lebensweise eines Pathogens nicht erfüllt, durch vorgeformte strukturelle Barrieren oder toxische Komponenten die erfolgreiche Invasion eines speziellen Pathogens verhindert oder den Angreifer durch die o.g. Mechanismen erkennt, lokalisiert und Abwehrprozesse anschaltet [93].

Die Strategie der pflanzlichen Pathogenabwehr erstreckt sich sowohl auf präformierte, d.h. ständig vorhandene (mechanischer Schutz durch Cutin, Suberin, Lignin; konstitutive Produktion von antimikrobiellen Sekundärstoffen) als auch auf induzierte Mechanismen.

1.2. Die Induktion von Abwehrmechanismen

Die induzierte Abwehr erlaubt flexible, meist dosierte Antwortreaktionen und verläuft über 3 Stufen:

1. Freisetzung von Elicitoren aus dem Pathogen
2. Erkennung der Elicitorstruktur, Signaltransfer zur Expression vielfältiger Abwehrreaktionen auf lokaler Ebene (Akkumulation verschiedener Resistenzfaktoren, Bildung von Phytoalexinen, s.u.)
3. Bildung systemischer Signale und Aktivierung spezifischer Genexpression zur Auslösung von Resistenzfaktoren in entfernteren Geweben (systemic acquired resistance (SAR))

1.2.1. Ubiquitäre, frühe Abwehrreaktionen

Ein Pathogenkontakt resultiert meist in einer Vielzahl miteinander vernetzter Abwehrreaktionen. So polymorph wie die beteiligten Komponenten ist auch das Netzwerk der Signalwege zur Koordination dieser Antworten. An den Zusammenhängen aller in diesem Prozess involvierten Reaktionen wird sehr intensiv geforscht. Bisher ungeklärte Mechanismen über die detaillierte Wirkungsweise niedermolekularer Signalmoleküle (z.B. Ca^{2+} , Lipide, Octadecanoide) einschließlich der Angriffspunkte für modifizierende oder desensibilisierende Effekte [12] erschweren die Aufklärung der Signalabschnitte von Elicitorkontakt bis hin zur Zellantwort. Als ein Beispiel für zahlreiche Versuche einer zusammenfassenden Übersicht ist eine Darstellung von Hammond-Kossack and Jones [93] wiedergegeben (Abb. 1).

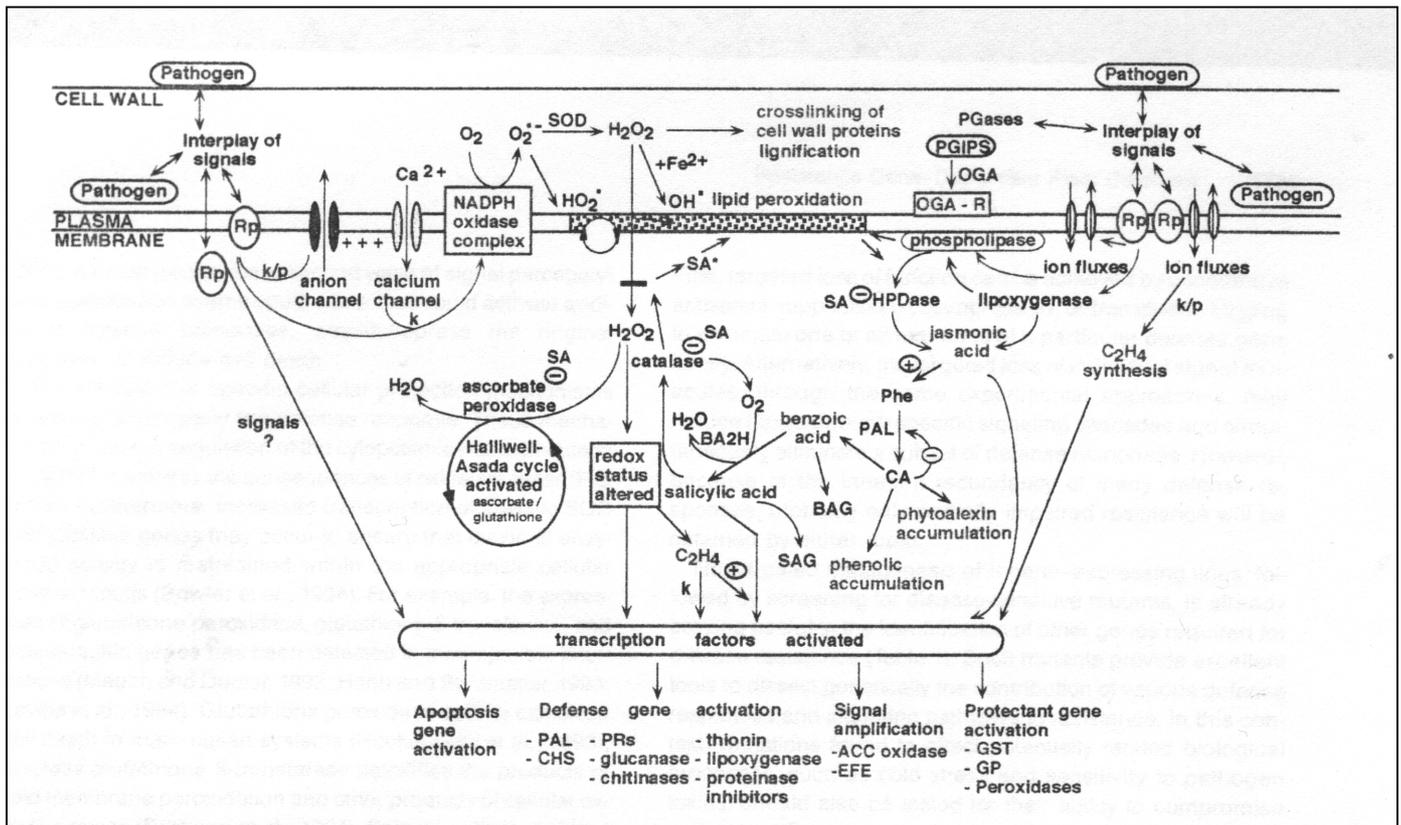


Abb. 1: Vorstellung nach Hammond-Kossack and Jones, 1996 über mögliche Verknüpfungen bisher bekannter Signalereignisse [93].

Rezeptormoleküle fangen pathogen- oder interaktionsabhängige Signale auf. Von dort an sind eine Vielzahl von Enzymen wie Kinasen oder Phosphatasen sowie G-Proteine am Signaltransfer beteiligt. Rp: plant receptor proteins; (+) positive (-) negative Interaktion; ACC: oxidase 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase; BAG: benzoic acid glucosidase; BALH: benzoic acid-2-hydroxylase; CA: cinnamic acid; CHS: chalcone synthase; EFE: ethylene-forming enzyme; HO_2^* : hydroperoxyl radical; HPDase: hydroperoxide dehydrase; GP: glutathione peroxidase; GST: glutathione S-transferase; k: kinase; O_2^- : superoxide anion; OH^{*}: hydroxyl radical; OGA und OGAR: oligogalacturonide fragments und receptor; p: phosphatase; PAL: phenylalanine ammonia-lyase; PGasa: polygalacturonases; PGIPS: plant polygalacturonic acid inhibitor protein; Phe: phenylalanine; PR: pathogenesis related; Rp: plant receptor protein; SA und SAG: salicylic acid und salicylic acid glucoside; SA^{*}: SA radical; SOD: superoxide dismutase

Den Anfang der Signalereignisse einer Pathogen- ausgelösten Abwehrreaktionen bildet in der Regel eine rezeptorvermittelte Pathogenerkennung, die über Elicitoren, d.h. Pathogenbestandteile oder Komponenten der pflanzlichen Zellwand, die durch die Wirkung hydrolytischer Enzyme des Pathogens freigesetzt werden, ausgelöst wird [17, 51, 53, 54, 89].

Elicitoren als Signale zur Auslösung pflanzlicher Abwehrreaktionen umfassen ein breit gefächertes Spektrum an Verbindungen. Bei der Pflanze-Pathogen-Interaktion sind nur die biotischen Elicitoren von Bedeutung, welche Glycoproteine [44, 134, 162, 185, 192], Polysaccharide (Heptaglukan, Glucane, Chitosan) [4, 33, 88, 173, 217, 245], Lipopolysaccharide [171] oder Fettsäuren (Arachidonsäure, Eicosapentaensäure) [18, 32] umfassen. Zur Auslösung der Pathogenabwehrreaktion werden diese Verbindungen an Rezeptorproteine gebunden. Über den Aufbau pflanzlicher Elicitor-Rezeptoren wurden in den letzten Jahren zunehmend genauere Ergebnisse erarbeitet. Im Falle des Heptaglukan-Rezeptors aus Soja gelang z.B. die Sequenzierung [172, 232]. Hochaffine Rezeptoren sind auch in Petersilienzellen für einen Peptid-Elicitor aus *Phytophthora* [184, 185] und Tabakzellen für das Elicitor-Protein Cryptogein [240] bekannt. Eine verallgemeinerungsfähige Vorstellung über die Signalwandlung an diesen Rezeptoren und die detaillierte kausale Abfolge der Signalweiterleitung existiert bisher nicht. Es sind jedoch zahlreiche Elemente von downstream-Ereignissen bekannt, deren grundsätzliche Beteiligung an vielen Elicitor- ausgelösten Signalketten gesichert ist. Nach Erkennung der elicitierenden Pathogenstruktur durch die Pflanzenzelle können bereits nach wenigen Minuten Störungen der zellulären Ionenbalance (Cl^- - und K^+ -Ausstrom, Ca^{2+} -Einstrom [7, 112, 226], zelluläre Ansäuerung [6, 163], sowie Alkalisierung des Mediums) [69] beobachtet werden [52, 84, 185, 206]. In einigen Elicitor-behandelten Pflanzenzellen wurde eine cytoplasmatische Ansäuerung beobachtet [163, 189, 204, 206, 254].

Während bei den zum hypersensitive response führenden Reaktionsketten ein Einstrom externer Protonen beteiligt ist [8, 70, 163, 164] ist bei der vom hypersensitive response (s.u.) unabhängigen Auslösung der Phytoalexin-Bildung in *Eschscholzia* ein Efflux vakuolärer Protonen erforderlich [204, 206].

Ca^{2+} hat offenbar eine wichtige Signalfunktion in Verbindung mit dem oxidative burst (s.u.) und dem programmierten Zelltod [143, 150, 203, 206]. Es wird wahrscheinlich, dass sowohl oxidative burst, als auch hypersensitive response über einen Elicitor ausgelöst

Ca^{2+} Einstrom, durch Elicitor-aktivierte Kanäle der Plasmamembran, unter Beteiligung von Calmodulin, initiiert werden [29, 186, 255].

Die Stimulation eines Ca^{2+} -Kanals, wodurch ein schneller Ca^{2+} -Einstrom ins Cytosol resultiert [198], wurde beispielsweise in Sojabohnenzellen als ein essenzieller Schritt zur Induktion des Zelltodes nachgewiesen [150], dessen erste Anzeichen bereits nach wenigen Stunden als Permeabilitätsdefekte der Zellmembran erkennbar sind [128].

Der oxidative burst, d.h. die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. H_2O_2 und O_2^-) (Abb. 2) besitzt neben der Signalwirkung als second messenger und der daraus resultierenden Expression verschiedener Gene der Pathogenabwehr [54, 143, 167, 186], auch eine direkte Bedeutung als Generator antimikrobieller Agentien. Reaktive Sauerstoffspezies wirken aber nicht nur für das Pathogen, sondern auch für die Pflanze cytotoxisch. Aus diesem Grund sind Schutz- und Entgiftungsreaktionen u.a. über Glutathion-Peroxidasen, Katalasen und von niedermolekularen Redoxkomponenten wie Ascorbat, Flavonoide und auch Phenolen notwendig [41, 150]. Trotz seiner Toxizität spielt H_2O_2 eine wesentliche Rolle bei dem sogenannten "oxidative cross linking" von Zellwandbestandteilen (u.a. Prolin- bzw. Tyrosinreiche Proteine) [21, 22, 41, 93, 167]. Diese Reaktionen, an denen auch Peroxidasen beteiligt sind [27, 124], verstärken die Zellwand und machen sie für Mikroben weniger passierbar [22, 167, 194].

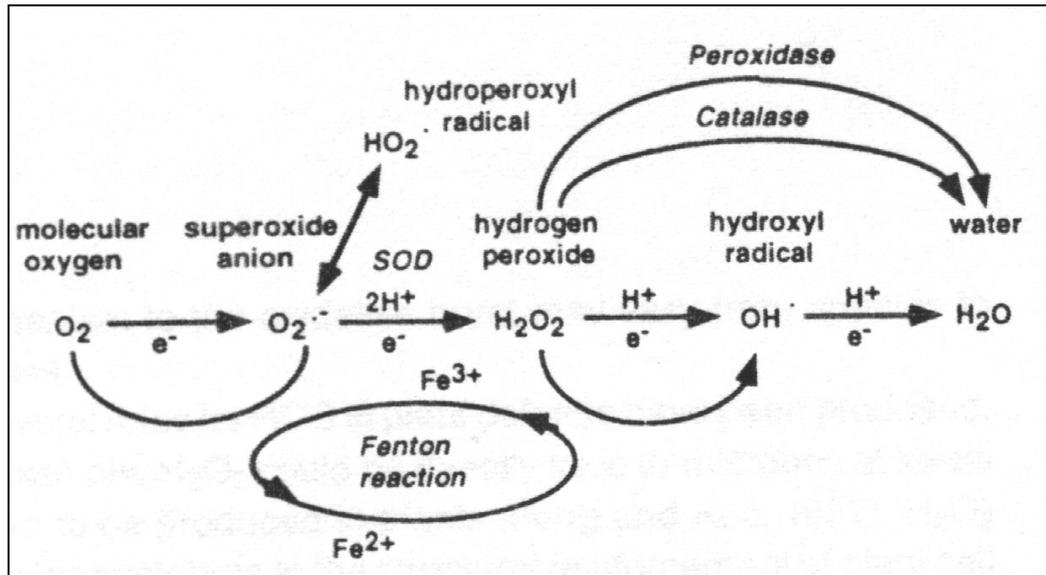


Abb. 2: Hauptschema zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in der Pathogenabwehr nach Hammond-Kosack und Jones, 1996 [93]. SOD - Superoxiddismutase

Die lokalen Abwehrreaktionen repräsentieren eine komplexe Vielfalt verschiedener Komponenten. Frühe Reaktionen sind vor allem Ionenfluxe (Verlust von K^+ , Influx von H^+ (s.u.) und von Ca^{2+} , oxidative burst-Reaktionen (Bildung reaktiver Sauerstoffspezies) und Fettsäure-Peroxidation, gefolgt von der Verstärkung der Zellwand durch Tyrosin- und Prolin-reichen Proteinen, der Bildung von Polyphenolen und dem meist mit diesen Vorgängen verbundenen lokalisierten hypersensitiven Zelltod (HR), d.h. einem Prozess der Apoptose.

In den Nachbarzellen erfolgt die Induktion zahlreicher "pathogenesis-related proteins" (PR-Proteine), zu denen u.a. Enzyme der Phytoalexin-Biosynthese und lytische Enzyme wie β -1, 3-Glucanasen und Chitinasen [84, 127, 135] gehören. Letztere sind beispielsweise in der Lage, die pilzliche Zellwand anzugreifen [135], Sporen zu lysieren oder deren Keimung zu verhindern [120, 127].

Die einzelnen Komponenten dieser komplexen Abwehrreaktionen kommen bei Kontakt mit verschiedenen Pathogenen unterschiedlich zur Ausprägung. So ist in den meisten Fällen für die Abtötung eines bestimmten Pathogens nicht das gesamte Spektrum der induzierten Abwehrreaktion notwendig [79, 119, 159, 227].

Mechanische Barrieren zum Schutz vor Pathogenen können beispielsweise durch HPRG-Proteine (hydroxyproline-rich glycoproteins) errichtet werden. Dabei handelt es sich um hydroxyprolinreiche Glycoproteine mit einem Hydroxyprolinegehalt von 25 % bis 45 %

[56], die in direkter Nachbarschaft zu abgestorbenen oder hypersensitiv reagierenden Zellen abgelagert werden und eine zusätzliche chemische Barriere für das Pathogenwachstum darstellen [56]. So konnte beispielsweise in Melonenkeimlingen nach Kontakt mit dem Pathogen *Colletotrichum lagenarium* ein 10fach höherer Anteil an HPRG-Proteinen nachgewiesen, als in Kontrollzellen, dieser Anstieg korrelierte dabei mit der Erhöhung der Resistenz gegenüber dem Pathogen [58, 59, 229].

Zur weiteren Verstärkung von Zellwandstrukturen und Geweben kann über die allosterische Aktivierung der im Plasmalemma vorhandenen β -1,3- Glucanase [122], die Bildung von Kallose und Zellulose um die befallene Stelle induziert werden. Zusätzlich kommt es oft zur Einlagerung von Lignin, Suberin, Kaffeesäure oder Chlorogensäure. Nach dem Absterben dieser Zellen werden durch die Nachbarzellen Melanine, Tannine sowie Phytoalexine produziert und in das tote Gewebe abgelagert [38].

Zusätzlich wird um die Infektionsstelle herum die Transkription verschiedener Gene induziert bzw. reprimiert [19, 93, 212, 218]. Einige dieser induzierten Gene kodieren für Enzyme des Sekundärstoffwechsels, so dass u.a. die Synthese von Phenolen ("browning") und des Phenylpropanstoffwechsels hochreguliert wird [47, 239].

Neben der Vielzahl an lokalen Reaktionen im Zusammenhang mit der hypersensitiv response-Reaktion wird in vielen Pflanzen nach Pathogenkontakt eine systemische Resistenz induziert, die als SAR (Systemic Acquired Resistance) oder ISR (Induced Systemic Resistance) bezeichnet wird. Sie erstreckt sich auf vom Infektionsort entfernte Pflanzenteile und soll gegen nachfolgende Infektionen mit verschiedenen Pathogenen "immunisieren" [49, 167, 209, 234]. Ausgangspunkt ist wahrscheinlich die verstärkte Akkumulation bestimmter Signalmoleküle (u.a. Salicylsäure) [167, 208, 209], die vermutlich über Salicylsäure-binde Proteine zur Induktion von SAR-Genen (u.a. für β -1,3-Glucanasen, Chitinasen, PR-Proteine oder Thaumatin codierend) in vom Infektionsort entfernten Geweben führen [153, 167]. Die Natur des in der Peripherie ausgesandten Signals ist noch unbekannt.

1.2.2. Die Induktion der Phytoalexinbildung

Neben den ubiquitären, in praktisch allen Pflanzenspezies zu erwartenden Pathogen-Abwehrreaktionen stellt die Phytoalexinbiosynthese speziestypische Sekundärstoffe mit antimikrobieller Wirkung bereit. Diese niedermolekularen, meist lipophilen Strukturen [83] werden nach Pathogenbefall oder als Antwort auf biotische oder abiotische Elicitoren sehr schnell im vom Pathogen befallene Gewebe angehäuft [217]. Die erste Beschreibung der Induktion von chemischen Abwehrstoffen erfolgte 1941 von Müller und Börger, die daraus den Begriff der Phytoalexine prägten (griech. phyton = Pflanze, alexin = Abwehr). Phytoalexine werden seither als postinfektionelle, vom Wirt gebildete Abwehrstoffe mit antimikrobiellen Eigenschaften definiert [175].

Anzahl und Strukturtypen dieser Verbindungen sind sehr umfangreich.

Mehr als 12.000 Phytoalexine aus ca. 30 Familien wurden chemisch charakterisiert [26, 65, 137, 243]. Aufgrund der ständig steigenden Zahlen an isolierten und identifizierten Verbindungen existiert keine umfassende Übersicht über ihre chemische Natur und Verbreitung. In Tab. 1 sind einige ausgewählte Beispiele von Phytoalexinen aus der Klasse der Isoflavonoide, Isochinolinalkaloide, Sesquiterpene, Furanoterpenoide, Polyacetylene und Dihydrophenanthrene dargestellt.

Neben der Einlagerung in die Vakuole werden die Phytoalexine häufig auch in der Zellwand akkumuliert [156, 161, 188], wodurch vor allem die antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien oder Pilze zum Tragen kommt. Ihre Toxizität resultiert aus der Interaktion mit einer Vielzahl von essentiellen Stoffwechselreaktionen, u.a. der Hemmung von Nukleinsäure- oder Proteinbiosynthese [247], Kern- und Zellteilungen [191, 248], Störung der Membranintegrität (z.B. durch Saponine [120, 181, 187, 188]), Verminderung der Sauerstoffaufnahme, Hemmung verschiedener metabolischer Enzyme [118, 213, 224, 230, 231] oder dem Angriff auf das Cytoskelett [137].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Benzophenanthridin-Alkaloide wie beispielsweise Sanguinarin (Macarpin oder Chelirubin) besitzen eine starke antimikrobielle Wirkung, die hauptsächlich durch Interkalation in DNA [157, 158] und RNA, Inhibierung der DNA- und RNA-Polymerase und Hemmung der ATP-Synthase zustande kommt [66, 213]. Chelerythrin, ein weiteres Benzophenanthridin-Alkaloid, wirkt auf die Na⁺/K⁺-ATPase [145].

Tab. 1: Strukturen ausgewählter Phytoalexine [51, 83].

Klasse	Name	Vorkommen
Isoflavonoide	Arvesan [109]	<i>Trifolium arvense</i> [109]
	Isosativan [105]	<i>Trifolium hybridum</i> [105]
	Demethylvestitol [107]	<i>Tetragonobulus</i> -Arten [107]
	Kieviton [25]	Buschbohne, Hyacinthbohne [25, 125]
	Wighteon [110]	<i>Glycine wightii</i> [110]
	Medicarpin [11]	<i>Trifolium pratense</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Canavalia ensiformis</i> [11, 105, 106]
Isochinolinalkaloide	Dihydrochelerythrin [10]	<i>Eschscholzia californica</i> [10]
	Sanguinarin [99, 225]	<i>Eschscholzia californica</i> [99, 225]
Sesquiterpene	Rishitin [24, 121]	<i>Solanum</i> -Arten, <i>Lycopersicum esculentum</i> [24, 121]
	Capsidiol [16, 81]	<i>Capsicum frutescens</i> [16, 81]
	Lubimin [223]	<i>Datura stramonium</i> [223]
	Phytuberi [35]	Kartoffeln [35]
	Hemigossypol [9, 250]	<i>Gossypium</i> -Arten [9, 250]
	Scodopin [242]	<i>Scorodocarpus borneensis</i> [242]
	Rotundines A, B, C [115]	<i>Cyperus rotundus</i> [115]
	4-Hydroxy-7-epi-chuchuhuanin E-V [151]	<i>Peritassa campestris</i> [151]
Furanoterpenoide	Ipomeamaron [1]	<i>Ipomoea batatas</i> [1]
Polyacetylene	Safinol [2, 176]	<i>Carthamus tinctoris</i> [2, 176]
	Wyeronsäure [68, 148]	<i>Vicia faba</i> [68, 148]
Dihydrophenanthrene	Orchinol [76, 95]	Orchidaceae [76, 95]

Trotz der hohen Komplexität des Netzwerkes pflanzlicher Abwehrreaktionen ist es möglich, individuelle Signalwege zu untersuchen. Ein Beispiel ist die in dieser Arbeit untersuchte Auslösung und Kontrolle der Biosynthese von Phytoalexinen.

1.3. Benzophenanthridin-Biosynthese in *Eschscholzia californica*

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung der Alkaloidbildung durch Zellkulturen von *Eschscholzia californica*, des Kalifornischen Mohns.

Das ursprüngliche Habitat dieser Pflanze ist an der Westküste der USA (Kalifornien, Arizona, Nevada und Utah) und in New Mexiko angesiedelt. Von dort aus wurde sie bis nach Zentralamerika und Chile verbreitet, bis sie gegen Mitte des 19. Jahrhunderts nach Europa gelangte.

Die medizinische Bedeutung erlangte *Eschscholzia* aufgrund ihrer pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffe, die schon in der traditionellen Medizin der Indianer ihre Anwendung fanden. Bei diesen Verbindungen handelt es sich vor allem um Isochinolinalkaloide, zu denen hauptsächlich Benzophenanthridin-Alkaloide wie Sanguinarin, Chelerythrin und in geringen Mengen Protopinderivate gehören [86, 96, 214], und deren Bildung man auch in der Zellkultur nach Elicitorkontakt verstärkt beobachten kann. Das Spektrum der gebildeten Benzophenanthridine kann dabei sehr weitgefächert sein. Tabelle 2 gibt einen kurzen Überblick über eine Auswahl der in *Eschscholzia californica* gebildeten Verbindungen.

1.3.1. Ablauf der Biosynthese

Die Biosynthese dieser Benzophenanthridin-Alkaloide verläuft über einen vielstufigen Biosyntheseweg aus L-Tyrosin (Abb. 3). Auf der Stufe des S-Reticulins zweigt die Biosynthese zu den Morphinanen ab. Ein alternativer Weg eröffnet sich durch die Aktivität des membrangebundenen Berberin-Brücken-Enzyms (BBE) [139, 141, 199, 220] welches die stereospezifische Umwandlung der N-Methylgruppe des S-Reticulins für den Ringschluss zum S-Scoulerin katalysiert [74, 199, 220]. Das BBE hat eine zentrale, kontrollierende Rolle in mehreren Biosyntheseketten [63]. Das Scoulerin ist Vorläufer einer Vielzahl weiterer

Isochinolin-Alkaloide, wie Berberlin in *Berberis* [252] und den Benzophenanthridinen in *Papaver* und *Eschscholzia* [63, 139].

Tab. 2: Auswahl einiger aus *Eschscholzia californica* isolierten Benzophenanthridin-Alkaloide. Modifizierte Aufstellung überlassen von D. Weiss [unveröffentlicht].

Verbindung	Vorkommen	Referenz
Chelerythrin	Ganzpflanze	[99]
Chelidonin	Ganzpflanze	[99]
Chelilutin	Zellkultur	[214]
Chelirubin	Zellkultur	[99]
Macarpin	Zellkultur	[214]
Sanguinarin	Ganzpflanze Zellkultur	[99, 225]
Dihydrochelerythrin	Zellkultur	[10]
Dihydrochelilutin	Zellkultur	[10]
Dihydrochelirubin	Zellkultur	[10]
Dihydromacarpin	Zellkultur	[10]
Dihydrosanguinarin	Zellkultur	[10]
Dihydrosanguirubin	Zellkultur	[10]
Dihydrohydroxychelirubin	Zellkultur	[225]
10-Hydroxysanguinarin	Zellkultur	[225]
10-Hydroxychelerythrin	Zellkultur	[225]
12-Hydroxychelirubin	Zellkultur	[225]
10-Hydroxydihydrochelerythrin	Zellkultur	[225]
10-Hydroxydihydrosanguinarin	Zellkultur	[225]
12-Hydroxydihydrochelirubin	Zellkultur	[225]

Neben dem bereits identifizierten und klonierten Flavin-Enzym BBE [139] sind mehrere P-450-abhängige Monooxygenasen, wie beispielsweise die Protropin-6-Hydroxylase [225] oder die (S)-N-Methylcoclaurin-3-Hydroxylase [190], an der Synthese der *Eschscholzia*-Alkaloide beteiligt. Die Induktion dieser Enzyme, z.B. durch die klassischen P-450-Induktoren wie Phenobarbital führt zu einer erhöhten Biosyntheserate der Alkaloide [90].

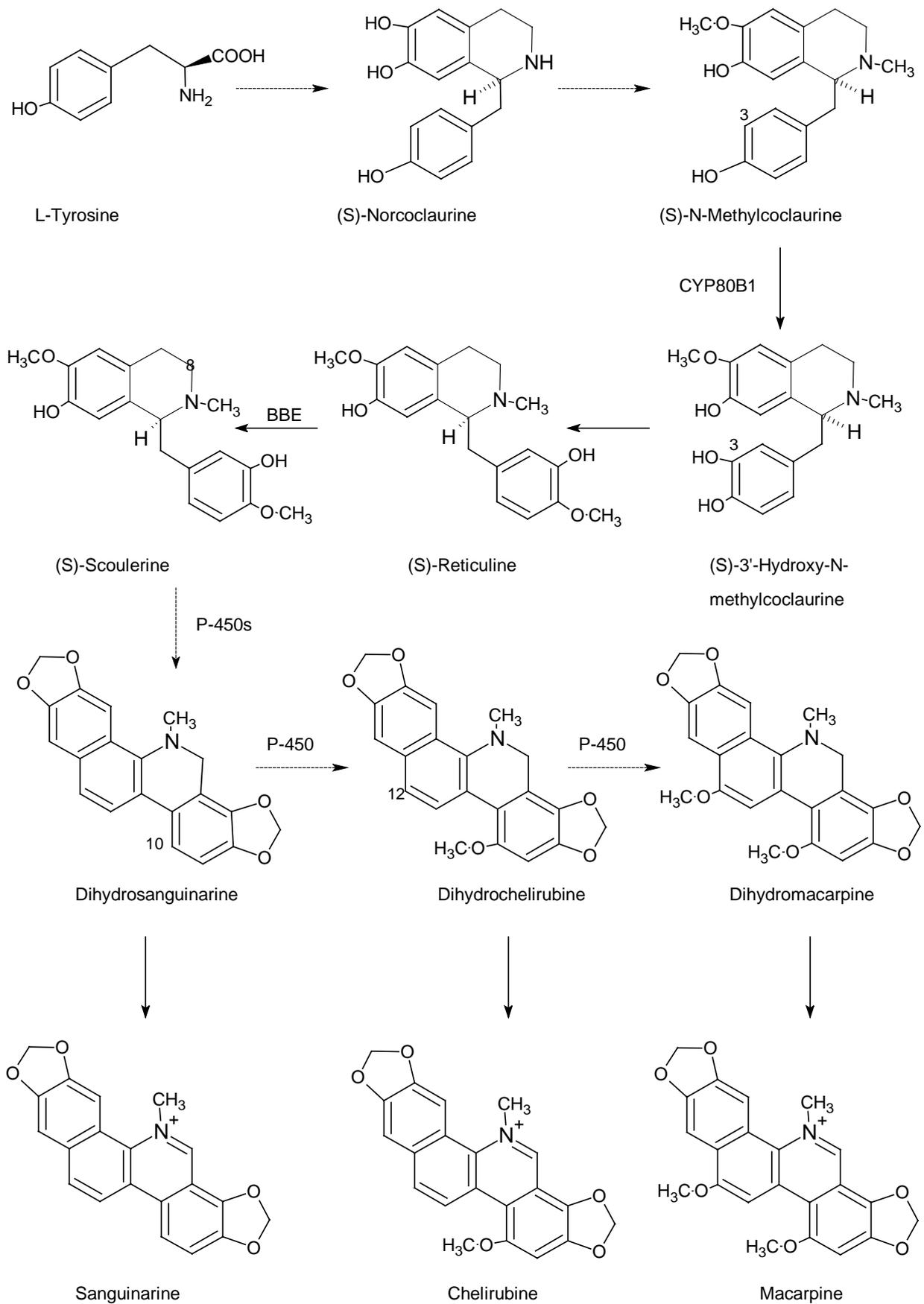


Abb. 3: Vereinfachtes Biosyntheschema der Benzophenanthridin-Alkaloide aus L-Tyrosin in *Eschscholzia californica* nach Haider et al., 1997 [90].

1.3.2. Signalmechanismen zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese

Nach Einwirkung des Elicitors auf Eschscholzia-Zellkulturen kann die ausgelöste Alkaloidantwort an der Verfärbung der Zellen und des Kulturmediums, die durch das jeweils produzierte Benzophenanthridin-Spektrum hervorgerufen wird (z.B. Sanguinarin - gelb/orange, Macarpin - rot) erkannt werden. Abb. 4 zeigt diesen Effekt an der Kontaktzone zwischen der Kalluskultur und einem Pathogen, hier einer Kolonie von *Penicillium cyclopium*.

Die Auslösung der Alkaloidbiosynthese in Eschscholzia-Zellkulturen kann durch verschiedene Signale erfolgen, z.B.:

- mikrobielle Elicitoren (Hefe-Glycoproteine: Abb. 5 [205], S. 18, 19, bakterielle Proteine: Gram-positiver, Gram-negativer Bakterien, sowie Proteine von Archebakterien [87])
- Jasmonat u.a. Octadekanoide [91, 15]
- osmotische Stressoren (siehe Kap. 2.4.3. ff.)



Abb. 4: Kalluskultur von *Eschscholzia californica* in Kontakt mit dem Pathogen *Penicillium cyclopium*. Die Rotfärbung wird durch die Produktion von Benzophenanthridin-Alkaloiden hervorgerufen. [Roos, W.; Hieke, M.; unveröffentlicht]

In der für diese Arbeit verwendeten Zellkultur wurde bisher gezeigt, dass die Elicitor-
ausgelöste Alkaloidbildung über 2 Wege erfolgen kann (Abb. 5) [67]:

- a) Nach Zusatz hoher Elicitor-Konzentrationen (größer 2 $\mu\text{g/ml}$) treten rasch die bekannten Vorläufer der hypersensitiven Reaktion wie: K^+ -Verlust, Alkalisierung des Außenmediums, gefolgt von der Erhöhung des zellulären Jasmonatgehaltes, Polyphenolbildung (browning) und erhöhter Alkaloidbildung auf. Das browning und der folgende Zelltod können ohne Beeinflussung der Alkaloidbildung verhindert werden, wenn zusammen mit dem Elicitor Katalase den Kulturen zugesetzt wird [206].
- b) Niedrige Elicitor-Konzentrationen (etwa 1 $\mu\text{g/ml}$) führen weder zu K^+ -Verlust und Alkalisierung, noch zur Erhöhung des Jasmonatgehaltes, lösen aber fast gleiche Raten der Alkaloidbildung aus wie hohe Konzentrationen [204, 67].

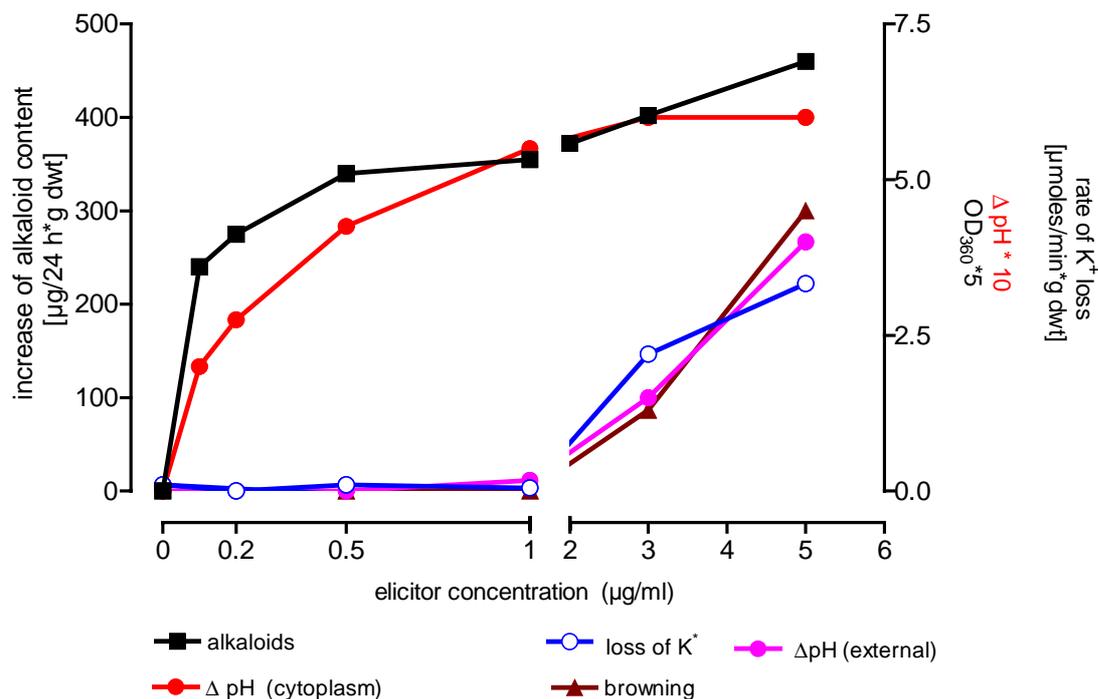


Abb. 5: Trennung des hypersensitive response-Weges von der Auslösung der Alkaloidbiosynthese [204].

Durch hohe Elicitorkonzentrationen (2 - 6 $\mu\text{g/ml}$) werden neben dem Anstieg des cytoplasmatischen pH und der Auslösung der Alkaloidbiosynthese Prozesse wie browning, Anstieg des externen pH und K^+ -Ausstrom beobachtet. Diese Reaktionen finden bei Konzentrationen bis 1 $\mu\text{g/ml}$ nicht statt, während die Auslösung der Alkaloidbildung bei etwa 1 $\mu\text{g/ml}$ gesättigt wird.

Offenbar kann die Alkaloidbildung unabhängig von den zum hypersensitiv response führenden Reaktionen ausgelöst werden (zumindest ohne Beteiligung von H_2O_2).

Damit eröffnen sich Möglichkeiten, die Auslösung der Alkaloidbiosynthese selektiv und unbeeinflusst von den zum hypersensitive response führenden Signalereignissen zu untersuchen. Ein solcher Weg wird in der vorliegenden Arbeit besprochen. Bisher sind folgende Teilschritte des Signalweges nach Elicitorkontakt bekannt bzw. wurden wahrscheinlich gemacht:

Das verwendete Elicitorpräparat ist ein 25 bis 40 kDa Glycoprotein aus Bäckerhefe. Da auch das deglycosylierte Protein unveränderte Elicitorwirkung zeigt, kann nicht von einer Beteiligung der Zuckerkette ausgegangen werden [221]. In der Plasmamembran wurde ein heterotrimeres G-Protein immunologisch nachgewiesen (Antikörper gegen $G\alpha$ und $-G\beta$) welches durch den Elicitor aktiviert wird [78, 205]. Das Signal wird sehr wahrscheinlich an eine Phospholipase (PLA_2) weitergeleitet [205, 235]. Die Aktivitätssteigerung der PLA_2 nach Elicitorkontakt [204] wurde über die Spaltung künstlicher Phospholipide mikroskopisch und in Zellsuspensionen nachgewiesen [235]. Massenspektrometrische Analysen erbrachten den Beweis der Elicitor-ausgelösten Bildung von Lysophosphatidylcholin (LPC) durch dieses Enzym [235]. Am Tonoplasten aktiviert LPC einen H^+ -Ausstrom [235], der zu einem cytoplasmatischen pH-shift (messbar 3 bis 10 min nach Elicitorkontakt) führt (Abb. 6) [204, 235].

Mittels konfokaler pH-Topographie und dem Einsatz permeierender Säuren (Buttersäure, Pivalinsäure) konnte gezeigt werden, dass ein pH-shift im Cytoplasma ein notwendiger und hinreichender Schritt des Signalweges zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese in *Eschscholzia californica* ist [204]. PH-shifts als second messenger, spielen bei der Signaltransduktion vieler pflanzlicher Signale eine wichtige Rolle [206]. Als Beispiele können genannt werden: die durch Auxin und Abscisinsäure ausgelöste Schließung und Öffnung der Stomata [77, 111], die gravitrope Reaktion [215], sowie die Elicitierung antimikrobieller Abwehrreaktionen bei der Nicht-Wirts-Resistenz (s.o.) [163, 206].

Die nach dem pH-shift folgenden Ereignisse sind bisher kaum bekannt. Untersuchungen von S. Evers [unveröffentlicht] weisen aber auf Änderungen der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung hin.

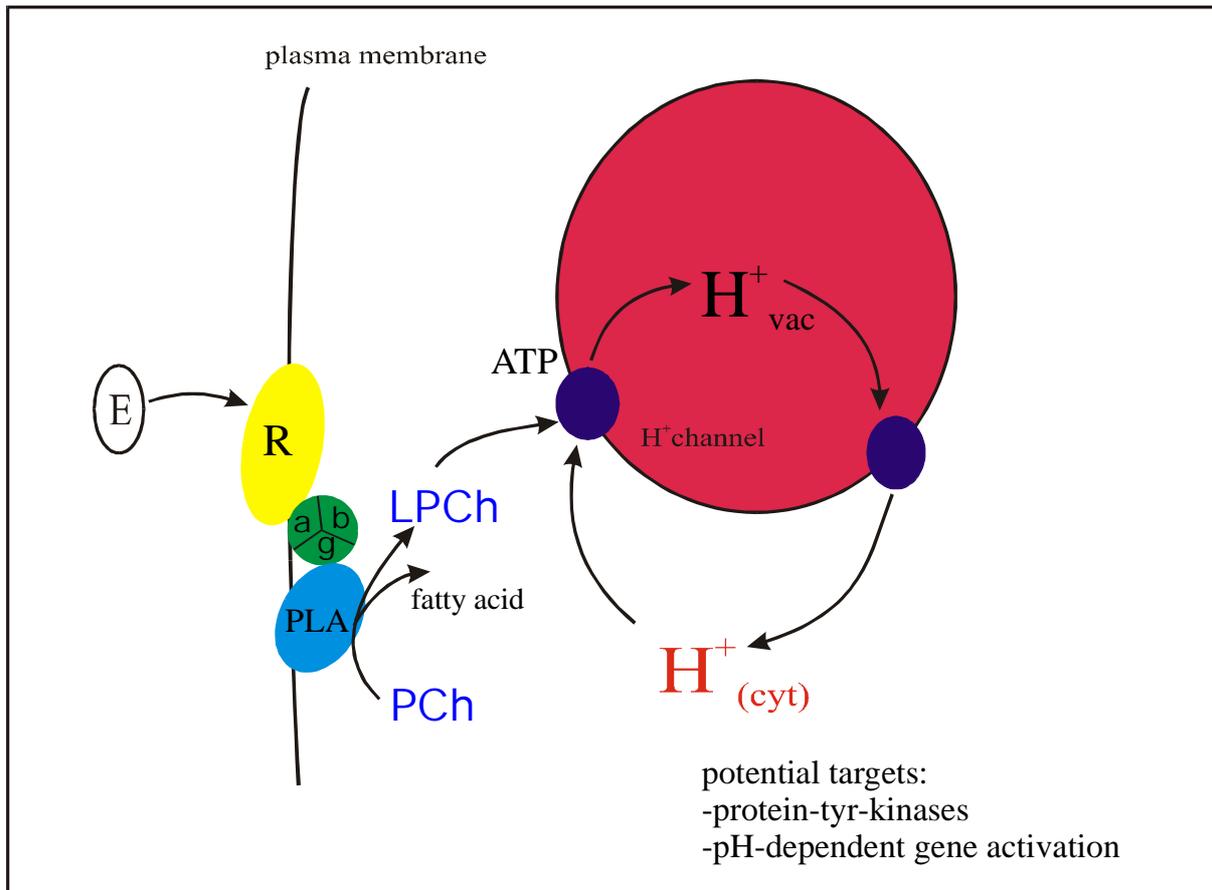


Abb. 6: Postulierter Signalweg in *Eschscholzia californica* von Elicitorbindung bis hin zur Produktion von Benzophenanthridin-Alkaloiden [204, 205, 235].

Nach Elicitorbindung am Plasmamembran-ständigen Rezeptor und der nachfolgenden Aktivierung der G-Protein gekoppelten PLA, kommt es zur Auslösung eines pH-shifts und Aktivierung weiterer, bisher noch unbekannter Teile des Signalweges, die letztendlich die Produktion von Benzophenanthridin-Alkaloiden auslösen. E: Elicitor; R: Rezeptor; a,b,g: G-Protein; PLA: Phospholipase A (A₂); PCh: Phosphatidylcholin; LPCh: Lysophosphatidylcholin, vac: vacuolär; cyt: cytoplasmatisch, ATP: Adenosintriphosphat

1.4. Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Suche nach Gemeinsamkeiten und Unterschieden bei der Auslösung der Benzophenanthridin-Bildung in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* durch verschiedene Signale.

Kontrollmechanismen der Alkaloidbildung wurden sowohl auf der physiologischen als auch auf der Proteinebene gesucht. Dabei standen folgende Aspekte im Mittelpunkt:

- der Schutz der Zelle vor der Toxizität der Benzophenanthridin-Alkaloide
- feedback-Mechanismen der Alkaloide auf ihre Biosynthese
- Desensibilisierungsmechanismen und die Interaktion verschiedener externer Signale bei der Auslösung der Alkaloidbildung
- Analyse von mRNA- und Proteinmustern nach Stimulation mit verschiedenen Induktoren der Alkaloidbiosynthese.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1. Ausgangspunkt:

Wo akkumulieren die Benzophenanthridin-Alkaloide in den Zellen der Suspensionskultur?

2.1.1. Die Toxizität der Benzophenanthridin-Alkaloide

Benzophenanthridin-Alkaloide sind cytotoxische Agenzien mit mehreren Angriffspunkten an essentiellen zellulären Strukturen und Funktionen. Die meisten Daten stammen von tierisch/menschlichen Zellen und wurden aufgrund der lange bekannten Anwendung dieser Alkaloide in der Schul- und Volksmedizin erhoben. Die molekulare Basis für toxische Effekte der Benzophenanthridine liegt in ihrer Grundstruktur: ein nahezu planares, heterozyklisches, hydrophobes Kation [66].

1. Eine allgemeine Eigenschaft der Benzophenanthridin-Alkaloide ist ihre Fähigkeit zur Interkalation in DNA oder andere Doppelstrang-Nukleinsäuren [158, 177, 210]. Dies führt zu Veränderungen der Doppelhelix-Struktur, zu Störungen der Transkription bestimmter Gene und dem Ausfall der entsprechenden Proteine [66].
2. Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthese durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Sie beruht auf der Neutralisation negativer Ladungen an der Außenseite der mitochondrialen Innenmembran. Die Fähigkeit zur DNA-Interkalation korreliert vermutlich mit der Entkoppler-Wirkung. Sanguinarin (mit der höchsten Hydrophobie) zeigt meist die stärkste interkalierende und membrandepolarisierende Aktivität.
3. Hemmung SH-abhängiger Enzymaktivitäten, vermutlich aufgrund der Fähigkeit der Alkaloide, reaktive Iminium-Formen zu bilden. Wegen der besonders hydrophoben Eigenschaften sind besonders Sanguinarin und Chelerythrin wirksame Hemmstoffe von Kationen-transportierenden ATPasen, z.B. mitochondrialen Na^+/K^+ -ATPasen [216].
4. Hemmung der Cholin-Esterase [66, 230]

5. Frühere Angaben über die Hemmung der Protein-Kinase C [100] und der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren [31] konnten zumindest für mehrere Säuger-Isoenzyme nicht bestätigt werden [145].
6. Bindung an Cytoskelett-Proteine [244].

Neben der bereits beschriebenen Wirkung der Benzophenanthridin-Alkaloide ist Sanguinarin zusätzlich in der Lage, die Membranpermeabilität durch Porenbildung zu beeinflussen und damit weitreichende Schädigungen auszulösen [114, 213].

2.1.2. Kompartimentierung und Export von Benzophenanthridinen

Die Toxizität der Benzophenanthridine macht sie zu sehr effizienten Phytoalexinen. Zugleich erfordert sie jedoch sichere Schutzmechanismen der produzierenden Pflanzenzelle.

Wie wird der Kontakt der Alkaloide mit der DNA und anderen intrazellulären Angriffspunkten verhindert?

Die Kompartimentierung von Alkaloiden als wichtigster Schutzmechanismus vor deren Toxizität ist in vielen Pflanzen bekannt. Dabei spielen die Akkumulation in der Vakuole und die Sekretion nach außen, z.B. nach Aufnahme in Transportvesikel eine entscheidende Rolle. Bis in die 80iger Jahre wurde die Ionenfallentheorie als Hauptweg zur Speicherung von Alkaloiden in der Vakuole betrachtet.

Nach dieser Vorstellung können nicht geladene Alkaloide die Vakuolenmembran durch unkatalysierte Diffusion durchqueren. In der Vakuole erfolgt eine Protonierung und/oder eine Komplexierung mit Phenolen, so dass quaternäre Verbindungen, oder salzähnliche Komplexe entstehen. Diese verlieren ihre Membrangängigkeit und können deshalb die Vakuole nicht mehr verlassen.

Für die Benzophenanthridin-Vorläufer S-Reticulin und S-Scoulerin wurde jedoch dann ein stereospezifisches Transportsystem im Tonoplasten nachgewiesen, welches die ATP-abhängige Akkumulation in der Vakuole katalysiert [42, 43]. Heute ergeben sich aus der Tatsache, dass ähnlich strukturierte hydrophobe Kationen wie Berberin und Ethidiumbromid in tierischen Zellen Substrate von MDR-Transportsystemen (MDR - Multidrug Resistance Pumps) sind [222], neue Aspekte für potenzielle Alkaloid-Transporter. Transportsysteme für Alkaloide lassen sich auch aus älteren Arbeiten ableiten, z.B. über ihre Temperatur- [42], K^+ - [42, 48] und Mg^{2+} - Abhängigkeit [23, 42, 48, 85, 104, 165, 175, 179]. Einer energieabhängigen Aufnahme der Alkaloide in die Vakuole wird durch die Beteiligung von Komplexbildnern und des sauren vakuolären pH für die Aufrechterhaltung der Alkaloidakkumulation in der Vakuole nicht widersprochen, d.h. ein Ionenfallen-Mechanismus könnte sehr wohl mit der Carrier-vermittelten Aufnahme zusammenarbeiten.

Die zelluläre Lokalisation der Alkaloide in der Eschscholzia-Suspensionskultur lässt sich wegen der Fluoreszenz dieser Verbindungen relativ gut mit lichtmikroskopischer Auflösung verfolgen. Die Benzophenanthridine werden nicht in der Vakuole akkumuliert. Bei intensiver Beobachtung lassen sich in elicitierten Zellen, seltener auch in unbehandelten Zellen, Vesikel mit fluoreszierendem Inhalt erkennen (Abb. 7). Es liegt nahe, darin Transportvesikel zu vermuten, die der Ausscheidung des Alkaloides in das Außenmedium dienen. Dafür spricht auch, dass mit konfokaler Mikroskopie erstmals das Auftauchen von Alkaloiden in der Zellwand elicitierten Zellen nachgewiesen werden konnte, etwa zeitgleich mit dem Beginn des Anstiegs der Außenkonzentration [K. Viehweger, W. Roos, unveröffentlicht].

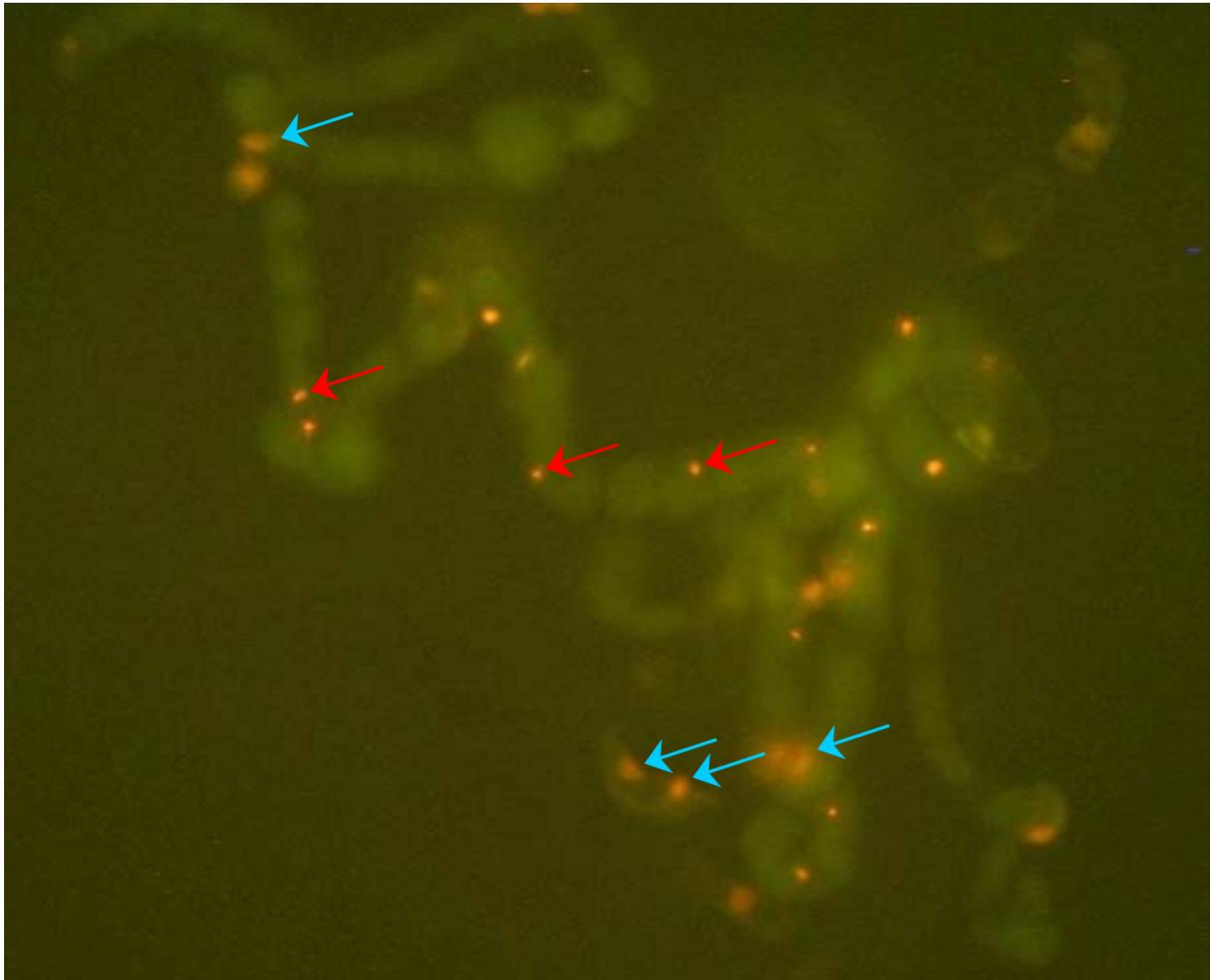


Abb. 7: Benzophenanthridin-Alkaloide werden über Transportvesikel ausgeschieden [K. Viehweger, unveröffentlicht].

Elicitierte Eschscholzia-Zellen (Kap. 3.4.) mit fluoreszierenden Vesikeln, die wahrscheinlich Benzophenanthridine enthalten (rote Pfeile; gelb/orange fluoreszierend). Die ausgeschiedenen Alkaloide können an die Zellkerne toter Zellen binden (blaue Pfeile; gelb/orange fluoreszierend). Färbung der Eschscholzia-Zellen mit 0,1 mM CFDA, das zur Anreicherung von Fluorescein besonders in der Vakuole führt. Fluoreszenzaufnahme: Excitation: 560 nm, Emission: 620 nm).

Die ins Medium abgegebenen Benzophenanthridin-Alkaloide vermögen offenbar nicht mehr die Plasmamembran intakter Eschscholzia-Zellen zu passieren. In mikroskopischen Analysen konnten wir deren Akkumulation nur in Zellkernen toter Zellen nachweisen, d.h. in Zellen, die keine Vitalfarbstoffe akkumulieren können (Abb. 7, 8). Um zu prüfen, ob die Permeabilität der Zellmembran (oder ggf. anderer zellulärer Membranen) entscheidend für den Ausschluss extrazellulärer Alkaloide ist, wurden vitale, Alkaloid-produzierende Zellen mit geringen Konzentrationen eines membranzerstörenden Detergenz (CTAB) behandelt. Danach kommt es sofort zum Einwandern der Alkaloide in die Pflanzenzelle und zur Bindung an Zellkerne und das Cytoskelett (Abb. 9 A/B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Impermeabilität der Zellmembran für die Benzophenanthridin-Alkaloide eine essentielle Voraussetzung für den Schutz der Produzentenzelle vor ihren cytotoxischen Produkten ist.

Die vesikuläre Kompartimentierung und die sich anschließende Sekretion durch die impermeable Zellmembran sind wesentliche Komponenten des Schutzsystems vor dem Kontakt mit den cytotoxischen Benzophenanthridinen. In anderen Species der Papaveraceen bzw. Zelltypen wird offenbar ein anderer Kompartimentierungs-Mechanismus benutzt: isolierte Vakuolen von *Papaver somniferum* akkumulieren externes Sanguinarin [62, 140, 141, M.H. Zenk, persönliche Mitteilung]. Das Berberin-Brücken-Enzym, ein Schlüsselenzym der Biosynthese der Benzylisochinolin-Alkaloide (nicht des Morphins) besitzt eine vakuoläre Sortierungssequenz, GFP-Konstrukte dieses Enzyms wurden in die Vakuole von Papaveraceae transportiert [13]. Das Enzym besitzt jedoch ein alkalisches pH-Optimum, sodass es in der Vakuole kaum aktiv sein dürfte. Es bleibt deshalb unklar, auf welche Weise das in den Vakuolen aufgefundene Sanguinarin dorthin gelangt [64, 140].

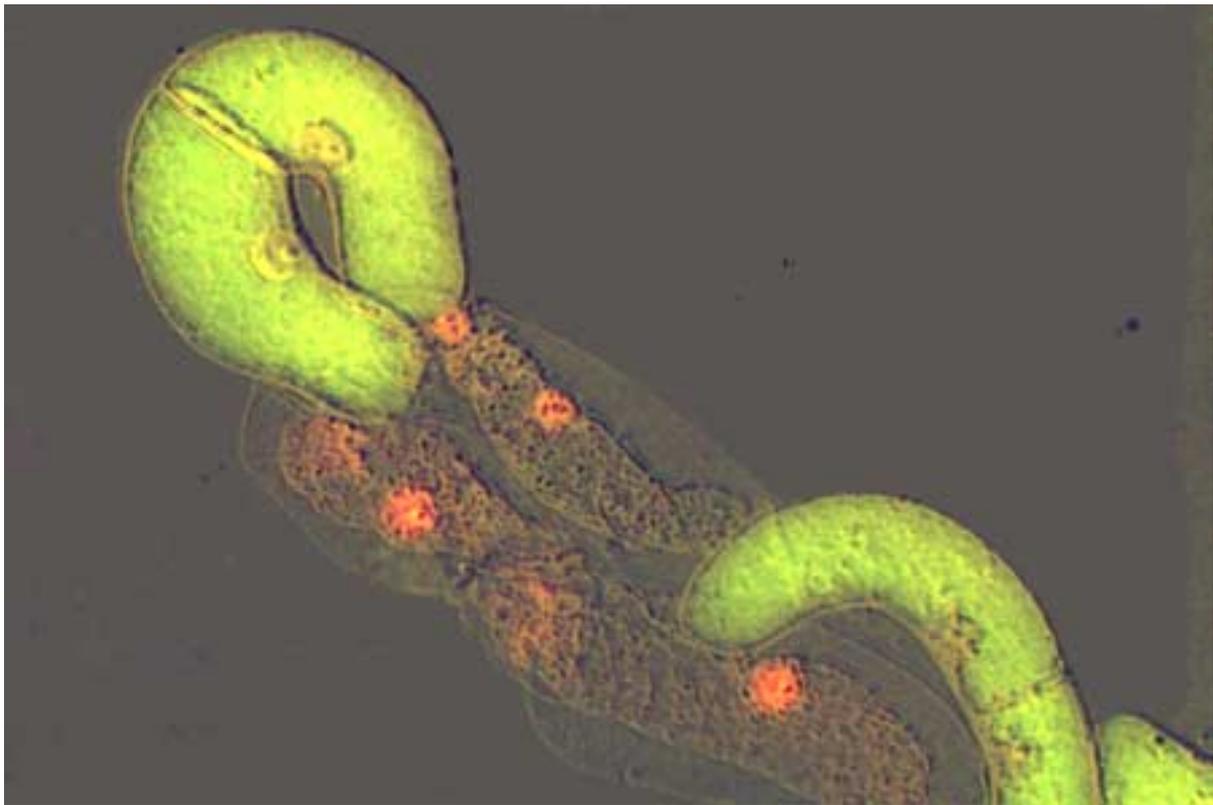


Abb. 8: Alkaloide binden an die Zellkerne toter Zellen [W. Roos, unveröffentlicht].

Zellsuspensionen wurden mit dem Vitalitätsmarker $0,1 \mu\text{M}$ CFDA angefärbt und mikroskopisch untersucht (Excitation: 560 nm , Emission: 620 nm). In vitale intakte Eschscholzia-Zellen (gelb gefärbt durch akkumuliertes Fluorescein) können die sekretierten Alkaloide nicht eindringen. Tote Zellen (ohne Fluorescein) besitzen durch die Alkaloide gefärbte, rot fluoreszierende Kerne und (wahrscheinlich) an Zytoskelett-Bestandteile gebundene Alkaloide im Cytoplasma.

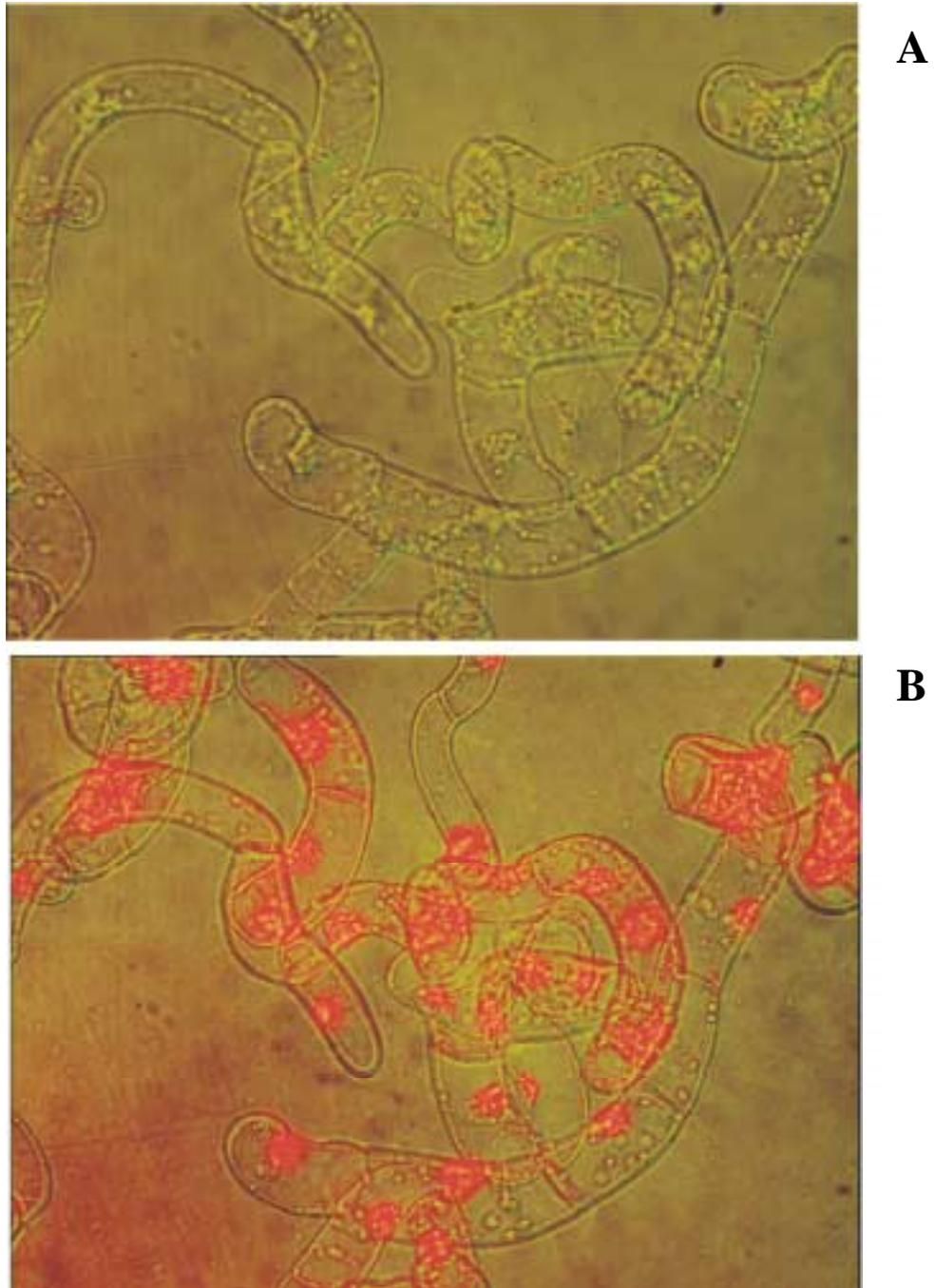


Abb. 9: Escherichia-Zellen in Kultur; Effekt von Detergentien.

5 Tage alte Escherichia-Zellen **A** mit intakten zellulären Membranen und **B** Detergens-behandelt, d.h. 30 sec. nach Zusatz von 0,1 % CTAB. Durchlicht-Aufnahmen mit Fluoreszenzaufnahmen (Excitation: 560 nm; Emission: 620 nm) überlagert.

2.2. Optimierte Elicitierung von *Eschscholzia*-Zellkulturen

In den für die folgenden Experimente verwendeten Zellkulturen von *Eschscholzia californica* ist es möglich, die Alkaloidbiosynthese selektiv, d.h. ohne Kopplung mit allgemeinen Pathogenabwehrreaktionen, wie browning oder oxidative burst-Reaktionen, auszulösen [204]. Die entscheidenden Voraussetzungen für eine selektiv induzierte Benzophenanthridin-Biosynthese sind neben geringer Elicitor-Konzentrationen (bis 1 µg/ml, Kap. 1, Abb. 5, Kap. 6, Abb. 30) und kurzer Einwirkdauer auch eine optimale Zelldichte, Wachstumsphase und Zusammensetzung des Nährmediums. Deshalb war zu Beginn der Untersuchungen eine Optimierung dieser Bedingungen notwendig.

2.2.1. Optimaler Elicitierungszeitpunkt

Die von uns verwendeten Zellkulturen durchlaufen eine 9tägige Kultivationsphase. Da zu Beginn der Untersuchungen nicht feststand, ob die Zellsuspensionen an allen Kultivationsstagen in gleichem Maß auf den Elicitor reagieren, wurde die Altersabhängigkeit der Elicitorwirkung auf die Alkaloidbildung untersucht.

Das Ergebnis (Abb. 10 A) zeigt eine starke Abhängigkeit vom Kulturalter. Die Elicitierbarkeit der Bildung von Benzophenanthridin-Alkaloiden erreicht nach einer Anstiegsphase (Tag 3 bis 7) ein Maximum am Tag 7 und fällt am Tag 8 abrupt auf einen niedrigeren Wert zurück. Die meisten Experimente ergaben, dass 8 und 9 Tage alte Zellen nicht mehr mit einer Alkaloidantwort reagieren.

Ein Vergleich mit der Wachstumskurve zeigt, dass die stärkste Elicitierbarkeit am Beginn der Wachstumsphase besteht, gefolgt von einem Abfall in der Phase des stärksten Wachstums. Als optimale Zelldichte für die Elicitierung wurden ca. 0,6 Mio Zellen/ml ermittelt.

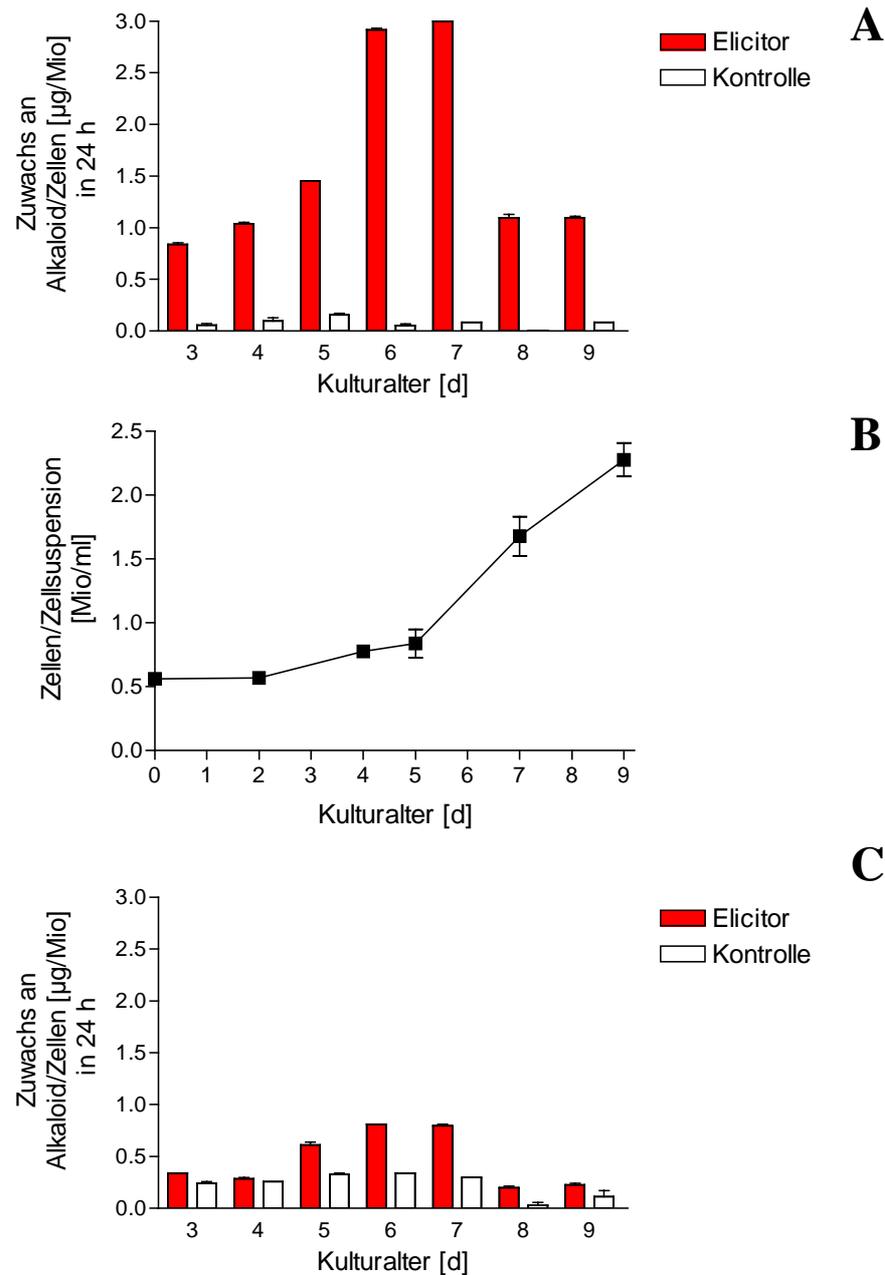


Abb. 10: A Elicitorwirkung in Abhängigkeit vom Kulturalter.

Elicitorung von Eschscholzia-Zellen im Laufe des Kultivierungszyklus (Kap. 3.4.). Vergleich von Elicitor-behandelten Kulturen und Elicitor-freien Kontrollen. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten. Jedes dieser Experimente lieferte einen Mittelwert aus 3 parallel untersuchten Zellsuspensionen.

B Trockenmasse im Kultivierungszeitraum. [M. Hieke, unveröffentlicht].

Die Bestimmung der Trockenmasse innerhalb des Kultivierungszeitraumes erfolgte in einer Standard-Kultur. Die Ermittlung der Trockenmasse erfolgte nach 3.6.1. Material und Methoden. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

C Elicitorwirkung in Abhängigkeit von Phosphat.

Die Zellen wurden in NL mit 1,25 mM KH_2PO_4 angezogen und nach Elicitorung für 24 h in NL-P mit 1,25 mM KH_2PO_4 kultiviert (Kap. 3.5.). Ähnliche, leicht verringerte Elicitor-Wirkungen wurden bei Verwendung von 3,75 mM KH_2PO_4 erhalten (Daten nicht dargestellt). Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

2.2.2. Einfluss von Phosphat

Phosphat ist als ein negativer Effektor des Sekundärmetabolismus gut bekannt [131, 132]. Hohe Phosphatkonzentrationen ($> 1,1$ mM) bewirken verstärkte Wachstumsraten und verringerte Syntheseraten an Alkaloiden, auch in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* [10]. Dieses Ergebnis wurde auch für die Elicitor-Antwort bestätigt. Der Zusatz von Phosphat nach der 30 minütigen Elicitorgabe wirkt sich negativ auf die Alkaloidantwort aus (Abb. 10 (A) und (C)).

Als Konsequenz aus den oben genannten Daten wurden alle weiteren Behandlungen in phosphatfreier Nährlösung (NL-P) durchgeführt. Aus diesem Grund wurden alle verwendeten Zellen in NL (1,25 mM Phosphat) angezogen und nach erfolgter Signalgabe zur Auslösung der Alkaloidantwort, in NL-P kultiviert.

2.3. feedback-Effekte der gebildeten Alkaloide auf ihre Biosynthese

2.3.1. Einfluss der Benzophenanthridin-Alkaloide auf ihre eigene Biosynthese

Die Impermeabilität der Plasmamembran allein sollte über länger Kultivationszeiten und bei hohen Außenkonzentrationen der Alkaloide keinen sicheren Schutz vor ihren toxischen Wirkungen bieten (Kap. 2.1.2.). Außerdem ist die Bildung der Benzophenanthridin-Alkaloide ein vielstufiger und energieaufwendiger Prozess (Beteiligung von mehr als 16 Enzymen [211, 253]). Es ist deshalb zu erwarten, dass die Biosynthese einer strengen Kontrolle unterliegt. Zuerst wurde nach einer möglichen feedback-Wirkung der Benzophenanthridine auf die eigene Biosynthese gesucht. Dazu wurden Experimente durchgeführt, bei denen einzelne Alkaloide oder Alkaloidmischungen vor, während und nach Kontakt mit dem Hefeelicitor zu den Zellsuspensionen gegeben wurden.

Sanguinarin, Chelerythrin und Berberin wurden als kommerziell erhältliche Verbindungen eingesetzt. Berberin ist kein Benzophenanthridin-Alkaloid und dient als Vergleichsmolekül aus der gleichen Biosynthesefamilie. Um auch den Einfluss der von *Eschscholzia* selbst produzierten Alkaloidmischung untersuchen zu können, wurden die Hauptalkaloide einer Elicitor-behandelten Kultur isoliert, durch HPLC gereinigt und den Kulturen als

Testmischung zugesetzt. Diese Mischung enthielt: Chelirubin ca. 20 %, Macarpin ca. 10 %, Sanguinarin ca. 5 %, 10-OH-Chelerythrin ca. 30 % und ca. 35 % nichtidentifizierte Benzophenanthridine, die ein typisches Benzophenanthridin-UV-Spektrum aufweisen [D. Weiss, unveröffentlicht].

2.3.1.1. Alkaloidwirkung vor Elicitorkontakt

Sanguinarin bewirkt bei alleinigem Zusatz zur Suspensionskultur eine deutliche Hemmung der Alkaloidantwort bei nachfolgendem Elicitorkontakt (Abb. 11; Kap. 6, Tab. 8). Dieser Effekt war wenig abhängig von den hier verwendeten Konzentrationen (1,36 μM bis 27,2 μM) und ist am stärksten, wenn Sanguinarin 4 h bis 6 h vor dem Elicitor zugesetzt wird (Hemmung um durchschnittlich 40 %).

Die Sanguinarin-Konzentrationen wurden in gleichen Bereichen wie die von der Zellkultur selbst produzierten Alkaloide gewählt, d.h. Sanguinarin war in ähnlichen Konzentrationen anwesend, wie die Gesamtalkaloide des Kulturmediums (13 μM).

Die von *Eschscholzia*-Zellen produzierte Alkaloidmischung bewirkt ebenso wie Sanguinarin eine Hemmung der Alkaloidantwort bei nachfolgendem Elicitorkontakt (Abb. 11). Es kann jedoch noch nicht entschieden werden, ob der Hemmeffekt der Alkaloidmischung auf die darin enthaltene Sanguinarinmenge allein zurückzuführen ist, oder ob andere Alkaloide bzw. deren Molverhältnisse einen ähnlichen Effekt wie Sanguinarin bewirken.

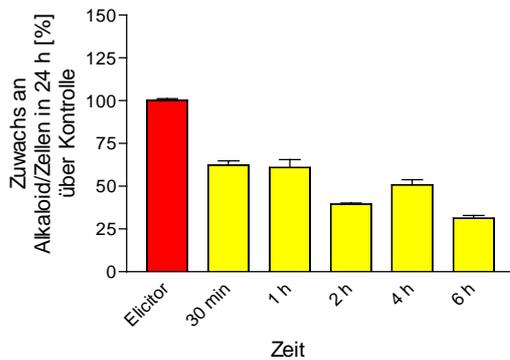
In den hier verwendeten Konzentrationsbereichen führten die verwendeten Alkaloide zu keiner nachweislichen Beeinträchtigung der Zellneubildung bzw. der Vitalität der Zellen. So konnten innerhalb von 24 h durchschnittlich 20 % Zellzuwachs nachgewiesen werden, was etwa dem Kontrollniveau entspricht (Daten nicht dargestellt).

Worauf sind die feedback-Effekte der Alkaloid zurückzuführen?

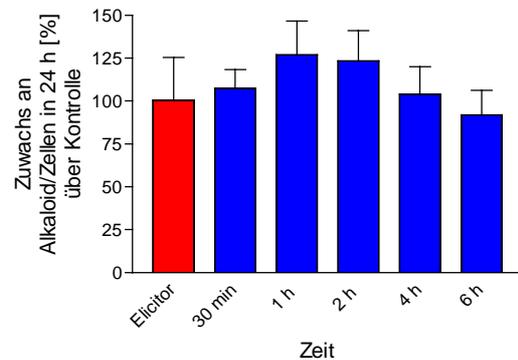
Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der externe Zusatz von Sanguinarin, neben der extrem schnellen Reduktion dieses Alkaloides und zu einer starken Hemmung der PLA-Aktivität in *Eschscholzia*-Zellkulturen führt [103]. Als Ursache wird eine Verminderung des Glutathion-Gehaltes vermutet [103]. Die Phospholipase A_2 ist ein für die Auslösung der Alkaloidbiosynthese wichtiges Signenzym (Kap. 1.) Chelerythrin und Berberin sind im

Gegensatz zu Sanguinarin weitgehend unwirksam (Abb. 11), was ebenfalls mit ihrem fehlenden oder deutlich geringeren Effekt auf die PLA₂-Aktivität korreliert [104]. Wegen des geringen Gehaltes von Sanguinarin in der Alkaloidmischung kann deren Wirkung aber nur teilweise mit dem o.g. Effekt erklärt werden.

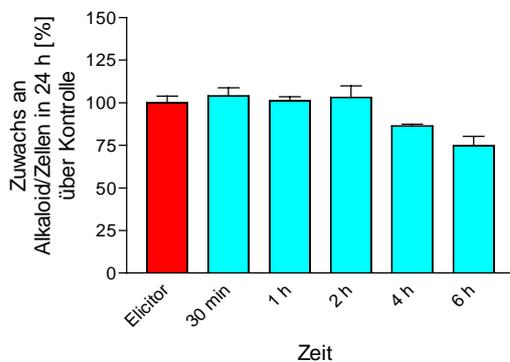
A Wirkung von Sanguinarin



B Wirkung von Chelerythrin



C Wirkung von Berberin



D Wirkung verschiedener Benzophenanthridine

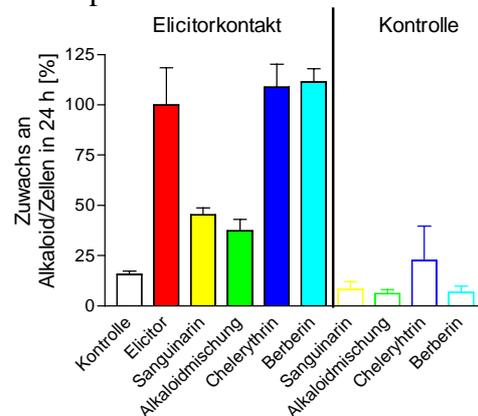


Abb. 11: Wirkung verschiedener Benzophenanthridine auf die Alkaloidbiosynthese bei Zusatz vor Elicitorgabe.

Zellsuspensionen wurden innerhalb der angegebenen Zeiträume vor Elicitorkontakt mit:

(A) Sanguinarin [13,6 μM], (B) Chelerythrin [13 μM] bzw. (C) Berberin [13 μM] (Kap. 3.4.), inkubiert. (D) 24 h vor Elicitorung erfolgte die Inkubation mit: Sanguinarin [13 μM], einer durch *Eschscholzia*-Zellen selbst produzierten Alkaloidmischung [4,5 μM] (Kap. 3.5.1.), Chelerythrin [13 μM] bzw. Berberin [13 μM]. Danach wurden die Zellen gewaschen und eliciert (Kap. 3.4.). Nach 30 min Elicitorkontakt wurden die Zellen erneut gewaschen und in frischer NL weiter kultiviert (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: (A) 100 % = 0,77 - 5,48 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]; (B) 100 % = 1,24 - 3,12 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]; (C) 100 % = 2,09 - 2,39 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]; (D) 100 % = 0,88 - 7,83 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]; Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

2.3.1.2. Alkaloidwirkung während Elicitorkontakt

Bei gleichzeitiger Einwirkung der verschiedenen Alkaloide und der Elicitormoleküle wird ein ähnliches Ergebnis wie bei der Vorinkubation erzielt. Die Alkaloidmischung (Abb. 12) wirkt allerdings deutlich stärker hemmend als das Sanguinarin allein. Sanguinarin bewirkt bei gleichzeitiger Anwesenheit mit dem Elicitor den gleichen Hemmeffekt (ca. 60 bis 75 %) wie bei 30 minütiger Anwesenheit vor dem nachfolgenden Elicitorkontakt (Abb. 11, 12). Interessanterweise sind kleinere Sanguinarin-Konzentrationen [1,36 μM] wirksamer als höhere, wenn diese während des Elicitorkontaktes einwirken. Berberin und Chelerythrin (Abb. 12) bleiben wie im vorherigen Experiment wirkungslos.

2.3.1.3. Alkaloidwirkung nach Elicitorkontakt

Werden Sanguinarin oder die Alkaloidmischung erst nach Elicitorkontakt den Zellen zugesetzt, findet ebenfalls eine klare Hemmung der Alkaloidantwort statt (Abb. 13). Chelerythrin bzw. Berberin sind wiederum wirkungslos. Auch hier wirkt die Alkaloidmischung stärker hemmend als Sanguinarin. Da in diesem Falle die früheren Signalereignisse bereits stattgefunden haben, werden entweder späte Schritte der Signalkette (d.h. nach dem pH-shift) oder die Expression bzw. Aktivität der Biosynthese-Enzyme negativ beeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Gegenwart von Benzophenanthridin-Alkaloiden vor, gleichzeitig oder nach dem Elicitor zu einer Hemmung der Alkaloidantwort führt. Die o.g. hemmende Wirkung des Sanguinarins auf die PLA₂-Aktivität kann diese Effekte bestenfalls teilweise erklären, da die anderen Alkaloide deutlich stärker wirksam sind als Sanguinarin und die Effekte auch noch nach dem Elicitorkontakt ausgelöst werden können. Die molekularen Ursachen für den feedback-Effekt sind bisher unbekannt. Er weist auf einen Benzophenanthridin-spezifischen Angriffspunkt in der späten Signalkette oder der Biosynthese hin.

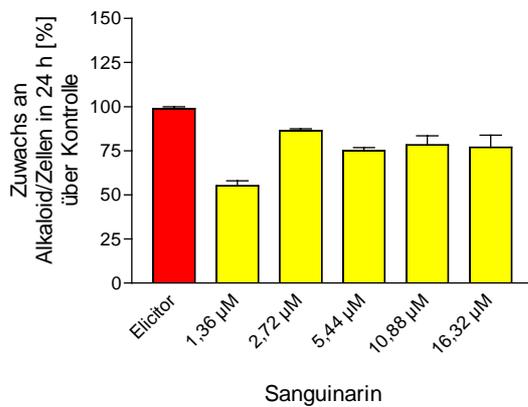
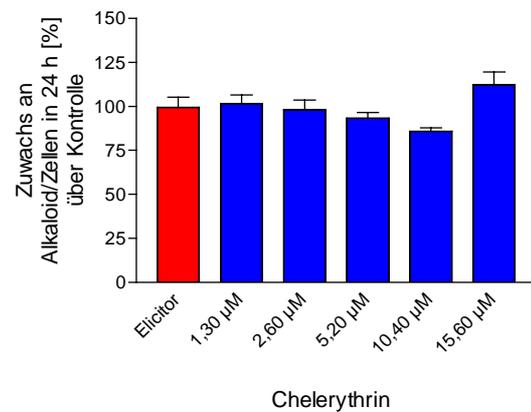
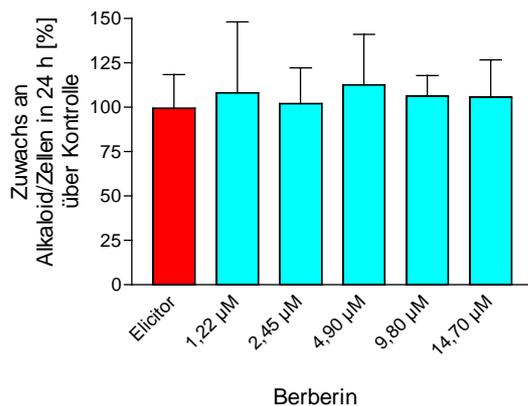
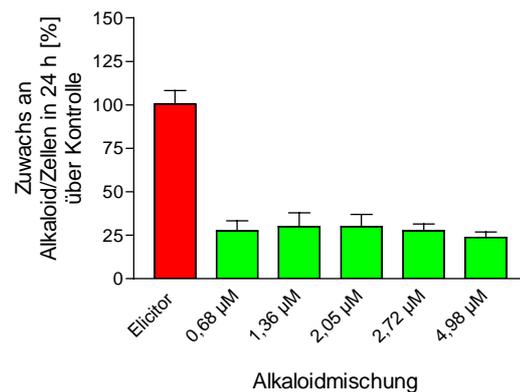
A Wirkung von Sanguinarin**B** Wirkung von Chelerythrin**C** Wirkung von Berberin**D** Wirkung der Alkaloidmischung

Abb. 12: Wirkung von Sanguinarin, Chelerythrin, Berberin bzw. der Alkaloidmischung auf die Alkaloidbiosynthese, bei gleichzeitiger Anwesenheit mit dem Elicitor.

Zellsuspensionen wurden während des Elicitorkontaktes mit: (A) Sanguinarin [13,6 µM], (B) Chelerythrin [13 µM], (C) Berberin [13 µM] (Kap. 3.4.) bzw. einer durch *Eschscholzia*-Zellen selbst produzierten (D) Alkaloidmischung [4,5 µM] (siehe Kap. 3.5.3.) inkubiert. Nach 30 minütiger Elicitierung, wurden die Zellen gewaschen und in frischer Nährlösung weiter kultiviert (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: (A) 100 % = 1,32 - 1,37 Alkaloid/Zellen [µg/Mio]; (B) 100 % = 2,48 - 3,03 Alkaloid/Zellen [µg/Mio]; (C) 100 % = 1,45 - 2,77 Alkaloid/Zellen [µg/Mio]; (D) 100 % = 2,99 - 3,89 Alkaloid/Zellen [µg/Mio]. Alle Messwerte sind Mittelwerte ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

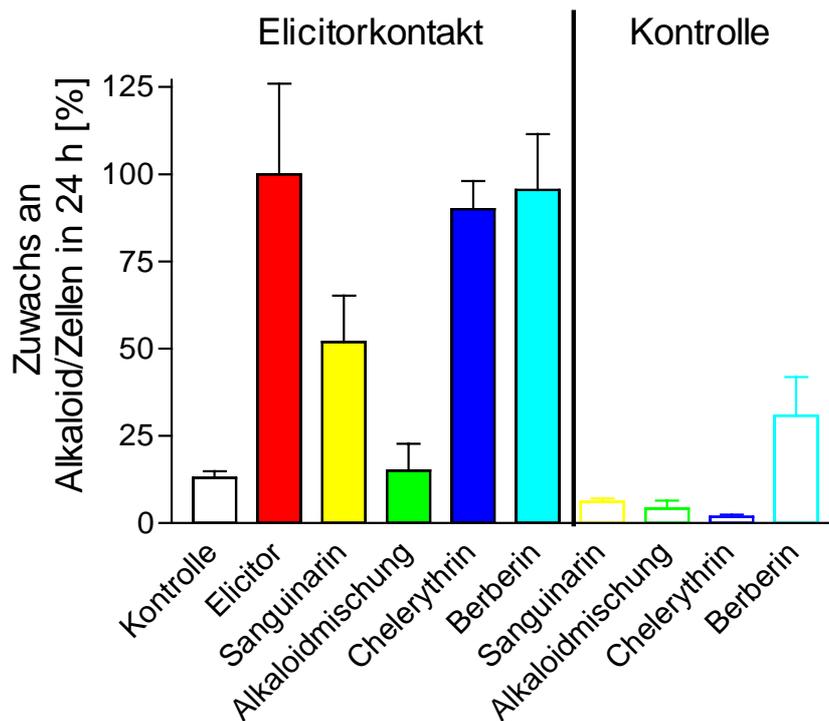


Abb. 13: Einfluss verschiedener Benzophenanthridin-Alkaloide auf die Alkaloidbiosynthese bei Zusatz nach Elicitorkontakt.

Im Anschluss an die Elicitierung (Kap. 3.4.) wurde den einzelnen Varianten jeweils Sanguinarin [13,6 μM], eine durch die Eschscholzia-Zellen selbst produzierte Alkaloidmischung [4,5 μM] (Kap. 3.5.3.), Chelerythrin [13 μM] bzw. Berberin [13 μM] zugesetzt und für 24 h inkubiert. Die Wirkung des Elicitorkontaktes vom Zeitpunkt $t = 0$ h bis $t = 24$ h wurde mit 100 % normiert. 100 % Elicitorwirkung nach Erstkontakt, entsprechen im Zeitraum von $t = 0$ h bis $t = 24$ h: 100 % = 0,56 - 7,33 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]; Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

2.3.1.4. Wirkung ausgewählter Benzophenanthridine auf mRNA- und Proteinebene

Die o.g. Ergebnisse führten zu der Frage, ob ein Effekt extern zugesetzter Alkaloide auch auf der Transkriptionsebene, d.h. dem Spektrum der mRNA's sichtbar ist, wobei der Zusatz nach Elicitorkontakt besonders interessant war. Wie in Abb. 14 gezeigt, sind beim Vergleich der mRNA-Muster und der daraus durch *in vitro* Translation gebildeten Proteine deutliche Hinweise für einen Einfluss von Sanguinarin und der oben genannten Alkaloidmischung erkennbar. Durch den externen Zusatz dieser Alkaloide nach Elicitorkontakt, scheint es zur Überexpression verschiedener, bisher noch nicht identifizierter Proteine zu kommen (vgl. Spur A6 und S6 mit E6 und K6). Eine verringerte Expression anderer Proteine erscheint möglich, kann aber noch nicht mit Bestimmtheit festgestellt werden. Dennoch ist die Veränderung des Expressionsmusters durch Kontakt mit den von *Eschscholzia* produzierten Alkaloiden ein interessanter Befund und ein guter Ausgangspunkt für die nähere Analyse der überexprimierten bzw. vermindert exprimierten Proteine.

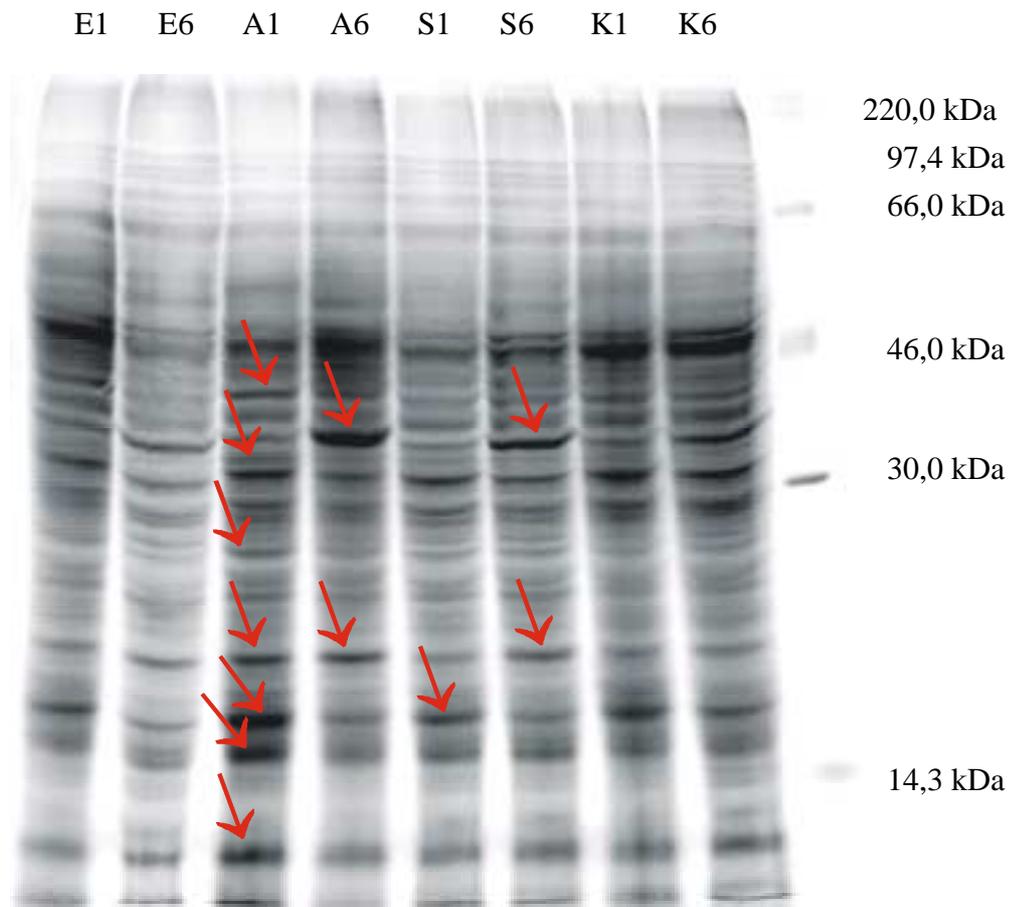


Abb. 14: Ausgewählte Beispiele der Alkaloidwirkung auf mRNA Ebene.

Eschscholzia-Zellen wurden elicitiert (Kap. 3.4.) (Kontrolle - ohne Elicitor). Im Anschluss wurde den Zellen für jeweils 1 h bzw. 6 h mit einer Alkaloidmischung [1,4 μ M] (Kap. 3.5.3.) (Ansatz A1 und A6) bzw. mit Sanguinarin [1,4 μ M] (Ansatz S1 und S6) inkubiert. Die Gesamt-mRNA wurde nach 1 h bzw. 6 h isoliert (Kap. 3.9.) und im Weizenkeimsystem translatiert (Kap. 3.13.). Die erhaltenen Proteine wurden im 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt (Kap. 3.14.1. ff.) und ausgewertet. Die roten Pfeile markieren Beispiele für Veränderungen auf mRNA-Ebene, die durch die *in vitro* translatierten Proteine sichtbar gemacht wurden.

Bezeichnung	Zeit nach Signalgabe [h]	Elicitorkontakt	Kontrolle	Zusatz einer Alkaloidmischung [1,4 μ M]	Zusatz von Sanguinarin [1,4 μ M]
E1	1	+			
E6	6	+			
A1	1	+		+	
A6	6	+		+	
S1	1	+			+
S6	6	+			+
K1	1		+		
K6	6		+		

2.4. Desensibilisierung der Phytoalexinantwort und alternative Signalwege

Die Bildung der Benzophenanthridin-Alkaloide ist ein vielstufiger und energieaufwendiger Prozess [211, 253], in dessen Verlauf cytotoxische Endprodukte gebildet werden. Da die Wirkung der von *Eschscholzia* gebildeten Alkaloide auch gegen die produzierende Zelle selbst gerichtet sein kann, erscheint es biologisch sinnvoll, deren Bildung streng zu kontrollieren und eine Neusynthese erst dann anzuschalten, wenn keine ausreichenden Mengen an Alkaloide für die Pathogenabwehr zur Verfügung stehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in *Eschscholzia* erstmals gefunden, dass die Wiederholung des Elicitorkontaktes keine erneute Alkaloidantwort auslöst. Ein solches Phänomen wird als Desensibilisierung bezeichnet.

Desensibilisierungseffekte in der pflanzlichen Pathogenabwehr wurden in mehreren Systemen beschrieben [12, 30]. Als Beispiele wären zu nennen: die Desensibilisierung des Wechsels vom Membranpotenzial des Luzernenwurzelhaares bei wiederholtem Kontakt mit *Rhizobium meliloti* [55], die Desensibilisierung von Tomatenzellen durch Chitinfragmente und Xylanase [69, 70], die Desensibilisierung von Gurkenzellen durch Ergosterol und Chitosan [123], sowie die Desensibilisierung durch Cryptogein und Oligogalacturonoide in Tabak [12]. Die Signalgaben und deren Reaktionen legen dabei fest, ob es sich um eine homo- oder heterologe Desensibilisierung handelt [12]. Eine Desensibilisierung bezeichnet man dann als homolog, wenn durch wiederholte Gabe desselben Signals keine erneute Antwort ausgelöst werden kann. Alternative Stimulatoren sind dagegen in der Lage, eine wiederholte Reaktion auszulösen. Wird nach zwei unterschiedlicher Signale die Wirkung des Zweitsignals abgeschwächt, handelt es sich um eine heterologe Desensibilisierung [12].

2.4.1. Kurzzeitige oder ständige Anwesenheit des Elicitors

Zuerst wurde untersucht, ob eine Veränderung der Synthesekapazität an Benzophenanthridinen durch die ständige Anwesenheit des Elicitors im Vergleich zu einem nur 30 minütigen Kontakt auftritt.

Wie das Ergebnis aus Abb. 15 zeigt, bewirken sowohl kurzzeitiger Elicitorkontakt (30 min), als auch dessen permanente Anwesenheit über den Zeitraum von 96 h etwa den gleichen Effekt auf die Alkaloidbildung. Das spricht dafür, dass das Elicitierungssignal zur Alkaloidbildung bereits innerhalb von 30 min gesendet wird und danach keine weitere Induktion mehr erfolgt.

Gründe für dieses Ergebnis könnten sein:

- die Auslösung der maximalen Synthesekapazität bereits bei kurzzeitigem Elicitorkontakt;
- die Inaktivierung des Elicitors bei längerer Anwesenheit oder
- die Inaktivierung der Signalkette unmittelbar nach Elicitorkontakt.

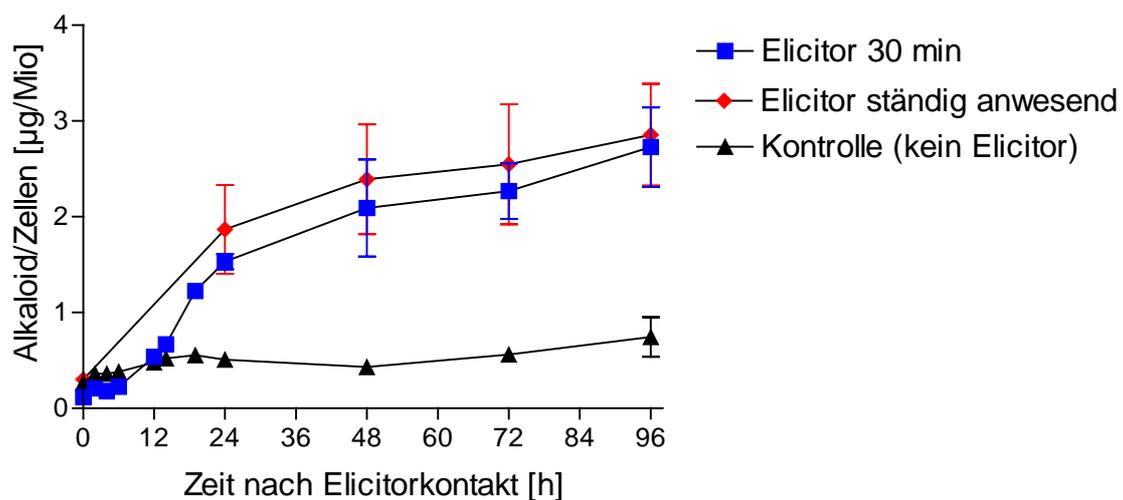


Abb. 15: Wirkung von kurzzeitiger oder ständiger Anwesenheit des Elicitors.

Eschscholzia-Zellen (Elicitor 30 min anwesend) wurden für 30 min mit Elicitor behandelt (Kap. 3.4.). Die Zellsuspensionen (Elicitor ständig anwesend) wurden mit dem 3fachen Volumen NL-P gewaschen, in NL-P mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Elicitor suspendiert und für 96 h inkubiert. Kontrolle (ohne Elicitorzusatz); Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

2.4.2. Einmalige oder wiederholte Elicitorgabe

Benzophenanthridin-Alkaloide und andere regulatorisch wirkende Substanzen, die nach Induktorgabe in das Nährmedium ausgeschieden werden, könnten das Ergebnis jeder weiteren Stimulation mit Elicitor-molekülen beeinflussen. Um solche Einflüsse auszuschliessen, wurde das Nährmedium vor und nach jedem Elicitorkontakt entfernt und durch neues Medium ersetzt. Dabei wurde die Versuchseinstellung der folgenden Experimente so gewählt, dass die Elicitoreinwirkung nur über 30 min erfolgte. Nach unterschiedlich langen Zeitintervallen erfolgte eine erneute Elicitorgabe. Hierzu wurde das Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen erneut mit Elicitor behandelt. Es ist also unwahrscheinlich, dass bei dieser Versuchseinstellung die gebildeten Alkaloide oder andere unbekannte Substanzen die Reaktion auf die 2. Elicitorgabe beeinflussen.

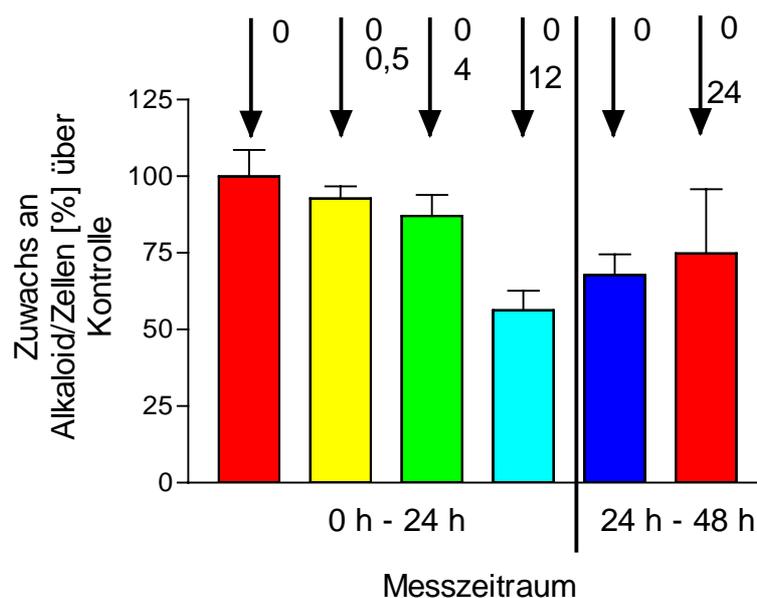


Abb. 16: Kurze Intervalle zwischen Erst- und Zweitkontakt mit dem Elicitor.

Eschscholzia-Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h eliciert (Kap. 3.4.). Nach 30 min, 4 h, 12 h bzw. 24 h erfolgte eine erneute Elicitorgabe (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des einmaligen Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von $t = 0$ h bis $t = 24$ h: $100 \% = 2,48 - 4,18$ Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. An den Pfeilen ist jeweils der Zeitpunkt der Elicitorgabe vermerkt. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 6 unabhängigen Experimenten.

Die in Abb. 16 und 17 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei kurzzeitigen als auch bei längeren Intervallen die jeweils 2. Elicitorgabe ohne Effekt auf die Alkaloidbildung ist.

Intervalle von 30 min bis 24 h zwischen zwei Elicitorgaben bewirken keine erneute Auslösung der Alkaloidbiosynthese (Abb. 16). Eine Neuinduktion der Alkaloidbiosynthese wird bereits 30 min nach dem Erstkontakt verhindert, wobei dessen desensibilisierende Wirkung über die Zeitspanne von 72 h bestehen bleibt (Abb. 17).

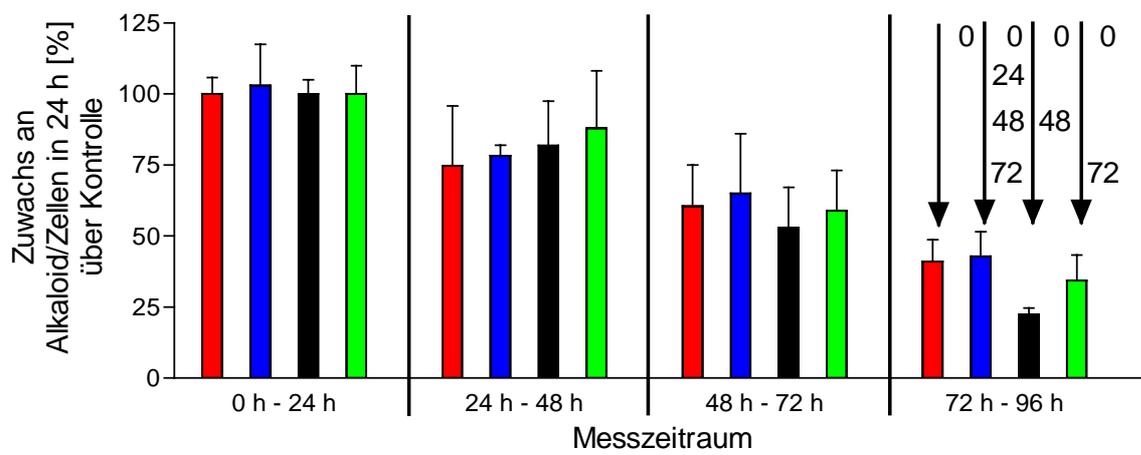


Abb. 17: Wirkung des wiederholten Elicitorkontaktes nach 24 h, 48 h und 72 h.

Eschscholzia-Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h eliciert (Kap. 3.4.). Nach 24 h, 48 h, bzw. 72 h erfolgte eine erneute Elicitorgabe (Kap. 3.45.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von $t = 0$ h bis $t = 24$ h:

Elicitor 0 h 100 % = 0,78 - 0,94 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]

Elicitor 0 h, 24 h, 48 h, 72 h 100 % = 0,81 - 1,31 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]

Elicitor 0 h, 48 h 100 % = 0,77 - 0,91 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]

Elicitor 0 h, 72 h 100 % = 0,57 - 0,98 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]

An den Pfeilen ist jeweils der Zeitpunkt der Elicitorgabe vermerkt. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Hieraus ergibt sich der Schluss, dass der Elicitorkontakt nicht nur die Alkaloidbiosynthese auslöst, sondern auch zu einer Blockade jedes weiteren Elicitorsignals führt. Sogleich wird klar, dass eine Inaktivierung des Elicitors nicht am Ausfall der Alkaloidantwort beteiligt sein kann.

Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass diese Desensibilisierung in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* nicht an ein bestimmtes Zellalter gebunden ist. Ebenso wie 5 Tage alte Zellen sind auch Zellen im Alter von 3 Tagen von dieser Art der Desensibilisierung nach wiederholtem Elicitorkontakt betroffen (Daten hier nicht dargestellt).

Auch der Einsatz niedrigerer Elicitorkonzentrationen (von 0,25 µg/ml statt 1 µg/ml) im Verlauf des gesamten Experimentes ermöglichte keine Neusynthese an Alkaloiden (Daten hier nicht dargestellt).

Aus den hier dargestellten Ergebnissen gehen eine Reihe von Fragen hervor: Wodurch wird die Desensibilisierung hervorgerufen? Wirken die nach Elicitor-Kontakt gebildeten Alkaloide als "Ausschalter" der Signalkette?

Auf der Suche nach dem Auslöser der Desensibilisierung zeigen die dargestellten Ergebnisse (Kap. 2.4.1./2.), dass eine Desensibilisierung gegenüber einem Elicitor-Zweitkontakt bereits vor dem Auftreten der Alkaloide erfolgt. Somit scheiden diese als induzierende Faktoren aus (Abb. 16, 17).

Weiterhin ergibt sich die Frage, ob die nach Erstkontakt ausgelöste Alkaloidantwort bereits die maximale Synthesekapazität erreicht hat. Somit wäre eine erneute Auslösung der Biosynthese schon aus Kapazitätsgründen nicht möglich. Zur Klärung dieser Frage sollte der Einsatz alternativer Signalmoleküle beitragen, von denen bereits bekannt ist, dass sie ebenfalls die Alkaloidbildung auslösen. Wenn solche Effektoren eine deutliche Erhöhung der Synthesekapazität nach vorausgegangenem Elicitorkontakt ermöglichen, kann nicht von einer Inhibierung der Biosynthese infolge einer Kapazitätsüberschreitung ausgegangen werden. Diese Moleküle sollten dann alternative Signalwege zur Alkaloidbildung verwenden.

2.4.3. Einsatz alternativer Signale zur Auslösung der Benzophenanthridin-Biosynthese

Die Auslösung der Alkaloidbiosynthese kann in der verwendeten Zellkultur von *Eschscholzia californica* durch verschiedene Verbindungen erreicht werden, deren Wirkungsmechanismen jedoch nur teilweise bekannt sind. In Tabelle 3 sind einige dieser Verbindungen aufgelistet. Die Verwendung verschiedener Signale eröffnet immerhin die Möglichkeit, dass damit auch unterschiedliche Wirkungsmechanismen bzw. Signalwege zur Induktion der Alkaloidbiosynthese beschritten werden. Dies erlaubt eine vergleichende Suche nach intermediären Signalschritten und einen Zugang zum Verständnis des Desensibilisierungs-Phänomens.

Tab. 3: Signale und (z.T. putative) Wirkungsmechanismen zur Auslösung der Phytoalexinbiosynthese.

Diese Tabelle zeigt eine Auswahl publizierter Induktoren der Alkaloidbiosynthese aus verschiedenen Pflanzen.

Verbindung	Wirkung	System	Referenz
Octadecanoide: Methyl-Jasmonat, Trihomojasmonat, Hexahomojasmonat, 12-Oxophytodiensäure	u.a. Stimulator des BBE, (S)-Cheilanthifolin-Synthase, (S)-Stylopin-Synthase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	<i>Eschscholzia californica</i> , <i>Nicotiana tabacum</i>	[15, 91, 138, 160]
permeierende Säuren: Pivalinsäure oder Buttersäure	intrazellulärer pH-Shift	<i>Eschscholzia californica</i>	[102, 204]
Quercetin	Wirkungsmechanismus noch unbekannt	<i>Sanguinaria canadensis</i>	[155]
Mastoparan	ubiquitärer G-Protein-Aktivator	<i>Eschscholzia californica</i>	[205]
KCl, NaCl, Mannit, Sorbit, Saccharose	osmotischer Stress	<i>Eschscholzia californica</i>	[Weiss, D. unveröffentlicht]
H ₂ O ₂	sekund messenger, Intermediat der Hypersensitivitätsreaktion	Sojabohne (<i>Glycine max. L.</i>)	[5, 149]
Barbiturate: Barbitursäure, Butethal, Phenobarbital, 2-Thiobarbitursäure	induziert mikrosomales Zytochrom P-450	<i>Eschscholzia californica</i>	[90]
Natriumorthovanadat	über Tyrosindecarboxylase, H ⁺ -ATPase	<i>Eschscholzia californica</i>	[236]

Zur Auslösung der Benzophenanthridin-Biosynthese in *Eschscholzia californica* wurden neben dem Elicitor die folgenden Induktoren bzw. Behandlungen ausgewählt:

1. Jasmonat und andere Octadecanoide stimulieren die Produktion von Benzophenanthridin-Alkaloiden [91] über die Induktion essentieller Biosyntheseenzyme, u.a. des Schlüsselenzyms BBE [138]. Octadecanoide sind bekannte Intermediärsignale der pflanzlichen Pathogenabwehr, einschließlich einiger

Bereiche des Sekundärstoffwechsels. In Zellkulturen von *Catharanthus* wurde gezeigt, dass die Induktion der Strictosidin-Synthase, eines Schlüsselenzyms der Biosynthese von iridoiden Indol-Alkaloiden, durch Jasmonat u.a. Octadecanoide über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der ORCA-Gruppe verläuft [169, 170]. Abbildung 19 zeigt typische Ergebnisse mit der hier verwendeten *Eschscholzia*-Zellkultur. Die maximale Wirkung von Methyl-Jasmonat auf die Alkaloidbildung liegt etwa im selben Rahmen wie die des Elicitorsignals. Methyl-Jasmonat-Konzentrationen $>50 \mu\text{M}$ wirken negativ auf die Zellneubildung: (Kap. 6, Abb. 31, Tab. 9).

2. Ein shift des cytoplasmatischen pH konnte als notwendiger Schritt im Signalmechanismus zur Elicitor-ausgelösten Alkaloidbildung in *Eschscholzia californica* identifiziert werden (Kap. 1) [204]. Durch kurzzeitigen Zusatz permeierender Säuren wie Buttersäure oder Pivalinsäure kann ein transienter Abfall des cytoplasmatischen pH auch experimentell ausgelöst werden (Abb. 18). Dieser führt ohne Anwesenheit des Elicitors zur Bildung von Benzophenanthridin-Alkaloiden (Kap. 6, Abb. 33, Tab. 9) [204].
3. Hyperosmotischer Stress führt ebenfalls zur Stimulation der Alkaloidbiosynthese in *Eschscholzia*-Zellkulturen [D. Weiss, unveröffentlicht]. Hyperosmotische Bedingungen lösen in pflanzlichen Organismen z.B. die Aktivierung von Ionenkanälen der Plasmamembran (K^+ -Ausstrom aus den Zellen), extrazelluläre Alkalisierung, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Proteinphosphorylierung, u.a. über die Aktivierung von MAP-Kinasen [71] aus. Der Effekt von Osmotika ist oft auf Transkriptionsebene nachweisbar: in Bakterien gibt es z.B. mehrere "osmoregulierte" Operons [37]. Abbildung 38 und 39 (Kap. 6) zeigen die Wirkung verschiedener Osmotika auf die Alkaloidbildung in *Eschscholzia*-Zellkulturen in Abhängigkeit von Einwirkzeiten und Konzentrationen. Die Konzentration von 90 mM (260 bzw. 430 mOsmol/kg, vgl. Kap. 6, Abb. 38, 39) erwies sich in den meisten Fällen als optimal für die Induktion von Benzophenanthridinen (keine oder geringe Hemmung der Zellneubildung).

Die folgenden Verbindungen führen in unserem experimentellen System nicht zu einer reproduzierbaren Induktion der Alkaloidbiosynthese, wurden aber in anderen Zellkulturen als Stimulatoren der Phytoalexinbildung beschrieben:

4. In einem von Apostol et al. [5] bereits 1989 vorgeschlagenen Modell wurde H₂O₂ als potenzieller second messenger zur Induktion von Genen der Pathogenabwehr einschließlich gewisser Phytoalexine in Soja-Zellen diskutiert. Dabei sollten die Verschiebung des Verhältnisses von reduzierten zu oxidiertem Glutathion oder NADP eine Rolle spielen. Inzwischen wurden mehrerer regulatorische Funktionen von H₂O₂ und anderen Produkten des oxidative burst wahrscheinlich gemacht [3, 143, 149]. In unserem Zellkultursystem hat zumindest von außen zugesetztes H₂O₂ keine Wirkung auf die Alkaloidbiosynthese. Abbildung 36 und Tab. 9 (Kap. 6) zeigen, dass es durch Konzentrationen zwischen 20 µM und 100 mM nicht zur Auslösung der Benzophenanthridin-Biosynthese in *Eschscholzia*-Zellkulturen kam. Dies bestätigt die bereits bekannte Unabhängigkeit der Wirkung niedriger Elicitor-Konzentrationen vom oxidative burst (Kap. 1.).
5. Mahady und Beecher fanden 1994, dass Quercetin, ein ubiquitär verbreitetes Flavonoid, in *Sanguinaria canadensis* zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese, insbesondere von Sanguinarin und Chelerythrin eingesetzt werden kann [155]. Eine definierte Angriffsstelle von Quercetin in der Alkaloidbiosynthese konnte bisher nicht identifiziert werden. Abbildung 35 und Tab. 9 (Kap. 6) zeigen, dass im verwendeten Konzentrationsbereich innerhalb von 24 h keine Induktion der Benzophenanthridin-Biosynthese in *Eschscholzia*-Zellkulturen erfolgt.
6. Mastoparan, ein kationisches, amphiphiles Tetradecapeptid, ist als Stimulator von G-Proteinen [101] und daraus resultierend auch als Aktivator einiger PLAsen, [28, 237] bekannt. Die durch Aminosäureaustausch gewonnenen Derivate Mastoparan 7 (ein hyperaktiver Stimulator) und Mastoparan 17 (ein inaktiver Effektor) wurden ebenso wie Mastoparan den Zellkulturen von *Eschscholzia californica* zugesetzt. Obwohl in einigen Fällen ein stimulierender Effekt auf die Alkaloidbildung und ein pH-shift nachgewiesen werden konnte [205], gelang es nicht, diesen Effekt reproduzierbar zu gestalten, insbesondere nicht beim Vergleich von Zellkulturchargen unterschiedlichen Alters (Kap. 6, Tab. 9)

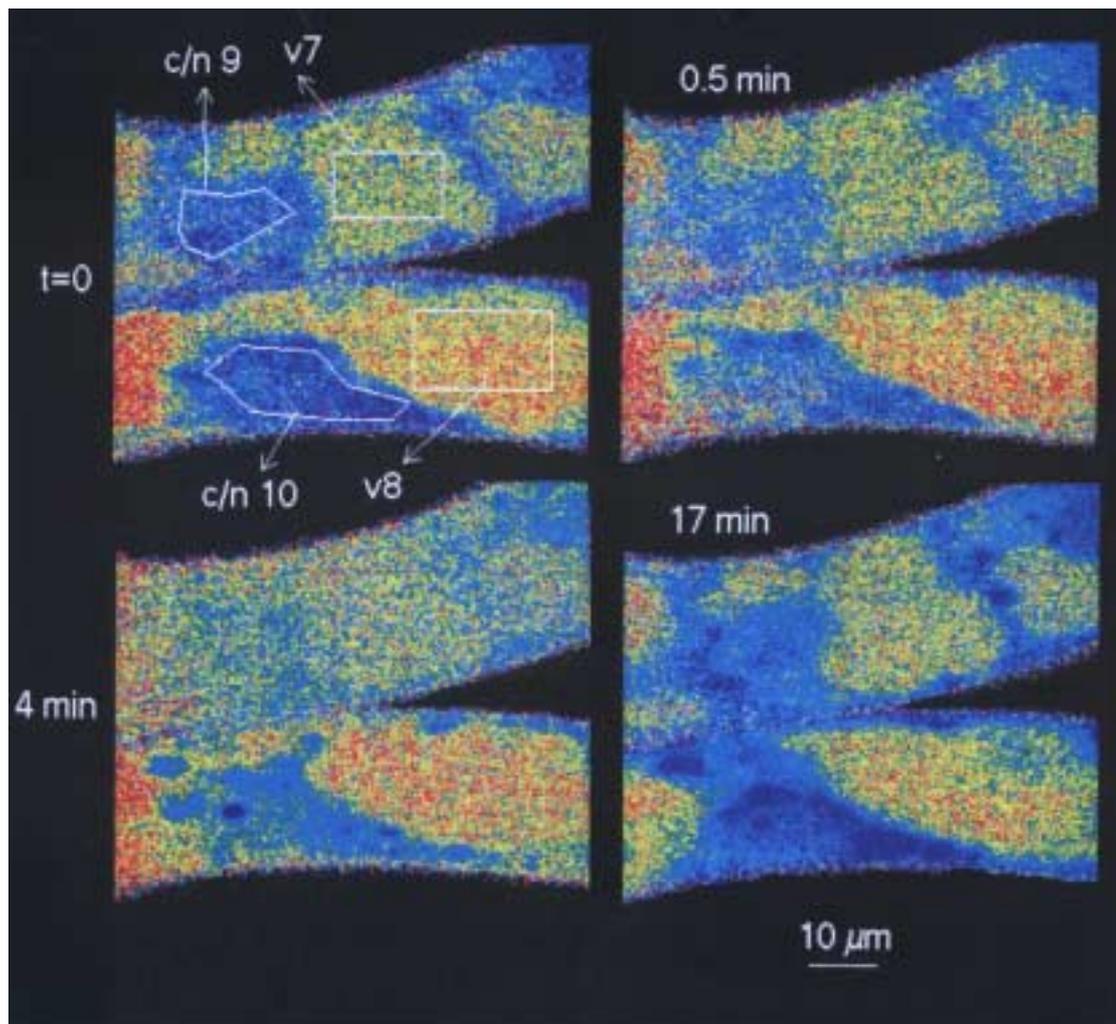


Abb. 18: pH-shift zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese in *Eschscholzia californica* [204]. Infolge des Eindringens von permeierenden Säuren wie Buttersäure oder Pivalinsäure kommt es zur Auslösung eines cytoplasmatischen pH-shifts (hier zwischen 0,5 und 4 min). Nach Entfernen/Auswaschen der Säuren im Außenmedium wird der pH-Abfall reversibel.

2.4.3.1. Die Wirkung ausgewählter Signale bei Erstkontakt

Von den o.g. Stimulatoren der Alkaloidbiosynthese wurden die folgenden ausgewählt, um ihre Wirksamkeit mit der des Hefe-Elicitors zu vergleichen und Desensibilisierungs-Effekte bei aufeinanderfolgender Gabe zweier Signalmoleküle zu untersuchen:

1. Hefeelicitor
2. Methyl-Jasmonat
3. Buttersäure-Behandlung
4. Hyperosmotischer Stress (in der Regel durch NaCl oder KCl ausgelöst)

In Abb. 19 (und Kap. 6, Abb. 31, 33, 38, 39) sind zunächst die Wirkungen dieser Effektoren bei einmaliger Einwirkung unter optimierten Bedingungen verglichen.

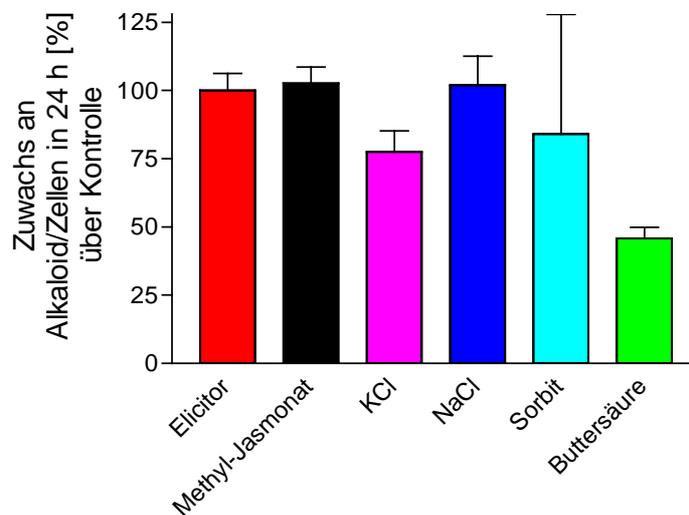


Abb. 19: Wirkung einiger positiver Effektoren auf die Benzophenanthridin-Bildung bei Erstkontakt mit Eschscholzia-Zellen.

Eingesetzt wurden: Hefeelicitor 1 $\mu\text{g/ml}$, 50 μM Methyl-Jasmonat, 30 min; 90 mM KCl (ges. osmot. Druck: 340 mOsmol/kg), 24 h; 90 mM NaCl (ges. osmot. Druck: 340 mOsmol/kg), 24 h; 90 mM Sorbit (ges. osmot. Druck: 260 mOsmol/kg), 6 h; 4 mM Natrium-Butyrat, pH 5,0, 15 min. Die Werte sind auf die Wirkung des ersten Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung = 0,769 - 2,50 μg Alkaloid/Mio Zellen. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

2.4.3.2. Die Wirkung ausgewählter Signale bei Zweitkontakt

Zur näheren Charakterisierung desensibilisierender Mechanismen wurde nun untersucht, ob:

1. die durch den Elicitor bewirkte Desensibilisierung auch für andere Signalmoleküle wirksam ist,
2. andere Signalmoleküle bei Erstkontakt ebenfalls eine Desensibilisierung auslösen und
3. welche ErstsSignale die Zellen für welche Zweitsignale desensibilisieren.

Insgesamt stellt sich nun die Frage, ob durch "homologe" oder "heterologe" Desensibilisierung Hinweise auf unterschiedliche Signalwege erbracht werden können. In den im folgenden zusammengefassten Experimenten wurden unterschiedliche Abfolgen der beschriebenen Erst- und Zweitsignale angewandt und ihre Wirkung auf die Auslösung der Alkaloidbiosynthese untersucht. Jeder der o.g. Effektoren wurde sowohl als Erst- als auch als Zweitsignal eingesetzt (Kap. 6, Tab. 9 ff.) Eine typische Folge von Experimenten ist in Tab. 4 dargestellt. Tab. 5 gibt einen vereinfachten Gesamtüberblick über die erhaltenen Ergebnisse.

Es ist ersichtlich, dass nach der Elicitorbehandlung eine weitere Steigerung der Alkaloidproduktion erreicht werden kann und zwar durch hyperosmotische Behandlung (Tab. 4; Kap. 6, Abb. 40, 41) oder durch Zusatz von Methyl-Jasmonat (Tab. 4; Kap. 6, Abb. 32).

Durch den Elicitorkontakt wird also nur ein Teil der maximal möglichen Alkaloidsyntheserate ausgeschöpft. Der Grund für diese Limitierung ist wahrscheinlich nicht eine Verringerung der metabolischen Aktivität, da die Zellen auf zusätzliche Signale mit einer verstärkten Syntheseleistung reagieren können. Dafür sprechen auch Vitalitätstests mit Fluoreszenzfarbstoffen, die nach wiederholtem Elicitorkontakt zumindest keine gravierenden Zellschädigungen anzeigen (Abb. 20; Kap. 6, Tab. 10). Somit sind weder das Erreichen der Kapazitätsgrenze noch toxische Effekte plausible Gründe für die Begrenzung der Alkaloidsyntheserate nach Elicitorkontakt.

Es wird weiterhin erkennbar, dass die verwendeten Signale Desensibilisierungseffekte mit unterschiedlicher Auswirkung aufbauen:

1. Die Auslösung der Alkaloidbiosynthese nach Elicitorkontakt oder durch künstliche Ansäuerung ist mit der Ausschaltung des Signalweges für das jeweils andere Signal verbunden. Das spricht dafür, dass sowohl das Elicitorsignal als auch der pH-shift Elemente einer gemeinsamen Signalkette sind. Dieser Befund ist im Einklang mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe [204]. Die Unwirksamkeit des künstlichen pH-shifts in elicitierten Zellen (Kap. 6, Tab. 11, 12) spricht dafür, dass der die Desensibilisierung bewirkende "Block" der Signalkette stromabwärts vom pH-shift lokalisiert ist.
2. Die Wirkungen von Methyl-Jasmonat und hyperosmotischem Stress können nach Elicitorkontakt nicht ausgeschaltet werden, d.h. in beiden Fällen tritt eine weitere Steigerung der Alkaloidantwort in elicitierten Zellkulturen ein (Kap. 6, Tab. 10, Abb. 32, 40, 41). Parallel zu diesen Daten wurde in unserer Arbeitsgruppe gefunden, dass die verwendeten Methyl-Jasmonat-Konzentrationen keinen pH-shift auslösen [67]. Dies spricht ebenfalls für einen eigenständigen, vom Elicitorkontakt und dem pH-shift unabhängigen Signalweg zwischen Methyl-Jasmonat bzw. osmotischem Stress und der Induktion der Alkaloidbiosynthese.
3. Methyl-Jasmonat führt zu einem sehr weitgehenden Desensibilisierungseffekt: nach Methyl-Jasmonat-Gabe waren alle verwendeten Effektoren ohne messbare Wirkung auf die Alkaloidbildung (Tab. 4, Kap. 6, Tab. 13). Ähnliches gilt für die Erstbehandlung mit Osmotika, welche ebenfalls zu einem weitgehenden Ausschalten der Induktion bei nachfolgenden Effektoren führt (Tab. 5, Kap. 6, Tab. 17, 18, 19, 20, 21). Die nach KCl-Behandlung einzig noch wirksame, erneute KCl-Gabe ist wahrscheinlich auf die nicht ausreichende Sättigung des Desensibilisierungseffektes zurückzuführen). Es ist also nicht unwahrscheinlich, dass Methyl-Jasmonat und osmotischer Stress eine gemeinsame Signalkette (zumindest gemeinsame Elemente) besitzen. Dafür spricht auch, dass ein Anstieg von Jasmonat als Antwort auf osmotischen Stress in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen wurde [136, 146, 238].

4. Interessant scheint auch das Ergebnis, dass Signale wie Quercetin, H₂O₂, Mastoparan, Mastoparan 7 und Mastoparan 17 die Auslösung der Benzophenanthridin-Biosynthese in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* durch die Zweitsignale verhindern, obwohl sie selbst keine Induktoren der Alkaloidbiosynthese sind (Kap. 6, Abb. 34, 35, 36, 37, Tab. 14, 15, 16). Möglicherweise deutet sich hier eine desensibilisierende Wirkung von Metaboliten des oxidativen Bursts und des Fettsäure-Stoffwechsels an.

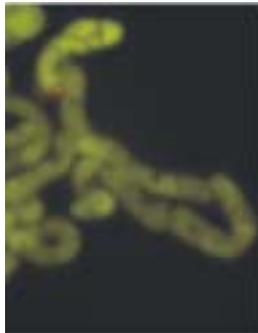
Tab. 4: Wirkung verschiedener Signale nach Kontakt mit Elicitor oder Buttersäure.

Die Zuwachsraten des Alkaloidgehaltes sind auf Wirkung des 1. Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen t = 0 h bis t = 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung nach Erstkontakt, entsprechen im Zeitraum von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,84 - 3,91 Alkaloid/Zellen [µg/Mio]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

	1. Kontakt: Elicitor (1 µg/ml, 30 min)	1. Kontakt: Buttersäure (4 mM, 15 min)	1. Kontakt: Methyl-Jasmonat (50 µM, 30 min)
2. Kontakt:	Zuwachs Alkaloid/Zellen [µg/Mio] in 24 h	Zuwachs Alkaloid/Zellen [µg/Mio] in 24 h	Zuwachs Alkaloid/Zellen [µg/Mio] in 24 h
Elicitor (1 µg/ml, 30 min)	0 %	0 %	0 %
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0 %	0 %	0 %
Methyl-Jasmonat (50 µM, 30 min)	44,04 % ± 21,16	62,05 % ± 30,38	0 %
KCl (90 mM, 30 min)	170,27 % ± 179,88	13,35 % ± 7,85	0 %
NaCl (90 mM, 30 min)	166,01 % ± 7,83	0 %	0 %
Mannit (90 mM, 30 min)	44,63 % ± 6,85	0 %	0 %
Sorbit (90 mM, 30 min)	80,19 % ± 60,73	0 %	0 %

Tab. 5: Wirkung von Erst- und Zweitsignalen zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese

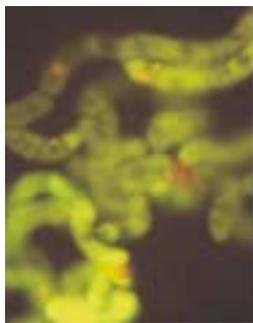
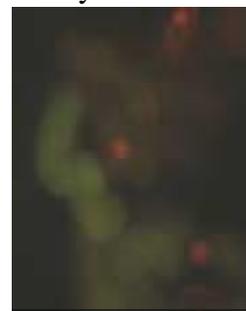
1. Signal	<i>erlaubt</i> welches Signal	<i>verhindert</i> welches Signal
<i>Elicitor</i>	<i>Methyl-Jasmonat</i> <i>Osmotika (KCl, NaCl, Saccharose, Mannit, Sorbit)</i>	Elicitor pH-Shift (Buttersäure, Pivalinsäure) Mastoparan
<i>Pivalinsäure</i>	<i>KCl</i>	Elicitor pH-Shift (Pivalinsäure) Methyl-Jasmonat Mastoparan
<i>Buttersäure</i>	<i>Methyl-Jasmonat</i> <i>KCl</i>	Elicitor pH-Shift (Buttersäure) Mastoparan
Mastoparan	-	Elicitor pH-Shift (Buttersäure, Pivalinsäure) Methyl-Jasmonat Mastoparan Osmotika
Methyl-Jasmonat	-	Elicitor pH-Shift (Buttersäure, Pivalinsäure) Methyl-Jasmonat Mastoparan Osmotika (KCl, NaCl, Sorbit, Mannit, Saccharose)
Osmotika <i>KCl</i> NaCl Sorbit Mannit Saccharose	<i>KCl</i> - - - -	Elicitor pH-Shift (Buttersäure, Pivalinsäure) Methyl-Jasmonat Mastoparan



t = 0 h

Abb. 20: Vitalfärbung von Eschscholzia-Zellen zur Kontrolle potentiell toxischer Elicitor- oder Methyl-Jasmonat-Effekte.

Die dargestellten Zellfäden stammen aus Kulturen, welche mit Elicitor (1 $\mu\text{g/ml}$, 30 min) bzw. Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min) (Kap. 3.4.) behandelt wurden. Nach 1 stündiger Inkubation mit 50 nM CFDA, wurden die Zellen mit 2 μM Propidiumjodid angefärbt und mikroskopisch beobachtet (Excitation: 490 nm, Emission: 520 nm). Die Akkumulation des freigesetzten Carboxy-Fluoresceins (grüne Fluoreszenz) zeigt eine intakte, zur Protonenakkumulation fähige Vakuole an. Die Einlagerung von Propidiumjodid in die DNA (rote Fluoreszenz) ist nur nach Zerstörung der Diffusionsbarriere der Plasmamembran möglich.

t = 24 h,
Elicitor: 0 ht = 24 h,
Kontrolle (ohne Elicitor)t = 24 h,
Elicitor: 0 ht = 48 h,
Elicitor: 0 h, 24 ht = 48 h,
Kontrolle (ohne Elicitor)t = 48 h,
Elicitor: 0 h
Methyl-Jasmonat: 24 ht = 72 h,
Elicitor: 0 h, 24 ht = 72 h,
Kontrolle (ohne Elicitor)t = 72 h,
Elicitor: 0 h
Methyl-Jasmonat: 24 h

2.5. mRNA- und Proteinmuster unter dem Einfluss verschiedener Signale der Alkaloidbildung

2.5.1. Einfluss der Benzophenanthridin-Alkaloide auf die *in vitro* Translation

Die Fähigkeit der Benzophenanthridin-Alkaloide, zur Interkalation in DNA (Kap. 2.1.) legen die Vermutung nahe, dass sie als Hemmstoffe der Transkription wirksam sind. Da unsere molekularbiologischen Untersuchungen auch die *in vitro* Translation der extrahierten mRNA vorsahen (s.u.), war es wichtig zu wissen, ob die Alkaloide auch Translationsvorgänge beeinflussen. Die nach Elicitorkontakt von den Eschscholzia-Zellen produzierten Benzophenanthridine können aus einem Zellpellet nicht vollständig ausgewaschen werden; ein bestimmter Anteil (ca. 1/3 der 24 h nach Elicitorkontakt gebildeten Alkaloide) ist in intakten Zellen präsent, ihre Anwesenheit in der extrahierten mRNA kann daher nicht ausgeschlossen werden. Neben der notwendigen Absicherung der *in vitro* Translationsversuche war die mögliche Beeinflussung der Translation auch hinsichtlich der Toxikologie der Benzophenanthridin-Alkaloide interessant.

Abb. 21 zeigt zunächst, dass Alkaloide nach Zusatz zu einem Reaktionsansatz der *in vitro* Translation bis zu 10 μM keine Verringerung der Translationsausbeute bewirken. Auffällig ist, dass die mRNA Elicitor-behandelter Zellen in Gegenwart verschiedener Alkaloide mit höherer Ausbeute translatiert wird: Sanguinarin, eine aus derselben Zellkultur isolierte Alkaloid-Mischung, und Berberin (als strukturähnliches, nicht-Benzophenanthridin-Alkaloid eingesetzt) bewirken hier 3-10 % höhere Methionin-Einbauraten in das neugebildete Protein.

Bei der 1D-Analyse der translatierten Proteine (Abb. 22) fällt auf, dass Sanguinarin (54 μM) keine Verringerung distinkter Proteinbanden bewirkt. Dagegen scheint es sogar zur Überexpression einzelner Proteine (Proteinbereich von ca. 46 kDa - ca. 27 kDa, bzw. um 20 kDa) zu kommen (vgl. Spuren a-d mit K_E). Die Wirkung der Alkaloidmischung (10 μM) auf die *in vitro* Translation (vgl. Abb. 24) zeigt trotz analoger Einbauraten wie bei Sanguinarin deutliche Unterschiede im Proteinmuster. Deutlich wird vor allem die Inhibierung der *in vitro*-translatierten Proteine im Bereich um 220 kDa - 40 kDa (vgl. Spuren A und a mit K_E bzw. K_K). Diese vorläufigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Sanguinarin und andere Benzophenanthridine in hohen Konzentrationen (die allerdings in intakten Zellen kaum erreicht werden; die Alkaloidkonzentration im Medium elicitierter Kulturen liegt bei maximal

7 µg/ml) die *in vitro* Translation im Weizenkeimsystem beeinflussen. Eine generelle Beeinträchtigung des Translationsmechanismus kann aber ausgeschlossen werden.

Um endgültige Aussagen über die Stimulation bzw. Hemmung der *in vitro* Translation bestimmter mRNA's treffen zu können, ist eine 2D-Auftrennung und eine nachfolgende Analyse der Proteine erforderlich.

Bei der Analyse des in Gegenwart von Berberin gebildeten Proteinmusters (vgl. Abb. 23) fällt auf, dass bei höheren Berberin-Konzentrationen [98 µM] die Synthese einzelner Proteinbanden im Bereich von 220 kDa - 40 kDa deutlich verringert wurde (vgl. Spuren a und A mit den übrigen Spuren). Das lässt vermuten, dass Berberin unter Umständen einen hemmenden Einfluss auf die Translation großer Transkripte besitzt. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, ob dieser Effekt nur mit den hier verwendeten Weizenkeim-Ribosomen oder auch bei der Proteinbiosynthese in *Eschscholzia* auftritt.

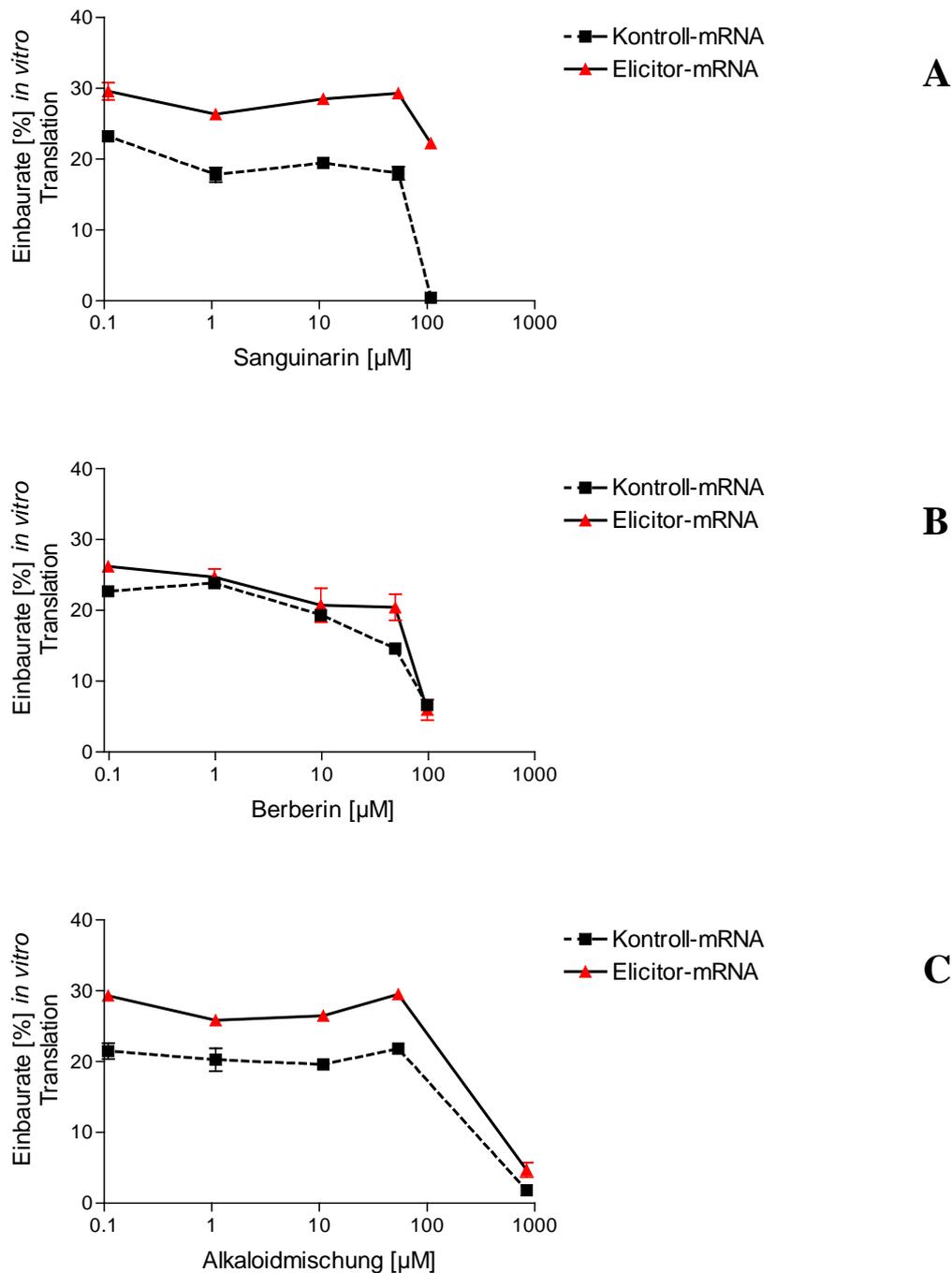


Abb. 21: Einbauraten von ^{35}S -Methionin bei der *in vitro* Translation von Eschscholzia-mRNA.

Einfluss von (A) Sanguinarin (B) Berberin (C) Alkaloidmischung; Sanguinarin und Berberin (gelöst in NL-P) wurden dem *in vitro* Translationsansatz (Kap. 3.13.) zugesetzt. Die verwendete Alkaloidmischung wurde wie folgt gewonnen: 5 Tage alte Zellsuspensionen wurden für 30 min mit dem Elicitor behandelt (Kap. 3.4.), 3 mal mit jeweils dem 4 fachen Volumen an 50 %iger NL-P gewaschen und danach in NL-P für 24 h kultiviert. nach Abtrennung der Zellen (Nylonsieb) wurde das Medium durch einen Sterilfilter von Partikeln gereinigt und wie beschrieben verwendet. Im Testexperiment wurde keine Elicitorwirkung des Filtrates festgestellt. Zur Bestimmung der jeweiligen Einbauraten wurden mRNA's (Kap. 3.9.) aus Elicitor-behandelten Zellen (1 h nach Elicitorkontakt) und aus Kontrollen (ohne Elicitorzusatz) benutzt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SD aus 3 parallelen Messwerten.

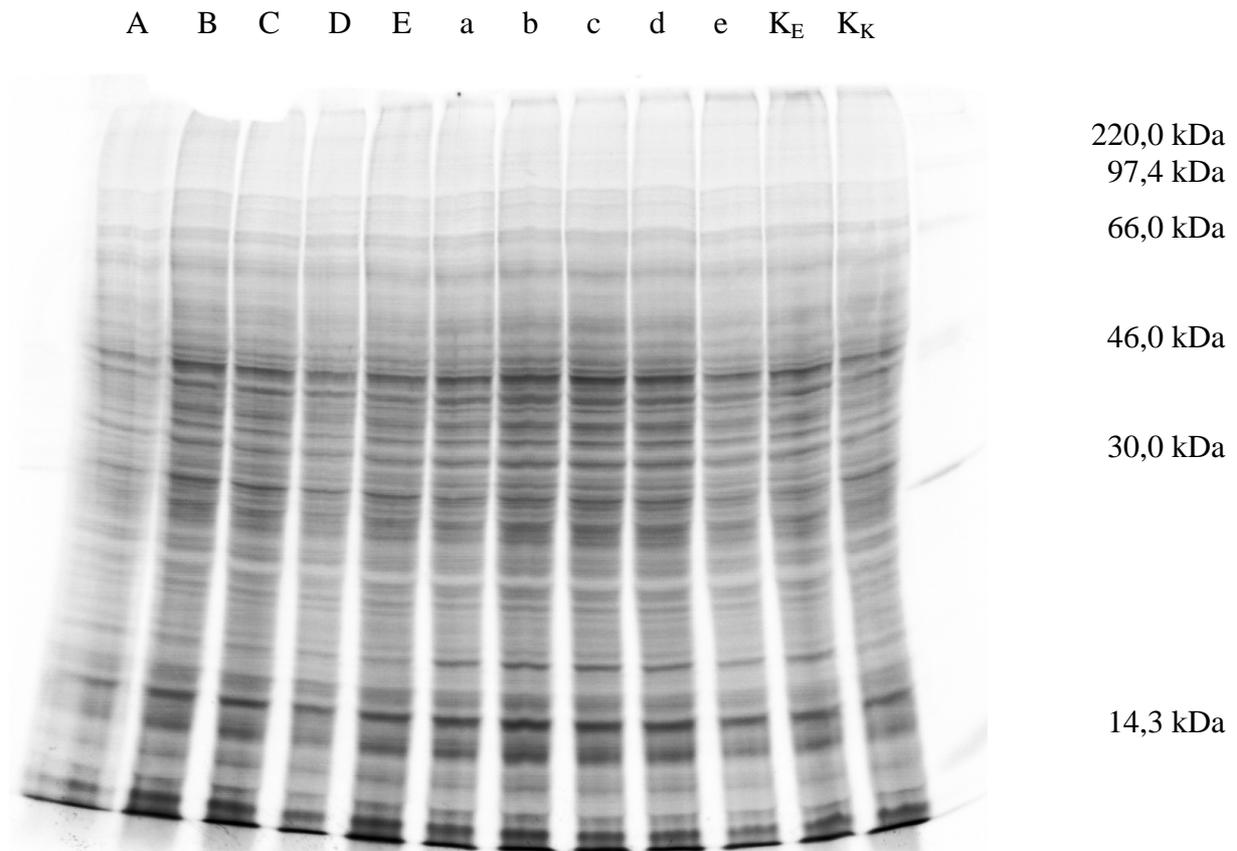


Abb. 22: SDS-PAGE der nach *in vitro* Translation aus Eschscholzia-mRNA gebildeten Proteine unter Einwirkung von Sanguinarin.

Die mRNA's wurden sowohl aus Elicitor-behandelten (nach 1 h) als auch aus Elicitor-freien Kulturen isoliert (Kap. 3.9.). Als Kontrolle diente die mRNA aus nicht Elicitor-behandelten Zellen. Isolation der mRNA's (Kap. 3.9.); *in vitro* Translation (Kap. 3.13.); SDS-PAGE (Kap. 3.14.)

Bezeichnung der einzelnen Laufspuren:

Bezeichnung	Sanguinarin [μM]	ohne Elicitor	mit Elicitor
A	109,000	+	
B	54,380	+	
C	10,870	+	
D	1,090	+	
E	0,109	+	
a	109,000		+
b	54,380		+
c	10,870		+
d	1,090		+
e	0,109		+
K _E	-		+
K _K	-	+	

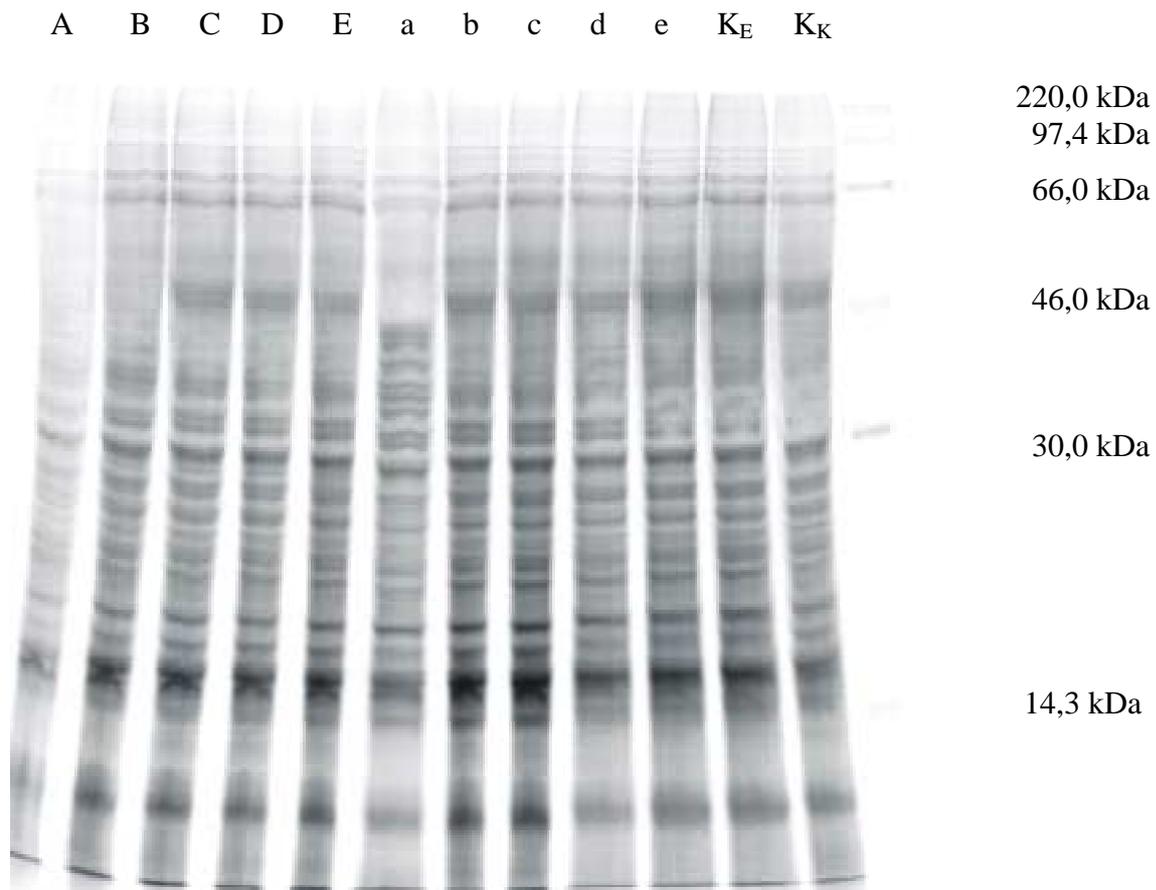


Abb. 23: SDS-PAGE der durch *in vitro* Translation aus Eschscholzia-mRNA gebildeten Proteine unter Einwirkung von Berberin.

Die mRNA's wurden sowohl aus Elicitor-behandelten (nach 1 h) als auch aus Elicitor-freien Kulturen isoliert (Kap. 3.9.). Als Kontrolle diente die mRNA aus nicht Elicitor-behandelten Zellen. Isolation der mRNA's (Kap. 3.9.); *in vitro* Translation (Kap. 3.13.); SDS-PAGE (Kap. 3.14.)

Bezeichnung der einzelnen Laufspuren:

Bezeichnung	Berberin [μM]	ohne Elicitor	mit Elicitor
A	98,000	+	
B	49,000	+	
C	9,800	+	
D	0,980	+	
E	0,098	+	
a	98,000		+
b	49,000		+
c	9,800		+
d	0,980		+
e	0,098		+
K _E	-		+
K _K	-	+	

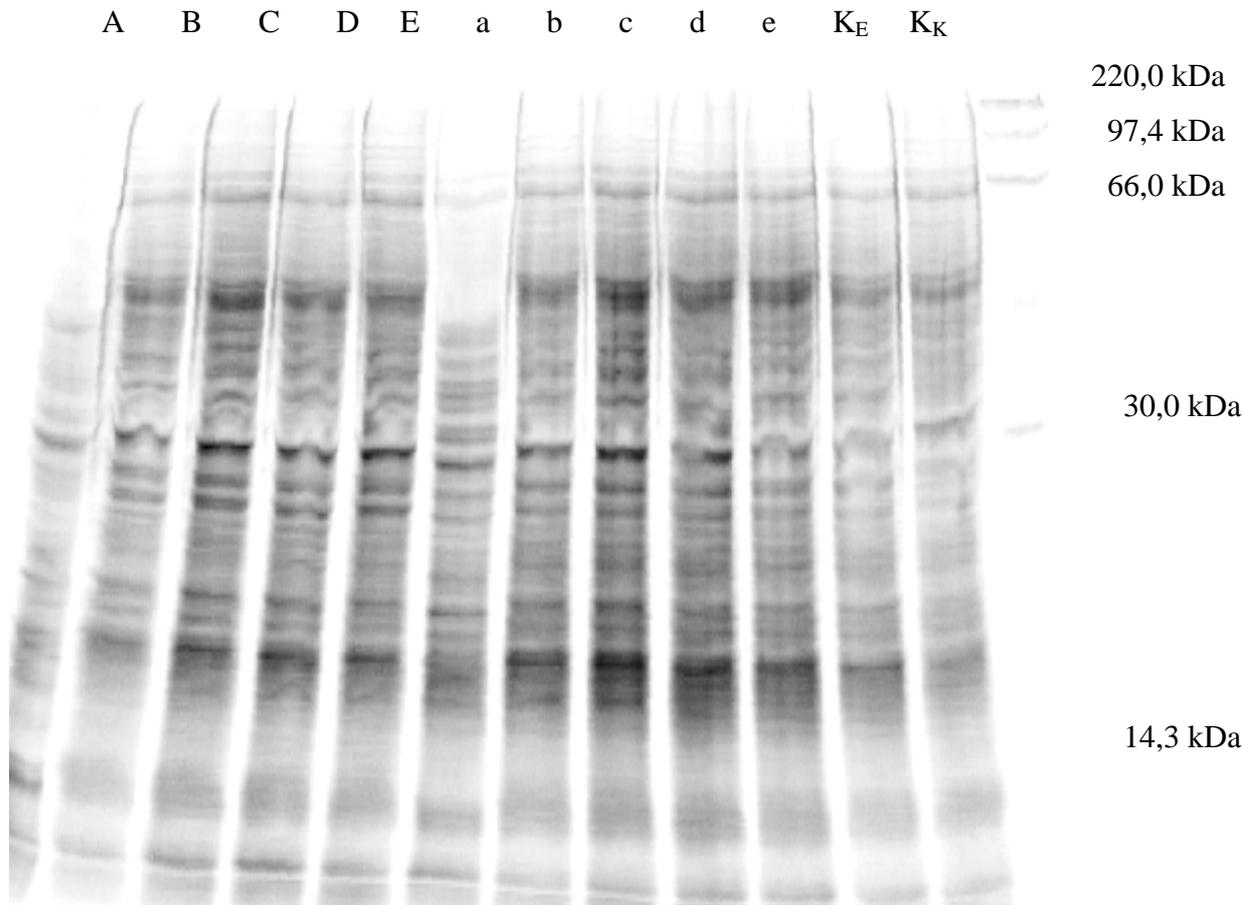


Abb. 24: SDS-PAGE der nach *in vitro* Translation aus Eschscholzia-mRNA gebildeten Proteine unter Einwirkung einer von Eschscholzia-Zellen produzierten Alkaloidmischung. Die mRNA's wurden sowohl aus Elicitor-behandelten (nach 1 h) als auch aus Elicitor-freien Kulturen isoliert (Kap. 3.9.). Als Kontrolle diente die mRNA aus nicht Elicitor-behandelten Zellen. Isolation der mRNA's (Kap. 3.9.); *in vitro* Translation (Kap. 3.13.); SDS-PAGE (Kap. 3.14.)

Bezeichnung der einzelnen Laufspuren:

Bezeichnung	Alkaloidmischung [µM]	ohne Elicitor	mit Elicitor
A	1090,00	+	
B	543,80	+	
C	108,70	+	
D	10,90	+	
E	1,09	+	
a	1090,00		+
b	543,80		+
c	108,70		+
d	10,90		+
e	1,09		+
K _E	-		+
K _K	-	+	

2.5.2. Einfluss ausgewählter Signale zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese auf das Protein- und mRNA-Spektrum

2.5.2.1. Experimentelle Vorgehensweise

Nachdem die auf zellphysiologischer Ebene gewonnenen Daten für mindestens zwei unterschiedliche Signalwege zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese sprechen (Kap. 2.4.), stellte sich nun die Frage, inwieweit diese Unterschiede auf der Ebene des mRNA- und Proteinmusters widergespiegelt werden. Eine vollständige Darstellung des Proteoms und des gesamten mRNA-Spektrums konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit natürlich nicht angestrebt werden. Die aktuellen Arbeiten über das Proteom von Pflanzenzellen und seine Beeinflussung durch externe Signale zeigen, dass die gegenwärtig verfügbaren Methoden noch keine sichere Auftrennung des gesamten Proteinmusters ermöglichen, sondern eine gezielte Auswahl bestimmter interessierender Größenbereiche oder Proteineigenschaften getroffen werden muss [193]. In unserem Untersuchungsobjekt bietet die Möglichkeit der Expression des Sekundärstoffwechsels durch verschiedene Signale ein solches, zweckmäßiges Auswahlkriterium. Deshalb wurde gezielt nach solchen Proteinen und *in vitro*-translatierbaren mRNA's gesucht, die:

1. übereinstimmend in den Kulturen mit induzierter Alkaloidbiosynthese auftreten oder
2. deren Auftreten sich zwischen den verwendeten Induktionssignalen deutlich unterscheidet.

Dabei erwies sich die folgende Vorgehensweise als sinnvoll (Abb. 25):

1. Isolation von mRNA aus Effektor-behandelten Kulturen und aus Kontrollkulturen.
2. *In vitro* Translation an Weizenkeimribosomen unter Einbau von ³⁵S-Methionin.

3. Gelelektrophoretische 2D-Trennung der translatierten Proteine nach Mischung mit den vorhandenen extrahierten Proteinen (vorrangig lösliche Proteine) der entsprechenden Zellkultur.
4. Massenspektrometrische Analyse einiger der unter Stress überexprimierten Proteine.

Das durch *in vitro* Translation aus den isolierten mRNAs gebildete Proteinspektrum wurde auf demselben 2D-Gel zusammen mit den extrahierten, löslichen Proteinen aufgetrennt, welche 6 h nach Stressorgabe in derselben Zellkultur vorhanden waren. Diese Proteine wurden aus den Zellen isoliert und vor Beginn der 2D-Trennung mit in den *in vitro* Translationsansatz gemischt. Bei diesem Verfahren wird die Neubildung ^{35}S -markierter Proteine lediglich als Indikator für die Anwesenheit der entsprechenden mRNA genutzt. Wenn die translatierbare mRNA und das entsprechende Eschscholzia-Protein gleichzeitig anwesend sind, wird die durch die *in vitro* Translation gebildete sehr geringe Proteinmenge erhöht und es können ausreichende Mengen für die MALDI-TOF-Strukturanalyse gewonnen werden.

Darüber hinaus erlaubt dieses Verfahren die grundsätzliche Feststellung, welche Proteine:

- a) gemeinsam mit den mRNAs vorhanden sind
- b) unter Einwirkung der Stressoren neu gebildet werden
- c) noch vorhanden, aber nach Stressorgabe nicht mehr transkribiert werden.

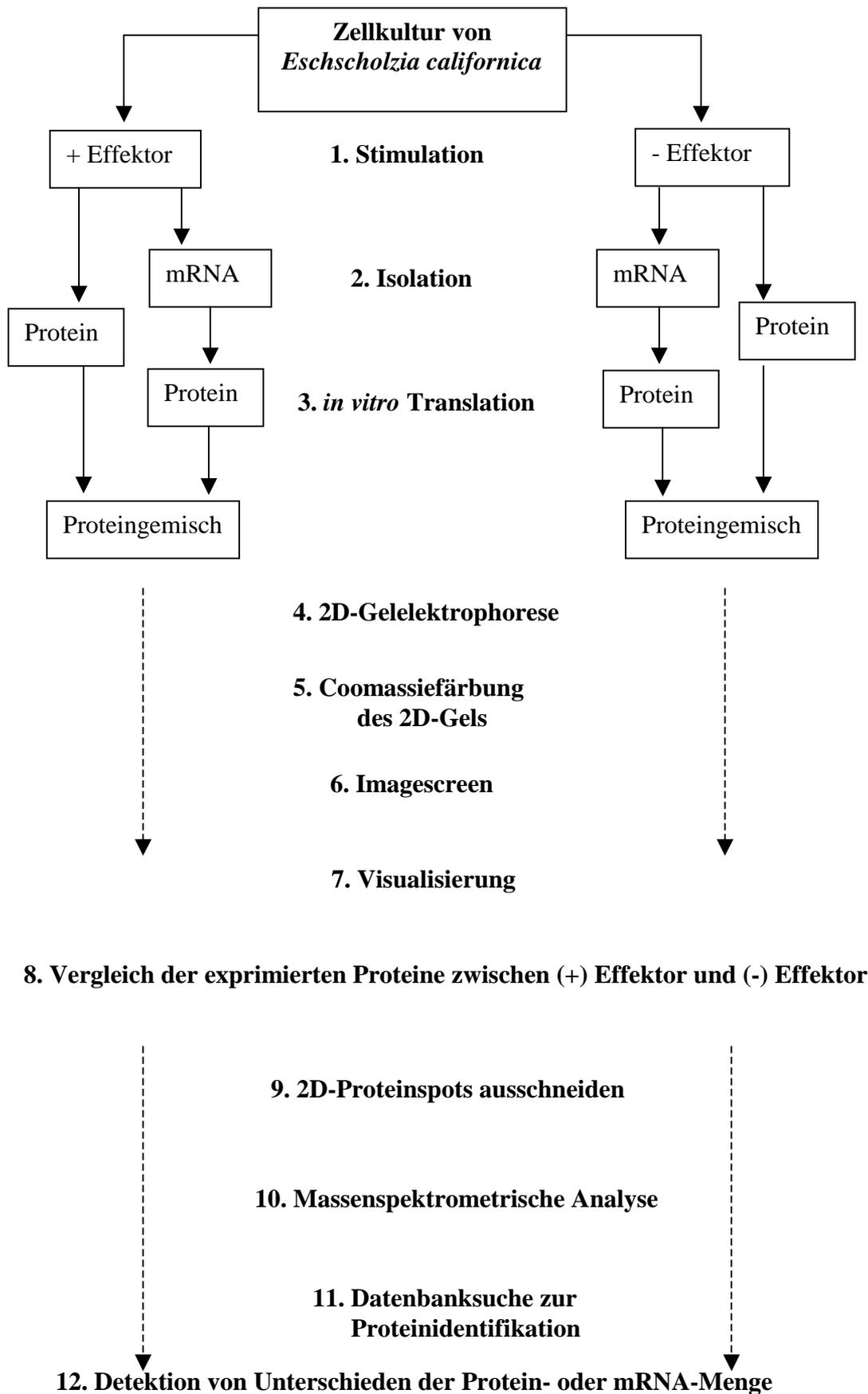


Abb. 25: 2D-Analyse-Verfahren; Vergleichende Interpretation des Protein- und mRNA-Musters. Arbeitsschema - zur Analyse des Protein- und mRNA-Spektrums.

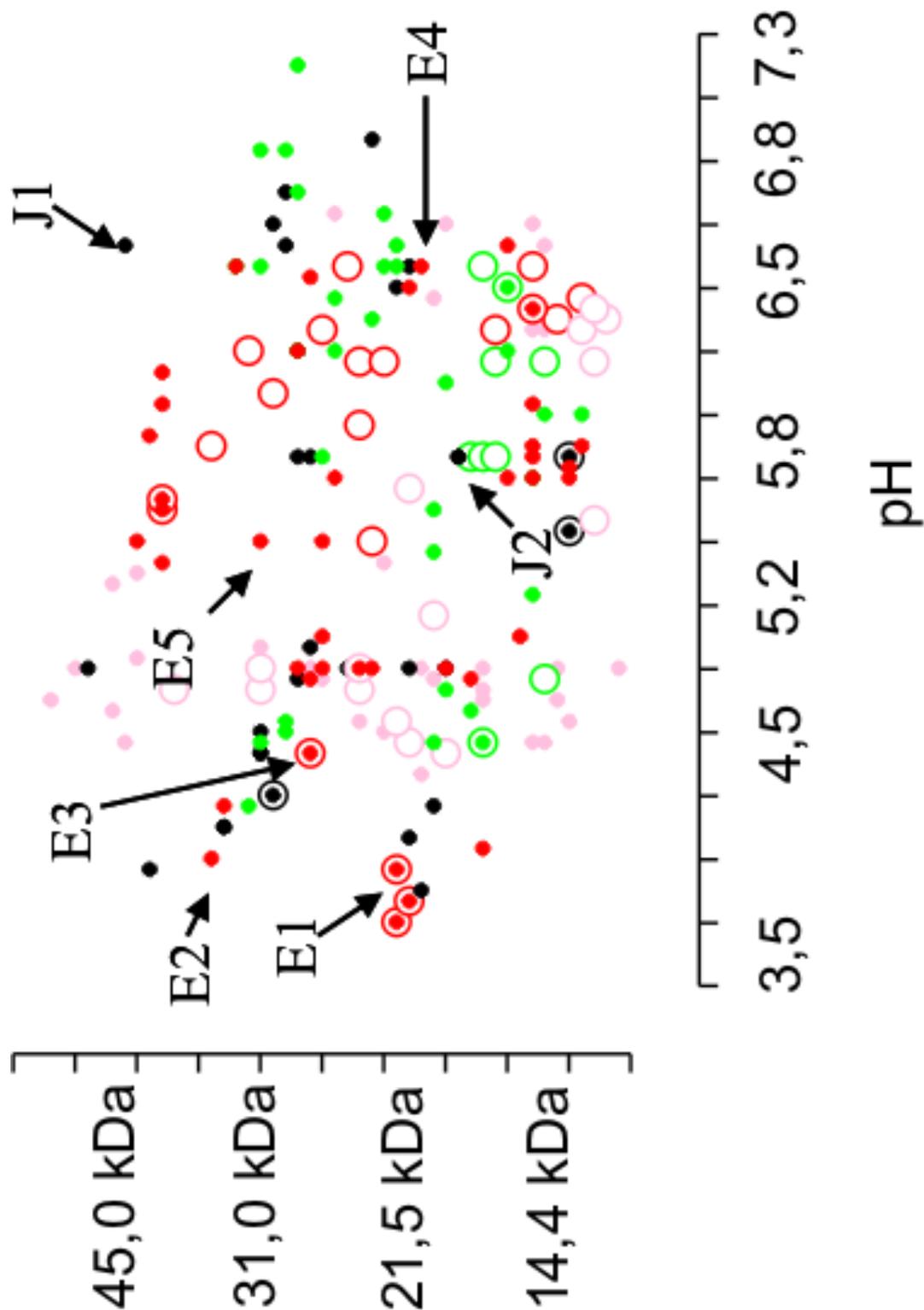


Abb. 26: Zusammenfassung typischer 2D-Trennungen *in vitro*-translatierter und nativer Proteine. Wirkung des Erstkontaktes verschiedener Effektoren.

Offene Symbole (○) kennzeichnen *in vitro* Translationsprodukte aus mRNA, welche 3 h nach Effektorkontakt isoliert wurden. Geschlossene Symbole (●) kennzeichnen native Proteine, die 6 h nach Effektorkontakt extrahiert wurden. (●, ○) Elicitor, 1 μg/ml, 30 min; (●, ○) 4 mM Buttersäure, pH 5,0, 15 min; (●, ○) 50 μM Methyl-Jasmonat, 30 min; (●, ○) 90 mM KCl, (vgl. auch Kap. 3.4.)

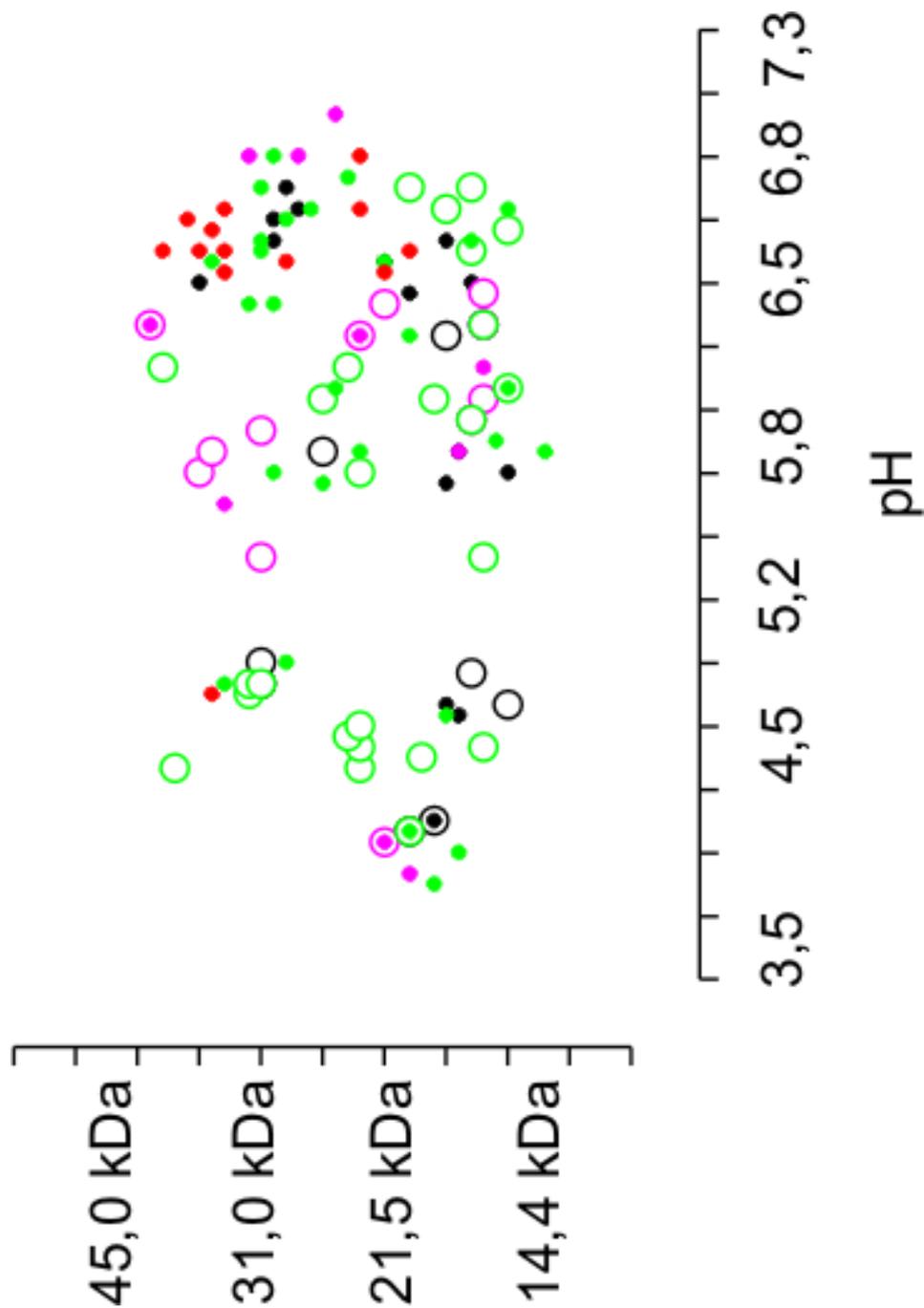


Abb. 27: Zusammenfassung typischer 2D-Trennungen *in vitro*-translatierter und nativer Proteine. Wirkung von Induktoren der Alkaloidbiosynthese nach vorherigem Elicitorkontakt. Alle Effektoren wurden 24 h nach einem 30 min-Elicitorkontakt den Zellen zugesetzt. Offene Symbole (O) kennzeichnen *in vitro* Translationsprodukte aus mRNA, welche 3 h nach Effektorkontakt isoliert wurden. Geschlossene Symbole (●) kennzeichnen native Proteine, die 6 h nach Effektorkontakt extrahiert wurden. (●, ○) Elicitor, 1 µg/ml, 30 min; (●, ○) 4 mM Buttersäure, pH 5,0, 15 min; (●, ○) 50 µM Methyl-Jasmonat, 30 min; (●, ○) 90 mM KCl, 30 min (Kap. 3.4.)

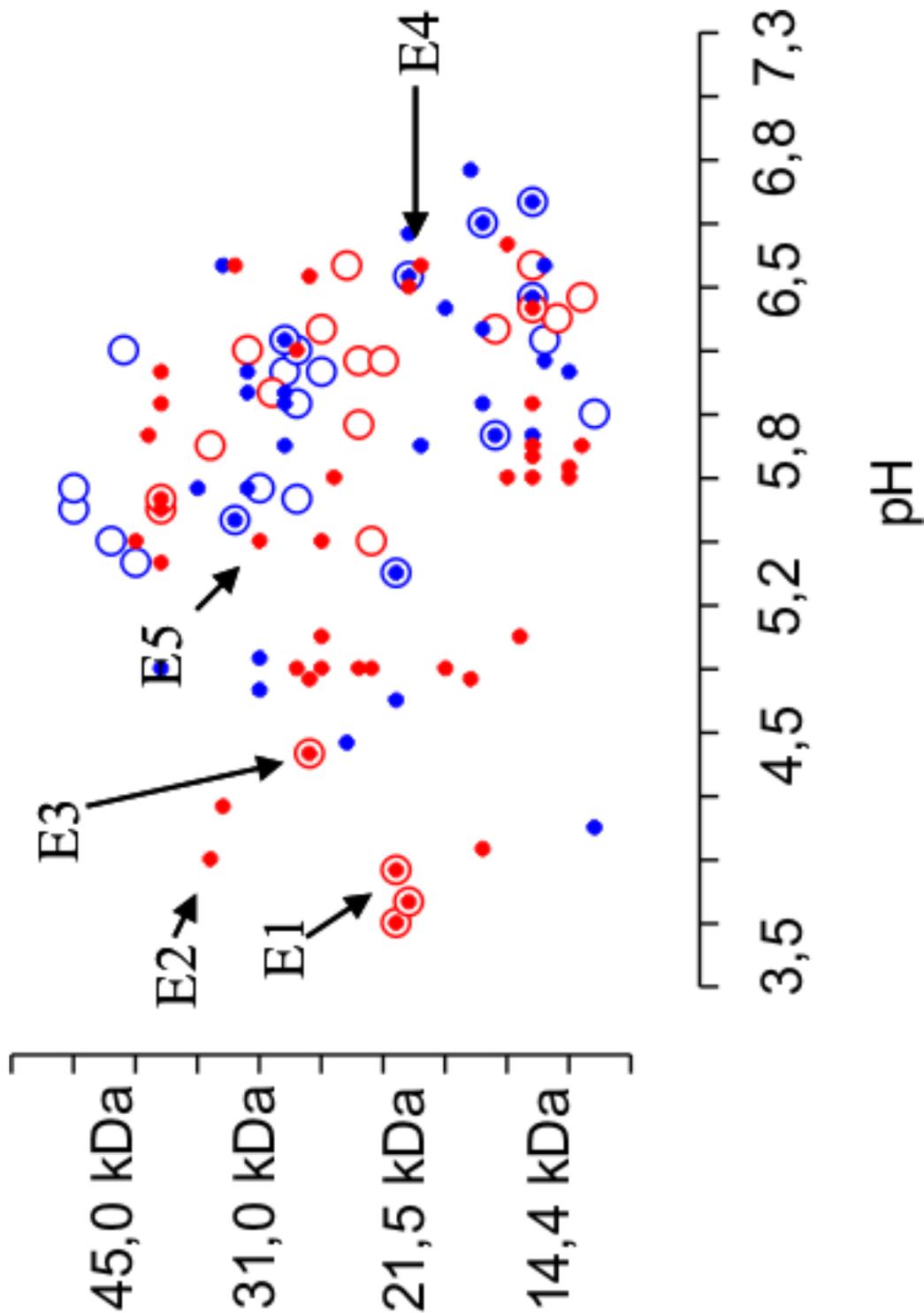


Abb. 28: Zusammenfassung typischer 2D-Trennungen *in vitro*-translatierter und nativer Proteine. Vergleich der Elicitor-Wirkung in Mutante TG1 und Wildstamm.

Offene Symbole (O) kennzeichnen *in vitro* Translationsprodukte aus mRNA, welche 3 h nach Effektorkontakt isoliert wurden. Geschlossene Symbole (●) kennzeichnen native Proteine, die 6 h nach Effektorkontakt extrahiert wurden. (●, O) Elicitor, 1 µg/ml, 30 min, Wildtyp; (●, O) Elicitor, 1 µg/ml, 30 min, Mutante (vgl. auch Kap. 3.4.). E1 bis E5 markieren Proteine bzw. mRNA, die in der Mutante nach Elicitorkontakt nicht auftauchen.

2.5.2.2. Vergleich von mRNA und exprimierten Proteinen nach Einwirkung verschiedener Signale

Abbildung 26 gibt einen graphischen Überblick der nach Einwirkung verschiedener Induktoren der Alkaloidbiosynthese (Elicitor, Methyl-Jasmonat, Buttersäure und Hyperosmose) gefundenen Änderungen der Proteinmuster (Kap. 6, Abb. 42, 43, 44, 45, 46). Proteine, deren mRNA im Weizenkeimsystem translatiert wird, sollten mit dem analogen nativen Protein (weitestgehend) identisch sein, die entsprechenden Spots sind deshalb ³⁵S-markiert.

1. Die Auftrennung (im pH-Bereich 3-10) und Analyse der nach Stressorgabe (s.o.) überexprimierten Proteine (³⁵S-markierte Translationsprodukte bzw. der extrahierten Eschscholzia-Proteine) ergab überwiegend Proteine mit sauren bzw. nahezu neutralem pI (pH 3,5 - 7,3) im Bereich von 10 kDa - 50 kDa.
2. Nach Elicitor-Stimulation findet man überwiegend Proteine im Bereich von pH 5,2 - 6,5; dagegen weniger im pH-Bereich von 3,5 - 5,0; bzw. einem Größenbereich von 10 bis 45 kDa.
Einige der überexprimierten Proteine konnten sowohl auf Transkriptionsebene, als auch als extrahiertes Protein nachgewiesen werden (pH 3,5 - 5,8; 21,5 kDa - 40 kDa).
3. Methyl-Jasmonat induziert Proteine, die sich in zwei pH-Bereichen konzentrieren; pH 3,7 - 4,8 und pH 5,6 - 6,8. Die Größenverteilung liegt im Bereich von 14 kDa - 50 kDa.
Bei 3 Proteinen konnte sowohl das Transkript, als auch das extrahierte Protein nachgewiesen werden.
4. Buttersäure-Behandlung (pH-shift) induziert vor allem Proteine im Bereich von pH 5,8 - 7,3, Einzelne Proteinspots konnten auch im Bereich von pH 4,0 - 5,2 detektiert werden. Das Molekulargewicht liegt überwiegend zwischen 10 kDa - 35 kDa. In 3 Fällen konnte sowohl das Transkript, als auch das extrahierte Protein nachgewiesen werden.

5. Hyperosmose durch KCl induziert hauptsächlich Proteine im Bereich von pH 4,0 - 5,5, bzw. 10 kDa - 50 kDa. Vereinzelt Proteinspots können im Bereich von pH 6,0 bis 6,5 bzw. 10 kDa - 25 kDa detektiert werden.
Die ³⁵S-markierten Proteine konnten in keinem der hier dargestellten Proteinspots mit dem extrahierten Protein "zur Deckung" gebracht werden.

Abbildung 27 gibt eine graphische Zusammenfassung überexprimierter mRNA's/Proteine, ausgelöst durch wiederholten Elicitorkontakt bzw. alternative Induktoren der Alkaloidbiosynthese (Methyl-Jasmonat, Buttersäure und KCl) nach vorherigem Elicitorkontakt (Kap. 6, Abb. 47, 48, 49, 50, 51):

1. Die Auftrennung (im pH-Bereich 3-10) und Analyse der nach wiederholter Stressorgabe (s.o.) überexprimierten Proteine (³⁵S-markierte Proteine bzw. der extrahierten Eschscholzia-Proteine) ergab überwiegend Proteine mit sauren bzw. nahezu neutralem pI (pH 3,5 - 7,3) im kDa-Bereich von 14 bis 45.
Die Anzahl der Proteinspots ist deutlich verringert.
2. Nach wiederholtem Elicitorkontakt kommt es zur Überexpression von Proteinen vor allem im Bereich von pH 6,5 - 7,0; bzw. 20 kDa - 40 kDa. ³⁵S-Translationsprodukte konnten im SDS-Gel nicht nachgewiesen werden, d.h. der Zweitkontakt mit Elicitor führt zu einem drastischen Abfall der Bildung von translatierbaren Transkripten. Im Gegensatz zur Erstelicitorierung führt erneuter Elicitorkontakt zu einer dramatischen Einschränkung der Genexpression. Dies unterstützt die Befunde der Desensibilisierung, d.h. das Ausbleiben einer neuen Induktion der Alkaloid-Biosynthese.
3. Methyl-Jasmonat induziert Proteine, die sich vorwiegend in zwei pH-Bereichen konzentrieren; pH 3,7 - 4,8 und pH 5,6 - 6,8. Die Größenverteilung liegt im Bereich von 14 kDa - 50 kDa. Die drastische Hemmwirkung des zweiten Elicitorkontaktes tritt hier nicht auf.
Nur im Falle eines Proteinspots konnte sowohl das Transkript als auch das extrahierte Protein detektiert werden.

4. Buttersäure-Behandlung induziert nach vorheriger Elicitorstimulation vor allem Proteine im Bereich von pH 5,2 - 6,8. Das Molekulargewicht liegt zwischen 14 kDa - 40 kDa. In zwei Fällen konnte sowohl das Transkript als auch das extrahierte Protein nachgewiesen werden. Es fällt auf, dass zahlreiche mRNAs neu auftauchen, ein Zeichen für die Induktionswirkung des pH-shifts.

5. KCl induziert nach vorangegangenem Elicitorkontakt Proteine im Bereich von pH 5,2 - 7,0 bzw. 10 kDa - 50 kDa. Vereinzelt Proteinspots können im Bereich von pH 3,7 bzw. 22 kDa detektiert werden.
3 Proteine können sowohl als Transkript, als auch als isoliertes Protein nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der durch Elicitor-Wirkung veränderten Proteinexpression wurde nicht nur im Wildstamm, sondern auch in einer antisense-Mutante durchgeführt (Abb. 29). Dieser Zellstamm wurde durch antisense-Transformation des Wildstammes mit dem Gen für ein pflanzliches G α -Protein aus Tabak erhalten.

Obwohl umfassende Daten über die Signalereignisse in dieser Mutante noch nicht verfügbar sind, lässt sich bereits feststellen, dass nach Elicitorkontakt eine verminderte Produktion von Benzophenanthridinen ausgelöst wird [Schumann, B.; Lein, W.; Roos, W.; unveröffentlicht]. Die im Westernblot nachweisbaren Mengen an G α -Protein ist gegenüber dem Wildstamm verringert [Steighardt, J.; Roos, W.; unveröffentlicht].



Abb. 29: Eschscholzia-Suspensionskulturen

[Lein W.; Schumann, B.; Roos, W.; unveröffentlicht]

A und **B** Eschscholzia-Suspensionskulturen Alkaloid-produzierender Zellen (Wildtypstamm).

A Kontrolle, **B** Zellen nach Elicitorkontakt, **C** Suspensionskultur (charakterisiert durch die hell gelbe Färbung) der Mutante TG1 nach Elicitorkontakt.

Der Vergleich der Proteinmuster (Abb. 28) von Wildstamm und Mutante lässt sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede erkennen. Die Verteilung der Proteinspots zeigt in beiden Fällen eine Akkumulation überexprimierter Proteinen im Bereich von pH 5,2 - 6,5. Bereiche, in denen Transkript und/oder isoliertes Protein von Wildstamm und Mutante "zusammentreffen" sind z.B. (pH 6,0/30 kDa; pH 6,5/21,5 kDa; pH 6,4/17 kDa; pH 6,4/15; pH 6,6/15 kDa; pH 5,8/15 kDa; pH 6,6/31 kDa). Einige Elicitor-induzierte Proteine und mRNA's fehlen wahrscheinlich in der Mutante (Spots E1 bis E5, Abb. 28).

Ausgewählte Proteine, die in ausreichender Menge auf dem 2D-Gel präsent waren, wurden einer vorläufigen Sequenzanalyse mittels MALDI-TOF-Analyse unterzogen. Diese Analyse geht von einem Datenbank-Vergleich von Sequenzbruchstücken aus, die zumeist im Arabidopsis-Genom bzw. -Proteom gefunden wurden. Die gefundenen Hinweise auf konkrete Proteine setzen also Homologien zu Arabidopsis-Proteinen voraus. Aufgrund der geringen Zahl bisher beschriebener *Eschscholzia*-Proteine in den Datenbanken können daher keine endgültigen Aussagen über die Sicherheit dieser Zuordnung getroffen werden. Dennoch sind die aktuellen Erkenntnisse über putative Proteine, welche nach Zusatz der verwendeten Signalmoleküle selektiv überexprimiert werden, wertvolle Ausgangspunkte für die weitere Suche nach Modulen des durch Elicitor- bzw. Jasmonat-Signalweges zur Bildung von Benzophenanthridinen in *Eschscholzia californica*. Konkrete Aussagen zur Identität bzw. Homologie erfordern in jedem Falle die direkte Sequenzierung (Edman-Abbau) der gefundenen Proteine.

Tabelle 6 und 7 (Kap. 6, Abb. 54 ff.) geben eine erste Aufstellung über die bisherigen Ergebnisse der Struktur-Analyse ausgewählter Proteine. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vergleiche der verschiedenen Proteinmuster konzentrieren sich vorerst auf die nach Effektorzusatz überexprimierten Proteine. Beim Vergleich der einzelnen 2D-Gele (Kap. 6, Abb. 42-53) fällt auf, dass es auch zum "Verschwinden" einzelner Proteinspots nach Signalgabe kommt, wenn auch in geringerem Umfang als die Überexpression distinkter Proteine. Weiterführende Arbeiten sollten auch diese nach Effektorzusatz "unterexprimierten" bzw. im 2D-Gel nicht mehr nachweisbaren Proteine einbeziehen.

Die Aufstellungen (Abb. 26, 27, 28, Tab. 6) zeigen, dass zu den gewählten Zeitpunkten (mRNA-Veränderungen 3 h und Protein-Veränderungen 6 h nach Effektorzusatz) durchaus nicht immer Protein und eine "zugehörige" mRNA gleichzeitig nachweisbar sind. So ist

beispielsweise im Fall des Proteinspots E2 nur das aus *Eschscholzia*-Zellen isolierte Protein nachweisbar. Dies kann bedeuten, dass entweder:

1. zum Zeitpunkt $t = 3$ h keine für diese Protein codierende mRNA existiert (Da die Proteinmenge jedoch nach Effektorzusatz ansteigt (6 h), sollte diese mRNA zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt als 3 h gebildet werden.) oder
2. die aus *Eschscholzia* stammende mRNA nur in *Eschscholzia*, nicht aber im Weizenkeimsystem translatiert wird.

In den bisherigen Analysen zeigte sich (vgl. Abb. 26, 27, 28), dass zum Zeitpunkt $t = 3$ h nur die translatierbare mRNA, nicht aber das "zugehörige" Protein vorhanden ist. Das kann bedeuten, dass:

1. zu einem späteren Zeitpunkt als $t = 6$ h das "zugehörige" Protein vorhanden ist. Denkbar wäre auch, dass es sich hierbei um ein "kurzlebige" Protein handelt. Da die codierende mRNA vorhanden ist, sollte auch das zugehörige Protein exprimiert werden.

Aus den hier genannten Gründen sollten in allen weiterführenden Analysen auch alternative Zeitpunkte zur näheren Analyse und Charakterisierung überexprimierter Proteine gewählt werden.

Die bisher identifizierten, putativen Proteine können (unter Berücksichtigung der o.g. Vorbehalte) u.a. einigen bekannten pathogenesis-related proteins zugeordnet werden, jedoch sind auch weitere interessante Kandidaten aufgetaucht (Tab. 6, 7, Kap. 1).

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Involvierung von Lipoxygenasen, Superoxiddismutasen oder Chitinasen in Prozesse der Pathogenabwehr kann über deren mögliche Funktion am Signalweg zur Bildung von Benzophenanthridin-Alkaloiden in *Eschscholzia californica* nur spekuliert werden.

Tab. 6: Vergleich überexprimierter Proteine im Vergleich von Kontrolle und Elicitor-Behandlung bzw. Methyl-Jasmonat (Kap. 6, Abb. 42, 43, 45) Aufstellung der bisher analysierten, nach Elicitor- bzw. Methyl-Jasmonat-Stimulation überexprimierten Proteine im Vergleich zur Kontrolle (ohne Stimulation). Die Bezeichnung der Proteine (E1 bis E5 bzw. J1 und J2) dient zur Kennzeichnung der Proteinspots auf dem jeweiligen Gel (+) kennzeichnet die jeweilige Überexpression von mRNA bzw. Protein.

Protein-Spot	Kontrolle		+ Elicitor		+ Methyl-Jasmonat	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
J2						+
E1			+	+		
E2				+		+
E3			+	+		
E4			+	+		
J1						+
E5				+		

Tab. 7 : Zusammenfassung überexprimierter Proteine nach Elicitor- bzw. Methyl-Jasmonatstimulation (Kap. 6, Abb. 54 ff.). Stimulation, Extraktion von Protein und mRNA, *in vitro* Translation, sowie 2D-Analyse erfolgten wie angegeben (Kap. 3). Die nach Elicitor bzw. Methyl-Jasmonat-Behandlung überexprimierten Proteinssots (im Vergleich zur Kontrolle) wurden mittels MALDI-TOF-MS (Kap. 3.16.) analysiert. Die Zuordnung der MD-Daten erfolgte unter Verwendung der angegebenen Datenbanken (Kap. 3.16.1.). Die Tabelle gibt eine Übersicht über die in sequenzierfähigen Mengen erhaltene Proteine nach Elicitorbehandlung (+ Elicitor) und nach Methyl-Jasmonat-Behandlung (+ Methyl-Jasmonat). Die Bezeichnung der Proteine (E1 bis E5 bzw. J1 und J2) dient als Kennzeichnung der Proteinspots auf dem jeweiligen Gel.

Protein-Spot	+ Elicitor 1 µg/ml, 30 min	+ Methyl-Jasmonat 50 µM, 30 min
J2		Apoptosis Inhibitor homolog, Cytochrom C Oxidase
E1	Auxin induziertes Protein, putative Chitinase	
E2	Transkriptionsregulator, putatives RNA-binde Protein	
E3	CTP-Synthase	
E4 und J1	Superoxiddismutase	Superoxiddismutase
E5	Lipoxygenase	

Kommentare:

1. *Apoptosis Inhibitor homolog (induziert durch Methyl-Jasmonat)*

Die Beteiligung von Apoptose-Prozessen an der pflanzlichen Pathogen-Abwehr wurde erst in den letzten Jahren gezeigt [82, 113, 128, 174]. In tierischen Systemen liegen dagegen detaillierte Erkenntnisse vor.

Apoptosen werden grundsätzlich in 3 Phasen unterteilt:

- Induktionsphase: Stimulatoren wie TNF (tumor necrosis factor), Hitzeschock, Viren, Proteinsynthese-Inhibitoren, oxidativen Streß, Hypoxie oder Stickstoffmonoxid binden an spezifische Rezeptoren und induzieren Signalprozesse beispielsweise durch die MAP-Kinase-Kaskade, Ionenfluxe (H^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}) die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies oder ATP [113, 144, 147].
- Effektorphase: Signalamplifikation und -kontrolle; Eintritt in die Phase des irreversiblen Zelltodes. Stimulatoren der Apoptose lösen eine Entkopplung des Elektronentransportes aus, die zur Erniedrigung bzw. Zerstörung des transmembranalen Mitochondrienpotentials, zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sowie zur Verringerung von reduzierten Glutathion führen [75, 113, 251]. Daraufhin wird Cytochrom C ins Cytosol entlassen, wo dieses Proteasen aktiviert, die weitere Apoptoseprozesse in Gang setzen [113, 130, 154, 247]
- Zelltod: Im letzten Schritt kommt es u.a. zum Chromatinabbau durch Caspasen-aktivierte Endonucleasen [57, 113].

Man weiß beispielsweise von Drosophila, dass Aktivatoren wie Caspasen [183, 248], Deterin [116], oder deren Vorstufen auch ohne apoptotische Stimuli ständig anwesend sind [34]. Um das Anlaufen der die Apoptosemaschinerie und damit den Zelltod zu verhindern, müssen derartige Aktivatoren inhibiert werden, wobei verschiedene Apoptoseinhibitoren (Proteine) beteiligt sind. In Vertebraten sind diese meist durch BIR-repeats [207] und durch ein RING-Finger-Motif [38, 142] charakterisiert. Die BIR-Region

dient wahrscheinlich zur Bindung von Aktivatoren wie der Caspase und damit zur Blockierung deren Aktivität [97, 207].

In unseren *Eschscholzia*-Zellen könnte der Anstieg derartiger Inhibitoren auf die Blockade der Zelltod-Maschinerie durch die verwendeten, geringen Jasmonat-Konzentrationen hinweisen.

Cytochrom C Oxidase

Die Cytochrom C Oxidase katalysiert den Elektronentransfer vom reduzierten Cytochrom C (einer Schlüsselkomponente in der Aktivierungskaskade apoptotischer Prozesse) zum molekularen Sauerstoff. Die Bedeutung des Cytochrom C resultiert aus der Aktivierung von Proteasen (s.o.), die downstream Apoptose-Prozesse in Gang setzen [94, 114, 130, 154, 247]. Da Apoptosen u.a. die Zerstörung mitochondrialer Membranstrukturen bewirken, kommt es zum Zusammenbrechen des Elektronenflusses innerhalb der Atmungskette, ein Prozess der auch hinreichende Konsequenzen für die Cytochrom C Oxidase hat.

2. *Auxin-induziertes Protein (Anstieg nach Elicitorgabe)*

Auxin-induzierte Proteine sind an der Regulation verschiedener Entwicklungs- und Wachstumsvorgänge pflanzlicher Zellen und Gewebe beteiligt. Sicher ist, dass durch Auxin vier verschiedene Proteinfamilien induziert werden können. Beispiele sind Glutathion-S-Transferasen, Proteine der Auxin-Homöostase und kurzlebige Kernproteine [126].

3. *Putative Chitinase (Anstieg nach Elicitorgabe)*

Chitinasen sind ubiquitär in allen Pflanzen verbreitet und gehören zu den am längsten bekannten Proteinen der Pathogenabwehr. Ihre Expression ist beispielsweise nach Kontakt mit β -1,4-gekoppelten N-acetyl-D-Glucosamin oder Zellwandbestandteilen aus Pilzzellen induziert [14]. Ihre Überexpression in *Eschscholzia* ist daher nicht unerwartet. Interessant ist, dass Elicitor-Kontakt, nicht aber Methyl-Jasmonat die Überexpression induziert, was erneut für verschiedene Signalwege spricht.

4. *Transkriptionsregulator (Anstieg nach Elicitorkontakt)*

Mit der Identifikation eines putativen Transkriptionsregulators könnte ein sehr wichtiger Hinweis für den Signalweg der Pathogen-ausgelösten Benzophenanthridin-Biosynthese in

Eschscholzia-Zellkulturen gefunden worden sein. Pflanzliche Transkriptionsfaktoren, deren Wirksamkeit im Rahmen der Induktion des Sekundärstoffwechsels oder der Pathogenabwehr gezeigt wurden, sind z.B. ORCA-Faktoren aus der AP2-Gruppe [170] und die WRKY-Faktoren [50, 60, 61, 200, 249]. Erstere werden allerdings durch Ocatadecanoide induziert, was bei dem von uns gefundenen putativen Protein nicht der Fall ist.

5. *CTP-Synthase (Anstieg nach Elicitorkontakt)*

Die Notwendigkeit zur Synthese von DNA und RNA, erfordert neben der *de novo* Synthese von Nukleotiden vor allem die Nutzung von Nukleotiden, Nukleosiden und Nukleobasen durch verschiedene Wege der "Wiederverwertung" [219]. Ein Biosyntheseweg ist die Bildung verschiedener Pyrimidin-Derivate aus UMP über UTP. Ein Biosyntheseenzym in diesem Syntheseprozess ist die CTP-Synthase. Infolge der mRNA-Neusynthese zur Bildung von Enzymen, die zur Produktion von Benzophenanthridinen benötigt werden, scheint die Überexpression einer putativen CTP-Synthase erklärbar.

6. *Superoxiddismutasen (SOD) (Anstieg nach Elicitor- und Methyl-Jasmonatkontakt)*

SOD's zählen zu den ubiquitär verbreiteten Enzymen der Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies (Kap. 1) im Pflanzenreich. Die Überexpression dieses Protein nach Elicitorkontakt, als auch nach Induktion durch Methyl-Jasmonat überrascht insofern als die Elicitor-ausgelöste Induktion zur Bildung von Benzophenanthridin-Alkaloiden in *Eschscholzia californica* ohne Beteiligung des oxidative burst (Kap. 1) erfolgen sollte. Da jedoch kein endgültiges Bild über das Netzwerk der Pathogenabwehrreaktionen existiert, ist eine Beteiligung der SOD, evtl. als ubiquitärer Schutzmechanismus vorstellbar.

7. *Lipoxygenase (Anstieg nach Elicitorkontakt)*

Die erhöhte Expression von Lipoxygenasen wurde u.a. nach Pathogenkontakt in Tomate [182], Arabidopsis [195], Reis [168] und Petersilie [182] nachgewiesen. Lipoxygenasen produzieren Hydroperoxy-Fettsäuren, die über verschiedene Sekundär-Stoffwechselwege (wie den "hydroperoxyde lyase pathway" [166], den "allene oxide synthase pathway" [256], den "peroxygenase pathway" [16, 92] oder den "divinyl ether synthase pathway") in Komponenten wie 12-Oxo-phytodienensäure oder Jasmonat methabolisiert werden können [36]. Viele dieser Produkte agieren als Signalmoleküle [72].

2.5.2.3. Leistungsfähigkeit und Grenzen des verwendeten 2D-Analyse-Verfahrens

Die Etablierung der hier vorgestellten 2D-Analyse des Proteoms (Abb. 25) erforderte zahlreiche, oft aufwendige Optimierungen und spezifische Anpassungen an das experimentelle System der Eschscholzia-Kultur. Die wichtigsten der dabei aufgetretenen Probleme werden im folgenden kurz dargestellt.

1. *Abtrennung der zu analysierenden Protein durch Fällung*

Ein "Fällungsschritt" zur Abtrennung und Anreicherung der extrahierten Proteine erwies sich als unumgänglich, da verschiedene Komponenten des Protein-Puffer-Gemisches (Kap. 3.13.) das Ergebnis der 2D-Gelelektrophorese negativ beeinflussten. Die einschlägige Literatur zeigte vielfältige Möglichkeiten und Varianten potenzieller Fällungsverfahren, deren Erfolg sich jedoch oft als nicht zufriedenstellend erwies. Des weiteren gelang die Aufnahme der einmal gefällten Proteine in dem jeweiligen Elektrophoresepuffer nicht immer. Mit der in Kap. 3.10./11. beschriebenen Fällungsmethode wurde eine optimale Variante aufgezeigt.

2. *Phenol-Reinigung*

Ein weiteres Problem, das eine deutliche 2D-Auftrennung der isolierten Eschscholzia-Proteine erst nach vorheriger Phenol-Reinigung (Kap. 3.10./11.) möglich war. Auch durch Dialyse oder Filtration gelang es nicht, störende Effektoren des Proteingemisches zu entfernen. Erst der Einsatz des 2001 von Peck, S. etablierten Verfahrens [193], zur Reinigung von Proteinen ermöglichte die Trennung und die eindeutige Detektion von Proteinspots im 2D-Gel.

3. *Kombination von Translationsprodukten und nativen Protein*

Da sich das elektrophoretisch zu trennende Proteingemisch sowohl aus Eschscholzia-Proteinen, radioaktiv markierten Translationsprodukten als auch aus Proteinen des Weizenkeim-Translationssystems zusammensetzte, war die richtige Mischung dieser Anteile entscheidend für die Auflösung der 2D-Trennung und die Identifizierbarkeit der jeweiligen Proteine. So sind insbesondere die Proteine des Weizenkeim-Translationskits in relativ "großen Mengen" (ca. 80 Proteine) im Proteingemisch vorhanden sind, deren Spots auf dem 2D-Gelen andere Proteine überdecken können und außerdem meist limitierend für die Ladekapazität der IEF-Strips in der 1. Dimension waren. Durch vorherige Proteinbestimmungen und Errechnung der erforderlichen Radioaktivität der translatierten ³⁵S-

Proteine (resultierend aus der Einbaurate der *in vitro* Translation), war es möglich, das optimale Verhältnis der *in vitro* translatierten und der Eschscholzia-Proteine zu detektieren und damit eine massenspektrometrische Analyse zu ermöglichen. Durch die Anwendung der bereits beschriebenen Proteinreinigung gelangte nur ein Teil der Weizenkeimproteine in das 2D aufzutrennende Proteingemisch. Die noch verbliebenen Weizenkeimproteine dienten als Hilfsmittel und wurden als "Marker" der späteren 2D-Analyse verwendet.

4. Gelmaterial

Die Grundlage für qualitative Aussagen von 2D-Analysen ist die exakte Bestimmung der jeweiligen Proteinspots und deren Vergleich zwischen verschiedenen 2D-Gelen. Der Vergleich gelingt nur durch identische Gelmaße. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, dass alle Gele vor und nach dem Trockenvorgang die exakt gleiche Größe aufweisen mussten. Nach Versuchen, mit den konventionellen Methoden des Geltrocknens auswertbare 2D-Gele zu erhalten, musste festgestellt werden, dass es auf diese Weise nicht möglich war, hierdurch die Basis für eine exakte 2D-Gelauswertung zu schaffen. Aus diesem Grund wurde auf Träger-gestützte Gele zurückgegriffen. Trotz der hohen Anschaffungskosten bieten diese Gele den entscheidenden Vorteil, vor und nach dem Trocknen des Gels ihre exakten Maße beizubehalten.

Trotz der oftmals ausweglos scheinenden Situation, konnten viele Tücken dieser Methode "besiegt" werden, so dass letztendlich ein 2D-Analyse-Verfahren entstand, mit dem Standard-Untersuchungen zur Isolation und Charakterisierung überexprimierter Proteine nach Signalgabe in Eschscholzia-Zellkulturen durchgeführt werden können.

3. Material und Methoden

3.1. Kultivierung von *Eschscholzia californica*

Die Kulturen von *Eschscholzia californica* wurden im Kulturraum bei 23 - 24 °C, 600 lux Dauerlicht und einer Schüttelgeschwindigkeit von 120 U/min (Amplitude 25 mm) auf der Schüttelmaschine New Brunswick scientific, MLW S421 Schüttler KR, kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Medium nach Linsmaier und Skoog, 1965 [145], das modifiziert wurde (im folgenden als NL-Medium bezeichnet).

Die antisense G α -Mutante (Kap. 2.5.2.2.) wurde in gleicher Weise kultiviert wie der Wildtypstamm.

Grundnährlösung für *Eschscholzia*-Zellkulturen
- Nährmedium nach Linsmaier/Skoog (modifiziert)

NH ₄ NO ₃	20,60	mM/l
KNO ₃	18,80	mM/l
CaCl ₂ *2H ₂ O	3,00	mM/l
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,50	mM/l
KH ₂ PO ₄	1,25	mM/l
H ₃ BO ₃	100,00	mM/l
MnSO ₄ *H ₂ O	100,00	mM/l
ZnSO ₄ *7H ₂ O	30,00	mM/l
KJ	5,00	mM/l
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	1,00	mM/l
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,10	mM/l
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,15	mM/l
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	0,20	mM/l
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,10	mM/l
Thiamin-HCl (VitaminB1)	1,20	μM/l
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	1,00	μM/l
Naphthylessigsäure	1,00	μM/l
myo-Inosit	0,55	mM/l
Saccharose	87,60	mM/l
pH 6,0 (1N KOH); Osmotischer Druck:	176	mOsmol/kg

3.2. Inokulation von *Eschscholzia*-Kulturen

Die Kultivierung der *Eschscholzia*-Zellkulturen erfolgte in 300-ml-Erlenmeyerkolben. Hierzu wurden die entsprechenden Kolben mit 112,5 ml NL-Nährlösung gefüllt und autoklaviert. Zur Inokulation der Kultur wurden diese Kolben mit 37,5 ml Suspension aufgefüllt.

Vor dem Überimpfen der Stamm- und Versuchskulturen wurden 3 Kolben 9-10 Tage alter Suspension mit 2 Kolben 7 Tage alter Suspension gemischt. Nun wurden die vorbereiteten Erlenmeyerkolben mit der Zellsuspension aufgefüllt. Vor dem Auffüllen wurde die Suspension kurz geschwenkt, um ein Absetzen der Zellen zu verhindern.

3.3. Präparation des Hefeelicitors [87]

Die Präparation des Hefeelicitors erfolgte durch eine Methode nach Gundlach [87].

1 kg Bäckerhefe (DHW Vital Gold, Deutsche Hefewerke) wurde in 1,5 l Natriumcitratpuffer (20 mM, pH 7,0) suspendiert und 1 Std bei 121°C autoklaviert. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile 20 min bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Ethanol versetzt und über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurde erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals mit dem gleichen Volumen Ethanol versetzt und über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurde erneut abzentrifugiert und im Anschluss das Pellet in H₂O dest. suspendiert und lyophilisiert.

3.4. Elicitierung von *Eschscholzia californica*

Zur Elicitierung von *Eschscholzia californica* mit dem Hefe-Elicitorpräparat, wurden 20 ml einer 5 Tage alten Zellsuspension über ein Polyestersieb 200 mesh (50-55 µm) abgesaugt, mit dem doppelten Volumen 50 %iger NL-P gewaschen, in 20 ml Betain/Citrat-Medium suspendiert und mit 1 µg/ml Hefeelicitor für 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem 4fachen Volumen 50 %iger NL-P gewaschen und für 24 h in NL-P kultiviert. Zur Bestimmung der Parameter wie Zellzahl (Kap. 3.6.) und Alkaloidbildung (Kap. 3.5.), wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ h und $t = 24$ h (bzw. nach den speziell angegebenen Zeitpunkten) jeweils eine Probe der Zellsuspension entnommen. Für alle qualitativen Analysen erfolgte die

Kultivierung der jeweiligen Kulturen in 50 ml Erlenmeyerkolben. Die Kultivierung und Stimulation der *Eschscholzia*-Kulturen für die quantitative Analyse (Proteinisolation, Isolation von mRNA) wurde in 150 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. In analoger Vorgehensweise zur Elicitorbehandlung, erfolgte die Induktion der Alkaloid-Biosynthese durch Stimulatoren wie Buttersäure in NL-P (bei pH = 5,0), Pivalinsäure (bei pH = 5,0) in NL-P, Methyl-Jasmonat, Mastoparan, Mastoparan 7 und Mastoparan 17 jeweils in Betain/Citrat-Medium. Die Stimulation durch die jeweiligen Osmotika (KCl, NaCl, Mannit, Sorbit und Saccharose), die Behandlung mit Quercetin oder H₂O₂ erfolgte in NL-P-Medium.

Betain/Citrat-Medium:

150 mM Natriumcitrat
8 mM Betain
pH 5,0

In den einzelnen Kapiteln kamen auch Variationen von: Kulturalter, Zelldichte, Phosphatkonzentrationen des Nährmediums (Kap. 2.2.), Konzentration der jeweiligen Stimuli (Kap. 2.4./5., Anhang) oder externe Alkaloidgaben (Kap. 2.3) zum Einsatz. Die konkrete Versuchsbeschreibung wird in den einzelnen Legenden der Abbildungen erläutert.

In den einzelnen Kapiteln wurde die Wirkung verschiedener Stimuli nach erfolgten Effektor-Erstkontakt untersucht. Hierzu wurde analog der Erststimulation verfahren. Das heißt, dass nach Entnahme der Probe zur Bestimmung der jeweiligen Zellaggregate und der Alkaloidmengen, die Zellen im 4fachen Volumen 50 %iger NL-P gewaschen wurden. Nach dem jeweiligen Zweitkontakt wurden die Zellen in 50 %iger NL-P gewaschen und in NL-P für 24 h kultiviert. Auch hier wurde jeweils eine Probe zur Bestimmung der jeweiligen Zellaggregate und der Alkaloidmengen zum Zeitpunkt $t = 24$ h und $t = 48$ h entnommen.

Jede weitere Stimulierung erfolgte in analoger Vorgehensweise.

In Kap. 2.4./5. wurde der Zusatz verschiedener Effektoren zu *Eschscholzia*-Zellsuspensionen beschrieben. Die Verwendung der angegebenen Substanzen erfolgte auf der Basis folgender Parameter:

Verbindung:	gelöst in:	Anteil der jeweiligen Stammlösung im Versuchsansatz:
Elicitor	H ₂ O bidest.	bis 0,1 %
Buttersäure	H ₂ O bidest.	bis 1,7 %
Pivalinsäure	H ₂ O bidest.	bis 12 %
H ₂ O ₂	H ₂ O bidest.	bis 10 %
Mastoparan	H ₂ O bidest.	bis 0,5 %
Mastoparan 7	H ₂ O bidest.	bis 0,5 %
Mastoparan 17	H ₂ O bidest.	bis 0,5 %
Quercetin	DMSO	bis 7,5 %
Alkaloidmischung	Methanol bzw. NL-P	bis 2,0 %
Sanguinarin	H ₂ O bidest.	bis 1,0 %
Chelerythrin	H ₂ O bidest.	bis 1,0 %
Berberin	H ₂ O bidest.	bis 1,0 %

Um die mögliche Wirkung von Methanol bzw. DMSO auf *Eschscholzia*-Zellen zu berücksichtigen, erfolgte deren Zusatz zu den jeweiligen Kontrollen.

Das Ergebnis jedes Elicitierungs-Experimentes wurde nur dann als erfolgreich gewertet, wenn die Alkaloidproduktion der Kontroll-Behandlung höchstens 30 % der Elicitorwirkung erreichte.

3.5. Bestimmung der Benzophenanthridin-Alkaloide

Zur Quantifizierung der produzierten Benzophenanthridin-Alkaloide wurde deren Eigenschaft ausgenutzt, bei Anregung einer bestimmten Wellenlänge zu fluoreszieren.

3.5.1. Extraktion

Zur Bestimmung der Benzophenanthridin-Menge wurden 0,5 ml Zellsuspension mit 0,5 ml 96 % Methanol/36 mM HCl versetzt und für 20 min bei 40 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Danach wurde 20 min bei 13.000 rpm sedimentiert und der Überstand zur Bestimmung der Alkaloide verwendet.

3.5.2. Messung

Zur Quantifizierung der produzierten Benzophenanthridin-Alkaloide wurden je 100 µl Überstand aus Kap. 3.5.1. in eine Mikrotiterplatte (Dynatech Microfluor) überführt und die Fluoreszenz bei folgenden Parametern am Fluorolite 1000, Fa. Dynatech Laboratories bestimmt: Excitation 490 nm, Emmision 570 nm, Spannung 7,0 Volt. Aus der gemessenen Fluoreszenz konnte über eine Eichgerade die entsprechende Alkaloidmenge [µg/ml] errechnet werden.

3.5.3. Extraktion und Reinigung

Zur Untersuchung des Einflusses von selbst produzierten Benzophenanthridin-Alkaloiden mussten diese in größerem Maßstab (mg-Bereich) gewonnen werden. Hierzu wurde von D. Weiss ein Verfahren verwendet, dass sich auf eine von Bouleware, R., 1989 entwickelte und patentierte Methode stützt (Patent-Nummer: 89101427.6.). Dazu wurden Eschscholzia-Kulturen (Kap. 3.4.) mit Elicitor behandelt. Zur Isolation und Reinigung der gewünschten Alkaloidmischung wurden Zellen und Alkaloidsuspension durch Filtration getrennt und nur die im Nährmedium befindlichen Alkaloide weiter verwendet. Diese wurden zur weiteren Reinigung in ein unpolares Lösungsmittel überführt und mittels Mineralsäure ausgefällt.

3.6. Quantifizierung der Zellzahl

3.6.1. Bestimmung der Trockenmasse

Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte aus dem Zellpellet (aus Kap. 3.6.1.), welches bei 80°C für 2 Stunden getrocknet wurde. Nach 30 minütiger Abkühlung im Exsikkator und der sich anschließenden 15 minütigen Anpassung an die Raumtemperatur konnte die Trockenmasse über wägen bestimmt werden. Aus den Trockenmassen konnte über eine Eichgerade die Zellzahl errechnet werden.

3.6.2. Bestimmung der Zellaggregate

Zur Bestimmung der Zellzahl am Casy 1 der Firma Schärfe wurden 0,5 ml Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, mit 10 µl Mucosol vermischt und 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 ml einer 0,9 %igen NaCl-Lösung in ein Casy-Messgefäß überführt und mit 10 µl der vorher behandelten Zellsuspension versetzt. Nun erfolgte die Messung der Zellsuspension. Die Auswertung bezog sich nur auf Zellaggregate mit einer Partikelgröße im Intervall von 13,5 bis 90 µm. Nach Bestimmung der Zellaggregate konnte die Zellzahl über Multiplikation mit dem Faktor 5 bestimmt werden (1 Eschscholzia-Zellfaden besteht aus durchschnittlich 4 bis 6 Zellen). Über eine Eichgerade konnte die Trockenmasse [mg/ml] der entsprechenden Zellen errechnet werden.

3.7. Bestimmung des osmotischen Druckes des Nährmediums

Zur Bestimmung des osmotischen Druckes wurden 0,5 ml Zellsuspension entnommen, die Zellen 20 min bei 13.000 rpm sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung des osmotischen Druckes wurden je 150 µl des Überstandes entnommen und in das entsprechende Reaktionsgefäß zur Messung des osmotischen Druckes überführt. Im Anschluss erfolgte die Messung am Knauer Semi Micro-Osmometer.

3.8. Sammlung und Lagerung der Eschscholzia-Zellen

Zur Sammlung der Eschscholzia-Zellen wurden diese nach entsprechender Behandlung (Kap. 3.4.) abgesaugt, mit H₂O dest. gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.9. Isolation von mRNA [196]

Die Isolation erfolgte nach einer Variation von Pötter, E., Kloppstech, K., [196].

Aufschlusspuffer:

50,0	mM	Tris/HCl, pH 9,0
0,1	M	NaCl
10,0	mM	EDTA
3,0	%	SDS

Bindungspuffer:

10,0	mM	Tris/HCl, pH 7,5
0,4	M	NaCl
0,2	%	SDS
1,0	mM	EDTA

1. Waschpuffer:

10,0	mM	Tris/HCl, pH 7,5
0,1	M	NaCl
0,2	%	SDS
1,0	mM	EDTA

2. Waschpuffer:

10,0	mM	Tris/HCl, pH 7,5
0,1	M	NaCl
1,0	mM	EDTA

Elutionspuffer:

10,0 mM Tris/HCl, pH 7,5
1,0 mM EDTA

6 g gefrorenes Pflanzenmaterial wurde in der Zelmühle (Waring Commercial Laboratory Blender) mit Trockeneis aufgeschlossen und in 100 ml Aufschlusspuffer gegeben. Nach dem Auftauen wurde die aufgeschlossene Zellsuspension mit 100 µl einer 10 %igen Lösung Proteinase K (Firma Promega, 30 U/mg) in 50 mM Tris/1 mM EDTA, pH 8,0 versetzt und unter schütteln 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand 20 min bei 5.000 rpm und 20 °C (Zentrifuge 3K12 der Firma Sigma) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 10 ml einer 4 M NaCl-Lösung sowie der vorbereiteten Oligo-dt-Zellulose versetzt. Anschließend wurde für 60 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nun wurde die Suspension in eine Säule (Firma JenaGlas) Pore 100 gefüllt und der Überstand von der Oligo-dt-Zellulose abfiltriert. Die an die Oligo-dt-Zellulose (Fa. Boehringer) gebundene mRNA wurde nun mit 50 ml Bindungspuffer, 50 ml 1. Waschpuffer und einmal mit 50 ml 2. Waschpuffer gewaschen. Zur Elution der mRNA wurde mit 15 ml 55 °C warmen Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde mit 1 ml 4 M NaCl und 35 ml 100 %igem Ethanol versetzt und die mRNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde bei 4°C, 50 min bei 13.000 rpm sedimentiert, der Überstand verworfen, die Reaktionsgefäße mit 3 ml 0,2 M Natriumacetat/70 %igem Ethanol gespült und 12 min bei 4 °C und 13.000 rpm sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am UV/visible Spectrometer (Firma Pharmacia) bei 260 nm. Dabei entsprach 1 OD-Einheit bei 260 nm gleich 40 µg/ml. Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten mRNA wurde die OD bei 230 nm und 280 nm bestimmt.

3.10. Isolation von Proteinen

Das abgesaugte Zellmaterial wurde mit Trockeneis in der Zelmühle (Waring Commercial Laboratory Blender) homogenisiert. Danach wurden 1 g Frischmasse mit 6 ml M1-Puffer zum Zellaufschluss zugegeben und die Suspension langsam bei 4°C aufgetaut. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 4 °C auf dem Schüttler (KS-500 Schüttler, Jahnke und Kunkel) wurden die groben Zelltrümmer 10 min bei 5.000 rpm in der Zentrifuge (MLW, K23D)

abzentrifugiert. Zum Abtrennen der Membranproteine wurde 1 Std bei 100.000 g und 4 °C in der Ultrazentrifuge (Firma Beckmann, Optima LE 8014) sedimentiert.

M1-Puffer:

15,00	%	Saccharose
0,50	M	KCl
1,00	mM	MgCl ₂
150,00	mM	Tris-HCl, pH 7,5
0,08	%	(v/v) 2-Mercaptoethanol
1,50	mM	EDTA
5,00	mM	DTE
0,20	mM	PMSF
		H ₂ Odest.

3.11. Reinigung von Proteinen [193]

Die Oberphase aus Kap. 3.12. bzw. Kap. 3.15.1. wurde mit dem gleichen Volumen Phenol (Rotiphenol in 10 mM Tris, 1 mM EDTA-Na₂ äquilibriert, pH 7,5 - 8, Fa. Roth) versetzt und 15 min bei 4 °C ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung wurde 10 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Die Phenolphase wurde abgenommen und 2mal mit dem gleichen Volumen Tris-Puffer 15 min bei 4 °C ausgeschüttelt. Dazu wurde jeweils 10 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Die gereinigte Phenolphase wurde nun mit dem 4 fachen Volumen 0,1 M Ammoniumacetat in 96 %igem Methanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proteine 10 min bei 8.000 rpm sedimentiert. Das Pellet einmal mit 96 %igem Methanol und 2 mal mit 80 %igem Aceton gewaschen und dann getrocknet.

Tris-Puffer:

0,1	M	Tris
0,2	M	KCl
10,0	mM	EDTA
		pH 8,0

3.12. Proteinbestimmung [20]

Die Proteinbestimmung wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt [20].

3.13. *In vitro* Translation

3.13.1. Reaktionsansatz

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Promega unter Verwendung des Weizenkeimsystems.

Hierzu wurden 1 µg mRNA (isoliert nach Kap. 3.9.) in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß vorgelegt, mit 6 µl H₂O dest. aufgefüllt und der Translationsmix zugesetzt. Der Translationsmix bestand aus :

12,5 µl	Wheat Germ Extract
0,5 µl	Aminosäure-Mix minus Methionin
2,5 µl	1 M Kaliumacetat
0,5 µl	RNAseinhistor (Firma Promega)
1,25 µl	³⁵ S-Methionin (ca. 0,5 MBq; Fa. Hartmann)

Der Ansatz wurde 90 min bei 30 °C inkubiert.

3.13.2. Auswertung

Nach Beendigung der *in vitro* Translation wurde der Ansatz 10 min auf Eis gestellt. Danach wurden 2 µl des Reaktionsansatzes auf Filterpapierstückchen pipettiert, getrocknet und diese 10 min in 10 %ige TCA/0,1 M Methionin gekocht. Anschließend wurde 2 mal mit 5 %ige TCA/0,05 M Methionin, 2 mal mit 70 %igem Ethanol, 1 mal mit Aceton gewaschen, getrocknet, in Szintillationsröhrchen gegeben, mit 4 ml Szintillator Lumasafe plus (Firma Lumac) überschichtet und vermessen (im Packard, Tri-Carb 1900CA, Liquid Scintillation Analyser). Um den prozentualen Einbau berechnen zu können, wurde der *in vitro* Translationsansatz (nach Trocknung auf Filterpapier) einmal ohne zu waschen und einmal mit

vorheriger Waschprozedur vermessen. Als Blindwert diente ein Translationsansatz ohne den Zusatz von mRNA.

Der Einbau berechnete sich dann wie folgt :

$$\text{Prozentualer Einbau} = \frac{[\text{cpm (RNA-Werte nach TCA-Fällung)} - \text{Blindwert (nach TCA-Fällung)}]}{\text{cpm (RNA-Werte ohne TCA-Fällung)} \times 100}$$

3.14. Probenvorbereitung für die elektrophoretische Auftrennung

3.14.1. 1D-SDS-Gelelektrophorese

Hierzu wurden die aus Kap. 3.13. stammenden Proben mit dem gleichen Volumen 10 %ige TCA/0,1 M Methionin versetzt und für eine halbe Stunde auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde 10 min bei 13.000 rpm sedimentiert, die gefällten Proteine mit kaltem Aceton gewaschen und danach getrocknet. Nun wurde das Proteinpellet in der entsprechenden Menge SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Danach konnten die Proben für die SDS-Elektrophorese verwendet werden.

SDS-Probenpuffer:

56,00	mM	Na ₂ CO ₃
56,00	mM	DTT
2,00	%	SDS
12,00	%	Sucrose
2,00	mM	EDTA
0,04	%	Bromphenolblau

3.14.2. 2D-SDS-Gelelektrophorese

Der Translationsansatz wurde analog Kap. 3.11. gereinigt.

3.15. Elektrophoretische Methoden

3.15.1. 1D-SDS-Elektrophorese [180]

Die Auftrennung der Proteine in der 1D-Elektrophorese erfolgte nach dem von Neville et al. 1971 [180] beschriebenen System. Der Gel-Lauf wurde mit 30 mA für ein 1,0-mm-Gel gestartet und nach Verlassen der Bromphenolblau-Front gestoppt.

3.15.1.1. Fixierung des 1D-SDS-Gels

Zur Fixierung des aus Kap. 3.15.1. stammenden Gels wurde dieses 30 min in Isopropanol:H₂O: Essigsäure (25:65:10) auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

3.15.1.2. Trocknen des 1D-SDS-Gels

Um das 1D-SDS-Gel radioaktiv auswerten zu können, musste dieses vorher getrocknet werden. Die Geltrocknung fand bei 70 °C unter Vakuum im Vakuum-Geltrockner statt.

3.15.1.3. Detektion der radioaktiven Proteine auf dem 1D-Gel

Nach dem Trocknen des Gels wurde dieses auf eine Imaging-Platte der Firma Fuji gelegt und für 2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgte über Einscannen der Platte am Strom-Phospho-Imager bei 100 Micro und 750 Volt.

3.15.2. Probenvorbereitung für die IEF

Das getrocknete Pellet aus Kap. 3.11. wurde mit dem entsprechenden Elektrophoresepuffer versetzt, im Ultraschall gelöst und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Probe auf die IEF aufgetragen wurde.

Elektrophoresepuffer:

8,0	M	Harnstoff
0,5	%	NP40
5,0	%	Mercaptoethanol
40,0	%	Servalyt des entsprechenden pH-Bereiches
	ad	H ₂ O dest.

3.15.3. 2D-Gelelektrophorese

3.15.3.1. Isoelektrische Fokussierung

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden die Immobiline DryStrips (Firma Amersham), pH 3-10, 18 cm, verwendet. Die IEF-Strips wurden 20 Stunden in Rehydratisierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden diese in feuchtem Zellstoff abgetupft. Auf die Kühlplatte (Fa. Amersham, Multiphor 2) wurde Kerosin vorgelegt und die IEF-Streifen positioniert. Die Elektrodenstrips wurden in pyrogenfreiem Wasser getränkt und auf die Enden der IEF-Strips gelegt.

Danach wurden die sample cups auf den IEF-Strip positioniert. Am Ende wurden die Elektroden in die richtige Lage gebracht und der Lauf gestartet. Hierzu wurde nach folgendem System verfahren (Firma Consort, E832 Microcomputer elektrophoresis Power supply).

1,0 h	0,5 kV	2 mA	5 Watt
48,0 h	3,0 kV	2 mA	5 Watt

Die Kühlung erfolgte durch den Thermostat Julabo 5B bei 20 °C.

Rehydratisierungslösung:

8,0	M	Harnstoff
0,5	%	NP40
10,0	mM	DTT

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die IEF-Streifen 2 mal 15 min äquilibriert. Hierzu wurde die Äquilibrierungslösung der Firma ETC verwendet.

Äquilibrierungspuffer: Probenpuffer der Firma ETC

15,0	ml	Probenpuffer
0,1	mM	EDTA
2,0	%	SDS

ad 100 ml H₂O bidest.

vor der Äquilibrierung wurden zu 10 ml Äquilibrierungspuffer je 200 µl einer 62 mmol/l Stammlösung DTT zugegeben

3.15.3.2. SDS-Gelelektrophorese

Nach der IEF wurde der IEF-Streifen äquilibriert und im SDS-Gel aufgetrennt. Hierzu wurden 12,5 %ige Wet-Gele der Firma ETC verwendet. Der Lauf erfolgte in der Multiphor 2 (Firma Pharmazia) bei folgenden Parametern:

700	Volt
30	mA
50	Watt
10 °C	Kühlung

Als das Gel die Bromphenolfront verließ, wurde der Lauf gestoppt.

3.15.3.3. Visualisierung der Ergebnisse aus der 2D-Gelelektrophorese

3.15.3.3.1. Coomassie-Färbung

Hierbei wurde die Heißfärbung verwendet, die den Vorteil der Fixierung und Färbung im Einschnittverfahren ermöglicht.

Färbelösung: 0,02 %iger (w/v) Coomassie R-350 Tablette
(Firma Pharmacia) in
10,00 %iger Essigsäure lösen und im Anschluss filtrieren

Entfärbelösung: 400 ml Methanol
70 ml Essigsäure
ad 1.000 ml H₂O dest.

Impregnierungslösung: 7 %igem (v/v) Glycerol

Färbeprogramm: 30 min bei 60-70 °C färben
2 mal 20 min entfärben
10 min in Impregnierungslösung baden

Trocknen: bei Raumtemperatur über Nacht

3.15.3.3.2. Detektion der radioaktiven Proteine auf dem 2D-Gel

Nach dem Trocknen des Gels wurde dieses auf eine Imaging-Platte der Firma Fuji gelegt und für 2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgte über Einscannen der Platte am Storm- Phospho-Imager bei 100 Micron und 750 Volt.

3.15.3.4. Gelelektrophoretische Auswertung

Die Auswertung der 2-D-Gele erfolgte unter Verwendung der 2D-Auswertesoftware ImageMaster der Firma Amersham (Version 3.10).

3.16. Massenspektrometrische Analyse

Die ausgeschnittenen Gelspots mit den zu untersuchenden Proteinen wurden zerkleinert, 3 mal mit je 20 μl H_2O , 3 mal mit 20 μl NH_4HCO_3 -Puffer (50 mM, pH 8,5) gewaschen und dann getrocknet. Anschließend wurden die Gelstücken mit 10 μl NH_4HCO_3 -Puffer (50 mM, pH 8,5) und 0,5 μl Trypsin (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Firma Boehringer) inkubiert und über Nacht bei 37 °C verdaut. 1 μl des Überstandes wurde für die MALDI-TOF-MS-Messung eingesetzt. Hierzu wurde auf dem Probenträger zunächst eine dünne Matrix-Schicht von α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure in Aceton erzeugt. In 1 μl 1%iger Trifluoressigsäure (TFA) wurde 1 μl der Verdauungslösung direkt auf dem Probenträger pipettiert. Nach dem Trocknen der Lösung wurde der Spot noch 3 mal mit 10 μl 0,1% TFA gewaschen und mit MALDI-TOF-MS vermessen. Die Messung erfolgte an einem Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometer (REFLEX2, Firma Bruker Daltonik GmbH, Bremen). Die Spektren wurden intern mit den Autoproteolysepeptiden des Trypsins kalibriert. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in den Proteindatenbanken genutzt.

Zur weiteren Analyse wurden die Gel-Spots 3 mal mit 70 %igem Acetonitril/5 %iger Ameisensäure extrahiert und die vereinigten Lösungen unter einem Stickstoffstrom zur Trockne eingedunstet. Bevor es möglich war, diese Digests mit Nano-Elektrospray zu analysieren, musste die Probe entsalzt werden. Dazu wurden aus abgeschnittenen Gelloader-Tips kleine Säulen mit ca. 5 μl Poros R2 Füllmaterial (Perseptive Biosystems) gebaut. Nach dem Waschen und Packen der Säulen mit 50 %igem Acetonitril/5 %iger Ameisensäure wurden die Säulen mit 5 %iger Ameisensäure äquilibriert, die Verdauungsmischung in 8 μl 5 %iger Ameisensäure gelöst und auf die Säule gegeben. Diese wurde 3 mal mit 10 μl 5 %iger Ameisensäure gewaschen, um den Puffer zu entfernen. Anschließend wurden die Peptide mit 2 mal mit 4 μl 50 %igem Acetonitril/5 %iger Ameisensäure eluiert. Alle Wasch- und Elutionsschritte erfolgten durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge. 3 μl der eluierten Peptidlösung wurden in eine Nanospray-Kapillare gefüllt und mit Elektrospray-MS

vermessen. Die Messung erfolgte am Quadrupol-Flugzeit Hybrid-Massenspektrometer Q-TOF, Micromass, UK, Manchester.

3.16.1. MS-Datenbanken

Zur Auswertung der erhaltenen Peptidmassen wurde die Datenbank Mascot der Firma Matrix Science bzw. das Programm "Der Protein Prospektor" MS-Fit der University of California genutzt. Dabei wurden folgende Suchkriterien verwendet:

- * Masse des jeweiligen Peptides
- * Massentoleranz 25 %
- * Analyse der jeweiligen b-Ionen, d.h. die angegebene Sequenz geht vom N- zum C-Terminus
- * Taxonomie: green plants

4. Zusammenfassung

1.) Grundlagen des zellulären Mechanismus zur Ausscheidung der Benzophenanthridin-Alkaloide in *Eschscholzia californica*

Die von *Eschscholzia californica* gebildeten Benzophenanthridin-Alkaloide werden nach mikroskopischen Beobachtungen nicht in der Vakuole akkumuliert, sondern wahrscheinlich über Transportvesikel aus der Zelle in das Nährmedium ausgeschieden. Somit scheinen vesikuläre Kompartimentierung und die sich anschließende Sekretion eine Komponente des Schutzsystems vor der Toxizität dieser Alkaloide zu sein. Die ins Medium abgegebenen Benzophenanthridin-Alkaloide vermögen offenbar nicht mehr die Plasmamembran intakter *Eschscholzia*-Zellen zu passieren, nach Zerstörung der Membranbarriere durch Detergenzien kommt es zu einem raschen Einbau der externen Alkaloide in den Zellkern.

2.) Optimierte Elicitierung von *Eschscholzia*-Zellkulturen

Die von uns verwendeten Zellkulturen durchlaufen eine 9tägige Kultivationsphase. Innerhalb dieser Zeit ist es möglich, die Alkaloidbiosynthese durch den Einsatz verschiedener Elicitormoleküle, u.a. einem Hefezellwandpräparat, auszulösen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Elicitierbarkeit der Alkaloidbiosynthese stark vom Kulturalter abhängt. Eine optimale Elicitierbarkeit tritt zu Beginn der Wachstumsphase auf.

Phosphat ist als negativer Effektor des Sekundärmetabolismus bekannt. In der von uns verwendeten Zellkultur führt die Anwesenheit von Phosphat nach Effektorzusatz zu einer starken Verminderung der Alkaloidantwort.

3.) feedback-Effekte der gebildeten Alkaloide

Sanguinarin, eines der am stärksten cytotoxischen Alkaloide, bewirkt sowohl vor, als auch nach dem Elicitorkontakt eine deutliche Hemmung der Alkaloidantwort. Eine Mischung der von der Zellkultur produzierten Alkaloide bewirkt ebenfalls eine Hemmung der Alkaloidantwort. Chelerythrin, ein Benzophenanthridin-Alkaloid, das von der verwendeten Kultur nicht gebildet wird und Berberin, ein strukturähnliches Alkaloid vom Protoberberintyp verursachen keine Hemmung der Alkaloidbildung, d.h. keinen Benzophenanthridin-spezifischen feedback-Mechanismus.

Der Effekt extern zugesetzter Alkaloide zeichnet sich auch auf der Transkriptionsebene ab. Der externe Zusatz von Sanguinarin und einer Alkaloidmischung scheint zur Überexpression verschiedener, bisher noch nicht näher identifizierter Proteine zu führen.

4.) Desensibilisierung der Phytoalexinantwort und alternative Signalwege

Der kurzzeitige Kontakt mit dem Hefe-Elicitor (30 min) als auch dessen permanente Anwesenheit über den Zeitraum von 96 h bewirken eine gleich starke Stimulation sowohl bei kurzzeitigem, als auch bei längeren Intervallen zwischen zwei Elicitorkontakten. Daraus ergibt sich der Schluss, dass der Elicitorkontakt nicht nur die Alkaloidbiosynthese auslöst, sondern auch zu einer des Signalweges führt.

Untersuchungen mit verschiedenen Stimulatoren als Erst- sowie als Zweitsignal lassen Desensibilisierungseffekte mit unterschiedlicher Ausprägung erkennen:

- Die Auslösung der Alkaloidbiosynthese nach Elicitorkontakt oder durch künstliche Ansäuerung ist mit der Ausschaltung des Signalweges für das jeweils andere Signal verbunden; was dafür spricht, dass sowohl das Elicitorsignal als auch der pH-shift Elemente einer gemeinsamen Signalkette sind.

- Methyl-Jasmonat und Osmotischer Stress scheinen die Alkaloidbiosynthese auf einen vom Elicitor unabhängigen, Signalweg auszulösen, denn ihre Stimulatorwirkung kann durch vorherigen Elicitorkontakt nicht ausgeschaltet werden.
- Signale wie Quercetin, H₂O₂, Mastoparan, Mastoparan 7 und Mastoparan 17 können die Auslösung der Alkaloid-Biosynthese verhindern, obwohl sie nicht in der Lage sind, selbst die Bildung von Benzophenanthridinen auszulösen.

Diese Daten sprechen für die Existenz zweier eigenständiger Signalwege zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese: den Elicitor-pH-Weg und den bereits länger bekannten Jasmonatweg.

5.) mRNA- und Proteinmuster unter dem Einfluss verschiedener Signale der Alkaloidbildung

In der vorliegenden Arbeit wurde die methodische Basis zur Untersuchung der mRNA- und Proteinmuster Alkaloid-produzierender Zellen etabliert. Dabei können die Translationsprodukte der aktuell extrahierbaren mRNA's und die (vorwiegend löslichen) Proteine auf dem gleichen 2D-Gel quantifiziert werden. Dieses Analyseverfahren schafft die Möglichkeit, die durch *in vitro* Translation gebildete Proteinmenge im Fall der gleichzeitigen Anwesenheit des entsprechenden Eschscholzia-Proteins zu erhöhen und damit das ausreichende Material für eine MALDI-TOF-Strukturaufklärung zu gewinnen. Erste Analysen zeigten Hinweise auf differentiell exprimierte Proteine, die Homologien zu folgenden (in der Datenbank vorhandenen) Proteinen aufweisen: Apoptose Inhibitor, Cytochrom C Oxidase bzw. eine Superoxiddismutase (nach Methyl-Jasmonatstimulation), Auxin induziertes Protein, putative Chitinase, Transkriptionsregulator, putatives RNA-binde Protein, CTP-Synthase, Superoxiddismutase, Lipoxygenase (nach Elicitorstimulation).

Auch auf der Ebene der mRNA lässt sich der desensibilisierende Effekt des Elicitors nachweisen: im Gegensatz zum Erstkontakt führt der Zweitkontakt zu einem fast vollständigen Verschwinden der translatierbaren mRNA's. Dagegen führt Methyl-

Jasmonat auch nach dem Elicitorkontakt zur Transkription spezifischer mRNA's, was erneut die Existenz zweier unabhängiger Signalwege bei der Wirkung von Hefe-Elicitor und Jasmonat unterstreicht.

5. Anregungen zur Weiterführung

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation wurde die Bildung von Phytoalexinen im Vergleich mit dem mRNA- und Proteinmuster nach Pathogenkontakt bearbeitet. Durch die Komplexität der mit dieser Thematik in Zusammenhang stehenden Prozesse konnten nur einige wichtige Bereiche beleuchtet werden.

Die sowohl auf zellphysiologischer als auch auf molekularbiologischer Ebene gewonnenen Ergebnisse bilden die Grundlage u.a. für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Aufklärung von Desensibilisierungsmechanismen in *Eschscholzia californica*.

Insbesondere die etablierte 2D-Analysenmethode bietet ein geeignetes Hilfsmittel zur Bearbeitung dieser Fragestellung.

In nachfolgenden Projekten sollte ein besonderes Augenmerk auf Expression und Vergleich von Proteinen gelegt werden, die durch verschiedene Induktoren der Alkaloidbiosynthese nach Erst- und Zweitkontakt ausgelöst werden. Damit könnte u.a. das Phänomen der Desensibilisierung auf Protein- und mRNA-Ebene weiter aufbereitet werden.

2D-Analysen im Rahmen dieser Arbeit gaben erste Hinweise auf Proteine, die nach Effektorzusatz möglicherweise "herunterreguliert" werden. Um Signalvorgänge umfassend beleuchten zu können, sollten weiterführende Arbeiten auch an dieser Stelle anknüpfen.

Ein weiterer wichtiger Schritt sollte in der näheren Charakterisierung des Einflusses der Alkaloide auf ihre Biosynthese unternommen werden. Auch hier sind interessante Ansatzpunkte auf molekularer Ebene gegeben.

6. Anhang

Tab. 8: Wirkung von Sanguinarin auf die Alkaloidbiosynthese, ausgelöst durch Zusatz vor Elicitorgabe [%]

Sanguinarin (käuflich erworben) wurde in unterschiedlicher zeitlicher Abhängigkeit und den hier angegebenen Konzentrationen vor Elicitorierung (Kap. 3.4.) zu Eschscholzia-Zellkulturen zugesetzt. Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,77 - 5,48 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Kontaktzeit vor Elicitor-behandlung	Sanguinarin [μM]				
	1,36	2,72	8,16	13,6	27,2
30 min	69,48 % \pm 2,09	54,87 % \pm 10,19	68,86 % \pm 0,57	62,16 % \pm 4,52	69,06 % \pm 9,21
1 h	81,46 % \pm 9,65	52,87 % \pm 2,20	80,98 % \pm 7,66	60,96 % \pm 8,24	73,70 % \pm 14,22
2 h	93,67 % \pm 32,18	34,77 % \pm 4,52	92,34 % \pm 17,00	39,39 % \pm 1,31	41,59 % \pm 15,20
4 h	79,70 % \pm 21,97	49,83 % \pm 4,23	86,03 % \pm 2,80	50,87 % \pm 5,14	65,30 % \pm 4,96
6 h	58,43 % \pm 19,08	39,48 % \pm 9,29	57,92 % \pm 6,50	31,18 % \pm 3,04	62,38 % \pm 11,19

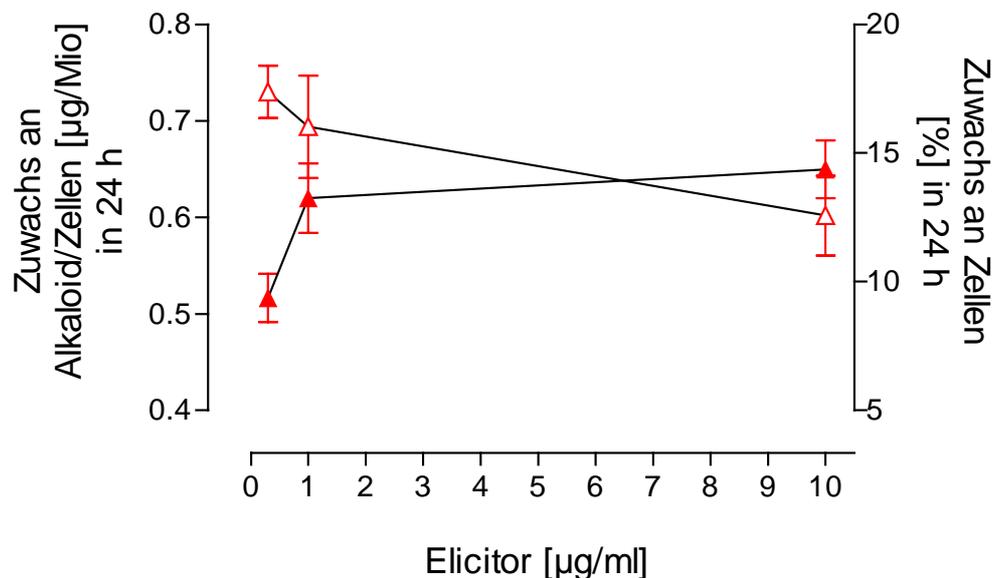


Abb. 30: Dosis-Wirkung vom Hefeelicitor

Die vollen Symbole kennzeichnen den Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h. Die leeren Symbole zeigen den prozentualen Zuwachs an Zellen in 24 h.

Der Einsatz von Hefe-Elicitor (0,3 bis 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min) induziert in Eschscholzia-Zellen die Bildung von Benzophenanthridinen (Kap. 3.4.). Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

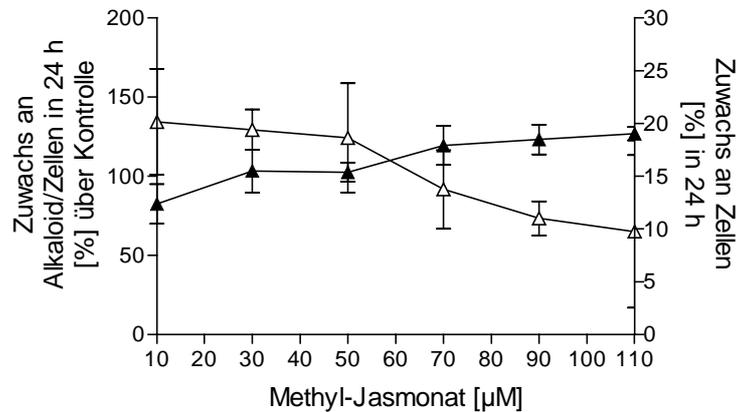


Abb. 31: Dosis-Wirkung von Methyl-Jasmonat

Die vollen Symbole kennzeichnen den prozentualen Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h. Die leeren Symbole zeigen den prozentualen Zuwachs an Zellen in 24 h. Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von $t = 0$ h bis $t = 24$ h: 100 % = 1,92 - 2,51 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

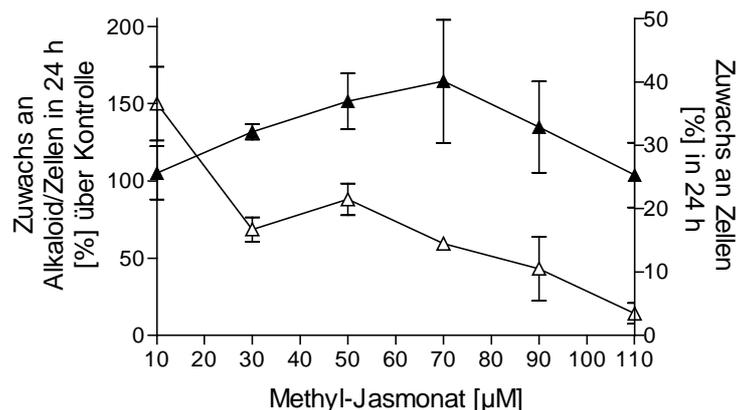


Abb. 32: Dosis-Wirkung von Methyl-Jasmonat nach Elicitorkontakt

Die vollen Symbole kennzeichnen den prozentualen Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h. Die leeren Symbole zeigen den prozentualen Zuwachs an Zellen in 24 h. Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von $t = 0$ h bis $t = 24$ h: 100 % = 1,96 - 2,65 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten

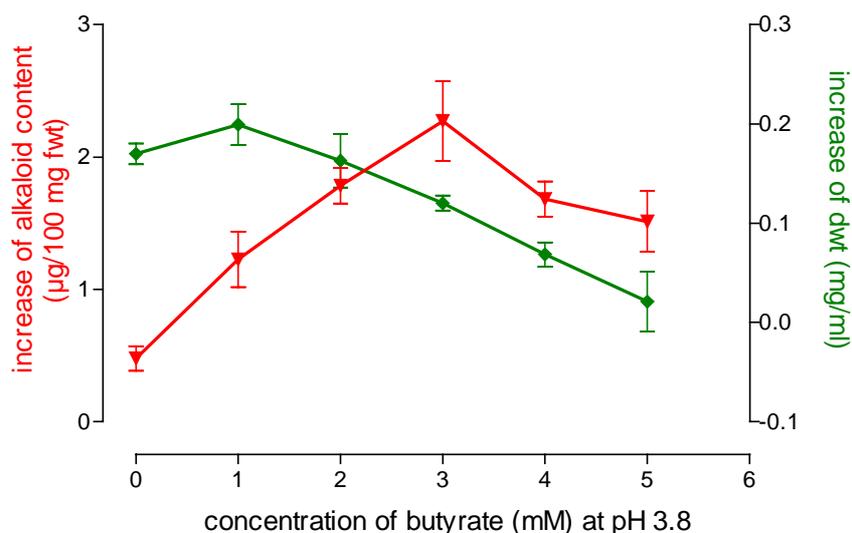


Abb. 33: Dosis-Wirkung von Buttersäure aus: [204]

Die vollen Symbole kennzeichnen den Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h. Die leeren Symbole zeigen den prozentualen Zuwachs an Zellen in 24 h.

Der Einsatz von Buttersäure (1 bis 6 mM, Stimulation: 15 min, pH 3,8) induziert in Eschscholzia-Zellen die Bildung von Benzophenantridinen (Kap. 3.4.). Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 3 parallel untersuchten Zellsuspensionen.

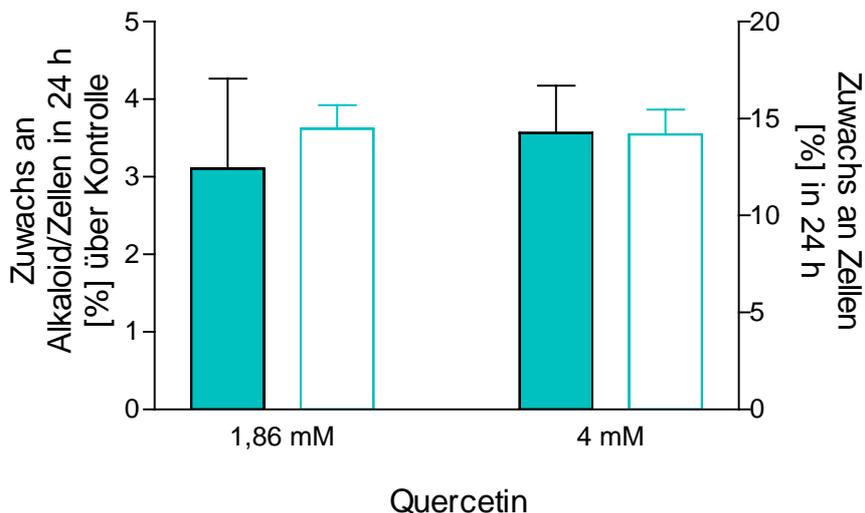


Abb. 34: Dosis-Wirkung von Quercetin

Die vollen Symbole kennzeichnen den prozentualen Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h. Die leeren Symbole zeigen den prozentualen Zuwachs an Zellen in 24 h. Die Wirkung des Elicitorkontaktes vom Zeitpunkt $t = 0$ h bis $t = 24$ h wurde mit 100 % normiert. Der Kontrollwert wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung nach Erstkontakt, entsprechen im Zeitraum von $t = 0$ h bis $t = 24$ h: 100 % = 0,6- 2,99 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. $n = 3$; Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

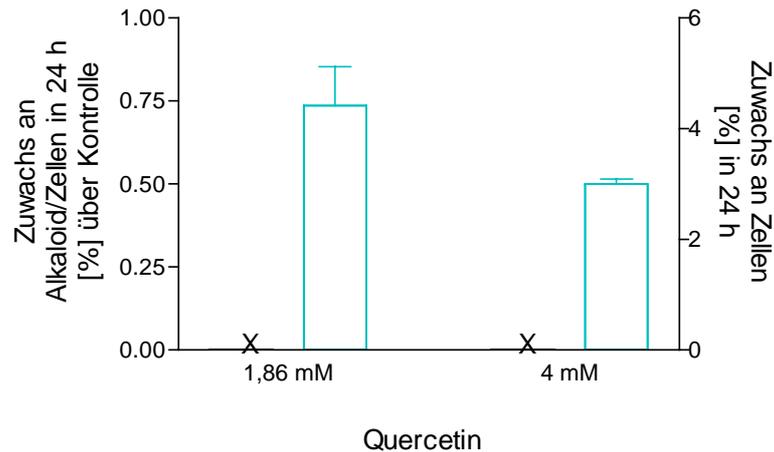


Abb. 35: Dosis-Wirkung von Quercetin nach Elicitorkontakt

Die (X)-Symbole kennzeichnen den prozentualen Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h, der gleich 0 war. Die leeren Symbole zeigen den prozentualen Zuwachs an Zellen in 24 h. Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von $t = 0$ h bis $t = 24$ h: 100 % = 0,6 - 2,99 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

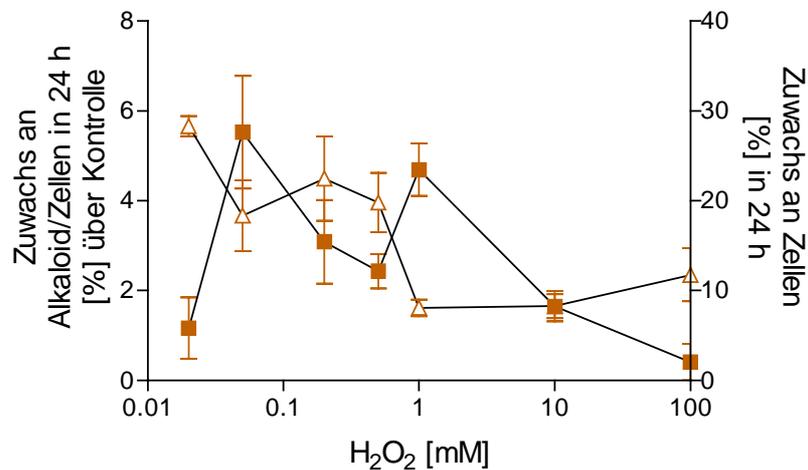


Abb. 36: Dosis-Wirkung von H₂O₂

Die vollen Symbole kennzeichnen den prozentualen Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h. Die leeren Symbole zeigen den prozentualen Zuwachs an Zellen in 24 h. Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von $t = 0$ h bis $t = 24$ h: 100 % = 1,66 - 5,04 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

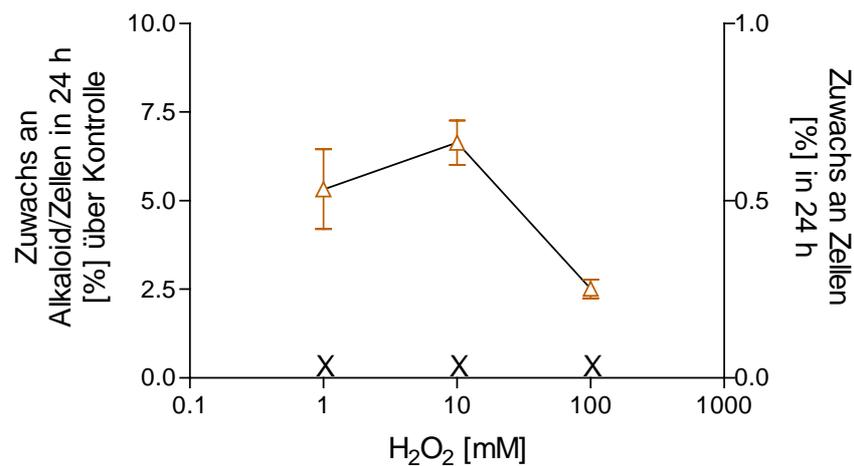


Abb. 37: Dosis-Wirkung von H₂O₂ nach Elicitorkontakt

Die (X)-Symbole kennzeichnen den prozentualen Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h, der 0 war. Die leeren Symbole zeigen den prozentualen Zuwachs an Zellen in 24 h. Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 1,66 - 5,04 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

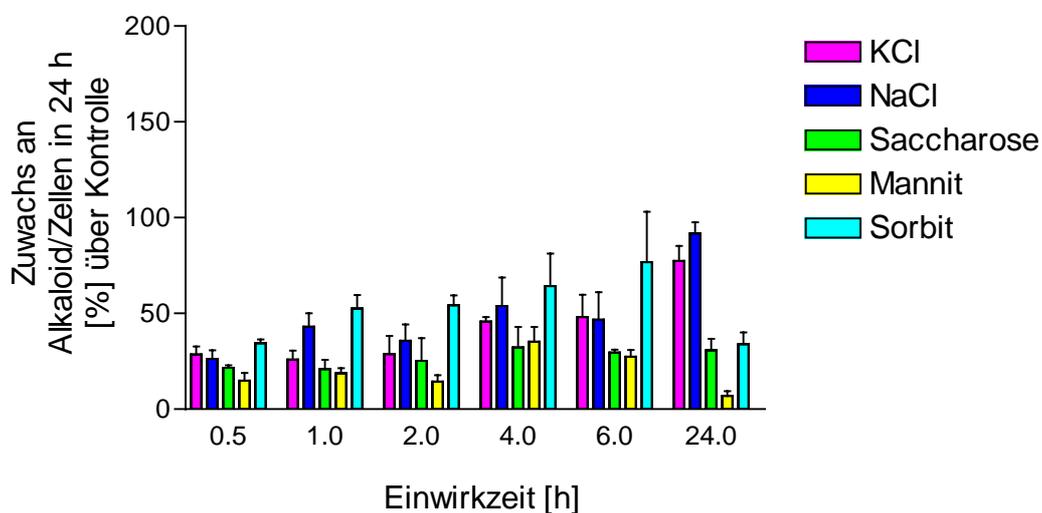


Abb. 38: Wirkung verschiedener Osmotika in Abhängigkeit verschiedener Einwirkzeiten

Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,85 - 2,82 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

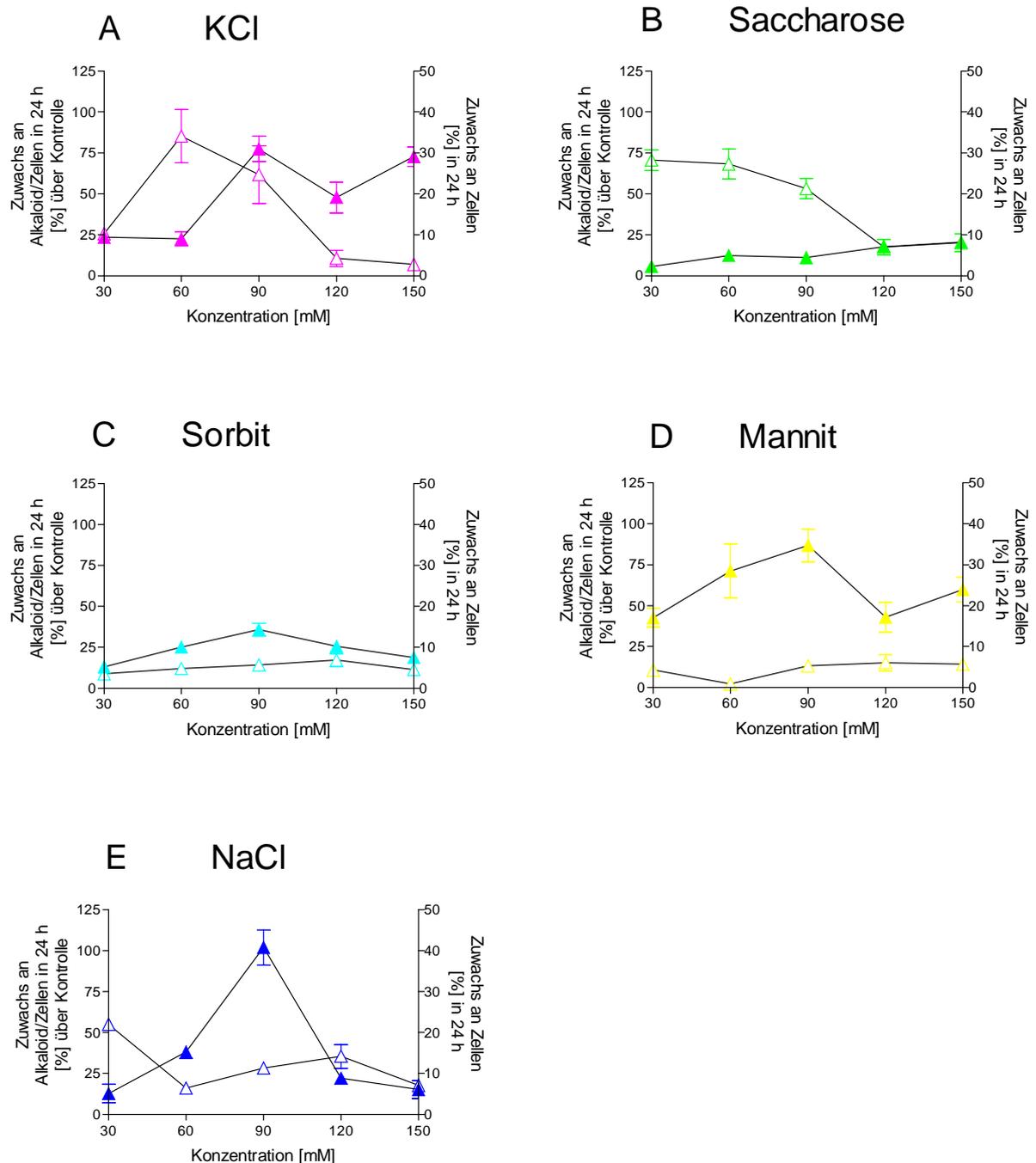


Abb. 39: Dosis-Wirkung verschiedener Osmotika in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen

Die vollen Symbole kennzeichnen den prozentualen Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h. Die leeren Symbole zeigen den prozentualen Zuwachs an Zellen in 24 h. Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,51 - 3,33 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

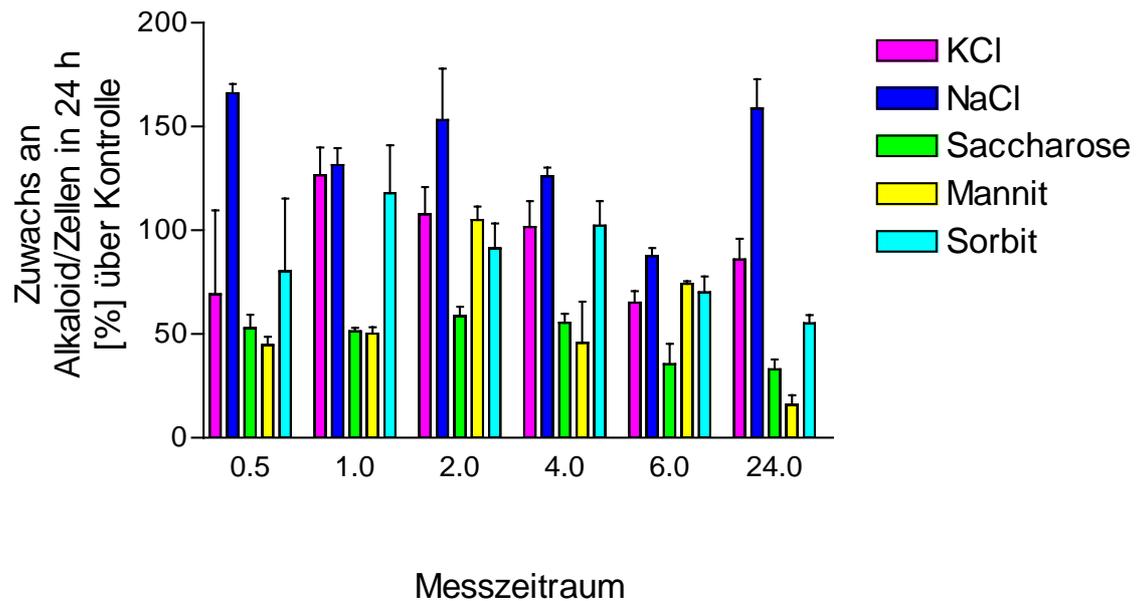


Abb. 40: Wirkung verschiedener Osmotika in Abhängigkeit verschiedener Einwirkzeiten 24 h nach Elicitorkontakt

Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h:

100 % = 0,85 - 2,82 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

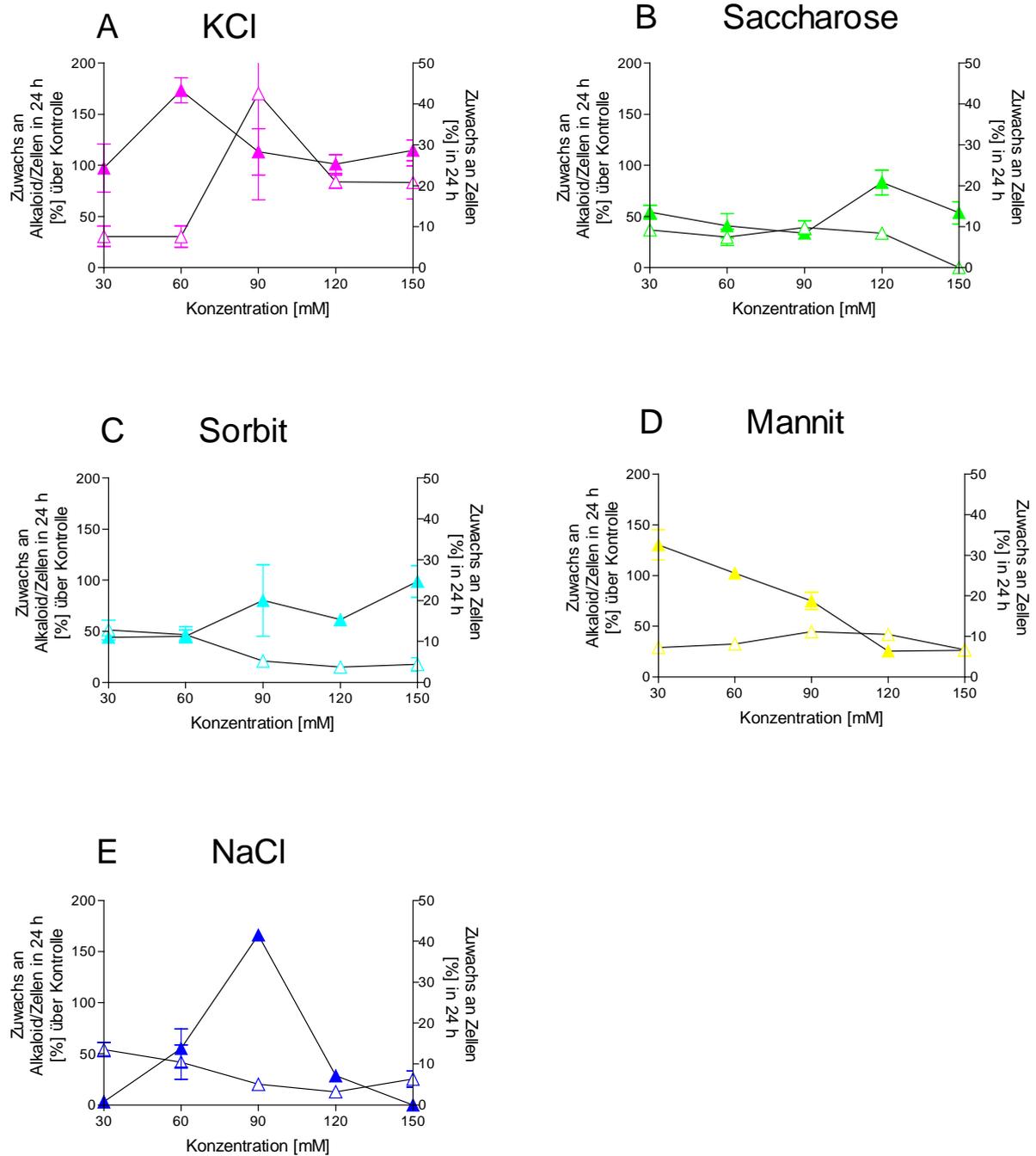


Abb. 41: Dosis-Wirkung in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen bei Zweitkontakt.

Die vollen Symbole kennzeichnen den prozentualen Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h. Die offenen Symbole zeigen den prozentualen Zuwachs an Zellen in 24 h. Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von $t = 0$ h bis $t = 24$ h: $100\% = 0,51 - 3,33$ Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Tab. 9: Wirkung verschiedener Signale zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese

Die verschiedenen Signale wurden wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,77 - 2,50 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	100 \pm 10,99
Buttersäure (4 mM, 15 min)	45,74 \pm 7,11
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	12,90 \pm 2,83
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 17 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	102,65 \pm 10,19
H ₂ O ₂ (20 μM - 1 mM, 30 min)	0
Quercetin (4 mM, 30 min)	0

Tab. 10: Der Elicitor als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach Elicitor-Kontakt wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,94 - 2,99 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Pivalinhsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 17 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	44,04 \pm 21,16
H ₂ O ₂ (20 μM - 1 mM, 30 min)	0
Quercetin (4 mM, 30 min)	0

Tab. 11: Pivalinsäure als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach Pivalinsäure-Kontakt wie in der Tabelle eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,73 - 1,92 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 17 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	0
Osmotika 90 mM	
KCl 30 min	35,42 \pm 2,27
Sorbit 30 min	0
Mannit 30 min	0
Saccharose 30 min	0
NaCl 30 min	0

Tab. 12: Buttersäure als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach Butyrat-Kontakt wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,90 - 3,63 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 17 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	62,05 \pm 30,38
Osmotika 90 mM	
KCl 30 min	13,35 \pm 7,85
Sorbit 30 min	0
Mannit 30 min	0
Saccharose 30 min	0
NaCl 30 min	0

Tab. 13: Methyl-Jasmonat als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach Methyl-Jasmonat wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,81 - 2,95 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 17 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	0
Osmotika 90 mM	
KCl 30 min	0
Sorbit 30 min	0
Mannit 30 min	0
Saccharose 30 min	0
NaCl 30 min	0

Abb. 14: Mastoparan als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach Mastoparan-Kontakt wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,68 - 2,56 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	0
Osmotika 90 mM	
KCl 30 min	0
Sorbit 30 min	0
Mannit 30 min	0
Saccharose 30 min	0
NaCl 30 min	0

Tab. 15: Mastoparan 7 als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach Mastoparan 7 wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,51 - 2,43 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	0
Osmotika 90 mM	
KCl 30 min	0
Sorbit 30 min	0
Mannit 30 min	0
Saccharose 30 min	0
NaCl 30 min	0

Tab. 16: Mastoparan 17 als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach Mastoparan 17 wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,55 - 2,56 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	0
Osmotika 90 mM	
KCl 30 min	0
Sorbit 30 min	0
Mannit 30 min	0
Saccharose 30 min	0
NaCl 30 min	0

Tab. 17: KCl als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach KCl-Kontakt (90 mM, 24 h) wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,47 - 2,52 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 17 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	0
Osmotika 90 mM KCl 30 min	127,17 \pm 10,56

Tab. 18: NaCl als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach NaCl-Kontakt (90 mM, 24 h) wie in der Tabelle eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,73 - 3,07 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 17 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	0
Osmotika 90 mM NaCl 30 min	0

Tab.: 19 Sorbit als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach Sorbit-Kontakt (90 mM, 24 h) wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 0,77 - 2,86 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 17 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	0
Osmotika 90 mM	
Sorbit 30 min	0

Tab. 20: Mannit als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach Mannit-Kontakt (90 mM, 24 h) wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 1,37 - 3,07 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 17 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	0
Osmotika 90 mM Mannit 30 min	0

Tab. 21: Saccharose als Erstsinal und die Wirkung ausgewählter Zweitsignale

Die verschiedenen Signale wurden 24 h nach Saccharose-Kontakt (90 mM, 24 h) wie in der Tabelle angegeben eingesetzt (Kap. 3.4.). Die Werte sind auf die Wirkung des Elicitorkontaktes (Anstieg des Alkaloidgehaltes zwischen 0 h und 24 h) normiert, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Der Kontrollwert (ohne Elicitor) wurde von allen anderen Messwerten vor der Normierung subtrahiert. 100 % Elicitorwirkung von t = 0 h bis t = 24 h: 100 % = 1,20 - 3,67 Alkaloid/Zellen [$\mu\text{g}/\text{Mio}$]. Der fortwirkende Effekt der ersten Elicitorgabe wurde aus mitgeführten Standard-Kulturen ermittelt und bei der Berechnung der Zuwachsraten nach Zweitkontakt subtrahiert. Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Signal (Konzentration, Kontaktzeit)	Zuwachs an Alkaloid/Zellen in 24 h [%] über Kontrolle
Elicitor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min)	0
Buttersäure (4 mM, 15 min)	0
Pivalinsäure (2 mM, 15 min)	0
Mastoparan (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 7 (5 μM , 30 min)	0
Mastoparan 17 (5 μM , 30 min)	0
Methyl-Jasmonat (50 μM , 30 min)	0
Osmotika 90 mM	
Saccharose 30 min	0

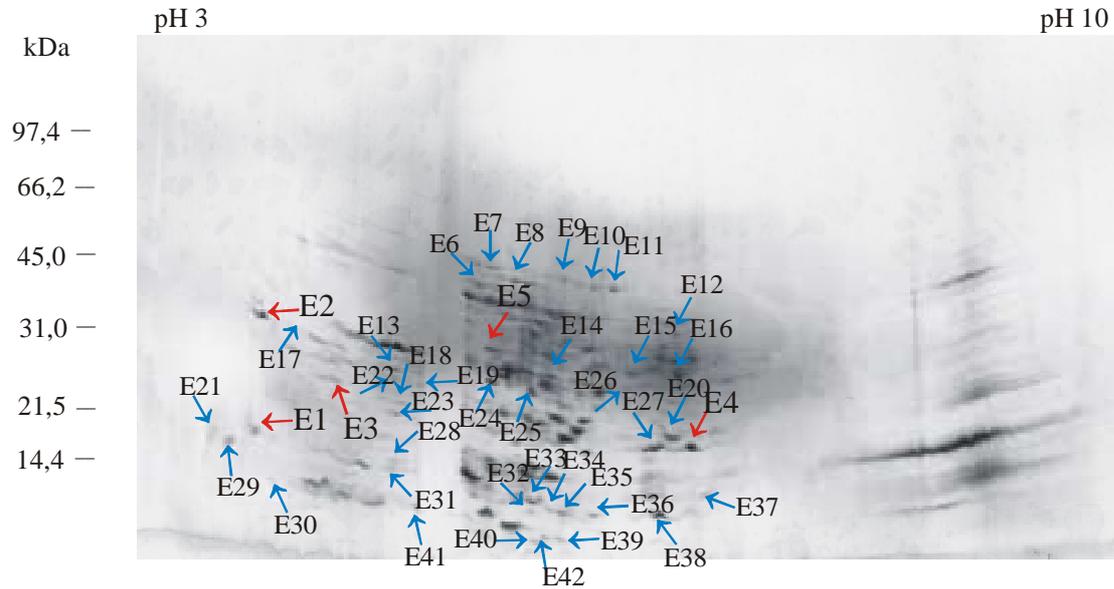
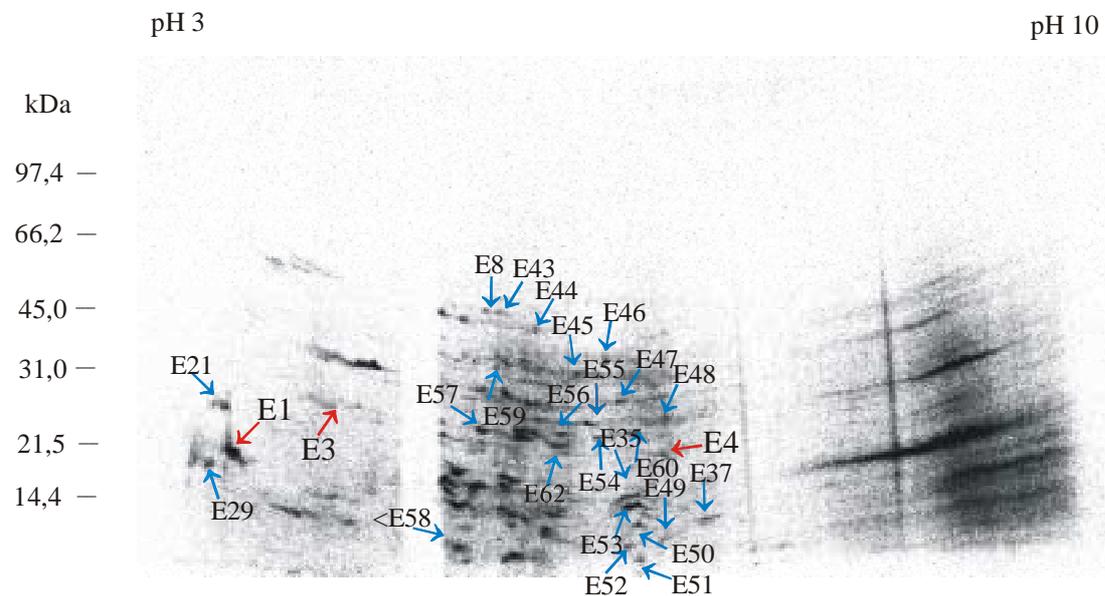
A**B**

Abb. 42: 2D-Gelelektrophorese: Elicitor-Behandlung (t = 0 h: Elicitor-Kontakt 1 µg/ml, 30 min) (Kap. 3.4. ff.), **A** Coomassiefärbung, **B** Imagescreen, Elicitor-Behandlung (Kap. 3.4.). Die roten und blauen Pfeile markieren neu oder überexprimierte Proteine im Vergleich zur Kontrolle. Die mit nummerierten roten Pfeilen markierten Proteine wurden durch MALDI-TOF-Analysen analysiert.

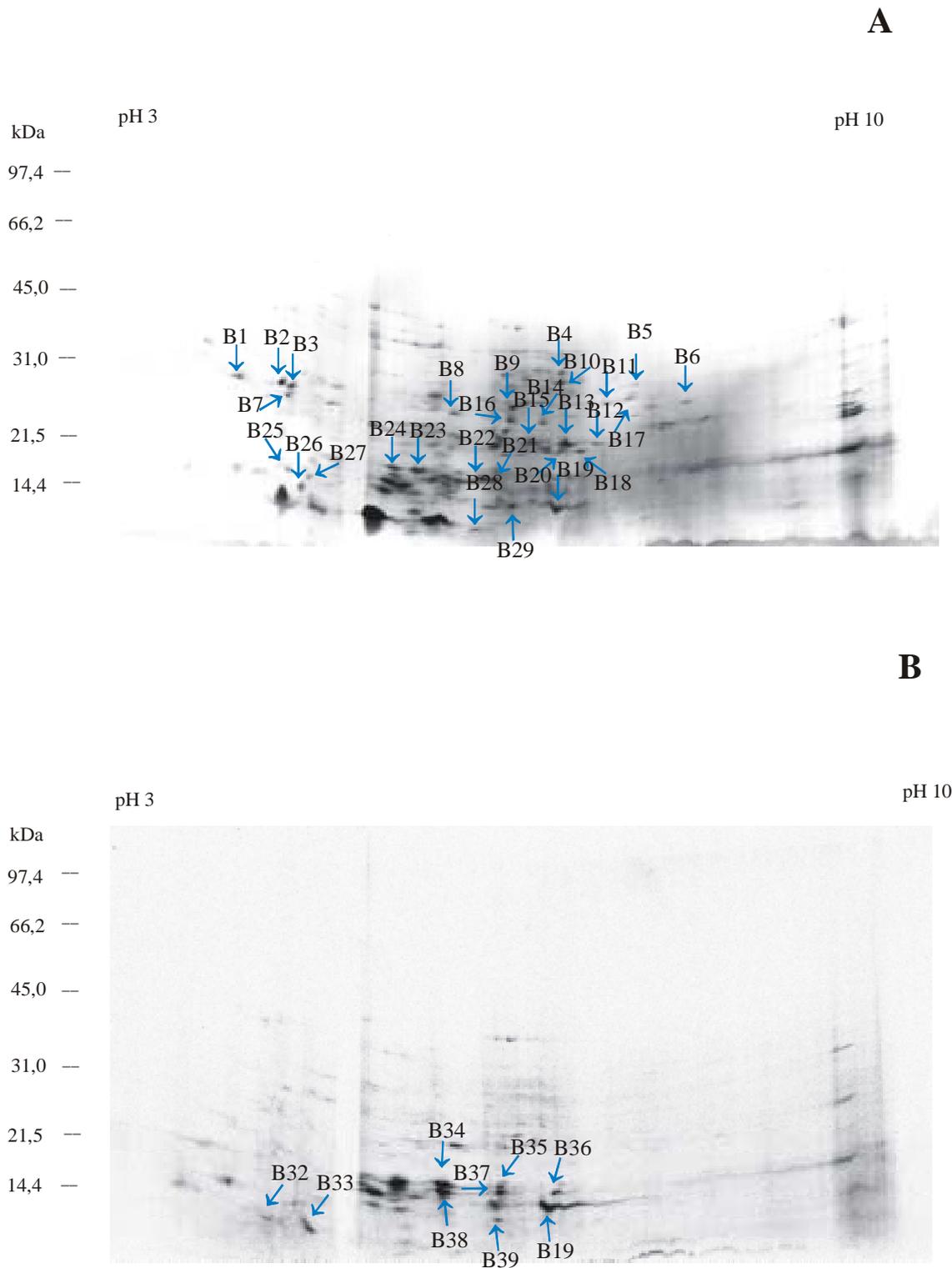


Abb. 44: 2D-Gelelektrophorese: Buttersäure-Behandlung ($t = 0$ h: Buttersäure-Kontakt 4 mM, 15 min, pH 5,0) (Kap. 3.4.), **A** Coomassiefärbung, **B** Imagescreen, Buttersäure-Behandlung (Kap. 3.4.). Die blauen Pfeile markieren neu oder überexprimierte Proteine im Vergleich zur Kontrolle.

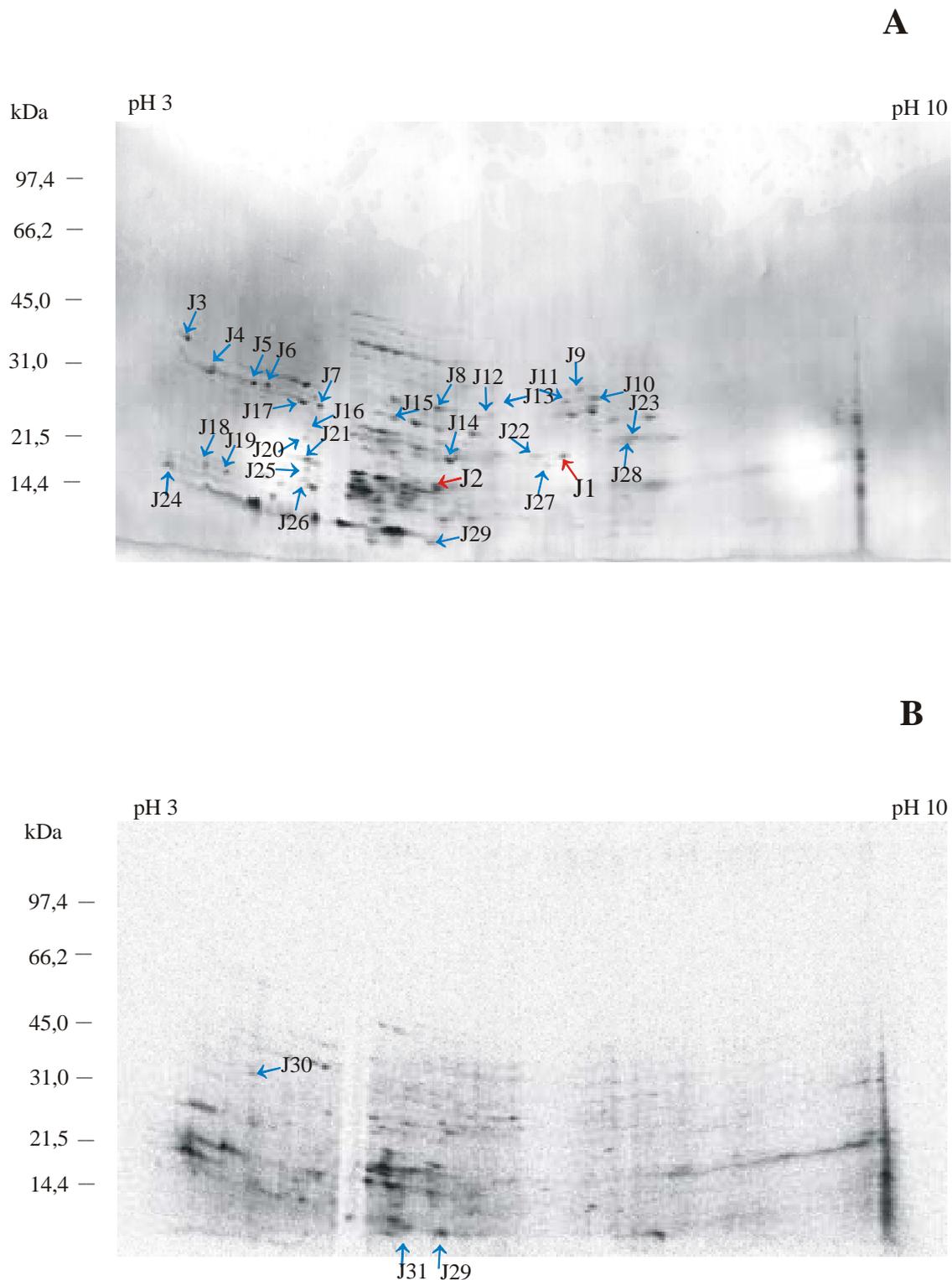


Abb. 45: 2D-Gelelektrophorese: Methyl-Jasmonat-Behandlung (t = 0 h: Methyl-Jasmonat-Kontakt 50 μ M, 30 min) (Kap. 3.4. ff.), **A** Coomassiefärbung, **B** Imagescreen, Methyl-Jasmonat-Behandlung (Kap. 3.4.). Die roten und blauen Pfeile markieren neu oder überexprimierte Proteine im Vergleich zur Kontrolle. Die mit nummerierten roten Pfeilen markierten Proteine wurden durch MALDI-TOF-Analysen analysiert.

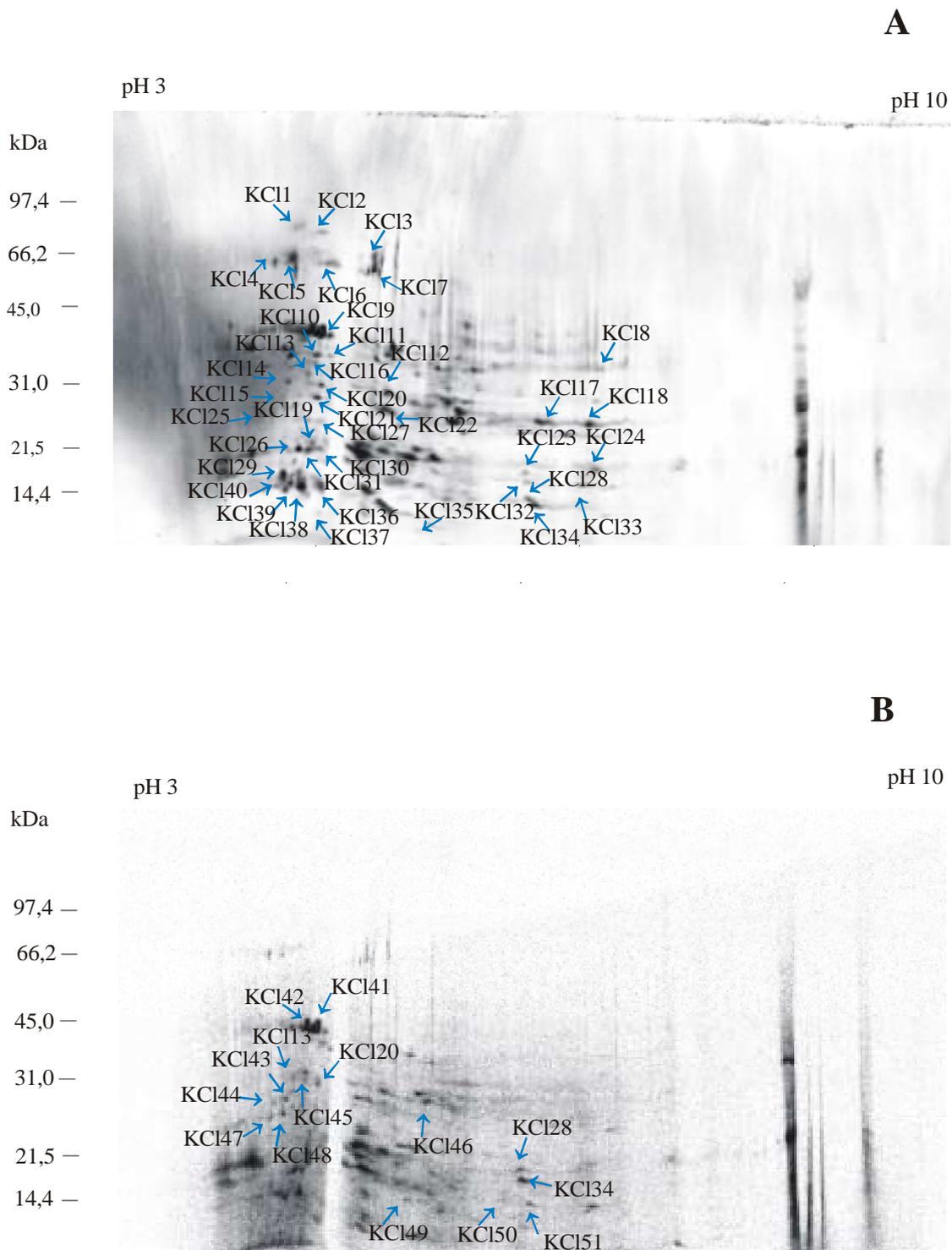


Abb. 46: 2D-Gelelektrophorese: KCl-Behandlung ($t = 0$ h; KCl-Kontakt 90 mM, 24 h) (Kap. 3.4. ff.), **A** Coomassiefärbung, **B** Imagescreen, KCl-Behandlung (Kap. 3.4.). Die blauen Pfeile markieren neu oder überexprimierte Proteine im Vergleich zur Kontrolle.

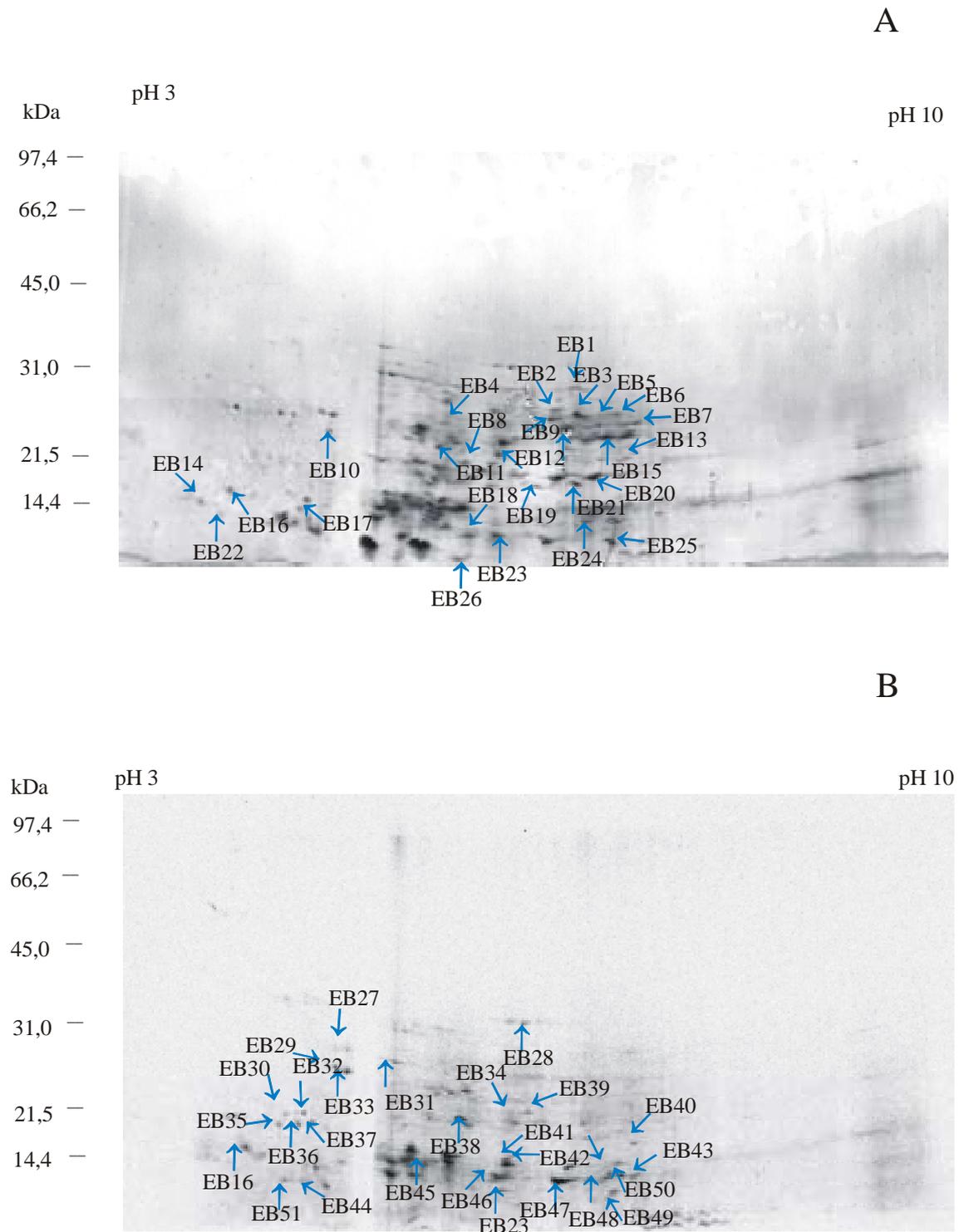


Abb. 49: 2D-Gelelektrophorese: Buttersäure-Behandlung (t = 0 h; Elicitor-Kontakt 1 µg/ml, 30 min; t = 24 h; Buttersäure-Kontakt 4 mM, pH 5,0, 15 min) (Kap.: 3.4. ff.), **A** Coomassiefärbung, **B** Imagescreen, Elicitor- und Butyrat-Behandlung (Kap. 3.4.). Die blauen Pfeile markieren neu oder überexprimierte Proteine im Vergleich zur Kontrolle.

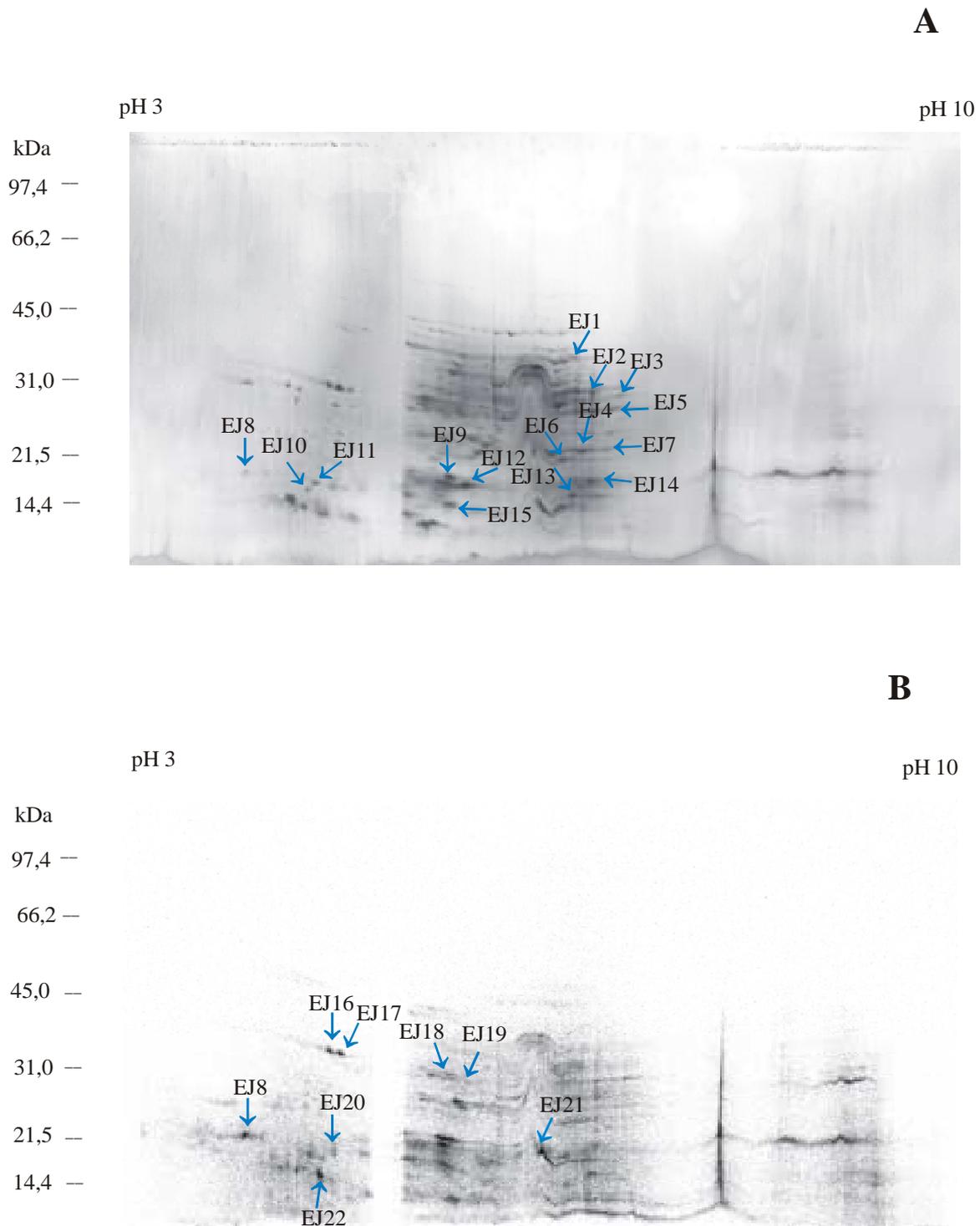


Abb. 50: 2D-Gelelektrophorese: Methyl-Jasmonat-Behandlung (t = 0 h: Elicitor-Kontakt 1 $\mu\text{g/ml}$, 30 min; t = 24 h Methyl-Jasmonat-Kontakt 50 μM , 30 min) (Kap. 3.4. ff.), **A** Coomassiefärbung, **B** Imagescreen, Elicitor- und Methyl-Jasmonat-Behandlung (Kap. 3.4.). Die blauen Pfeile markieren neu oder überexprimierte Proteine im Vergleich zur Kontrolle.

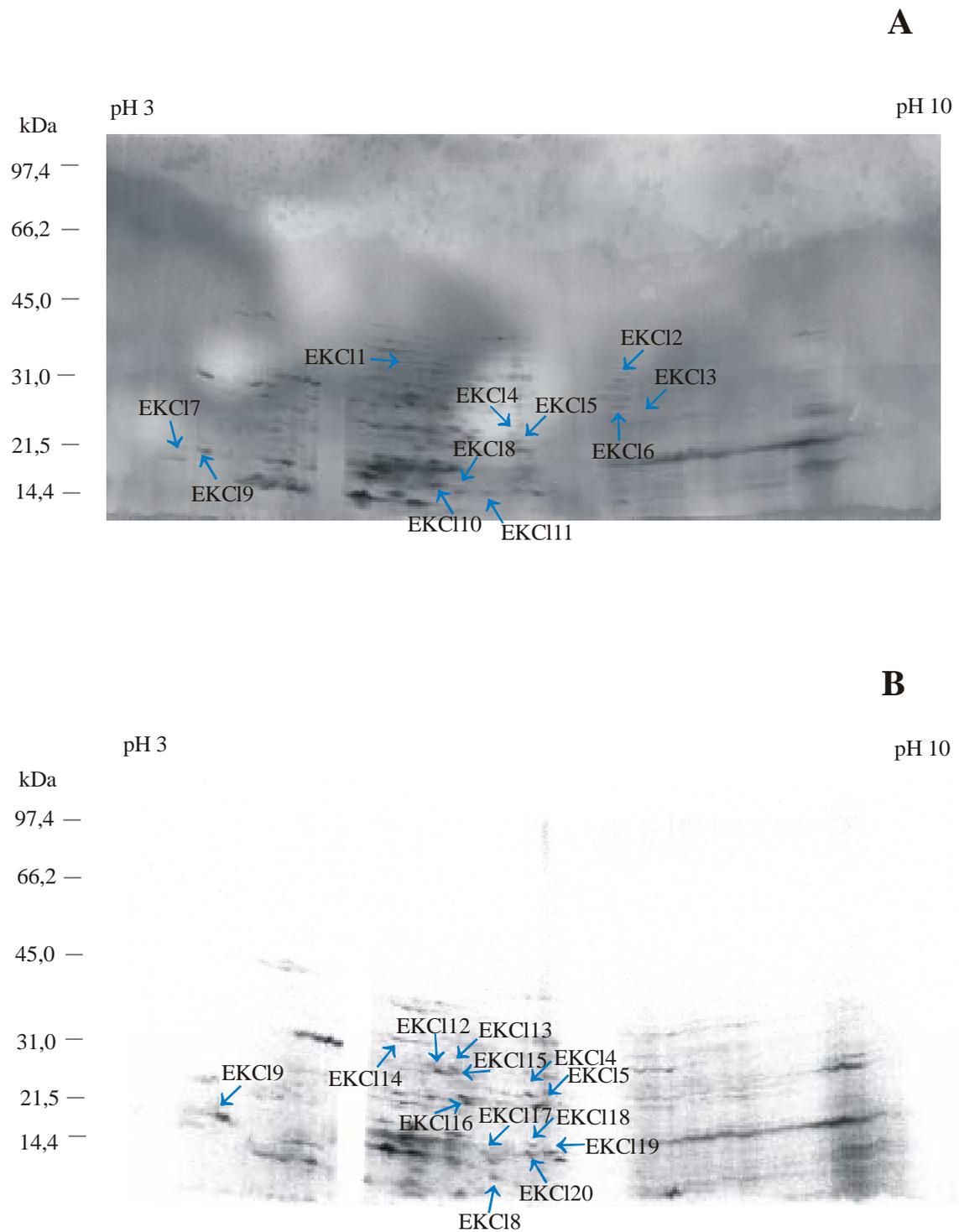


Abb. 51: 2D-Gelelektrophorese: KCl-Behandlung (t = 0 h: Elicitor-Kontakt 1 µg/ml, 30 min; t = 24 h KCl-Kontakt 90 mM, 30 min) (Kap. 3.4. ff.), **A** Coomassiefärbung, **B** Imagescreen, Elicitor- und KCl-Behandlung (Kap. 3.4.). Die blauen Pfeile markieren neu oder überexprimierte Proteine im Vergleich zur Kontrolle.

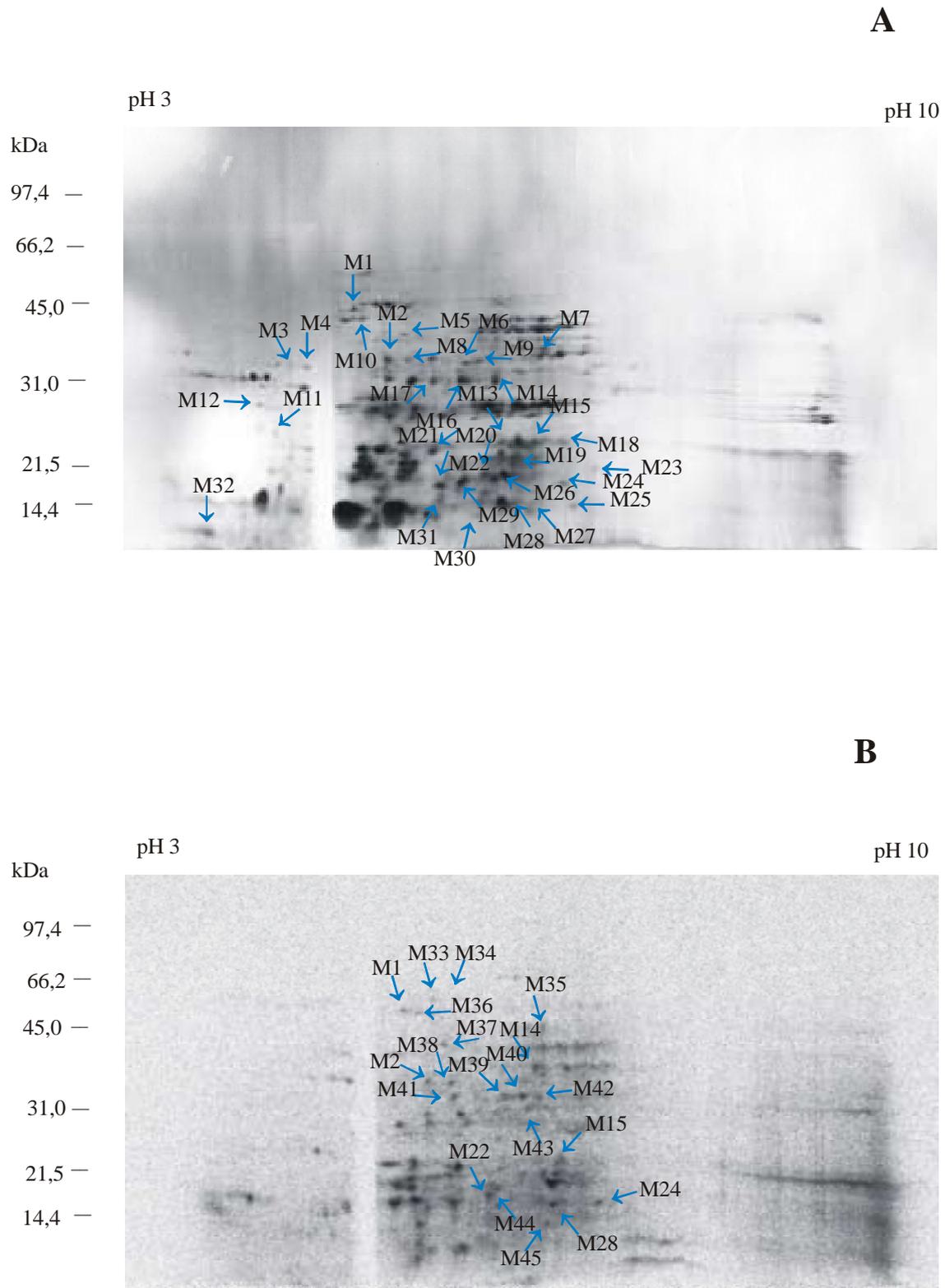


Abb. 52: 2D-Gelelektrophorese: Mutante TG1 - Elicitor-Behandlung (t = 0 h: 1 µg/ml, 30 min) (Kap. 3.4. ff.), **A** Coomassiefärbung, **B** Imagescreen, Elicitor-Behandlung (Kap. 3.4.). Die blauen Pfeile markieren neu oder überexprimierte Proteine im Vergleich zur Kontrolle.

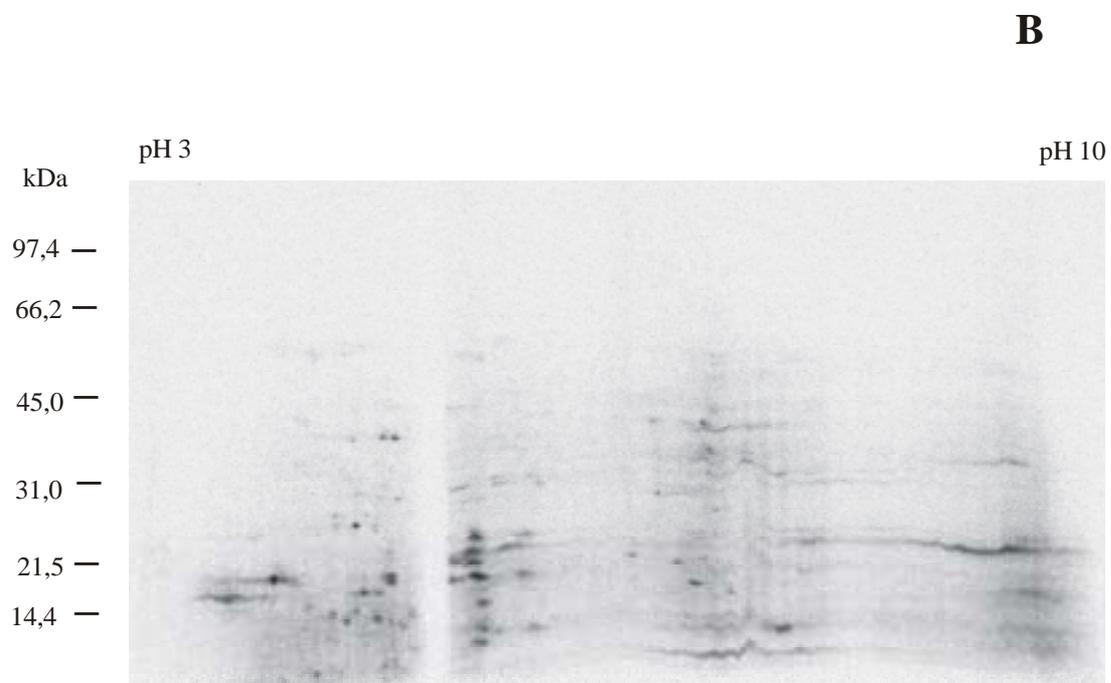


Abb. 53: 2D-Gelelektrophorese: Mutante TG1 - Kontrolle (Kap. 3.4. ff.), **A** Coomassie-färbung, **B** Imagescreen, Kontroll-Behandlung (Kap. 3.4.).

Abb. 54: Proteindaten, gewonnen aus MS-Identifizierung und Datenbanksuche (Kap. 3.4. ff.).

Protein-Spot: **E 1**
 geschätztes Molekulargewicht aus dem 2D-Gel: 18 kDa
 geschätzter pI aus dem 2D-Gel: 3,7
 analysierte Peptid-Sequenz (Molekulargewicht): **EAS** (1967,9 Da)

analog zu: 1. **Auxin-induziertes Protein IAA2**
 (Fragment)
 Spezies: *Lycopersicon esculentum*
 Referenz: Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science

1 VRSYRKNILE ASYVKVSMDG AAYLRKIDLN TYKSYPLLK ALENMFKCSI
 51 DVYSETDGYN GCNYIPTYE

Peptid-Masse: 2099,07 Da 7-25 **NILEASVVKVSMDGAAYLR**

analog zu: 2. **putative Chitinase (AJ309376)**
 Spezies: *Atropa belladonna*
 Referenz: Datenbank: Mascot,
 Fa. Matrix Science, [Nouar, E., (2001):
 Thesis Department of plant
 Biotechnology, Universite de Bruxelles,
 Brussels, Belgium]

1 LGTTWMNFDE YNTIFTKVAY AKKNGLLGYF AWHVGVDDKW **WTLSEQASQAW**
 51 **EA**

Peptid-Masse: 1505,68 Da 40-52 **WTLSEQASQAWEA**

Abb. 55: Proteindaten, gewonnen aus MS-Identifizierung und Datenbanksuche (Kap. 3.4.ff.)

Proteinspot:	E 2
geschätztes Molekulargewicht aus dem 2D-Gel:	33 kDa
geschätzter pI aus dem 2D-Gel:	3,8
analyisierte Peptid-Sequenz (Molekulargewicht):	GGISY bzw. NISY (nicht eindeutig) (1771,69 Da)
analog zu:	1. Transkriptionsregulator (AF329761)
Spezies:	<i>Zea diploperennis</i>
Referenz:	Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science, [Tiffin, P., Gaut, B.S. (2001): Sequencediversity in the tetraploid <i>Zea perennis</i> and the related diploid <i>Z. diploperennis</i> . Insights from four nuclear loci. Genetics 158: 401-412]
<pre> 1 MGRACCEKE GVKRGAWTTK EDDALAAYVK AHGEGKWREV PQKAGLRRCG 51 KSCRLRWLNY LRPNIRRGNI SYDEEDLIIR LHKLLGNRWS LIAGRL </pre>	
Peptid-Masse:	1691,85 Da 67-80 RGNISYDEEDLIIR
analog zu: (AC020579)	2. putatives RNA-binde Protein
Spezies:	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Referenz:	Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science, [Lin, X., Kaul, S., Town, C.D., Benito, H., Haas, B.J., Wu, D., Maiti, R., Ronning, C.M., Koo, H., Fujii, C.Y., Utterback, T.R., 2001, unveröffentlicht]
<pre> 1 MAFLSKVGRL FSQTSSHVTA SSSMLQSIRC MSSSKIFVGG ISYSTDEFGL 51 REAFSKYGEV VDAKIIVDRE TGRSRGFV TFTSTEEASN AMQLDGQDLH 101 GRRIRVNYAT ERGSGFGGRG FGGPGGGYGA SDGGYGAPAG GYGGGAGGYG 151 GNSSYSGNAG GGGGYGGNSS YGGNAGGYGG NPPYSGNAV GGGGYGSNFG 201 GGGGYGVAGG VGGSENFAQG SSTNAGFDDK FESNQPLGND TDHQTESGLG 251 GDEQFGGSDN QFGDAENGNT ENGPVGFDDQ DDGDVAKRA </pre>	

Peptid-Masse: 1759,88 Da 36-51 **IFVGG ISYSTDEFGLR**

Abb. 56: Proteindaten, gewonnen aus MS-Identifizierung und Datenbanksuche (Kap. 3.4. ff.)

Proteinspot: **E 3**
 geschätztes Molekulargewicht aus dem 2D-Gel: 25 kDa
 geschätzter pI aus dem 2D-Gel: 4,5
 analysierte Peptid-Sequenz (Molekulargewicht): **DNNIT** (1918,81 Da)

analog zu: 1. **CTP-Synthase** (AB024033)
 Spezies: *Arabidopsis thaliana*
 Referenz: Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science,
 [Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T.,
 Katoh, T., Asamizu, E., Tabata, S.(2000):
 Structural analysis of *Arabidopsis thaliana*
 chromosome 3. I. sequence features of the
 regions of 4, 504, 864 bp covered by sixty
 P1 and TAC clones. DNA res. 7: 131-135]

```

1 MKYVLVTGGV VSGLGKGVTA SSIGLLLQAC GLRVTSIKID PYLNTDAGTM
51 SPFEHGEV FV LDDGGEVDLD LGNYERFLDS TLTRDNNITT GKIYQSVIDK
101 ERKGDYLGRT VQVVPHTDA IQEWIERVAN VPDGKEGPP DVCVIELGGT
151 IGDIESMPFI EALGQFSYKV GPGNFCLVHV SLVPVLSVVG EQTKPTQHS
201 VRGLRSLGLT PNILACRSTK ALEENVKTKL SQFCHVPEVN IVTLYDVPNI
251 WHVPLLLRDQ KAHEAILREL NLSNAIKPDL TEWTARTKIY DTLQDPVRIA
301 MVGKYTGLTD SYLSVLKALL HASVACHKKL VIEWVAASDL EEITAQETPD
351 VHKAARDLLK GADGILVPGG FGDRGVQGI LATKYARENQ VPFLGICLGM
401 QLAVVEFARS ILGFHDANST EFEPE TSSPC IIFMPEGSTT HMGGMRLGS
451 RKTYFQVADC KSAKLYGNAK FVDERHRHRY EVNPD MISEI EKAGLSFVGK
501 DETGRRMEIV ELPSHPYFVG AQFHPEFKSR PGKPSALFLG LIAAASGCLE
551 SVLQTGGKVN IVSKNGVANG SAMGKVHONG NVYSNGNGLH H

```

Peptid-Masse: 1807,93 Da 85-100 **DNNITGKIYQSVIDK**

Abb. 57: Proteindaten, gewonnen aus MS-Identifizierung und Datenbanksuche (Kap. 3.4. ff.)

Protein-Spot: **E 4**
 geschätztes Molekulargewicht aus dem 2D-Gel: 20 kDa
 geschätzter pI aus dem 2D-Gel: 7,0
 analysierte Peptid-Sequenz (Molekulargewicht): **ETTA** (1627,9 Da)

analog zu: 1. **Superoxiddismutase** (EC1.15.1.1)
 Spezies: *Cinnamomum camphora*
 Referenz: Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science,
 [Chen, H.Y., Chen, W.F., Liu, W.Y.,
 Wang, T.P., Schroeder, W., Franke, P.,
 Ulbrich, N., 1998, unveröffentlicht]

```

1 PAISGEIMQL HHQNHHQTYV TNYNKALEQL DDAMAKGDAP TVVKLQSAIK
51 FNGGGHINHS IFWKNLIPIH EGGGEPPKGS LGWAIDMHFG SFEALLQKMN
101 AEGAALQGSW WWLGLDKEL KRLVVETTAN QDPLVTKGAS LVPLLGDVW
151 EHAYYLQYKN VRPDYLNNIW KVINWKYASE LYEKESP

```

Peptid-Masse: 1626,88 Da 123-137 **LVVETTANQDPLVTK**

Abb. 58: Proteindaten, gewonnen aus MS-Identifizierung und Datenbanksuche (Kap. 3.4. ff.)

Protein-Spot: **E 5**
 geschätztes Molekulargewicht aus dem 2D-Gel: 29 kDa
 geschätzter pI aus dem 2D-Gel: 5,8
 analysierte Peptid-Sequenz (Molekulargewicht): **IFRT** (1265,68 Da)
NND (1174,68 Da)

analog zu: 1. **Lipoxygenase** partial coding sequenz
 (AC064840)

Spezies: *Arabidopsis thaliana*

Referenz: Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science

```

1  MFGELRDLLT  GGGNETTTKK  VKGTVVLMKK  NVLDFNDFNA  SFLDRLHEFL
51  GNKITLRLVS  SDVTDSENGS  KGKLGKAAHL  EDWITTTITSL  TAGESAFKVT
101  FDYETDFGYP  GAFLIRNSHF  SEFLLKSLTL  EDVPGHGRVH  YICNSWIYPA
151  KHYTTDRVFF  SNKTYLPHET  PATLLKYREE  ELVSLRGTGE  GELKEWDRVY
201  DYAYYNDLGV  PPKNPRPVLG  GTQEYPYPRR  GRTGRKPTKE  DPQTESRLPI
251  TSSLDIYVPR  DERFGHLKMS  DFLAYALKAI  AQFIQPALEA  VFDDTPKEFD
301  SFEDVLKIYE  EGIDLPNQAL  IDSIVKNIPL  EMLKEIFRTD  GQKFLKFPVP
351  QVIKEDKTAW  RTDEEFAREM  LAGLNPVVIQ  LLKEFPPKSK  L

```

Peptid-Masse: 1092,56 Da 335–343 **E**IFRTD**GQK**

analog zu: 3. **Lipoxygenase** (U36192)

Spezies: *Glycine max*

Referenz: Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science

```

1  LIEKNNDETL  RNRYGPAMP  YTLLYPSSEE  GLTFRGIPNS  ISI

```

Peptid-Masse: 1130,54 Da 5-13 **NNDETLRNR**
 analog zu: 3. **Lipoxygenase**
 Spezies: *Arabidopsis thaliana*
 Referenz: Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science

```

1 MFGELRDLLT GGGNETTTKK VKGTVVLMKK NVLDFNDFNA SFLDRLHEFL
51 GNKITLRLVS SDVTDSSENGS KGKLGKAAHL EDWITTITSL TAGESAFKVT
101 FDYETDFGYP GAFLIRNSHF SEFLKSLTL EDVPGHGRVH YICNSWIYPA
151 KHYTTDRVFF SNKTYLPHEP PATLLKYREE ELVSLRGTGE GELKEWDRVY
201 DYAYYNDLGV PPKNPRPVLG GTQEYYPYPRR GRTGRKPTKE DPQTESRLPI
251 TSSLDIYVPR DERFGHLKMS DFLAYALKAI AQFIQPALEA VFDDTPKEFD
301 SFEDVLKIYE EGIDLPNQAL IDSIVKNIPL EMLKEIFRTD GQKFLKFPVP
351 QVIKEDKTAW RTDEEFAREM LAGLNPVVIQ LLKEFPPKSK LDSESYGNQN
401 STITKSHIEH NLDGLTVEEA LEKERLFILD HHDTLMPYLG RVNTTTTKTY
451 ASRTLLFLKD DGTLKPLVIE LSLPHPNGDK FGAVSEVYTP GEGVYDSLWQ
501 LAKAFVGVND SGNHQLISHW MQTHASIEPF VIATNRQLSV LHPVFKLLEP
551 HFRDTMNINA LARQILINGG GIFEITVFPS KYAMEMSSFI YKNHWTFPDQ
601 ALPAELKKRG MAVEDPEAPH GLRLRIKDYP YAVDGLVWY AIESWVRDYI
651 FLFYKIEEDI QDTELQAWW KEVREEGHGD KKSEPWWPKM QTREELVESC
701 TIIIWVASAL HAAVNFGQYP VAGYLPNRPT ISRQYMPKEN TPEFEELEKN
751 PDKVFLKTIT AQLQTLLGIS LIEILSTHSS DEVYLGQRDS KEWAAEKEAL
801 EAFEKFGKVK KEIEKNIDER NNDETLKNRT GLVKMPYTLL FPSSEGGVTG
851 RGIPNSVSI

```

Peptid-Masse: 1092,56 Da 335-343 **EIFRTDGQK**

Abb. 59: Proteindaten, gewonnen aus MS-Identifizierung und Datenbanksuche (Kap. 3.4. ff.)

Protein-Spot:

J 1

geschätztes Molekulargewicht aus dem 2D-Gel: 18 kDa
 geschätzter pI aus dem 2D-Gel: 7,0
 analysierte Peptid-Sequenz (Molekulargewicht): **ETTA** (1627,9 Da)

analog zu: 1. **Superoxiddismutase** (EC1.15.1.1)
 Spezies: *Cinnamomum camphora*
 Referenz: Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science,
 [Chen, H.Y., Chen, W.F., Liu, W.Y.,
 Wang, T.P., Schroeder, W., Franke, P.,
 Ulbrich, N., 1998, unveröffentlicht]

```

1 PAISGEIMQL HHQNHHTYV TNYNKALEQL DDAMAKGDAP TVVKLQSAIK
51 FNGGGHINHS IFWKNLIPIH EGGGEPPKGS LGWAIDMHFG SFEALLQKMN
101 AEGAALQGS WVLGLDKEL KRLVVETTAN QDPLVTKGAS LVPLLGIDVW
151 EHAYYLQYKN VRPDYLNNIW KVINWKYASE LYEKESP

```

Peptid-Masse: 1626,88 Da 123-137 **LVVETTANQDPLVTK**

Abb. 60: Proteindaten, gewonnen aus MS-Identifizierung und Datenbanksuche (Kap. 3.4. ff.)

Protein-Spot:	J 2
geschätztes Molekulargewicht aus dem 2D-Gel:	17,0 kDa
geschätzter pI aus dem 2D-Gel:	5,8
analyisierte Peptid-Sequenz (Molekulargewicht):	GTDLVS (2046 Da) EFY (1774 Da)
analog zu:	1. Apoptosis Inhibitor homolog (T4I9.12)
Spezies:	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Referenz:	Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science, [Parnell, L.D., Gnoj, L., de la Bastide, M., Hameed, A., Habermann, K., Schutz, K., Huang, E., Gottesman, T., Dedhia, N.N., McCombie, W.R. 1998, unveröffentlicht]

```

1 MVEKQEEMNE FGAVNGGKVG TSSSVSPQD KGRKNKRKLA DPSPQNAASL
51 TEFPRYELHS FKSQSPLCEN DSNGLKAE SDSVGWDDPF ACHLEGLLS
101 NLLTLFRSAM NQIMDCGYSE DVVLKAISS RFYCGGTDLV SNIVNDTLSF
151 LKSGKKVAGS RDYVFEDLQQ LVAYSLVEKI SLVREVRPSL STDEAMWRL
201 ICDLNVLKAF EVDADGLEGS SVSNASKSSE SPVAECNPPK SSDADNPKAP
251 VSNTQSKQSE PVKFGNFANV NNSKNPHASG ATPGKEVFSV STASGEGTKS
301 ASLTSVSDEK LVSCRKGRTK KEMAMLRQKS CVEKIRTYSK GGGYKTAKFG
351 GFLVEKRGKS ASDLLSAQAR NSSSKITTEV MKIPLAESS TLSNSTKSDS
401 PALDVKEHVT ALPANNAPAP VASEKKSSE PEEKPSVSTK PPDYAAIP
451 YDATLGIYIP RNKRDELILK LVPRMKDLQK ELQDWDWAN QKVKQATVRL
501 LKDQPELKAL RKEKEEAEFF RKEKQLEEN TIKRRSEMEL ALNNATNQL
551 RTNNTIRRLE LEQSLLKRER EAANIRASES AESCREAKER VQRLKNSQS
601 WEGQKNLLQE ELKSQRDKVA GLQEVAKAK TRQNQIEVSS FVGKMPHLVL
651 GLLVFGAVIY CMTTDHIIS TILFSAIKM TNETKLQATW KQEKSATGKL
701 TAQAAALKKE RGKLEELGKA EEERIKTKAE NDVKYYIENI KRLDTEISKL
751 KLKSDSLKIA ALKKGIDGNN DGNKSGMNHT TNTKANSMAS AKVWENNQGA
801 ESIKREREC VMCLSEEMSV IFLPCAQVL CSKCNQLHEK EAMEDCPSCR
851 AKIQRRIQAR FARG

```

Peptid-Masse: 2305,13 Da 132-152 **FYCGGTDLVSNIVNDTLSFLK**

analog zu: 2. **Cytochrom C Oxydase** (AB006702)
Spezies: *Arabidopsis thaliana*
Referenz: Datenbank: Mascot, Fa. Matrix Science,
[Kotani, H., Nakamura, Y., Sato, S.,
Kaneko, T., Asamizu, E., Tabata, S.
(1997): Structural analysis of *Arabidopsis*
thaliana chromosome 5. II. Sequence
features of the regions of 1,044,062 bp
covered by thireteen physically assigned
P1 clones. DNA res. 4: 291-300 1997]

1 MANVQKIGKA VYKGPSVVKE IIYGITLGFA VGGLWKMHHW NNQRRTK**EFY**
51 **DLLEKGEISV VVEDE**

Peptid-Masse: 2112,01 Da 48-65 **EFYDLLEKGEISVVVEDE**

7. Literaturverzeichnis

- [1] Akazawa, T. (1960): Chromatographic isolation of pure ipomeamarone and reinvestigation on its chemical properties. Arch. Biochem. Biophys. 90, 82-89
- [2] Alleen, E.H.; Thomas, C.A. (1971): Trans-trans-3,11-tridecadienne-5, 7, 9-triyn-1, 2-diol, an antifungal polyacetylene from diseased safflower (*Carthamus tinctorius*) Phytochemistry 10, 1579-1582
- [3] Alvarez, M.E.; Dixon, R.A.; Lamb, C. (1998): Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network and the establishment of plant immunity. Cell, 92: 773-784
- [4] Anderson, A.J: (1978): Isolation from three species of *Colletotrichum* of glucan-containing polysaccharides that elicit browning and phytoalexin production in bean. Phytopathol. 68: 189-194
- [5] Apostol, I, Heinstein, P.F.; Low, P.S. (1989): Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultures plant cells. Plant Physiol. 90: 109-116
- [6] Atkinson, M.M.; Midland, S.L.; Sims, J.J.; Keen, N.T. (1996): Syringolide 1 triggers Ca^{2+} influx, K^+ efflux, and extracellular alkalization in soybean cells carrying the disease resistance gene Rpg4. Plant Physiol. 112: 297-302
- [7] Bach, M.; Schnitzler, J.P.; Seitz, H.U. (1993): Elicitor-induced changes in Ca^{2+} influx, K^+ efflux, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplasts of *Daucus carota* L. Plant Physiol, 103: 407-412
- [8] Basse, C.W.; Fath, A.; Boller, T. (1993): High affinity binding of glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. J. Biol. Chem. 268: 14724-14731
- [9] Bell, A.A.; Stipanovic, R.D.; Howell, C.R.; Fryxell, P.A. (1975): Antimicrobial terpenoids of *Gossypium*: Hemogossypol, 6-Methoxyhemigossypol and 6-Deoxyhemigossypol. Phytochemistry 14: 225 -231

- [10] Berlin, J.; Forche, E.; Wray, V.; Hammer, J.; Hösel, W. (1983): Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. Z. Naturforsch. 38c: 346-352
- [11] Bilton, J.N.; Debnam, J.R.; Smith, I.M. (1976): 6a-Hydroxypterocarpanes from red clover. Phytochemistry 15: 1411-1412
- [12] Binet, M.-N.; Bourque, S.; Lebrun-Garcia, A.; Chiltz, A.; Pugin, A. (1998): Comparison of the effects of cryptogein and oligogalacturonides on tobacco cells and evidence of different forms of desensitization induced by these elicitors. Plant Science, 137: 33-41
- [13] Bird, D.A.; Facchini, P.J. (2001): Berberine bridge enzyme, a key branch-point enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, contains a vacuolar sorting determinant. Planta 213: 888-897
- [14] Bishop, J.G.; Dean, A.M.; Mitchell-Olds, T. (2000): Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 5322-5327
- [15] Bleichert, S.; Brodschelm, W.; Holder, S.; Kammerer, L.; Kutchan, T.M.; Mueller, M.J.; Xia, J.Q.; Zenk, M.H. (1995): The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 4099-4105
- [16] Blee, E. (1998): Phytooxylipins and plant defense reactions. Prog. Lipid Res. 37: 33-72
- [17] Boller, T. (1995): Chemoperception of microbial signals in plant cells. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 189-214
- [18] Bostock, R.M.; Kuc, J.A.; Laine, R.A. (1981): Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicits fungitoxic sesquiterpenes in the Potato. Science 212: 247-262

-
- [19] Bowles, D.W. (1990): Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 873-907
- [20] Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- [21] Bradley, D.J.; Kjellbom, P.; Lamb, C.J. (1992): Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a prolinerich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* 70: 21-30
- [22] Brisson, L.F.; Tenhaken, R.; Lamb, C. (1994): Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6: 1703-1712
- [23] Brooks, S.C.; Brooks, M.M. (1941): The permeability of living cells, cites in: Levitt, J. (1956) Osmosis and permeability. In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. 3: Pflanze und Wasser*, 22-29, Ruhland, W. ed. Springer, Berlin Göttingen, Heidelberg
- [24] Bukhari, S.T.K.; Guthrie, R.D. (1969): Structure of Rishitin. An example of the use of cuprammonium complexing in structural education. *J. Chem. Soc. C.*, 1073-1079
- [25] Burden, R.S.; Bailey, J.A.; Dawson, G.W. (1972): Structures of three new isoflavonoids from *Phaseolus vulgaris* infected with tobacco necrosis virus. *Tetrahedron Lett.* 1972, 4175-4178
- [26] Caporale, L.H. (1995): Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 755-82
- [27] Cassab, G. (1998): Plant cell wall proteins. *Ann. Rev. Physiol.* *Plant Mol. Biol.* 49: 281-310
- [28] Chandra, S.; Heinstein, P.F.; Low, P.S. (1996): Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiol.* 110, 979-986

- [29] Chandra, S.; Stennis, M.; Low, P.S. (1997): Measurement of Ca^{2+} fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J. Biol. Chem.* 272: 28274-28280
- [30] Chandra, S.; Cessna, S.G.; Yahraus, T. Devine, R.; Low, P.S. (2000): Homologous and heterologous desensitization and synergy in pathways leading to the soybean oxidative burst. *Planta* 211: 736-742
- [31] Chaturvedi, M.M.; Kumar, A.; Darnay, B.G.; Chainy, G.B.N.; Agarwal, S, Aggarwal, B.B. (1997): Sanguinarine (Pseudochelerythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation, and degradation. *J. Biol. Chem.* 272: 30129-30134
- [32] Choi, D.; Bostock, R.M.; Avdiushko, S.; Hildebrand, F. (1994): Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: Methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2329-2333
- [33] Cline, K.; Wade, M.; Albersheim, P. (1978): Host-pathogen interactions: XV. Fungal glucans which elicit phytoalexin accumulation in soybean also elicit the accumulation of phytoalexins in other plants. *Plant Physiol.* 62: 918-921
- [34] Cohen, G.M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1-16
- [35] Coxen, D.T.; Curtis, R.F.; Price, K.R.; Howard, B (1974): Phytuberin: A novel antifungal terpenoid from Potato. *Tetrahedron Lett.*: 2363-2366
- [36] Creelmann, R.A.; Mullet, J.E. (1997): Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 355-381
- [37] Csonka, L.N.; Hanson, A.D.(1991): Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 28274-28280

-
- [38] Czajka, S. (1997): Strategien der Infektabwehr bei Pflanzen: Ein Überblick. Pharmazeutische Zeitung, 27, 142. Jahrgang, 11-18
- [39] Daveraux, Q.L.; Reed, J.C. (1999): IAP family proteins - suppressors of apoptosis. Genes Dev. 13, 239-252
- [40] Day, P.R. (1971): Genetics of host-parasite interaction, San Francisco
- [41] Delledonne, M.; Xia, Y.; Dixon, R.A.; Lamb, C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance, Nature 394: 585-588
- [42] Deus-Neumann, B.; Zenk, M.H. (1984): A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. Planta 162: 250-260
- [43] Deus-Neumann, B.; Zenk, M.H. (1986): Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion-trap mechanism. Planta 167: 44-53
- [44] de Witt, P.J.G.M; Roseboom, P.H.M (1980): Isolation, partial Characterization and specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates, mycelium and cell wall of *Cladosporium fulvum* (Syn. *Fulvia fulva*). Physiol. Plant Pathol. 16: 391-408
- [45] de Witt, P.J.G.M. (1997): Pathogen avirulence and plant resistance: A key role for recognition. Trends Plant Sci. 2: 452-458
- [46] Dixon, R.A. (1986): The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression, Biol. Rev. 61: 239-291
- [47] Dixon, R.A.; Paiva, N.L. (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Biol. 1: 316-323
- [48] Doll, S.; Rodier, F.; Willenbrink, J. (1979): Accumulation of sucrose in vacuoles isolated from red beet tissue. Planta 144: 407-411

- [49] Dong, X. (1998): SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 316-323
- [50] Du, L.; Chen, Z. (2000): Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible target of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24(6): 827-847
- [51] Ebel, J.; Cosio, E.G. (1994): Elicitors of plant defense response. *Int. Rev. Cytol.* 148: 1-36
- [52] Ebel, J.; Bhagwat, A.A.; Cosio, E.G.; Feger, M.; Kissel, U.; Mithöfer, A.; Waldmüller, T. (1995): Elicitor-binding proteins and signal transduction in the activation of a phytoalexin defense response. *Ca. J. Bot.* 73: 506-510
- [53] Ebel, J.; Scheel, D. (1997): Signals in host-parasite interaction. In *The Mycota, Part A, Plant Relationships* (Carroll, G.; Tudzynski, P.; eds.), Springer Verlag Berlin: 85-105
- [54] Ebel, J.; Mithöfer, A. (1998): Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* 206: 335-348
- [55] Ehrhardt, D.W.; Atkinson E.M.; Long S.R. (1992): Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* nod factors. *Science* 256: 998-1000
- [56] Elstner et al. (1996): *Phytopathologie*, Spektrum Akademischer Verlag
- [57] Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S. (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50
- [58] Esquerre-Tugaye, M.-T.; Lafitte, C.; Mazau, D.; Toppan, A. Touze, A. (1979): Cell surfaces in plant-microorganism interactions. II Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall diseased plants as a defense mechanism. *Plant Physiol* 64: 320-326

- [59] Esquerre´-Tugaye´, M.-T.; Mazau, D.; Pelissier, B.; Roby, D.; Toppam, A. (1984): Elicitors and ethylene trigger defense responses in plants. In: Fuchs, Y.; Chalutz (eds) Ethylene: biochemical, physiological and applied aspects. Martinus Nijhoff, The Hague: 217-218
- [60] Eulgem, T.; Rushton, P.J.; Schmelzer, E.; Hahlbrock, K.; Somssich, I.E. (1999): Early nuclear defense signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. EMBA 18(17):4689-4699
- [61] Eulgem, T.; Rushton, P.J.; Robatzek, S.; Somssich, I.E. (2000): The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends Plant Sci. 5(5):199-206
- [62] Facchini, P.J.; Bird, D.A. (1998): Developmental regulation of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy plants and tissue cultures. In vitro cellular and developmental biology. Plant 34(1): 69-79
- [63] Facchini, P.J.; Johnson, A.G.; Poupart, J.; De Luca, V. (1996): Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. Plant Physiol. 111: 687-697
- [64] Faccini, P.J.; Huber-Allanach, K.L.; Tari, L.W. (2000): Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. Phytochemistry 54: 121-138
- [65] Facchini, P.J. (2001): Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.: 52, 29-66
- [66] Faddeeva, M.D.; Belaeva, T.N. (1997): Sanguinarine and ellipticine cytotoxic alkaloids isolated from well-known antitumor plants. Intracellular targets of their action. Tsitologija 39: 181-208
- [67] Färber, K.; Schumann, B.; Roos, W. (2002): Manuskript in Vorbereitung

- [68] Fawcett, C.H.; Firn, R.D.; Spencer, D.M. (1971): Weyerone increase in leaves of broad bean (*Vicia faba* L.) after infection by *Botrytis fabae*. *Physiol. Plant Pathol.* 163-166
- [69] Felix, G.; Regenass, M.; Boller, T. (1993): Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: inductions of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* 4: 307-316
- [70] Felix, G.; Baureithel, K.; Boller, T. (1998): Desensitization of the perception system for chitin fragment in tomato cells. *Plant Physiol.* 117: 643-650
- [71] Felix, G.; Regenass, M.; Boller, T. (2000): Sensing of osmotic pressure changes in tomato cells. *Plant Physiology.* 124: 1169-1179
- [72] Feussner, I.; Kühn, H.; Wasternack, C. (2001): Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in Plant Science* 6: 268-273
- [73] Flor, H.H. (1971): Current status of gene-for-gene concept. *Annu Rev. Phytopathol.* 9: 275-296
- [74] Frenzel, T.; Beale, J.M.; Kobayashi, M.; Zenk, M.H.; Floss, H.G. (1988): Stereochemistry of enzymatic formation of the berberine bridge in protoberberine alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 7878-7880
- [75] Garcia-Ruiz, C.; Colell, A.; Mari, M.; Morales, A.; Fernandez-Checa, J.C.(1997): Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.* 272: 11369-11377
- [76] Gäumann, E. (1964): Weitere Untersuchungen über die chemische Infektabwehr der orchideen. *Phytopath. Z.*: 212-232
- [77] Gehring, C.A.; Irving, H.R.; Parish, R.W. (1990): Effects of auxine and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9645-9649

- [78] Gesell, A. (2001): Untersuchungen zur Elicitor-abhängigen Aktivierung von G-Proteinen in *Eschscholzia californica*. Diplomarbeit
- [79] Glazebrook, J. L.; Ausubel, F.M. (1994): Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interaction with bacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8955-8959
- [80] Glazebrook, J. (2001): Genes controlling expression of defense response in *Arabidopsis* - 2001 status. Current Opinion in Plant Biology 4: 301-308
- [81] Gordon, M.; Stoessl, A.; Stothers, J.B. (1973): Post-infectious inhibitors from plants. IV: The structure of capsidiol, an antifungal sesquiterpene from sweet peppers. Can. J. Chem. 51: 748-752
- [82] Greenberg, J.T. (1997): Programmed cell death in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Physiol. 48: 525-545
- [83] Grisebach, H.; Ebel, J. (1978): Phytoalexine, chemische Abwehrstoffe höherer Pflanzen? Angew. Chemie 90: 668-681
- [84] Groten, K.; Barz, W. (2000): Elicitor-induced defense reactions in cell suspension cultures of soybean cultivars. Z. Naturforsch.: 718-730
- [85] Guern, J.; Kurdjian, A.; Barbier, H.; Manigault, P.; Quiquampiox, H.; Renaudin, J.P. (1982): Difference in electrochemical potential for protons on both sides of the tonoplast and vacuolar accumulation system. Actual. Bot. 3: 95-105
- [86] Guèdon, D.; Cappelaere, N.; Simanek, V. (1990): HPLC analysis of the main alkaloids from *Eschscholzia californica*. Phytochem. Anal. 1: 77-82
- [87] Gundlach, H. (1987): Untersuchungen zur Wirkung mikrobieller Elicitoren auf Zellkulturen von *Eschscholzia californica*. Diplomarbeit Ludwig-Maximilians-Universität München

- [88] Gundlach, H. (1992): Dissertation zum Thema: Das Abwehrsystem der Pflanzen: Reinigung eines Elicitors und Induktion von Sekundärstoffen in pflanzlichen Zellkulturen.
- [89] Hadwicker, L.A.; Beckmann, J.M. (1980): Chitosan as a component of Pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiol.* 66: 205-211
- [90] Hahn, M.G. (1996): Microbial elicitors and their receptors in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 387-412
- [91] Haider, G.; Kislinger, T.; Kutchan, T. (1997): Barbiturate induced benzophenanthridine alkaloid formation proceeds by gene transkript accumulation in the California Poppy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 241: 606-610
- [92] Haider, G.; von Schrader, T.; Fülllein, M.; Blechert, S.; Kutchan, T.M. (2000): Structure-activity relationships of synthetic analogs of jasmonic acid and coronatine on induction of benzo[c]phenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholzia californica* cell cultures. *Biol. Chem.* 381: 741-748
- [93] Hamberg, M. (1995): Hydroperoxide isomereases. *J. Lipid Mediators Cell Signal.* 12: 283-292
- [94] Hammond-Kosack, K.E.; Jones, J.D.G. (1996): Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791
- [95] Hancock, J.T.; Desikan, R.; Neill, S.J. (2001): Does the redox status of cytochrome C act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death? *Free Radical Biol. & Medicine*, 31(5): 697-703
- [96] Hardegger, E.; Biland, H.R.; Corrodi, H. (1963): Synthese von 2,4-Dimethoxy-6-hydroxy-phenanthren und Konstitution des Orchinols. *Helv. Chim. Acta* 46, 1354

- [97] Hauschild, K.; Hubert, H.P.; Kutchan, T.M. (1998): Isolation and analysis of a gene *bbe1* encoding the berberine bridge enzyme from the california poppy *Eschscholzia californica*. *Plant Molecular Biology* 36: 473-478
- [98] Hauser, H.P.; Bardroff, M.; Pyrowolakis, G.; Jentsch, S.A. (1998): A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J. Cell Biol.* 141: 1415-1422
- [99] Henry, T.A. (1924): *Papavers alkaloids 1*, 2nd ed.: 247-253, Paris
- [100] Herbert, J.M.; Augereau, J.M.; Gleye, J.; and Maffrand, J.P. (1990): Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 993-999
- [101] Higashijima, T.; Burnier, J.; Roos, E.R. (1990): Regulation of G_i and G_0 by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 14176-14186
- [102] Hildaway-Clarke, T.L.; Walker, N.A.; Reid, R.J.; Hepler, P.K.; Overall, R.L. (2001): Cytoplasmic acidification with butyric acid does not alter the ionic conductivity of plasmodesmata. *Protoplasma* 215:184-190
- [103] Hollstein, P. (2001): Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der Phospholipase A_2 -Aktivität und ihre Beziehung zum Glutathion-Gehalt in Einzelzellen von *Eschscholzia californica*. Diplomarbeit
- [104] Höfler, H. (1947): Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung. *Mikroskopie (Wien)* 2: 13-29
- [105] Ingham, J.L. (1976): Isosativan: an isoflavan phytoalexin from *Trifolium hybridum* and other *Trifolium* species. *Z. Naturforsch.* C31: 331-332
- [106] Ingham, J.L. (1977): Medicarpin as a phytoalexin of the genus *melilotus*. *Z. Naturforsch. C.* 32, 449-452

- [107] Ingham, J.L. (1977): Isoflavan phytoalexins from *Anthyllis*, *Lotus* and *Tetragonolobus*. *Phytochemistry* 16: 1279-1282
- [108] Ingham, J.L. (1977): An isoflavan phytoalexin from leaves of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry* 16: 1457-1458
- [109] Ingham, J.L.; Dewick, P.M. (1977): Isoflavonoid phytoalexins from leaves of *Trifolium arvense*. *Z. Naturforsch. C32*: 446-448
- [110] Ingham, J.L.; Keen, N.T.; Hynowitz, T. (1977): A new isoflavone phytoalexin from fungus-inoculated stems of *Glycine wightii*. *Phytochemistry* 16: 1943-1946
- [111] Irving, H.R.; Gehring, C.A.; Parish, R.W. (1992): Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1790-1794
- [112] Jabs, T.; Tschöpe, M.; Colling, C.; Hahlbrock, K.; Scheel, D. (1997): Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4800-4805
- [113] Jabs, T. (1999): Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.* 57: 231-245
- [114] Jans, B. (1974): Untersuchungen am Milchsaft des Schöllkrautes (*Chelidonium majus* L.). *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 83: 306-344
- [115] Jeong, S.J.; Miyamoto, T.; Inagaki, M.; Kim Y.C.; Higuchi, R. (2000): Rotundines A-C, three novel sesquiterpene alkaloids from *Cyperus rotundus*. *J. Nat. Prod.* 63(5): 673-675
- [116] Jones, G.; Jones, D.; Zhou, L.; Steller, H.; Chu, Y. (2000): Deterin, a new inhibitor of apoptosis from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 275: 22157 - 22165

- [117] Joosten, M.H.A.J.; Cozijnsen, T.J.; Wit, P.J.G.M. (1994): Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base pair change in an avirulence gene. *Nature* 367: 384-386
- [118] Kakiuchi, N.; Hattori, M.; Ishii, H.; Namba, T. (1987): Effect of benzo[c]phenanthridine alkaloids on reverse transcriptase and their binding property to nucleic acids. *Planta Medica* 53: 22-27
- [119] Kamoun, S.; Huitema, E.; Vleeshouwers, V.G.A.A. (1999): Resistance to oomycetes: general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci.* 4: 196-200
- [120] Kamoun, S. (2001): Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Current Opinion in Plant Biology*: 4: 295-300
- [121] Katsui, N.; Murai, A.; Takasugi, M.; Imaizumi, T.; Masamune, T.; Tomiyama, K. (1968): The structure of Rishitin, a new antifungal compound from diseased potato tubers. *Chem. Commun.* 43-44
- [122] Kauss, H.; Jeblick, W.; Domard, H. (1989): The degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* 178: 385-392
- [123] Kauss, H.; Jeblick, W. (1996): Influence of salicylic acid on the induction of competence for H₂O₂ elicitation. *Plant Physiol.* 111: 755-763
- [124] Kawalleck, P.; Keller, H.; Hahlbrock, K.; Scheel, D.; Somssich, I.E. (1995): Two pathogen-responsive genes in parsley encode a tyrosine-rich hydroxyproline-rich glycoprotein (hrgp) and an anionic peroxidase. *Mol. Gen. Genet.* 247: 444-452
- [125] Keen, N.T. in Wood, R.K.S.; Graniti, A. (1976): Specificity in plant diseases. Plenum, New York: 268
- [126] Kim, J.; Harter, K.; Theologis, A. (1997): Protein-protein interaction among the Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 11786-11791

- [127] Kitajima, S.; Sato, F. (1999): Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J. Biochem.* 125: 1-8
- [128] Klement, Z. (1982): Hypersensitivity. In: *Phytopathogen. Prokaryotes. Vol. 2* (Mount, M.S.; and Lacy, G.H.; Eds.) Academic Press, New York: 149-177
- [129] Klement, Z. (1986): Hypersensitivity. In: *Phytopathogenic Prokaryotes* (Eds. Mount MS and Lacy GH) 2: 149-177, Academic Press, New York
- [130] Kluck, R.M.; Martin, S.J.; Hoffman, B.M.; Zhou, J.S., Green, D.R., Newmeyer, D.D. (1997): Cytochrome C activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBA* 16:4639-4649
- [131] Knobloch, K.-H.; Berlin, J. (1980): Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Z. Naturforsch.* 35c, 551-561
- [132] Knobloch, K.-H.; Beutnagel, G.; Berlin, J. (1981): Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of cinnamoyl putrescine in medium-induced cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 153, 582-585
- [133] Knogge, W. (1996): Fungal infection in plants. *Plant Cell* 8: 1711-1722
- [134] Kogel, G.; Beissmann, B.; Reisener, H.J. (1988): A single glycoprotein from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* cell wall elicits the hypersensitive lignification response in wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33: 173-185
- [135] Kombrink, E.; Somssich, I.E. (1997): Pathogen-related proteins and plant defense. In: *The mycota, part a, plant relationships* (Carroll, G.; Tudzynski, P., eds.), Springer Verlag, Berlin: 107-128

- [136] Kramell, R.; Miersch, O.; Atzorn, R.; Parthier, B; Wasternack, C. (2000): Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signalling pathways. *Plant Physiol.* 123: 177-187
- [137] Kuc, J. (1995): Phytoalexins, stress, metabolism and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 275-297
- [138] Kutchan, T.M. (1993): 12-oxo-Phytodienoic acid induces accumulation of berberine bridge enzyme transcript in a manner analogous to Methyl-Jasmonate. *J. Plant Physiol.* 142: 502-505
- [139] Kutchan, T.M.; Dittrich, H. (1995): Characterization and mechanism of the berberine bridge enzyme, a covalently flavinylated oxidase of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 24475-24481
- [140] Kutchan, T.M. (1996): Heterologous expression of alkaloid biosynthetic genes - a review. *Gene* 179: 73-81
- [141] Kutchan, T.M. (1998): Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In G. Cordell. *The alkaloids.* 50: 257-316, San Diego
- [142] LaCasse, E.C.; Baird, S.; Korneluk, R.G.; MacKenzie, A.E. (1998): The Inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17: 3247-3249
- [143] Lamb, Ch.; Dixon, R.A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-275
- [144] Laster, S.M.; Wood, J.G.; Goodling, L.R. (1988): Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J. Immunol.* 141: 2629-2634

- [145] Lee, S.K.; Qing, W.G, Mar, W.; Luyengi, L.; Metha, R.G, Kawanishi, K.; Fong, H.; H.S.; Beecher, C.W.W.; Konghorn, A.D.; Pezzuto, J.M. (1998): Angoline and chelerythrine, benzophenanthridine alkaloids that do not inhibit protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 19829-19833
- [146] Lehmann, J.; Atzorn, R.; Brückner, C.; Reinbothe, S.; Leopold, J.; Wasternack, C.; Parthier, B. (1995): Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* 197: 156-162
- [147] Leist, M.; Nicotera P. (1997): The shape of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 1-9
- [148] Letcher, R.M.; Widdowson, D.A.; Deverall, B.J.; Mansfield, J.W. (1970): Identification and activity of wyerone acid as a phytoalexin in broad bean (*Vicia faba*) after infection by botrytis. *Phytochemistry* 9, 249, 1398
- [149] Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R.A.; Lamb, C. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease response. *Cell* 79: 583-593
- [150] Levine, A.; Pennell, R.I.; Alvarez, M.E.; Palmer, R.; Lamb, C. (1996): Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6: 427-437
- [151] Liao, L.M.; Vieira, P.C.; Rodrigues-Filho, E.; Fernandes, J.B.; Silca, M.F.G.F. (2001): Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Peritassa campestris*. *Phytochemistry* 58: 1205-1207
- [152] Linsmaier, E.M.; Skoog, F. (1965): Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 18: 100-127
- [153] Linthorst, H. (1991): Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 123-150

- [154] Liu, X.; Kim, C.N.; Yang, J.; Jemmerson, R.; Wang, X. (1996): Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157
- [155] Mahady, G.B.; Beecher, C.W.W.; (1994): Elicitor-stimulated benzophenanthridine alkaloids biosynthesis in bloodroot suspension cultures is mediated by calcium. *Phytochemistry*, 37: 415-419
- [156] Maher, E.A.; Bate, N.J.; Ni, J.; Elkind, Y.; Dixon, C.; Lamb, C. (1994): Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of performs phenylpropanoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994: 7803-7806
- [157] Maiti, M.; Nandi, R. (1987): Circular dichroism of sanguinarine-DNA complexes: effect of base composition, pH and ionic strength. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 5: 159-175
- [158] Maiti, M. (2001): Molecular aspects on the interaction of sanguinarine with B-form, Z-form, and HL-form DNA structure. *Indian J. Biochem. Biophys.* (1-2): 20-26
- [159] Maleck, K.; Dietrich, R.A. (1999): Defense on multiple fronts: how do plants cope with deverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4: 215-219
- [160] Mandujano-Chavez, A.; Schoenbeck, M.A.; Ralston, L.F.; Lozoya-Gloria, E.; Chappell, J. (2000): Differential induction of sesquiterpene metabolism in tobacco cell suspension cultures by methyl-jasmonate and fungal elicitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 381: 285-294
- [161] Mansfield, J.W. (1983): Antimicrobial compounds. In: *Biochemical Plant Pathology* (Callow, J. A.; ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK: 237-265
- [162] Marticke, K.H.; Reisner, H.J.; Fischer, R.; Hippe-Sanwald, S. (1998): *In situ* detection of a fungal glycoprotein-elicitor in stem rust infected susceptible and resistant wheat using immunogold electron microscopy. *Eur. Cell Biol.* 76(4): 265-273

- [163] Mathieu, Y.; Kurkdijan, A.; Xia, H.; Guern, J.; Koller, A. Spiro, M.D. O'Neill, M.; Albersheim, P.; Darvill, A. (1991): Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J.* 1: 33-343
- [164] Mathieu, Y.; Lapous, D.; Thomine, S.; Laurière, Ch.; Guern, J. (1996): Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta* 199: 416-424
- [165] Matile, Ph. (1984): Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle. *Naturwissenschaften* 71: 18-24
- [166] Matsui, K. (1998): Properties and structures of fatty hydroperoxide lyase. *Belg. J. Bot.* 131: 50-62
- [167] McDowell, J.M.; Dangl, J.L. (2000): Signal transduction in the plant immune response. *TIBS* 25: 79-82
- [168] Melan, M.A.; Dong, X.; Endara, M.E.; Davis, K.R.; Ausubel, F.M. and Petermann, T.K. (1993): An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid and methyl-jasmonate. *Plant Physiol.* 101: 441-450
- [169] Memelink, J.; Verpoorte R.; Kijine J.W. (2001): ORCANization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci.* 6(5): 212-219
- [170] Menke, F.L.; Champion, A.; Kijne, J.W.; Memelink, J. (1999): A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcript factor, ORCA2. *EMBO J.* 18(16): 4455-4463
- [171] Meyer, A.; Puhler, A.; Niehaus, K. (2001): The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 213(29): 214-222

- [172] Mithöfer, A.; Lottspeich, F.; Ebel, J. (1996): One-step purification of the β -glucan elicitor-binding protein from soybean roots and characterisation of an antipeptide antiserum. *FEBS Lett.* 381: 203-207
- [173] Mithöfer, A.; Fliegmann, J.; Ebel, J. (1999): Isolation of a French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) homolog to the β -glucan elicitor-binding protein of soybean (*Glycine max* L.) *Biochim. Biophys. Acta* 1418(1): 127-132
- [174] Morel, J.B.; Dangl, J.L. (1997): The hypersensitive response and induction of cell death in plants. *Cell Death Differ* 4: 671-683
- [175] Müller, E.; Neumann, D.; Nelles, A.; Bräutigam, E. (1976): Alkaloid transport and distribution in *Nicotiana* and *Macleaya*. Diversity and unity. *Nova Acta Leopold.*; Suppl. 7: 133-138
- [176] Nakada; H.; Kobayashi, A.; Yamashita, K. (1977): Stereochemistry and biological activity of phytoalexin "safinol" from safflower. *Agric. Biol. Chem.* 41, 1761-1765
- [177] Nandi, R.; Maiti, M. (1985): Binding of sanguinarine to desoxyribonucleic acids of differing base composition. *Biochem. Pharmacol.* 34: 321-324
- [178] Narvaez-Vasques, J.; Florin-Christensen, J.; Ryans, C.A. (1999): Positional specificity of a phospholipase a activity induced by wounding, systemin and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *The Plant Cell* 11: 2249-2260
- [179] Neumann, D.; Krauss, G.; Hieke, M.; Gröger, D. (1983): Indole alkaloid formation and storage in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.* 48: 20-23
- [180] Neville, D.M. (1971): Molecular weight determination of protein-dodecylsulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* 246: 6328-6334
- [181] Newman, S.E.; Roll, M.J. (1999): A naturally occurring compound for controlling powdery Mildew of Green Roses. *Hort Science* 34: 686-689

- [182] Noehringer, C.; Scheel, D.; Blée, E. (2000): Lipoxygenase isoforms in elicitor-treated parsley cell suspension cultures. *Biochemical Society Transactions* 28: 827-829
- [183] Nunez, G.; Benedict, M.A.; Hu, Y.; Inohara, N. (1998): Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17, 3237-3245
- [184] Nürnberger, T.; Colling, C.; Hahlbrock, K.; Jabs, T.; Renelt, A.; Sacks, W.R.; Scheel, D. (1994a): Perception and transduction of an elicitor signal in cultured parsley cells. *Biochem. Soc. Symp.* 60: 173-182
- [185] Nürnberger, T.; Nennstiel, D.; Jabs, T.; Sacks, W.R.; Halbrock, K.; Scheel, D. (1994b) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78: 449-460
- [186] Nürnberger, B. (1999): Non-peptide G-Protein activators as promising tools in cell biology and potential drug leads. *Eur. J. Med. Chem.* 34: 5-30
- [187] Osbourn, A. (1996): Saponins and plant defense - asoap stora. *Trends Plant Sci.* 1: 4-9
- [188] Osbourn, A.: (1996): Preformed antimicrobial compounds and plant defense fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831
- [189] Otte, O.; Pachten, A.; Hein, F.; Barz, W. (2001): Early elicitor-induced events in chickpea cells: functional links between oxidative burst, sequential occurrence of extracellular alkalinisation and acidification, K^+/H^+ exchange and defence-related gene activation. *Z. Naturforsch.* 56(1-2): 65-76
- [190] Pauli, H.H.; Kutchan, T.M. (1998): Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcochlorine-3-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent monooxygenase of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*, 13: 793-801

- [191] Panzer, A.; Joubert, A.M.; Bianchi, P.C.; Hamel, E.; Seegers, J.C. (2001): The effects of chelidonine on tubulin polymerisation, cell cyclus progression and selected signal transmission pathways. *Eur. J. Cell. Biol.*; 80: 111-118
- [192] Parker, J.E.; Schulte, W.; Hahlbrock, K.; Scheel, D.; (1991): An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultures parsley cells and protoplasts.
Mol. Plant-Microbe Interactions 4: 19-27
- [193] Peck, S.C.; Nühse, T.S.; Hess, D.; Iglesias, A.; Meins, F.; Boller, T. (2001): Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *The Plant Cell*. 13: 1467-1475
- [194] Peng, M.; Kuc, J. (1992): Peroxidase generated hydrogen peroxide as source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82: 696-699
- [195] Peng, Y.-L.; Shirano, Y.; Ohta, H.; Hibino, T.; Tanaka, K.; Shibata, D. (1994): A novel lipoxygenase from rice. Primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. *J. Biol. Chem.* 269: 3755-3761
- [196] Pötter, E.; Kloppstech, K. (1993): Effects of light stress as the expression of early light- inducible proteins in barley. *EJB* 214: 779-786
- [197] Prell, H.H. (1996): Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- [198] Price, A.H.; Taylor, S.; Ripley, S.J.; Griffiths, A.; Trewavas, A.J.; Knight, M.R. (1994): Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium.
Plant Cell. 6: 1301-1310
- [199] Rink, E.; Böhm, H. (1975): Conversion of reticuline into scoulerine by a cell free preparation from *Macleaya microcarpa* cell suspension cultures.
FEBS Lett. 49: 396-399

- [200] Robatzek, S.; Somssich, I.E. (2001): A new member of the arabidopsis WRKY transcription factor, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defense-related processes. *Plant J.* 28(2): 123-133
- [201] Roberson, D.J.; Harborne, J.B. (1977): Pisatin as a major phytoalexin in *Lathyrus*. *Z. Naturforsch. C* 32: 289
- [202] Romeis, T. (2001): Protein kinases in the plant defense response. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 407-414
- [203] Romeis, T.; Ludwig, A.A.; Martin, R.; Jones, J.D.G. (2001): Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* 20: 5556-5567
- [204] Roos, W.; Evers, S.; Hieke, M.; Tschöpe, M.; Schumann, B. (1998): Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids, *Plant Physiol.*: 349-364
- [205] Roos, W.; Dordschbal, B.; Steighardt, J.; Hieke, M.; Weiss, D.; Saalbach, G. (1999): A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipaseA of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloids biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1448: 390-402
- [206] Roos, W. (2000): Ion mapping in plant cells - methods and applications in signal transduction research. *Planta* 210: 347-370
- [207] Roy, N.; Deveraux, Q.L.; Takahashi, R.; Salvesen, G.S.; Reed, J.C. (1997): The C-IAP-1 and C-IAP-2 protein are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16: 6914-6925
- [208] Ryals, J.; Uknes, S.; Ward, E. (1994): Systemic acquired resistance. *Plant Physiol.*; 104: 1109-1112

- [209] Ryals, J.A.; Neuenschwanner, U.H.; Willits, M.G.; Molina, A.; Steiner, H.Y.; Hunt, M.D. (1996): Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819
- [210] Saran, A.; Srivastava, S.; Coutinho, E.; and Maiti, M. (1995): ¹H NMR investigation of the interaction of berberine and sanguinarine with DNA. *Indian J. Biochem. Biophys.* 32: 74-77
- [211] Sato, F.; Hashimoto, T.; Hachiya, A.; Tamura, K. Choi, K.; Morishige, T.; Fujimoto, H.; Yamada, Y. (2000): Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis: *PNAS* 98: 367-372
- [212] Scheel, D. (1991): Plant defense genes: In pesticide chemistry. (H. Frehse, ed.), VCH, Weinheim: 121-130
- [213] Schmeller, T.; Latz-Brüning, B.; Wink, M. (1997): Biochemical activities of Berberine, Palmitine and Sanguinarine mediating chemical defense against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44: 257-266
- [214] Schumacher, H.-M.; Gundlach, H.; Fiedler, F.; Zenk, M.H. (1987): Elicitations of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Reports* 6: 410-413
- [215] Scott, A.C.; Allen, N.S. (1999): Changes in cytosolic pH within arabidopsis root columella cells play a key role in the early signalling pathway for root gravitropism. *Plant Physiol.* 121: 1291-1298
- [216] Seifen, E.; Adams, R.J.; and Riemer, R.K. (1979): Sanguinarine is a possible intropic alkaloid which inhibits cardiac Na⁺, K⁺-ATPase. *Eur. J. Pharmacol.* 60: 373-377
- [217] Sharp, J.K.; Mc Neil, M.; Albersheim, P. (1984): The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(β-D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea. *J. Biol. Chem.* 259: 11321-11336

- [218] Somssich, I.E.; Hahlbrock, K. (1998): Pathogen defense in plant – a paradigm of biological complexit. Trends Plant Sci. 3: 86-90
- [219] Steen, L.L.; Wadskov-Hansen, Willemoes, M.; Martinussen, J.; Hammer, K.; Neuhard, J.; Larsen, S. (2001): Cloning and verification of the *Lactococcus lactis* pyrG gene and characterization of the gene product, CTP Synthase. JBC in press
- [220] Steffens, P.; Nagakura, N.; Zenk, M.H. (1985): Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from berberis beaniana cell cultures. Phytochemistry 24: 2577-2583
- [221] Steighardt, J.; Meyer, K.; Roos, W. (2000): Poster Botanikertagung: Search for plasma membrane proteins from *Eschscholzia californica* that bind yeast elicitor(s). Jena P04-16
- [222] Stermitz, F.R.; Lorenz, P.; Tawara, J.N.; Zenewicz, L.A.; Lewis, K. (2000): Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5`-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 1433-1437
- [223] Stoessl, A.; Stothers, J.B.; Ward, E.B. (1974): Lubimin: a phytoalexin of several *Solanaceae*. Structure revision and biogenetic relationships. J. Chem. Soc. Chem. Commun.; 709
- [224] Tan, G.T.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. (1991): Evaluation of natural products as inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV) reverse transcriptase. Journal of Natural Products 54: 143-154
- [225] Tanahashi, T.; Zenk, M.H. (1990): New hydroxylated benzophenanthridine alkaloids from *Eschscholzia californica* cell suspension culture. J. Nat. Prod. 53(3): 579-586
- [226] Tavenier, E.; Wendehenne, D., Blein, J.-P.; Puigin A. (1995): Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. Plant Physiol. 109: 1025-1031

- [227] Thomma, B.P.H.; Eggermont, K.; Penninck, I.A.M.; Mauch-Mani, B.; Vogelsang, R. Cammue, B.P.A.; Broekaert, W.F. (1998): Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 15107-15111
- [228] Tomè, F.; Colombo, M.L.; Caldiroli, L. (1999): A comparative investigation on alkaloid composition in different populations of *Eschscholzia californica* Cham. Phytochem. Anal. 10: 264-267
- [229] Topan, A.; Roby, D.; Esquerre-Tugaye, M.-T.; (1982): Cell surfaces in plant-microorganism interaction. III. In vivo effect on hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in the cell wall of diseased plants. Plant Physiol. 70: 82-86
- [230] Ulrichova, J.; Walterova, D.; Preininger, V.; Simanek, V. (1983): Inhibition of butyrylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. Planta 48: 174-177
- [231] Ulrichova, J.; Walterova, D.; Simanek, V. (1984): Molecular mechanism of the biological activity of quaternary benzophenanthridine and protoberberine alkaloids. Acta Univ. Palacki olomue Fac. Med. 106: 31-38
- [232] Umemoto, N.; Kakitani, M.; Nishimama, R.; Machida, Y. (1997): The structure and function of a soybean β -glucan binding-protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1029-1034
- [233] Van den Ackerveken, G.F.J.M.; Van Kan, J.A.L.; De Wit, P.J.G.M. (1992): Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. Plant J. 2: 359-366
- [234] Van Loon, L.C. (1997): Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Eur. J. Plant Pathol. 103: 753-765

- [235] Viehweger, K.; Dortschbal, B.; Roos, W. (2002): Elicitor-activated phospholipase A₂ generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H⁺ pool for the signal transfer towards phytoalexin biosynthesis. Manuskript akzeptiert.
- [236] Villegas, M.; Sommarin, M.; Brodelius, P.E. (2000): Effect of sodium orthovanadate on benzophenanthridine alkaloid formation and distribution in cell suspension cultures of *Eschscholzia californica*. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 233-241
- [237] Wakamatsu, K.; Higashijima, T.; Fujino, M.; Nakajima, T.; Miyazawa, T. (1983): Conformational change of mastoparan from wasp venom on binding with phospholipid membrane. *FEBS Lett.* 152: 227-230
- [238] Weichert, H.; Kohlmann, M.; Wasternack, C.; Feussner, I. (2000): Lipids and signalling: oxylipins 2 - functional aspects. *Biochemical Society Transactions.* 28(6) : 861-862
- [239] Weisshaar, B.; Jenkins, G.I. (1998): Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 251-257
- [240] Wendehenne, D.; Binet, M.N.; Blein, J.P.; Ricci, P.; Pugin, A. (1995): Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Letters* 374: 203-207
- [241] Wevelsiep, L.; Kogel, K.H.; Knogge, W. (1991): Purification and characterization of peptides from *Rynchosporium secalis* inducing necrosis in barley. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 471-482
- [242] Wiart, C.; Martin, M.-T.; Awang, K.; Hue, N.; Serani, L.; Lapr evote, O.; Pais, M.; Rhamani, M. (2001): Sesquiterpenes and alkaloids from *Scorodocarpus borneensis*. *Phytochemistry* 58: 653-656
- [243] Wink, M. (1999): Plant secondary metabolites from higher plants: biochemistry, function and biotechnology. In: *Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual. plant. reviews.* ed. Wink, M. 2:1-16, Sheffield: Sheffield Academic

- [244] Wolff, J.; Knipling, L. (1993): Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry* 32: 13334-13338
- [245] Yamaguchi, T.; Yamada, A.; Hong, N.; Ogawa, T.; Tadashi, I.; Shibuya, N. (2000): Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β -glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *The Plant Cell*, 12: 817-826
- [246] Yang, J., Liu, X.; Bhalla, K.; Kim, C.N.; Ibrado, A.M., Cai, J.; Peng, T.I.; Jones, D.P.; Wang, X. (1997): Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132
- [247] Yang, Y.O.; Shah, J.; Klessig, D.F. (1997): Signal perception and transduction in defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639
- [248] Ye, K.; Ke, Y.; Keshava, N.; Shanks, J.; Kapp, J.A.; Tekmal, R.R.; Petros, J.; Joshi, H.; C. (1998): Opium alkaloid nescapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 1601-1606
- [249] Yoda, H.; Ogawa, M.; Yamaguchi, Y.; Koizumi, N.; Kusano, T.; Sano, H. (2002): Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Mol. Genet. Genomics* 267(2): 154-61
- [250] Yuan, J.; Shaham, S.; Ledoux, S.; Ellis, H.M.; Horvitz, H.R. (1993): The *C. Elegans* cell death *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75: 641-652
- [251] Zamzami, N.; Marchetti, P.; Castedo, M.; Decaudin, D.; Macho, A.; Hirsch T.; Susin, S.A.; Petit, P.X.; Mignotte, B.; Kroemer, G. (1995): Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182: 367-377

-
- [252] Zenk, M.H. (1985): Enzymology of benzyloquinoline alkaloid formation. In: The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids, Phillipson, J.D.; Roberts, M.F.; Zenk, M.H.; eds. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo: 240-256
- [253] Zenk, M.H. (1995): Chasing the enzymes of alkaloid biosynthesis. Organic reactivity: physical and biological aspects: 89 - 109
- [254] Zhu, Q.; Dröge-Laser, W.; Dixon, R.A.; Lamb, C. (1996): Transcriptional activation of plant genes. Current Opinion in Genetics & Development 6: 624-630
- [255] Zimmermann, S.; Nürnberger, T.; Frachisse, J.-M.; Wirtz, W.; Guern, J.; Hedrich, R.; and Scheel, D. (1997): Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. Plant Biol. 94: 2751-2755
- [256] Ziegler, J. et al. (2000): Molecular cloning of allene oxide cyclase. J. Biol. Chem. 275: 19132-19138

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei Prof. W. Roos für die Überlassung des sehr interessanten Themas sowie die wissenschaftliche Unterstützung.

Ein weiterer Dank gilt Dr. B. Grimm aus Gatersleben und seiner Arbeitsgruppe, durch die ich erste Hilfestellungen bei der *in vitro* Translation, sowie bei der 2D-Elektrophorese erhalten habe.

Ein besonderer Dank gilt Dagmar Weiss für die Bereitstellung des Benzophenanthridin-Gemisches und für die gute Zusammenarbeit während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Katrin Viehweger danke ich für die Aufnahme der mikroskopischen Bilder.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse waren nur durch die Bereitstellung zahlreicher Suspensionskulturen von *Eschscholzia californica* möglich. Margit Hieke gilt deshalb ein besonderer Dank.

Gabriele Danders und Kathrin Thomasch danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor 010 während dieser 3 Jahre.

Frau Dr. A. Schierhorn danke ich für die MALDI-TOF-Analysen.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zellphysiologie, die mich während der Anfertigung meiner Arbeiten mit Rat und Tat, nicht nur in fachlichen Dingen unterstützt haben.

Lebenslauf

von Katrin Färber

1. Persönliche Daten

Geburtsdatum : 3. September 1971
Geburtsort : Schleiz

2. Schulische Ausbildung

Sept. 1978 - Aug. 1988 : Zehnklassige Oberschule
Abschluss : 10. Klasse

Sept. 1988 - Aug. 1990 : Arbeiter- und Bauernfakultät Halle/S.
Institut zur Vorbereitung auf das
Auslandsstudium
Abschluss : Hochschulreife

Sept. 1990 - Febr. 1993 : Gebr. Munzert GmbH & Co. KG
Naila-Marlesreuth
Abschluss : Industriekauffrau

Okt. 1993 - Juli 1998 : Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss : Diplom-Biochemie

3. Beruflicher Werdegang

Febr. 1993 - Sept. 1993 : Gebr. Munzert GmbH & Co. KG
Tätigkeit : Industriekauffrau

Aug. 1998 - Juni 2001 : Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Tätigkeit : Doktorandin

seit Juli 2001 : Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin
Abteilung Zelluläre Neurowissenschaften, Berlin
Tätigkeit : Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation zum Thema

**"Alkaloide als Toxine und Signale bei der pathogenen Interaktion
zwischen Pilz- und Pflanzenzelle"**

von mir mit der angegebenen Literatur eigenständig angefertigt wurde.

Katrin Färber