

Julia Koehl

Aufreinigung und Charakterisierung  
der Elicitine von *Phytophthora quercina*



Herbert Utz Verlag · Wissenschaft  
München

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

Ein Titeldatensatz für diese Publikation ist  
bei Der Deutschen Bibliothek erhältlich

Zugleich: Dissertation, München, Techn. Univ., 2002

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, der Entnahme von Abbildungen, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben – auch bei nur auszugsweiser Verwendung – vorbehalten.

Copyright © Herbert Utz Verlag GmbH 2002

ISBN 3-8316-0171-2

Printed in Germany

Herbert Utz Verlag GmbH, München

Tel.: 089/277791-00 – Fax: 089/277791-01

---

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.	<i>Phytophthora quercina</i>	1
2.	<b>Wirt-Pathogen-Interaktionen</b>	<b>2</b>
2.1.	Erkennung und Signalverarbeitung	3
2.2.	Signaltransduktion	5
3.	<b>Elicitine</b>	<b>11</b>
3.1.	Chemische und molekulare Eigenschaften der Elicitine	11
3.2.	Biologische Wirkung der Elicitine	12
3.3.	Elicitin-vermittelte Signalkaskade	14
3.4.	Rolle der Elicitine als Sterol-Carrier-Proteine	15
3.5.	Bedeutung der Elicitine in vivo	17
4.	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>II.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>19</b>
1.	<b>Chemikalien</b>	<b>19</b>
2.	<b>Geräte und Laborartikel</b>	<b>21</b>
3.	<b>Elektrophorese</b>	<b>23</b>
3.1.	Tris-Tricin-SDS-PAGE	23
3.2.	Proteine und Standards	24
3.2.1.	Cryptogein	24
3.2.2.	Low Range Standard	24
4.	<b>Western Blot</b>	<b>25</b>
4.1.	Lösungen	25
4.2.	Material	26
4.3.	Proteine, Standards und Antikörper	26
4.3.1.	Cryptogein	27
4.3.2.	Prestained Standard A	27
4.3.3.	Prestained Standard B	27
4.3.4.	Antikörper	27
5.	<b>Isoelektrische Fokussierung</b>	<b>28</b>
5.1.	Gellösung	28
5.2.	Elektrodenpuffer	28
6.	<b>Färbelösungen für die Elektrophorese</b>	<b>28</b>
6.1.	Silbernitratfärbung	28
6.2.	FCF Fast Green-Färbung	29
7.	<b>Pilzkulturmedien</b>	<b>30</b>
7.1.	V8-Medium	30
7.2.	Malzagar	30
7.3.	M1-Medium	30

<b>8.</b>	<b>Medien für Tabakzellkulturen</b>	<b>30</b>
8.1.	NTD-Medium	30
8.1.1.	Makroelemente	31
8.1.2.	Mikroelemente	31
8.1.3.	Vitamine	31
8.1.4.	Fe-EDTA-Lösung	31
8.1.5.	Hormone	32
<b>9.</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Nachweis</b>	<b>32</b>
9.1.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Nachweis in planta	32
9.2.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Nachweis in vitro	32
<b>10.</b>	<b>Zelltodbestimmung</b>	<b>33</b>
<b>11.</b>	<b>ELISA</b>	<b>33</b>
<b>III.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>35</b>
<b>1.</b>	<b>Anzucht von Pilzisolaten, Pflanzen und Zellen</b>	<b>35</b>
1.1.	Pilzisolat	35
1.1.1.	Anzucht und Flüssigkultur	35
1.1.2.	<i>Phytophthora</i> -Wachstumskurve und Elicitinabgabe	36
1.1.3.	Sterolzusatz zum Kulturmedium	36
1.1.4.	Gewinnung von Zoosporen von <i>P. quercina</i>	36
1.1.5.	Wurzelexsudatgewinnung von <i>Quercus robur</i>	37
1.2.	Anzucht der Pflanzen	37
1.3.	Zellkulturen	37
<b>2.</b>	<b>Proteinbestimmung</b>	<b>38</b>
<b>3.</b>	<b>Bioassay mit Tabakblättern</b>	<b>39</b>
3.1.	Infiltrieren von Lösung in Tabakblätter	39
3.2.	Inkubation der Blätter in Lösung	39
<b>4.</b>	<b>Bestimmung des Gehaltes an PR-Proteinen in Tabakblättern und -zellen</b>	<b>40</b>
4.1.	Ansatz und Probenaufbereitung der Tabakblätter	40
4.1.1.	Extraktion von Tabakblättern zur Bestimmung der $\beta$ -1,3-Glucanase- und Chitinaseaktivität	41
4.2.	Ansatz und Probenaufbereitung der Tabakzellen	42
4.3.	Bestimmung der Chitinase- und $\beta$ -1,3-Glucanaseaktivität	42
4.3.1.	$\beta$ -1,3-Glucanaseassay	42
4.3.1.1.	Ansatz	43
4.3.1.2.	Auswertung	43
4.3.2.	Chitinaseassay	44
4.3.2.1.	Ansatz	44
4.3.2.2.	Auswertung	44
<b>5.</b>	<b>Ethan- und Ethylenmessungen</b>	<b>45</b>

5.1.	Ethylen- und Ethanmessung in Tabakzellkulturen	45
5.2.	Ethylen- und Ethanmessung in Tabakblättern	45
<b>6.</b>	<b>Elektrophorese</b>	<b>46</b>
6.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
6.2.	Isoelektrische Fokussierung	47
6.3.	Auswertung	48
<b>7.</b>	<b>Western-Blot (semi-dry-blot)</b>	<b>48</b>
7.1.	Proteintransfer	48
7.2.	Antikörpermarkierung	49
<b>8.</b>	<b>Färbung der Gele und Blots</b>	<b>49</b>
8.1.	Silbernitratfärbung	49
8.2.	Fast Green FCF-Färbung	50
<b>9.</b>	<b>FPLC-Fast Protein Liquid Chromatography</b>	<b>51</b>
9.1.	Ionenaustauschchromatographie	
9.1.1	Reinigung von basischen Elicitinen aus dem Kulturfiltrat von <i>P. quercina</i> zur N-terminalen Sequenzierung	51
9.1.2	Quantitative Aufreinigung von Elicitinen aus dem Kulturfiltrat von <i>P. quercina</i> mittels Anionen- und Kationentauscher	52
9.2.	Gelfiltration	53
<b>10.</b>	<b>ELISA</b>	<b>54</b>
10.1.	Ansatz	54
10.2.	Auswertung	55
<b>11.</b>	<b>Messung des Oxidative Burst</b>	<b>56</b>
11.1.	Messung des Oxidative Burst in Zellkulturen	56
11.2.	Nachweis von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Tabakblättern	57
<b>12.</b>	<b>Bestimmung des Zelltods</b>	<b>58</b>
<b>13.</b>	<b>Leitfähigkeitsmessung an Tabakblattscheiben</b>	<b>59</b>
<b>14.</b>	<b>N-terminale Sequenzierung des Elicitins mittels Edman-Abbau</b>	<b>59</b>
14.1.	Probenvorbereitung	59
14.2.	N-terminale Aminosäuresequenzanalyse	59
<b>15.</b>	<b>Synthese eines synthetischen Peptids</b>	<b>60</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>61</b>
<b>1.</b>	<b>Gewinnung, Charakterisierung und Aufreinigung von Elicitinen aus dem Kulturfiltrat von <i>P. quercina</i></b>	<b>61</b>
1.1.	Gewinnung von Elicitinen aus dem Kulturfiltrat von <i>P. quercina</i>	61
1.1.1.	Proteinbestimmung	61
1.1.2.	Zusätze zum <i>Phytophthora</i> -Kulturmedium	61
1.1.3.	Kinetik der Elicitinproduktion	63
1.2.	Reinigung der Elicitine aus dem Kulturfiltrat von <i>P. quercina</i>	65
1.2.1.	Übersicht über die Aufreinigungsschritte bis zur Sequenzanalyse	65

1.2.2.	Darstellung der <i>Phytophthora</i> -Proteine mittels Tris-Tricin-SDS-PAGE	67
1.2.3.	Western Blot des Kulturfiltrats und Antikörpermarkierung mit Antikörpern gegen $\beta$ -Cryptogein	68
1.2.4.	Isoelektrische Fokussierung des rohen Kulturfiltrats	69
1.2.5.	Aktivitätstest des Kulturfiltrats von <i>P. quercina</i> an Tabakblättern	70
1.2.6.	Anionenaustauschchromatographie zur Gewinnung einer gereinigten basischen Elicitinfraktion	71
1.2.7.	Lokalisierung der Elicitine in den Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie	72
1.2.8.	Isoelektrische Fokussierung der Anionenaustauscherfraktionen	73
1.2.9.	Western Blot der basischen Fraktion des Kulturfiltrats von <i>P. quercina</i>	74
1.2.10.	N-terminale Ansequenzierung	74
1.2.11.	Biologische Aktivität der basischen Fraktion	76
1.2.12.	Ausbeute des gereinigten Elicitins	77
1.3.	Quantitative Gewinnung von sauren und basischen Elicitinen aus dem Kulturfiltrat von <i>P. quercina</i>	78
1.3.1.	Schematische Darstellung wichtiger Reinigungs- und Detektionsschritte	78
1.3.2.	Darstellung der im Kulturfiltrat enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE	79
1.3.3.	Ionenaustauschchromatographie	80
1.3.4.	Nachweis von Elicitinen in den Fraktionen mittels ELISA	82
1.3.5.	Darstellung der Fraktionen Fs-2 und Fb-2 mittels Tris-Tricin-SDS-PAGE	82
1.4.	Bestimmung des Molekulargewichts der Elicitine in vivo	84
1.4.1.	Gelfiltration	84
1.4.2.	Darstellung der Fraktionen F1 – F4 mittels ELISA	85
1.4.3.	Darstellung der Fraktionen F1 – F4 mittels SDS-PAGE	86
1.5.	Synthetisches Peptid	88
1.5.1.	Biotest	88
1.5.2.	ELISA des synthetischen Peptids Pep 666	88
1.6.	Wechselwirkung der Elicitine aus dem Kulturfiltrat von <i>P. quercina</i> mit Antikörpern gegen verschiedene Elicitine	89
1.7.	Zusammenfassung Kapitel 1	90
2.	<b>Biologische Wirkung des Kulturfiltrats von <i>Phytophthora quercina</i> auf Tabakpflanzen</b>	<b>92</b>
2.1.	Bioassay des Kulturfiltrats von <i>P. quercina</i> mit verschiedenen Tabaksorten	92

---

2.1.1.	Bioassay der Tabaksorten Bel B und Bel W3	92
2.1.2.	Einfluss der Belichtung auf die Symptomausprägung bei Tabakblättern der Sorte Samsun NN	93
2.2.	Ethyleninduktion in Tabakblättern	95
2.2.1.	Ethyleninduktion in Blättern der Tabaksorten Samsun NN, Bel B, Bel W3 unter Einfluss der Belichtung	96
2.2.2.	Konzentrationsabhängigkeit der Ethylenproduktion	97
2.2.3.	Einfluss der Lichtphasenlänge auf die Ethylenemission	98
2.3.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Nachweis in Tabakblättern	99
2.4.	Induktion von PR-Proteinen in Tabakblättern der Sorten Samsun NN, Bel B und Bel W3 nach Behandlung mit Kulturfiltrat von <i>P. quercina</i>	100
2.4.1.	β-1,3-Glucanasen	102
2.4.2.	Chitinasen	103
2.5.	Induktion von Elektrolytleakage in Tabakblättern	104
2.6.	Zusammenfassung Kapitel 2	107
<b>3.</b>	<b>Wirkung von Elicitinen auf Zellkulturen der Tabaksorten Bel B und Bel W3</b>	<b>109</b>
3.1.	Oxidative Burst und Zelltod	109
3.1.1.	Konzentrationsabhängigkeit des Oxidative Burst in den Tabakzellkulturen Bel B und Bel W3	110
3.1.2.	Konzentrationsabhängigkeit des Zelltods in den Tabakzellkulturen Bel B und Bel W3	112
3.1.3.	Zeitliche Darstellung der Induktion des Zelltods bei Bel W3 nach Elicitierung	113
3.1.4.	Zugabe von Katalase zu Tabakzellkulturen Bel B und Bel W3	114
3.1.5.	Zugabe von Superoxiddismutase zu Tabakzellkulturen Bel B und Bel W3	115
3.1.6.	Einfluss von DPI auf den Oxidative Burst und den Zelltod in der Zellkultur Bel W3	116
3.1.7.	Einfluss von Staurosporin auf den Oxidative Burst und den Zelltod in der Zellkultur Bel W3	118
3.1.8.	Hemmung der NO-Synthase durch Monomethyl-L-Arginin	119
3.2.	Messung der Ethylen- und Ethanemission in den Tabakzellkulturen Bel B und Bel W3	121
3.2.1.	Konzentrationsabhängigkeit der Ethylenemission	121
3.2.2.	Induktion von Ethan durch Kulturfiltrat von <i>P. quercina</i>	122

3.3.	Induktion von PR-Proteinen (Chitinase und $\beta$ -1,3-Glucanase) in den Tabakzellkulturen Bel B und Bel W3	124
3.4.	Zusammenfassung Kapitel 3	126
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>128</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>158</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>161</b>



## I. Einleitung

### 1. *Phytophthora quercina*

Seit Beginn der 80er Jahre wird ein zunehmendes Absterben von Eichen – sowohl an Einzelbäumen als auch an ganzen Beständen – beobachtet. Betroffen sind dabei v.a. die in Zentraleuropa vorkommenden Eichenarten *Quercus robur* und *Quercus petraea*, die häufig auf wechselfeuchten Standorten wachsen. Man geht davon aus, dass es sich bei der als Eichensterben oder *oak decline* bezeichneten Erscheinung um eine Komplexkrankheit handelt. Offensichtlich tragen abhängig von Region und Bestand verschiedene Ursachen – wie Frost- und Trockenperioden, Grundwasserabsenkung, verschiedene Insekten und phytopathogene Pilze – dazu bei (Jung et al., 1999).

Jung, (1998) zeigte im Rahmen seiner Dissertation, dass die von ihm untersuchten erkrankten Eichen eine starke Schädigung des Feinwurzelsystems, einen deutlich reduzierten Mykorrhizabesatz und Störungen in Wasser- und Nährstoffhaushalt aufwiesen. Mikroskopische Befunde bewiesen, dass die nekrotischen Wurzelläsionen der Eichen durch Vertreter der Gattung *Phytophthora* hervorgerufen wurden. Neben den an Eichenwurzeln auftretenden *Phytophthora*-Arten *P. citricola*, *P. cambivora*, *P. cactorum*, *P. gonapodyides* und *P. undulata* erwies sich die von Jung neu beschriebene Art *Phytophthora quercina* als besonders aggressiv (Jung et al., 1999). Die starke Präsenz und große Verbreitung der verschiedenen *Phytophthora*-Arten in den von Jung, (1998) untersuchten mitteleuropäischen Waldböden lässt eine entscheidende Rolle für die Oomycetengattung *Phytophthora* an dem Krankheitskomplex Eichensterben vermuten.

Die Gattung *Phytophthora* gehört zur Familie der Pythiaceae, Ordnung Peronosporales und zur Klasse der Oomyceten. Die meisten Vertreter dieser Gattung sind bodenbürtige, fakultative Pathogene mit großem Wirtsspektrum und weltweiter Verbreitung. Auf Grund ihrer engen Verwandtschaft zu heterokonten Algen werden die Oomyceten nicht länger zu den echten Pilzen gezählt, sondern in das Reich der Chromista eingeordnet. Begründet wird dies durch einige morphologische Eigenschaften wie die Beschaffenheit der Zellwand, die hauptsächlich aus Zellulose und  $\beta$ -1,3-Glucanen besteht. Pilzliche Zellwände weisen dagegen in der Regel Chitin als Hauptbestandteil auf. Im Gegensatz zu höheren Pilzen sind Vertreter der Oomyceten diploid und produzieren biflagellate, heterokonte Zoosporen (Erwin und Ribeiro, 1996).

Ungünstige Umweltbedingungen, wie Dürre und Frost, können *Phytophthora* - Arten mit Hilfe ihrer vegetativen dickwandigen Chlamydosporen und generativen

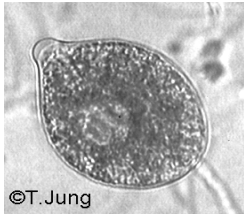


Abb. 1: Zoosporangium von *P. quercina*

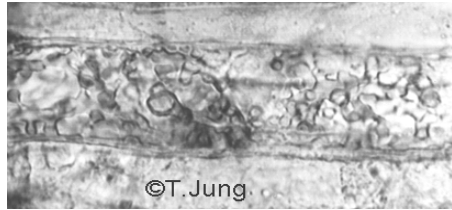


Abb. 2: Typisches koralloides *Phytophthora*-Mycel in Wurzelgewebe

Oosporen überdauern. Der Lebenszyklus dieser Parasiten steht in großer Abhängigkeit zum Feuchtigkeitsgehalt seiner Umgebung, v.a. des Bodens. Auskeimende Dauersporen bilden Zoosporangien (s. Abb. 1<sup>1)</sup>), aus denen begeißelte Zoosporen in das Bodenwasser entlassen werden. Die Zoosporen encystieren sich, sobald sie auf entsprechendes Substrat gestoßen sind, und infizieren die Pflanze durch Bildung eines Keimschlauchs (Erwin und Ribeiro, 1996; Jung et al., 1999; Jung, 1998). Im Feinwurzelgewebe bildet *Phytophthora quercina* Oosporen und ein typisches unseptiertes, koralloides Mycel (s. Abb. 2<sup>1)</sup>). Durch das Absterben eines großen Teils des Feinwurzelsystems kommt es zu oberirdischen Symptomen wie Blattchlorosen bis hin zum Absterben ganzer Äste und völliger Verkahlung.

Jung, (1998) demonstrierte außerdem, dass das Kulturfiltrat von *P. quercina* eine nekrotische Aktivität an Eichensämlingen besitzt, und postulierte die Bildung von Welketoxinen durch das Pathogen. Giefing, (1997) konnte bestätigen, dass von *P. quercina* kleine Proteine in das Kulturfiltrat abgegeben werden, welche für die Welkesymptome verantwortlich waren. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte in der vorliegenden Arbeit die biologische Aktivität des Kulturfiltrats von *P. quercina* untersucht werden.

## 2. Wirt – Pathogen – Interaktionen

Die Ausbildung der pflanzlichen Resistenz ist abhängig von dem Vermögen einer Pflanze Wachstum und Vermehrung eines Pathogens einzudämmen oder zu verhindern. Oftmals sind Geschwindigkeit und Ausmaß der Abwehrantwort sowie hochspezialisierte und empfindliche Erkennungssysteme entscheidend für die Ausbildung einer Resistenz. Das Erkennen des vom Pathogen produzierten Signals

<sup>1)</sup> Quelle:([www.forst.uni-muenchen.de/EXT/LST](http://www.forst.uni-muenchen.de/EXT/LST))

durch die Pflanze ist dabei der erste essentielle Schritt für die Aktivierung von Abwehrmechanismen. Es folgen die intrazelluläre Weiterleitung dieses Signals, die Synthese von Abwehrstoffen und deren Transport zu strategisch wichtigen Orten in der pflanzlichen Zelle (Nürnberger, 1999; Benhamou, 1996).

## 2.1. Erkennung und Signalverarbeitung

Pflanzen werden in der Natur von einer Vielzahl verschiedener Pathogene – wie Viren, Pilze, Bakterien und Nematoden – bedroht. Bei einem Zusammentreffen eines bestimmten Parasiten und einer speziellen Pflanzenart ist eine erfolgreiche Infektion bzw. Besiedlung der Pflanze die Ausnahme. In der großen Mehrzahl der Fälle können die Pflanzen einer Pathogenattacke standhalten, da sie keine geeigneten Wirte für das entsprechende Pathogen darstellen. In diesem Fall spricht man von einer sogenannten **non-host-resistance** (Nürnberger, 1999). Dieser weitverbreiteten Resistenzform lässt sich die weniger verbreitete **host- oder race/cultivar-resistance** gegenüberstellen, die nur bestimmte Sorten einer Pflanzenart entwickelt haben, und die in der Lage sind, eine bestimmte Rasse oder Linie einer Pathogenart erkennen zu können. Diese Resistenz ist genetisch festgelegt und beruht auf der Wechselwirkung zwischen einem dominanten R (Resistenz-)Gen-Produkt des Wirts und dem entsprechenden avr (Avirulenz-)Gen-Produkt des Pathogens (Somssich und Hahlbrock, 1998; Blumwald et al., 1998; Feys und Parker, 2000). Fehlt eines der beiden Genprodukte, kommt es immer zu einer anfälligen Wirt-Parasit-Interaktion. Diese Rassen/Sorten-spezifische Resistenz, deren genetische Grundlage Flor bereits Anfang der 40er Jahre dargestellt hat, hängt somit von dem Genotyp des attackierenden Pathogens ab (Somssich und Hahlbrock, 1998; Nürnberger, 1999; Feys und Parker, 2000). Bei der erwähnten non-host-resistance liegt dagegen eine grundlegende Inkompatibilität vor, die nicht auf einer spezifischen Genkombination beruht. Es ist vielmehr anzunehmen, dass strukturelle (mechanische) Barrieren, präformierte antimikrobielle Stoffe oder aber die Tatsache, dass ein ungeeignetes Substrat für ein bestimmtes Pathogen vorliegt, die Ausbreitung in der Pflanze verhindern.

Voraussetzung ist, dass die Pflanze das Pathogen erkennt und ihr multikomponentes Abwehrsystem aktiviert, was sowohl für die host- als auch für die non-host-resistance zutrifft (Nürnberger, 1999). Bedingung dafür ist eine schnelle und spezifische Erkennung eines potentiellen Eindringlings. In einer inkompatiblen Wirt-Parasit-Interaktion können sogenannte **Elicitoren** von Wirtsrezeptoren erkannt werden, wodurch die pflanzliche Abwehr induziert wird. Elicitoren sind Signalmole-

leküle, die entweder vom Pathogen (exogen) oder von der Wirtspflanze (endogen, meist Zellwandbestandteile) stammen (Benhamou, 1996). Der Begriff Elicitor bezog sich ursprünglich nur auf Stoffe, die die Akkumulation von Phytoalexinen in der Pflanze induzieren. Inzwischen wird dieser Begriff aber für alle Substanzen verwendet, die irgendeine Art von Abwehrantwort induzieren (Nürnberger, 1999). Elicitoren verschiedenster chemischer Stoffgruppen und unterschiedlichster Phytopathogene wurden in den letzten zwei Jahrzehnten charakterisiert. Die meisten bislang untersuchten Elicitoren sind unspezifische Elicitoren, sie kommen in verschiedenen Organismen vor und lösen in mehreren nicht verwandten Pflanzenarten eine Abwehrreaktion aus. Spezifische Elicitoren sind dagegen oft avr-Gen-Produkte und spielen deshalb eine Rolle bei der Sorten/Rassen-spezifischen Resistenz.

Die vom Pathogen produzierten Elicitoren sind Substanzen verschiedener Stoffklassen, darunter Kohlenhydrate, Proteine, Glykoproteine und Fettsäuren. Gut untersucht sind beispielsweise Glucanelicitoren von *P. megasperma* var. *sojae* sowie Chitin und Chitosan, die als strukturelle Komponenten pilzlicher Zellwände vorkommen. Chitin induziert u.a. eine Akkumulation von Phytoalexinen in Reis, PR-Proteinen in Erbse und Lignifizierung in Weizen (Huang, 2001; Benhamou, 1996). Auch Peptid- oder Proteinelicitoren werden häufig von Mikroorganismen produziert. Dazu gehören z.B. die Harpine, hitzestabile, saure 44 kDa-Proteine, die von einigen pflanzenpathogenen Bakterienarten, wie *Erwinia amylovora*, synthetisiert werden und in Nicht-Wirtspflanzen, aber auch in manchen resistenten Wirtssorten, eine hypersensitive Reaktion auslösen (Nürnberger, 1999). Auch der rassenspezifische Peptidelicitor von *Cladosporium fulvum*, das sog. avr9-Genprodukt, induziert Chlorosen und Nekrosen in Tomatenpflanzen, die das Cf9-Resistenzgen enthalten. Ein weiteres Beispiel für Elicitoren mit Proteincharakter sind die in dieser Arbeit untersuchten Elicitine.

Eine Reihe pilzlicher Glykoproteine besitzen Elicitoraktivität, interessanterweise kann dabei die Aktivität sowohl im Proteinanteil liegen, wie z.B. bei dem 42 kDa Glykoprotein aus dem Kulturfiltrat von *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, als auch im Kohlenhydratanteil, wie das bei dem Zellwandelicitor von *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* der Fall ist. Die in *P. infestans* vorkommenden ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure und Eicosapentaensäure induzieren die Phytoalexine Lubimin und Risihitin in Kartoffel (Huang, 2001; Nürnberger, 1999; Somssich und Hahlbrock, 1998; Benhamou, 1996).

Bei den aus der pflanzlichen Zellwand stammenden endogenen Elicitoren handelt es sich v.a. um Oligogalacturonide, die in einer Reihe verschiedener Pflanzenarten die Akkumulation von Phytoalexinen induzieren.

Voraussetzung für die Induktion einer Abwehrantwort ist, wie eingangs erwähnt, eine spezifische und schnelle Erkennung des Pathogens. In vielen Wirt-Parasit-Systemen existieren offensichtlich hochaffine Bindungsstellen – vornehmlich an der Plasmamembran – die mit Elicitoren wechselwirken und so eine Signalweiterleitung bis zum Zellkern und damit eine Abwehrantwort auslösen. Diese Bindung zwischen Rezeptor und Elicitor ist in der Regel reversibel, spezifisch, erfolgt in physiologischen Konzentrationen und führt zu einer Abwehrantwort in der Pflanze.

## 2.2. Signaltransduktion

### Calcium als Signalvermittler:

In dem folgenden Abschnitt werden Signalwege beschrieben, die bei einer Wirt – Pathogen/Elicitor – Interaktion in der Zelle aktiviert werden.

Das extrazelluläre Signal wird auf intrazellulärer Ebene umgewandelt und weitergeleitet. Als früheste Veränderungen in der Pflanzenzelle beobachtete man Proteinphosphorylierungen und Dephosphorylierungen sowie einen starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle.  $\text{Ca}^{2+}$  erfüllt in der Zelle eine Funktion als *second messenger* und liegt in geringen Konzentrationen ( $\sim 0,1 \mu\text{M}$ ) im Cytosol nicht-stimulierter Zellen vor. Diese Konzentration wird durch ATP-abhängige Ionenpumpen aufrechterhalten. Im Apoplasten finden sich dagegen verhältnismäßig hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von bis zu  $1000 \mu\text{M}$ . Verschiedene zelluläre Kompartimente wie Chloroplasten, Endoplasmatisches Retikulum und die Vakuole können vorübergehend  $\text{Ca}^{2+}$  speichern bzw. freisetzen, je nach Konzentration des freien cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ . Kommt es zu einem Pathogenbefall, so kann ein regelrechter Calciumburst (ca.  $200 - 300 \mu\text{M}$ ) im Cytosol beobachtet werden, der durch kurzzeitiges Öffnen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen zu Stande kommt. Dieser schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg im Cytosol führt seinerseits zu einer Reihe biochemischer Veränderungen in der Zelle: Membrangebundene  $\beta$ -1,3-Glucansynthasen werden aktiviert, was eine gesteigerte Calloseproduktion zur Folge hat;  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplexe assoziieren mit dem Cytoskelett und es kommt zur Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteinkinasen (Benhamou, 1996; Blumwald et al., 1998; Huang, 2001 und s. Abb. 3).