

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Quorum sensing in der Rhizosphäre.
Interaktion von *N*-Acyl-Homoserinlactonen mit Gerste
(*Hordeum vulgare* L.) und Yambohne (*Pachyrhizus erosus*
(L.) Urban) unter besonderer Berücksichtigung von Enzymen
des antioxidativen und des glutathionabhängigen
Entgiftungsstoffwechsels

Christine Götz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. J. Schnyder
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. P. Schröder
2. Univ.- Prof. Dr. W. Oßwald

Die Dissertation wurde am 29.05.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.08.2008 angenommen.

Meinen Eltern

Publikationen

- Fekete A, Götz C, Frommberger M, Hartmann A, Schröder P, Schmitt-Kopplin P** (in preparation) Working title: Strategy for primary metabolite analysis of *N*-acyl-homoserine lactones in biological materials determined by FTICR-MS. In preparation for: Rapid Communications in Mass Spectrometry.
- Götz C, Fekete A, Gebefuegi I, Forczek ST, Fuksová K, Li X, Englmann M, Gryndler M, Hartmann A, Matucha M, Schmitt-Kopplin P, Schröder P** (2007) Uptake, degradation and chiral discrimination of *N*-Acyl-D/L-homoserine lactones by barley (*Hordeum vulgare*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) plants. Analytical and Bioanalytical Chemistry 389: 1447-1457.¹
- Lyubenova L, Götz C, Golan-Goldhirsh A, Schröder P** (2007) Direct effect of Cd on Glutathione S-transferase and Glutathione reductase from *Calystegia sepium*. International Journal of Phytoremediation 9: 1-9.
- Schröder P, Götz C, Fekete A, Schmitt-Kopplin P, Matucha M, Hartmann A** (2007) Bacterial acyl-homoserine lactones - signal molecules in quorum sensing and plant defense. In BCPC International Congress Crop Science and Technology 2007. BCPC, Glasgow, p 724.
- Li X, Fekete A, Englmann M, Götz C, Rothballer M, Frommberger M, Buddrus K, Cai C, Schröder P, Hartmann A, Chen G, Schmitt-Kopplin P** (2006) Development and application of a method for the analysis of *N*-acylhomoserine lactones by solid-phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography. Journal of Chromatography A 1134: 186-193.
- Götz C, Schröder P** (2005) Herbicide resistance in *Convolvulus* and *Calystegia*- a matter of GST activity? In BCPC International Congress Crop Science and Technology 2005, Vol 1. BCPC, Glasgow, pp 169-174.
- Schröder P, Götz C, Lyubenova L, Neustifter JE** (2004) Exploiting plant metabolism for phytoremediation of organic xenobiotics. In A Hartmann, M Schmid, W Wenzel, P Hinsinger, eds, Rhizosphere 2004. Perspectives and Challenges. A Tribute to Lorenz Hiltner, München, pp 275-282.

¹Die beiden ersten Autoren haben einen gleichwertigen Beitrag zur Publikation geleistet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	17
1.1	Quorum sensing	17
1.1.1	Die Kommunikation der Bakterien	17
1.1.2	Quorum sensing auf Basis von <i>N</i> -Acyl-L-Homoserinlactonen (AHLs)	21
1.1.2.1	Struktur der <i>N</i> -Acyl-L-Homoserinlactone (AHLs)	21
1.1.2.2	Funktionsweise des AHL-basierten Quorum sensing	23
1.1.2.3	Degradation von AHLs	27
1.1.3	Quorum sensing in Proteobacteria	28
1.1.3.1	Quorum sensing in humanpathogenen Arten	28
1.1.3.2	Quorum sensing in pflanzenpathogenen Arten	29
1.1.3.3	Quorum sensing in PGPR und symbiotischen Bakterien	31
1.2	Interaktion von Signalstoff und Pflanze	33
1.2.1	Pigmente	36
1.2.2	Glutathion und Glutathion S-Transferasen	36
1.2.2.1	Das Tripeptid Glutathion	36
1.2.2.2	Pflanzliche Glutathion S-Transferasen und ihre Bedeutung	37
1.2.3	Enzyme des antioxidativen Systems	39
1.2.3.1	Superoxiddismutase	42
1.2.3.2	Katalase	42
1.2.3.3	Peroxidasen	43
1.2.3.4	Glutathionperoxidase	43
1.2.3.5	Ascorbatperoxidase	43
1.2.3.6	Monodehydroascorbatreduktase	44
1.2.3.7	Dehydroascorbatreduktase	44
1.2.3.8	Glutathionreduktase	45
1.2.3.9	Cytosol und Mikrosomen	45
1.3	Fragestellungen	46
2	Material und Methoden	49
2.1	Material	49
2.1.1	Die Versuchspflanzen Gerste und Yambohne	49
2.1.1.1	Gerste, <i>Hordeum vulgare</i> L., Kultivar „Barke“	49
2.1.1.2	Yambohne, <i>Pachyrhizus erosus</i> (L.) Urban „EC 550“	49
2.1.2	Simulationskammern	51
2.2	Methoden	52

2.2.1	Pflanzenanzucht	52
2.2.2	Medien	54
2.2.3	Untersuchung der AHL-Dynamik im axenischen System	55
2.2.3.1	Probenvorbereitung aus Medium und Pflanze	55
2.2.3.2	AHL-Nachweis an UPLC	56
2.2.3.3	AHL-Nachweis am FTICR-MS	57
2.2.3.4	Szintillation Tritium-markierter AHLs	58
2.2.3.5	Chirale Trennung von D/L-AHL	59
2.2.3.6	Analyse von AHL-Metaboliten	60
2.2.4	Pigmentanalyse	61
2.2.5	Bestimmung von Wurzelparametern	61
2.2.6	Blattflächenmessung	62
2.2.7	Extraktion cytosolischer und mikrosomaler Enzyme	62
2.2.8	Enzymatische Assays	64
2.2.8.1	Substrate der Glutathion S-Transferasen	64
2.2.8.2	Fluorodifen	64
2.2.8.3	Superoxid-Dismutase, SOD	65
2.2.8.4	Katalase, CAT	66
2.2.8.5	Peroxidase, POX	66
2.2.8.6	Glutathion-Peroxidase, GPOX	66
2.2.8.7	Ascorbatperoxidase, APOX	66
2.2.8.8	Monodehydroascorbatreduktase, MDHAR	67
2.2.8.9	Dehydroascorbatreduktase, DHAR	67
2.2.8.10	Glutathionreduktase, GR	67
2.2.8.11	Quantifizierung der Proteingehalte	67
2.2.9	2D-PAGE	68
2.2.9.1	Herstellung der Gele	68
2.2.9.2	Erste Dimension	68
2.2.9.3	Zweite Dimension, Färbung und Auswertung	69
2.2.10	Bestimmung der Thiolgehalte	70
2.2.11	Statistische Analyse	72
3	Ergebnisse	75
3.1	AHL-Dynamik im axenischen System	75
3.1.1	Abiotisch bedingte AHL-Abnahme	75
3.1.2	Pflanzenbedingte AHL-Abnahme	78
3.1.3	Chirale Selektion von AHL	83
3.1.4	Nachweis von AHL in Pflanzenextrakten	84
3.1.4.1	AHL-Nachweis an UPLC	84
3.1.4.2	Qualitativer AHL-Nachweis am FTICR-MS	86
3.1.4.3	Translokation von radioaktiv markiertem AHL in Gerste	88
3.1.4.4	Mathematische Modellierung	92
3.1.5	Screening nach AHL-Metaboliten	93

3.1.5.1	Metaboliten in Pflanzenextrakten	93
3.1.5.2	Metaboliten im Medium	95
3.1.6	Nachweis von AHL aus realer bakterieller Kolonisation	96
3.2	Einfluss von AHL auf physiologische Kenngrößen	98
3.2.1	Frischgewicht von Spross und Wurzel	98
3.2.2	Blattflächen	98
3.2.3	Sprosslängen der Gerste	102
3.2.4	pH-Wert des Mediums	103
3.2.5	Wurzelparameter	105
3.2.5.1	Gerstenwurzeln	105
3.2.5.2	Yambohnenwurzeln	108
3.2.6	Einfluss von AHL auf Pigmentgehalte	110
3.2.6.1	Pigmente der Gerste	110
3.2.6.2	Pigmente der Yambohne	111
3.3	Ergebnisse der enzymatischen Assays	112
3.3.1	Cytosolische Enzyme der Gerste	112
3.3.1.1	cGST : CDNB in Gerste	112
3.3.1.2	cGST : NBC in Gerste	112
3.3.1.3	cGST : NBOC in Gerste	113
3.3.1.4	cGST : DCNB in Gerste	115
3.3.1.5	cGST : Fluorodifen in Gerste	115
3.3.1.6	SOD der Gerste im Cytosol	116
3.3.1.7	POX der Gerste im Cytosol	117
3.3.1.8	GPOX der Gerste im Cytosol	117
3.3.1.9	APOX der Gerste im Cytosol	118
3.3.1.10	MDHAR der Gerste im Cytosol	120
3.3.1.11	DHAR der Gerste im Cytosol	120
3.3.1.12	GR der Gerste im Cytosol	121
3.3.2	Mikrosomale Enzyme der Gerste	123
3.3.2.1	mGST : CDNB in Gerste	123
3.3.2.2	mGST : NBC in Gerste	123
3.3.2.3	mGST : NBOC in Gerste	124
3.3.2.4	mGST : DCNB in Gerste	125
3.3.2.5	mGST : Fluorodifen in Gerste	125
3.3.2.6	Mikrosomale SOD der Gerste	125
3.3.2.7	Katalase der Gerste	125
3.3.2.8	Mikrosomale APOX der Gerste	127
3.3.2.9	Mikrosomale MDHAR der Gerste	128
3.3.2.10	Mikrosomale DHAR der Gerste	128
3.3.2.11	Mikrosomale GR der Gerste	130
3.3.3	Cytosolische Enzyme der Yambohne	131
3.3.3.1	cGST : CDNB in Yambohne	131
3.3.3.2	cGST : NBC der Yambohne	131

3.3.3.3	cGST : NBOC der Yambohne	132
3.3.3.4	cGST : DCNB der Yambohne	132
3.3.3.5	cGST : Fluorodifen der Yambohne	134
3.3.3.6	SOD der Yambohne im Cytosol	134
3.3.3.7	POX der Yambohne im Cytosol	135
3.3.3.8	GPOX der Yambohne im Cytosol	135
3.3.3.9	APOX der Yambohne im Cytosol	135
3.3.3.10	MDHAR der Yambohne im Cytosol	135
3.3.3.11	DHAR der Yambohne im Cytosol	138
3.3.3.12	GR der Yambohne im Cytosol	138
3.3.4	Mikrosomale Enzyme der Yambohne	140
3.3.4.1	mGST : CDNB in Yambohne	140
3.3.4.2	mGST : NBC in Yambohne	140
3.3.4.3	mGST : NBOC in Yambohne	141
3.3.4.4	mGST : DCNB in Yambohne	142
3.3.4.5	mGST : Fluorodifen in Yambohne	142
3.3.4.6	Mikrosomale SOD der Yambohne	143
3.3.4.7	Katalase der Yambohne	143
3.3.4.8	Mikrosomale APOX der Yambohne	144
3.3.4.9	Mikrosomale MDHAR der Yambohne	144
3.3.4.10	Mikrosomale DHAR der Yambohne	145
3.3.4.11	Mikrosomale GR der Yambohne	145
3.4	Thiolgehalte unter AHL-Einfluss	147
3.5	2D-Gelelektrophorese	149
4	Diskussion	159
4.1	AHL-Dynamik im axenischen Modellsystem	161
4.1.1	Wechselwirkung von AHL und Pflanzen im Medium	161
4.1.2	Nachweis von AHL und seinen Metaboliten in Pflanzen	164
4.1.2.1	AHL aus realer bakterieller Kolonisation	167
4.2	Einfluss von AHL auf morphologische und physiologische Parameter	168
4.3	Antioxidativer und detoxifizierender Stoffwechsel auf Proteomebene	170
4.3.1	Glutathion S-Transferasen	170
4.3.1.1	Nutzung von AHLs zur Pflanzenstärkung?	173
4.3.2	Antioxidativer Stoffwechsel und Thiole	174
4.3.3	2D-PAGE Analyse	177
4.4	Schlussfolgerungen	179
5	Zusammenfassung	181
6	Literaturverzeichnis	184
7	Anhang	197

Abbildungsverzeichnis

1.1	<i>Euprymna scolopes</i> und <i>Vibrio fischeri</i>	18
1.2	Entstehung von Biofilmen	20
1.3	Struktur der AHLs	22
1.4	Quorum sensing in <i>Vibrio fischeri</i>	25
1.5	Angriffspunkte für enzymatische Spaltung von AHL	27
1.6	Wirkung von AHL-Acylasen und -Lactonasen	28
1.7	Schadsymptome <i>Pseudomonas</i>	30
1.8	Schadsymptome <i>Erwinia amylovora</i>	31
1.9	Turmbau zu Babel	33
1.10	AHL und Furanon	35
1.11	Glutathion	37
1.12	GST-Reaktion mit CDNB	38
1.13	GST-Reaktion mit Fluorodifen	39
1.14	ROS-Entgiftungspfade	41
2.1	Die Versuchspflanzen Gerste und Yambohne	50
2.2	Pflanzen im axenischen System	54
2.3	Kalibriergerade für AHLs	57
2.4	Spezialglas	59
2.5	Reaktionschema des AccQ •Tag™	71
2.6	Kalibriergerade für Thiole	72
3.1	UPLC-Chromatogramm	76
3.2	Zeitablauf der abiotischen Adsorption	78
3.3	Einfluss abiotischer und pflanzlicher Faktoren auf AHLs	80
3.4	Zeitlicher Verlauf AHL-Abnahme	82
3.5	C6-HSL in Gerstenwurzel	85
3.6	C8-HSL in Gerstenwurzel	85
3.7	C10-HSL in Gerstenwurzel	86
3.8	AHL-Nachweis in Gerste	87
3.9	AHL-Nachweis in Yambohne	89
3.10	Tritiiertes AHL in Wurzel und Spross der Gerste	90
3.11	Modell der Abnahme von C6-HSL.	92
3.12	Einfluss von AHL auf das Frischgewicht	99
3.13	Absolute Blattfläche pro Pflanze in cm ²	100
3.14	Blattflächen pro Gramm Frischgewicht unter AHL-Einfluss.	101

3.15 Sprosslänge Gerste	102
3.16 pH-Wert des Mediums	104
3.17 Wurzeldurchmesserklassen Gerste	107
3.18 Wurzeldurchmesserklassen Yambohne	109
3.19 Pigmentgehalte der Gerste unter AHL-Einfluss.	110
3.20 Pigmentgehalte der Yambohne unter AHL-Einfluss.	111
3.21 Spezifische cGST:CDNB-Aktivität in Gerste.	113
3.22 Spezifische cGST:NBC-Aktivität in Gerste.	114
3.23 Spezifische cGST:NBOC-Aktivität in Gerste.	114
3.24 Spezifische cGST:DCNB-Aktivität in Gerste.	115
3.25 Spezifische cGST:Fluorodifen-Aktivität in Gerste.	116
3.26 Spezifische cytosolische SOD-Aktivität in Gerste.	117
3.27 Spezifische cytosolische POX-Aktivität in Gerste.	118
3.28 Spezifische cytosolische GPOX-Aktivität in Gerste.	119
3.29 Spezifische cytosolische APOX-Aktivität in Gerste.	119
3.30 Spezifische cytosolische MDHAR-Aktivität in Gerste.	120
3.31 Spezifische cytosolische DHAR-Aktivität in Gerste.	122
3.32 Spezifische cytosolische GR-Aktivität in Gerste.	122
3.33 Spezifische mGST:CDNB-Aktivität in Gerste.	123
3.34 Spezifische mGST:NBC-Aktivität in Gerste.	124
3.35 Spezifische mGST:NBOC-Aktivität in Gerste.	126
3.36 Spezifische mGST:Fluorodifen-Aktivität in Gerste.	126
3.37 Spezifische Katalase-Aktivität der Gerste.	127
3.38 Spezifische mikrosomale MDHAR-Aktivität in Gerste.	129
3.39 Spezifische mikrosomale DHAR-Aktivität in Gerste.	129
3.40 Spezifische mikrosomale GR-Aktivität in Gerste.	130
3.41 Spezifische cGST:CDNB-Aktivität in Yambohne.	131
3.42 Spezifische cGST:NBC-Aktivität in Yambohne.	132
3.43 Spezifische cGST:DCNB-Aktivität in Yambohne.	133
3.44 Spezifische cGST:Fluorodifen-Aktivität in Yambohne.	133
3.45 Spezifische cytosolische SOD-Aktivität in Yambohne.	134
3.46 Spezifische cytosolische POX-Aktivität in Yambohne.	136
3.47 Spezifische cytosolische GPOX-Aktivität in Yambohne.	136
3.48 Spezifische cytosolische APOX-Aktivität in Yambohne.	137
3.49 Spezifische cytosolische MDHAR-Aktivität in Yambohne.	137
3.50 Spezifische cytosolische DHAR-Aktivität in Yambohne.	139
3.51 Spezifische cytosolische GR-Aktivität in Yambohne.	139
3.52 Spezifische mGST:CDNB-Aktivität in Yambohne.	140
3.53 Spezifische mGST:NBC-Aktivität in Yambohne.	141
3.54 Spezifische mGST:NBOC-Aktivität in Yambohne.	142
3.55 Spezifische mGST:Fluorodifen-Aktivität in Yambohne.	143
3.56 Spezifische Katalase-Aktivität der Yambohne.	144
3.57 Spezifische mikrosomale MDHAR-Aktivität in Yambohne.	145

3.58 Spezifische mikrosomale DHAR-Aktivität in Yambohne.	146
3.59 Spezifische mikrosomale GR-Aktivität in Yambohne.	146
3.60 2D-Gel Kontrolle-C6	153
3.61 2D-Gel Kontrolle-C6	154
3.62 2D-Gel Kontrolle-C6	155
3.63 2D-Gel Kontrolle-C8 Yambohne	156
3.64 2D-Gel Kontrolle-C10 Yambohne	157
4.1 AHL-Abnahme interpoliert zu logP	162
7.1 Cytosolische Enzyme der Gerste (1)	198
7.2 Cytosolische Enzyme der Gerste (2)	199
7.3 Mikrosomale Enzyme der Gerste (1)	200
7.4 Mikrosomale Enzyme der Gerste (2)	201
7.5 Cytosolische Enzyme der Yambohne (1)	202
7.6 Cytosolische Enzyme der Yambohne (2)	203
7.7 Mikrosomale Enzyme der Yambohne (1)	204
7.8 Mikrosomale Enzyme der Yambohne (2)	205
7.9 pI und kDa Barke	205

Tabellenverzeichnis

1.1	Bakterien mit Nachweis von C6-HSL, C8-HSL und C10-HSL	24
2.1	Getestete Anzuchtgefäße	53
2.2	MS-Medium	55
2.3	GST-Substrate	64
2.4	Rehydratationspuffer	69
2.5	Equilibrierlösungen	69
3.1	Abiotischer AHL-Abbau	77
3.2	Pflanzenbedingte AHL-Abnahme	79
3.3	AHL-Konzentrationen nah und entfernt zur Wurzel	81
3.4	D/L-Ratio nach Pflanzenanzucht	84
3.5	AHL-Metaboliten in Gerste	94
3.6	AHL-Metaboliten in Yambohne	95
3.7	Verhältnis AHL:HS in Gerste und Yambohne.	96
3.8	Gersten unter <i>P. putida</i>	97
3.9	Wurzelparameter der Gerste	106
3.10	Wurzelparameter der Gerste	108
3.11	Thiolgehalte in Gerste	148
3.12	Thiolgehalte in Yambohne	148
7.1	Kalibration FTICR-MS	197
7.2	CDNB-Aktivität unter Einfluss von C8-HSL	197

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AHL	N-Acyl-Homoserinlacton
APOX	Ascorbatperoxidase
APS	Ammoniumpersulfat
BPDS	Bathophenanthrolindisulfonat-Natriumsalz
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
C6-HSL	N-Hexanoyl-Homoserinlacton
C8-HSL	N-Octanoyl-Homoserinlacton
C10-HSL	N-Decanoyl-Homoserinlacton
CA	Cellulose-Acetat
CDNB	1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol
cGST	cytosolische GST
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHES	2-[N-Cyclohexylamino]ethan-sulfonsäure
Ci	Curie
cm	Zentimeter
Cys	Cystein
d	Tag
dest.	destilliert
DCNB	1,2-Dichlornitrobenzol
DHA	Dehydroascorbat
DHAR	Dehydroascorbatreduktase
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreit
E.C.	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
FTICR-MS	Fouriertransform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry
g	Gramm oder Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometer
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GPOX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase

GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
³ H	Tritium
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HS	Homoserin
HSL	Homoserinlacton
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kat	Katal (Mol/Sekunde)
kDa	Kilodalton
k _m	Michaelis-Menten-Konstante
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
L.	Linné, Carl von (1707-1778)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
logP	Verteilungskoeffizient Octanol-Wasser (= logK _{ow})
M	Molar
m	Meter
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGST	mikrosomale GST
min	Minute
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaClO	Natriumhypochlorit
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NB	Nährbouillon
NBC	4-Nitrobenzylchlorid
NBOC	4-Nitrobenzoylchlorid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
P	Phosphor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
POX	Peroxidase
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QS	Quorum sensing
R ²	Korrelationskoeffizient
rLF	relative Luftfeuchte
rpm	Umdrehung pro min
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Solid-phase extraction
T	Zeitpunkt
Tab.	Tabelle

TCA	Trichloressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	Unit; Umsatz von 1 Mikromol Substrat pro min
UPLC	Ultra Pressure Liquid Chromatography
UV	Ultraviolette Strahlung
UV/Vis	UV und sichtbares Licht
v/v	Volumenprozent
V	Volt
w/v	Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 Quorum sensing

1.1.1 Die Kommunikation der Bakterien

Zell-Zell-Kommunikation ermöglicht die zeitlich koordinierte Expression von Genen in bakteriellen Populationen (Mole et al., 2007). Diese knappe Formulierung stellt die pointierte Beschreibung eines faszinierenden Phänomens dar, welches in den letzten Jahren beachtlich wachsendes Interesse erfahren hat: der Tatsache, dass Bakterien zu einer „Unterhaltung“ auf molekularer Ebene fähig sind und dadurch das Verhalten einer Gemeinschaft von Einzellern gezielt steuern können.

Vor dem Hintergrund, dass man lange Zeit glaubte, Bakterien seien nichts weiter als stumm und blind umherstreunende Einzelgänger (Obst, 2007), erschien diese Idee nahezu ketzerisch. Daher mag es nicht verwundern, dass eine beträchtliche Zeitspanne verging, bis die Bedeutung des heute als „Quorum sensing“ (Fuqua et al., 1994) bezeichneten Phänomens erkannt wurde, wobei der Begriff des „Quorum“ aus der Politik stammt und die kleinste für eine Entscheidungsfindung nötige Zahl an Stimmberechtigten beschreibt.

Erste Publikationen wiesen bereits vor über 40 Jahren auf die Existenz des Quorum sensing hin. Tomasz postulierte im Jahr 1965, dass die Zellkompetenz von grampositiven Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*) durch ein hormonähnliches Produkt reguliert werde. Nealson und seine Mitarbeiter erkannten später, dass Bakterien der gramnegativen Spezies *Vibrio (Photobacterium) fischeri*, welche in Symbiose mit dem Kopffüßler *Euprymna scolopes* leben, in Abhängigkeit von der Populationsdichte Biolumineszenz ausbilden (Nealson et al., 1970). In der Natur dient diesen nur etwa 2 cm langen nachtaktiven Zwergtintenfischen ein Leuchtorgan, in welchem sich die lumineszierenden Bakterien befinden, zur Imitation des Mond- und Sternenlichts, das sie für Fressfeinde praktisch

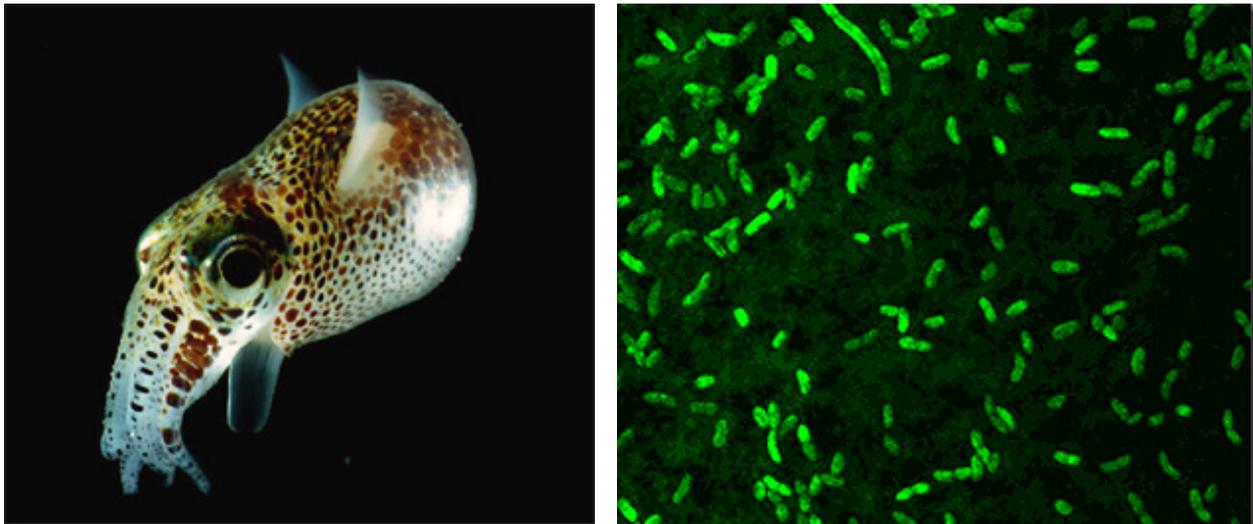


Abbildung 1.1: Der nachtaktive Zwergtintenfisch *Euprymna scolopes* neben fluoreszenzgefärbten *Vibrio fischeri*-Zellen. Bildnachweis: MJ McFall-Ngai, EG Ruby, University of Hawaii sowie E Nelson, L Sycuro, *Vibrio fischeri* Genome Project. <http://serc.carleton.edu/microbelife/topics/marinesymbiosis/squid-vibrio/index.html>

unsichtbar macht (Fuqua und Greenberg, 2002), weil sie keinen Schatten werfen. Interessant ist hierbei, dass in freier See lebende *Vibrio fischeri*-Zellen keine Biolumineszenz ausbilden (González und Keshavan, 2006). Erst wenn die Bakterien vom Tintenfisch aus dem Meerwasser aufgenommen werden, sich im Leuchtorgan des Tieres vermehren und eine Population von etwa 10^6 Zellen aufgebaut haben (Visick und Ruby, 2006), kommt es zur charakteristischen Lichtentwicklung, an welcher das Enzym Luciferase beteiligt ist.

Wie ist es zu erklären, dass *Vibrio fischeri* erst ab einer ganz bestimmten Zellzahl zu lumineszieren beginnt? Während anfangs noch davon ausgegangen wurde, dass bei zu geringer Populationsdichte die Luciferase-Synthese durch einen Inhibitor unterdrückt werde, wurde später erkannt, dass die Steuerung der Biolumineszenz durch einen Aktivator erfolgt (Eberhard, 1972), welcher erst in den frühen 80er Jahren als *N*-(β -Ketocaproyl)-Homoserinlacton klassifiziert wurde (Eberhard et al., 1981), der heute als *N*-(3-oxo-Hexanoyl)-L-Homoserinlacton oder kurz 3-oxo-C6-HSL bzw. OHHL bezeichnet wird. Dieses Molekül wird von *Vibrio fischeri* kontinuierlich gebildet, reichert sich innerhalb des Leuchtorgans des Zwergtintenfisches an und initiiert erst ab einer bestimmten Konzentrationsschwelle beziehungsweise Populationsdichte die Lumineszenz. Die genaue Funktion des Mechanismus wird in Kapitel 1.1.2 ausführlich beschrieben.

Die Signalmoleküle des Quorum sensing, so wie das 3-oxo-C6-HSL in *Vibrio fischeri*, zeichnen sich durch ein niedriges Molekulargewicht aus, sind überwiegend diffusionsfähig und gehören unterschiedlichen Stoffklassen an. Während Oligopeptide als typische

Signalstoffe in grampositiven Arten gelten, wirken die *N*-Acyl-L-Homoserinlactone (AHLs) in den gramnegativen Bakterien des Stammes der Proteobacteria als Signalmoleküle und stellen gleichzeitig die bisher am besten untersuchte Klasse von QS-Signalen dar (Hense et al., 2007). Über 50 Spezies der Proteobacteria (von Bodman et al., 2003) oder ungefähr 7 % allein aus den großen Klassen der Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria (McDougald et al., 2006) nutzen AHLs im Quorum sensing; mehr als 70 Quorum sensing-Systeme ähnlich dem von *Vibrio fischeri* („LuxIR“) sind bekannt (Taga und Bassler, 2003).

Neben AHL existieren noch weitere Komponenten, die verschiedenen Mikroorganismen als Signalstoffe (auch bezeichnet als Autoinducer) im Quorum sensing dienen, wie beispielsweise Quinolone, zyklische Dipeptide oder der sowohl in grampositiven wie gramnegativen Bakterien nachgewiesene Autoinducer-2 (AI-2) (McDougald et al., 2006), auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll.

Neben der Lumineszenz unterliegt eine ganze Reihe anderer Vorgänge der Regulation durch Quorum sensing. Dazu gehört beispielsweise auch die Bildung von Biofilmen, die in Abbildung 1.2 vereinfacht dargestellt ist. Neben einer frei lebenden, planktonischen Wuchsform können sich wahrscheinlich fast alle Bakterienarten als Biofilm etablieren, welcher sich durch festes Anhaften an einer Unterlage und einen strukturierten Aufbau auszeichnet (Folwaczny und Hickel, 2003). In einem Biofilm sind Bakterienpopulationen in eine extrazelluläre Polysaccharidmatrix eingebettet und bilden typische pilz- oder turmförmige Gebilde aus (Davies et al., 1998). Die Organisation als Biofilm verleiht bakteriellen Krankheitserregern eine außerordentlich hohe Resistenz gegen nahezu jede Art von antibakterieller Behandlung, die inzwischen als eine der Hauptursachen für eine Reihe von schwierig zu behandelnden chronischen Infektionen angesehen wird (Folwaczny und Hickel, 2003). Biofilme spielen eine Rolle bei dentalen Erkrankungen wie Karies und Parodontitis, aber auch bei Mittelohrentzündungen, Endocarditis (Entzündung der Herzklappen), Osteomyelitis (Entzündung des Knochenmarks) und anderen chronischen Infektionen (Kaplan, 2005). Experten schätzen sogar, dass in 65 % aller Infektionen die Bildung von Biofilmen eine Rolle spielt (Breuer, 2005). Da der geordnete Aufbau eines Biofilmes von der Regulation der Genexpression durch Quorum sensing abhängt, stellt die Störung der Zell-Zell-Kommunikation einen alternativen Ansatz zur Eliminierung von Infektionen dar (Stewart, 2003). Ein führender Züricher Forscher vergleicht dies gar drastisch mit moderner Kriegsführung, bei der zunächst die Kommunikationswege des Gegners zerstört

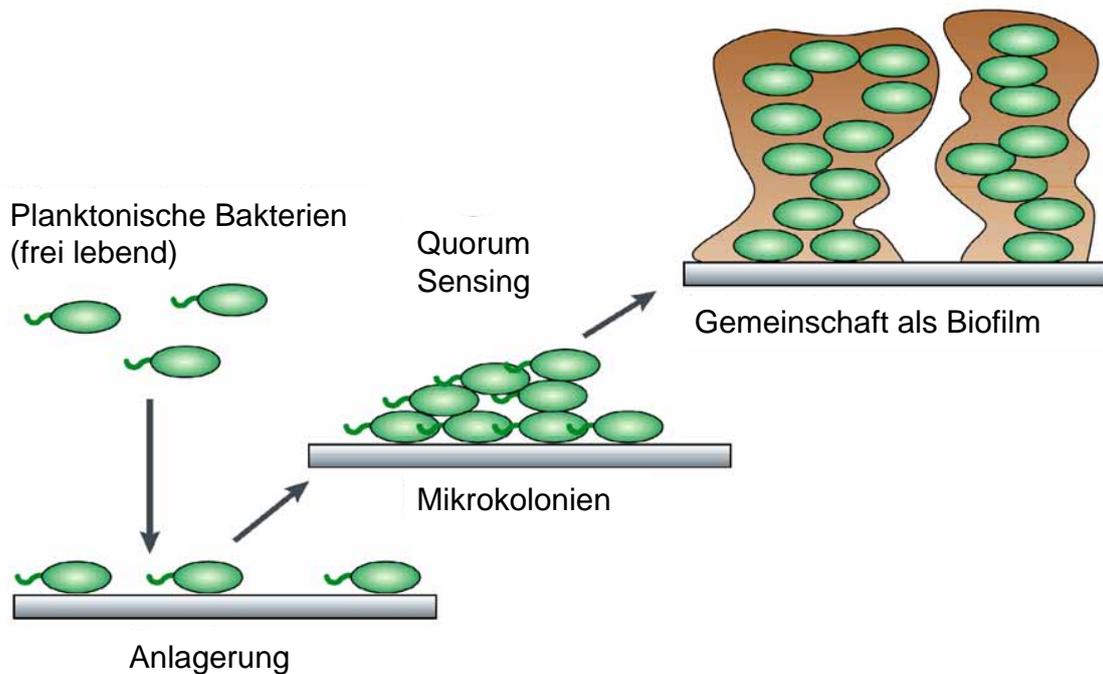


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Ausbildung von bakteriellen Biofilmen, modifiziert nach Fuqua und Greenberg (2002).

werden (Blech, 2001).

Lumineszenz und Biofilmbildung repräsentieren zwei sehr geeignete Beispiele, um die Bedeutung und den Einfluss von Quorum sensing in Bakterien zu veranschaulichen, doch nicht nur diese beiden Vorgänge unterliegen einer gezielten Regulation durch „bakterielle Zwiegespräche“. Weiterhin können zahlreiche andere Prozesse wie zum Beispiel die Produktion von Antibiotika, Motilität durch Schwärmen oder Schwimmen, Zellkompetenz, Plasmidtransfer, die Produktion von Virulenzfaktoren, Nodulation und viele andere Vorgänge unter der Kontrolle von Quorum sensing stehen (siehe hierzu Reviews von Miller und Bassler, 2001; Loh et al., 2002; von Bodman et al., 2003; Quiñones et al., 2005). In pflanzenpathogenen Bakterien beispielsweise hilft Quorum sensing dabei, die Kolonisierung sowie die Produktion von Antibiotika zu koordinieren. Auf diese Weise wird nicht nur der Befall des Wirtsgewebes erleichtert, sondern auch gleichzeitig verhindert, dass andere Mikroben an der Mahlzeit teilhaben (Obst, 2007). Zudem würde eine verfrühte Aktivierung von Virulenzgenen, beispielsweise für Toxinproduktion, Abwehrmechanismen des Wirtes auslösen und ihm damit einen Vorteil gegenüber den Bakterien verschaffen, da eine zu geringe Population die pflanzliche Abwehr kaum überwinden kann. Koordinierte Genexpression verhindert dabei ebenfalls, dass wertvolle Energie für die Synthese von Verbindungen zum unpassenden Zeitpunkt verschwendet wird (González und Keshavan,

2006).

Das Konzept der bakteriellen Verständigung war anfangs seiner Zeit voraus (Fuqua und Greenberg, 2002), da jahrzehntelang davon ausgegangen wurde, dass die Kontrolle der Lumineszenz nicht recht viel mehr darstelle als eine kuriose Besonderheit mariner Bakterien. Die ersten wenigen bekannten Fälle von interzellulärem Signalling wurden gar als Anomalie betrachtet (Miller und Bassler, 2001). Nealson hatte dementsprechend um 1970 einen schweren Stand, als er seine Erkenntnisse publizieren wollte. Der Artikel wurde mehrfach abgelehnt- "Bakterien tun so etwas einfach nicht", so die pauschale Begründung (Silberman, 2003). Heute hingegen weiß man, dass viele Mikroben die Zell-Zell-Kommunikation unter Verwendung vielfältigster Signalmoleküle nutzen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich die Zahl der jährlich erschienenen Publikationen zum Thema Quorum sensing zwischen 1993 und 2003 von weniger als 20 auf über 200 pro Jahr erhöht hat (Frommberger et al., 2005). Das Thema hat mittlerweile sogar Einzug in populäre Medien wie Zeitungen und Illustrierte gefunden, wo besonders das Potential des Quorum sensing bezüglich neuer antibakterieller Therapiemethoden unter Titeln wie „Geheimsprache der Bakterien“ (Der Spiegel), „Flower-Power gegen Bakterien“ (NZZ am Sonntag) oder „Schluss mit dem Bakterien-Geplapper“ (SonntagsZeitung, Schweiz) publiziert wurde (Blech, 2001; Behr, 2005; Breuer, 2005).

1.1.2 Quorum sensing auf Basis von *N*-Acyl-L-Homoserinlactonen (AHLs)

Bevor näher auf die Verbreitung, die Regulationsfunktionen und Bedeutung des Quorum sensing eingegangen wird, sollen hier zunächst die strukturelle Beschaffenheit und der regulatorische Ablauf erläutert werden. Da sich diese Arbeit auf die Signalstoffe von gramnegativen Bakterien konzentriert, werden hier die AHLs sowie typische Beispiele von Zell-Zell-Kommunikationssystemen von gramnegativen Arten, wie beispielsweise der LuxIR-Zyklus von *Vibrio fischeri*, besprochen.

1.1.2.1 Struktur der *N*-Acyl-L-Homoserinlactone (AHLs)

Wodurch wird ein Signalmolekül definiert? Gemäß Winzer et al. (2002) ist diese Bezeichnung reserviert für kleine, diffusionsfähige Moleküle, die eine Funktion in der Zell-Zell-Kommunikation übernehmen. Dies sind Kriterien, die AHLs erfüllen, auch wenn für langkettige AHLs ein durch Pumpen bewerkstelligter aktiver Efflux statt freier Diffusion postu-

liert wird (Pearson et al., 1999).

AHLs sind grundsätzlich, wie in Abbildung 1.3 deutlich wird, so aufgebaut, dass eine aliphatische Seitenkette mit variablen Substituenten und Kettenlängen mit einem aus Homoserin gebildeten Lactonring verbunden ist. Die Fettsäure ist hierbei über eine Acylbindung an die Aminogruppe des Homoserinlactons gekoppelt. Die Variabilität der Acyl-Gruppe

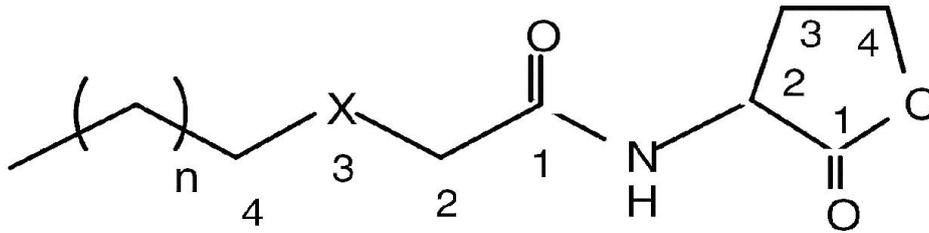


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau von *N*-Acyl-L-Homoserinlactonen (AHLs) nach Nasser und Reverchon (2006). AHLs bestehen aus einer ringförmigen Homoserinlacton-Einheit und Acyl-Seitenketten mit variablen Kettenlängen (fakultativ ungesättigt) und möglicher Substitution am C3 der Acyl-Seitenkette, gekennzeichnet mit X.

entsteht durch unterschiedliche Kettenlängen (C4 bis C18), fakultative Oxo- und Hydroxysubstitution am C3 der Acylkette oder Doppelbindungen bzw. Sättigungen (Frommberger, 2005). Daraus resultiert eine hohe Zahl möglicher Verbindungen. AHLs werden nach der Zahl der C-Atome in der Seitenkette benannt; *N*-Octanoyl-Homoserinlacton entspricht dem zur Folge C8-HSL, obwohl das Molekül zusammen mit der Homoserinlacton-Einheit insgesamt 12 C aufweist. Gemäß González und Keshavan (2006) gelten AHLs mit Acylgruppen von 4 bis 8 C-Atomen als kurzketting und jene mit größerer Anzahl C-Atomen als langketting. AHLs benötigen jedoch zur Stabilität immer eine Acylkette aus mindestens 4 C-Atomen. Homoserinlacton selbst kann nicht als Signalstoff wirken, da es bei pH-Werten >2 sofortiger Lactonolyse unterliegt (Yates et al., 2002). Lactonolyse kann jedoch auch bei den AHLs unter der Einwirkung von Enzymen oder bei ungünstigen pH-Werten, z.B. im basischen Bereich, geschehen (Englmann et al., 2007). Dies wird in Kapitel 1.1.2.3 näher erörtert werden.

Die einfachsten AHLs mit unsubstituierten Acylgruppen ohne Doppelbindungen stellen erwartungsgemäß die stabilsten AHLs dar (Cataldi et al., 2007; A. Fekete, persönliche Kommunikation). Bei dieser Gruppe von AHLs steigt die Lipophilie mit jeder zusätzlichen C2-Einheit um das Zehnfache bzw. der logP um je ungefähr eine ganzzahlige Stufe (ver-

gleiche Englmann et al., 2007). Dies bedeutet, dass die lipophilen Eigenschaften dieser AHLs von der Acyl-Seitenkette bestimmt werden.

Der Aufbau von Semiochemikalien mit einem Gerüst aus Fettsäureketten stellt in gram-negativen Bakterien im Übrigen keine Besonderheit dar. Auch andere bakterielle Signalstoffe wie 3-OH-Palmitinsäure-Methylester (3-OH-PAME) in *Ralstonia solanacearum*, dem Erreger der Schleimkrankheit an Nachtschattengewächsen, oder *cis*-11-Methyl-2-Dodecensäure (DSF, diffusible signal factor) in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Brassica-Adernschwärze) basieren in ihrer Grundstruktur auf Fettsäureketten (González und Keshavan, 2006; Horswill et al., 2007; Mole et al., 2007).

In den Experimenten zur vorliegenden Arbeit wurden unsubstituierte AHLs mit drei unterschiedlichen Kettenlängen verwendet. Es handelte sich hierbei um das *N*-Hexanoyl- (C6-HSL), das *N*-Octanoyl- (C8-HSL) sowie das *N*-Decanoyl-Homoserinlacton (C10-HSL). Diese AHLs zeichnen sich durch Löslichkeit in Ethanol aus, während längerkettige AHLs stärkere organische Lösungsmittel erfordern, was aber aufgrund der Applikation auf lebende Pflanzen ungeeignet war. Selbstverständlich spielen C6-HSL, C8-HSL und C10-HSL eine wichtige Rolle im Quorum sensing als häufige Signalstoffe. Eine kleine Auswahl von bakteriellen Spezies, in denen die in diesen Experimenten verwendeten AHLs nachgewiesen wurden, findet sich in Tabelle 1.1.

1.1.2.2 Funktionsweise des AHL-basierten Quorum sensing

Der Signalweg des AHL-basierten Quorum sensing soll hier am Beispiel von *Vibrio fischeri* besprochen werden. Der LuxIR-Regulationsmechanismus dieser Spezies, der die Biolumineszenz während der Symbiose mit dem Kopffüßler reguliert, ist eines der wohl am besten erforschten Beispiele für diese Art von Zell-Zell-Kommunikation (González und Marketon, 2003), welches in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt ist.

Solange die Bakterien frei bzw. planktonisch leben oder die Zelldichte niedrig ist, bleibt die Transkription der Gene für Biolumineszenz (*luxICDABEG*) auf einem geringem Niveau, welches für die Lichtemission nicht ausreicht (Whitehead et al., 2001). Die Sequenz *luxI* am Anfang des Operons, die für ein Enzym namens LuxI kodiert, wird hierbei konstitutiv, aber in geringem Maße exprimiert. Bei LuxI handelt es sich um eine AHL-Synthase, welche stetig den Signalstoff, in diesem Falle 3-oxo-C6-HSL oder OOHL, bildet. Sind die AHLs synthetisiert, verlassen sie die bakterielle Zelle entweder diffusiv oder im Falle

Tabelle 1.1: Eine Auswahl an Beispielen bakterieller Spezies, in denen die hier untersuchten AHLs C6-HSL, C8-HSL sowie C10-HSL als Signalstoffe nachgewiesen wurden.

HSL-Signalstoff	Spezies	Referenz
C6-HSL	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Williams et al., 2000
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Boşgelmez-Tinaz, 2003
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Aguilar et al., 2003
	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Ulrich et al., 2004 c
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Boşgelmez-Tinaz, 2003
	<i>Pantoea ananatis</i>	Pomini et al., 2006
	<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	Barnard und Salmond, 2007
	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	De Kievit und Iglewski, 2000
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Licciardello et al., 2007
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	González und Keshavan, 2006
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Elasri et al., 2001
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	von Bodman et al., 2003
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Blosser-Middleton und Gray, 2001
	<i>Serratia liquefaciens</i>	González und Keshavan, 2006
<i>Yersinia pestis</i>	Atkinson et al., 2006	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Atkinson et al., 2006	
C8-HSL	<i>Burkholderia cepacia</i>	Aguilar et al., 2003
	<i>Burkholderia mallei</i>	Ulrich et al., 2004 b
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Ulrich et al., 2004 a
	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Ulrich et al., 2004 c
	<i>Pantoea ananatis</i>	Pomini et al., 2006
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Licciardello et al., 2007
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	von Bodman et al., 2003
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Blosser-Middleton und Gray, 2001
	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Marketon und González, 2002
	<i>Vibrio fischeri</i>	Lupp et al., 2003
	<i>Yersinia pestis</i>	Atkinson et al., 2006
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Atkinson et al., 2006	
C10-HSL	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Cataldi et al., 2007
	<i>Burkholderia mallei</i>	Ulrich et al., 2004 b
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Ulrich et al., 2004 a
	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Ulrich et al., 2004 c
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	Conway and Greenberg, 2002
	<i>Methylobacterium spec.</i>	Poonguzhali et al., 2007
	<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	Barnard und Salmond, 2007
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cataldi et al., 2007
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Elasri et al., 2001
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cataldi et al., 2007	

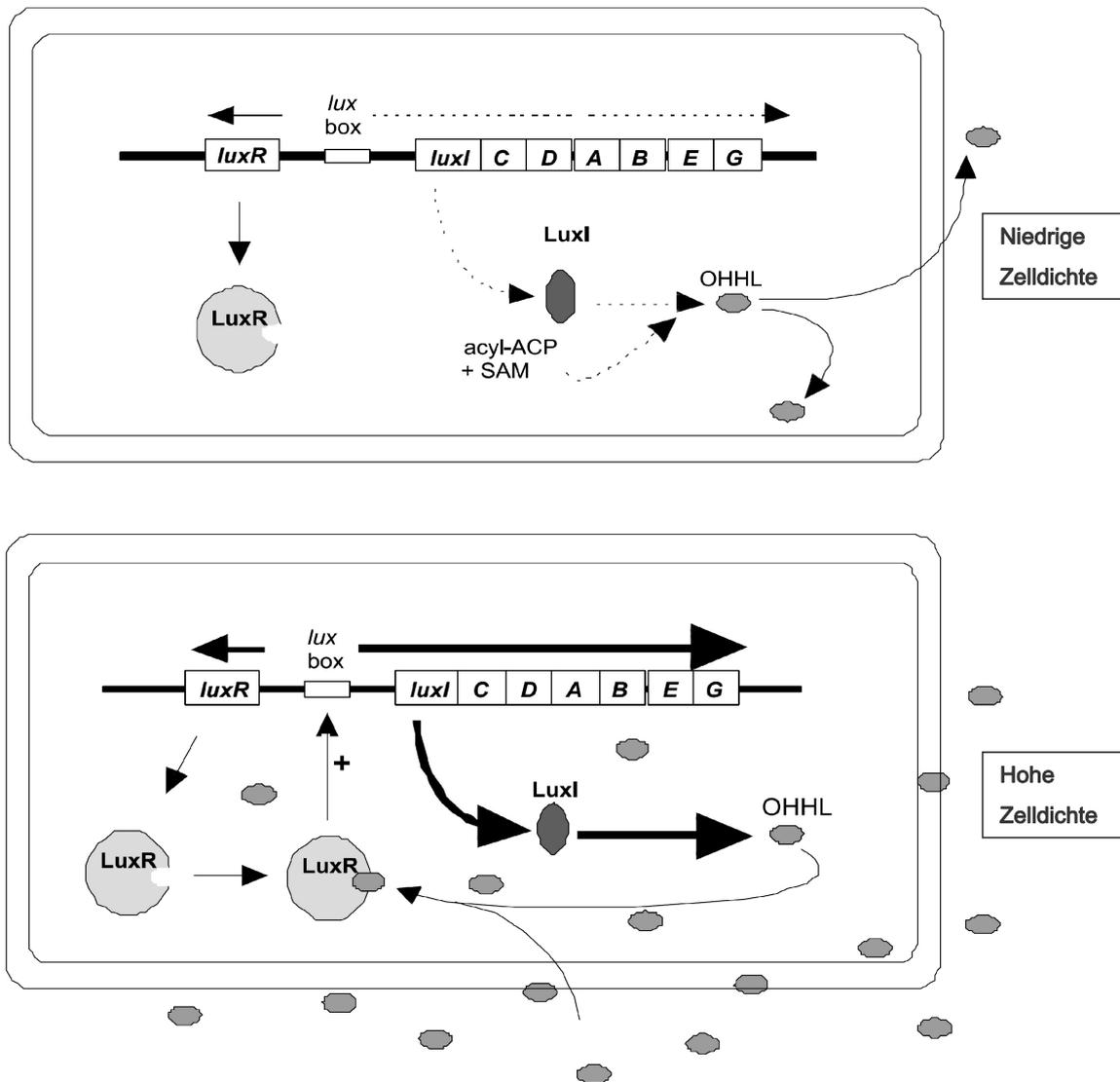


Abbildung 1.4: Regulation von Biolumineszenz durch Quorum sensing in *Vibrio fischeri*, modifiziert nach Whitehead et al., 2001. Bei geringer Zelldichte wird das Signalmolekül, hier 3-oxo-C6-HSL oder OHHL, konstitutiv gebildet. Im Leuchtorgan des Tintenfisches kommt es zur Anreicherung des OHHL, worauf dieses an den Rezeptor LuxR bindet. Der Komplex lagert sich an eine spezielle Sequenz, die „lux box“ an und initiiert die Transkription der Zielgene für Biolumineszenz *luxCDABEG* sowie der AHL-Synthese *luxI*.

langkettiger AHLs über Pumpen (Pearson et al., 1999). Solange einzelne Zellen von *Vibrio fischeri* planktonisch im Meer leben, werden die kontinuierlich auf niedrigem Niveau gebildeten Signalstoffe im umgebenden Wasser verdünnt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein AHL-Signalmolekül auf eine solche freie Zelle trifft und in diese zurückdiffundiert, ist daher gering.

Die Situation ändert sich jedoch grundlegend, sobald *Vibrio fischeri*-Bakterien vom Tintenfisch aufgenommen und in seinem speziellen Leuchtorgan angesiedelt werden. In diesem geschlossenen Kompartiment vermehren sich die Zellen und produzieren kontinuierlich AHLs, nur dass diese Signalstoffe nun nicht mehr verdünnt werden, sondern sich mit steigender Populationsdichte im Leuchtorgan anreichern, aus dem sie nicht entwei-

chen können. Auf diese Art und Weise steigt die Konzentration an AHLs stetig an und wird dabei im Leuchtorgan mindestens 100 nM erreichen (Boettcher und Ruby, 1995). In Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa* wurden sogar Konzentrationen von über 600 μM nachgewiesen (Charlton et al., 2000). Derartig aufkonzentriert, diffundieren die Signalmoleküle durch die Bakterienmembran und akkumulieren sowohl intra- als auch extrazellulär proportional zur Zelldichte (Bassler, 2002).

Innerhalb der Bakterienzelle befindet sich ein Rezeptor- oder Regulatorprotein, welches eine Bindungsstelle für AHL aufweist. Das *Vibrio fischeri*-LuxR Protein zum Beispiel besteht aus einer N-terminalen Domäne, welche AHL bindet, und einer C-terminalen Domäne, die an DNA binden kann (Atkinson et al., 2006). Dieses Protein ist allerdings ohne AHL so konformiert, dass die Bindung an DNA nicht möglich ist (Choi und Greenberg, 1992). Bindet nun AHL an das LuxR-Protein, so erfährt dieses eine Veränderung der Konformation und kann sich an eine spezielle Region der DNA anlagern. In *Vibrio fischeri* handelt es sich bei dieser spezifischen Stelle um die sogenannte „lux box“. Die „lux box“ besteht aus 20 Basenpaaren und ist dem Startpunkt für die Transkription der Zielgene vorgelagert (González und Keshavan, 2006). Sobald der Protein-AHL-Komplex an die „lux box“ angelagert ist, kommt es zur erhöhten Transkription der Zielgene, die aus zwei unterschiedlich transkribierten Einheiten bestehen, zum einen dem *luxICDABEG* Operon und zum anderen dem *luxR* Gen (Lupp et al., 2003). Infolge dieser Aktivierung werden die einzelnen zur Synthese der Enzyme für die Biolumineszenz notwendigen Sequenzen (*CDABEG*) in verstärktem Maße im Vergleich zur planktonischen Lebensweise gebildet und das typisch blau-grüne Leuchten (Swift et al., 1996) wird intensiviert.

Entscheidend für das Quorum sensing ist das *luxI*-Gen, welches für das AHL-produzierende Enzym (AHL-Synthase, LuxI) kodiert (Fuqua and Greenberg, 2002). *luxI* wird zusammen mit den Lumineszenz-Genen transkribiert, so dass das Signalmolekül in einer Art positivem Regelkreislauf effektiv für eine Erhöhung seiner eigenen Produktion sorgt. Auf diese Art und Weise erfolgt nach der Bindung des AHL an den Rezeptor ein rapider Anstieg der Synthese von AHL, welches die Konzentration des Signalstoffes in der Umgebung schlagartig ansteigen lässt. Da nun in der Umgebung aller Zellen bald eine sehr hohe Konzentration an AHLs vorliegt, wird in allen Zellen die gleiche Antwort ausgelöst: *Vibrio fischeri* beginnt im Organ des Tieres zu lumineszieren.

Die Gene für die AHL-Synthase in anderen Bakterien wie *Rhizobium*, *Agrobacterium*,

Pseudomonas, *Serratia*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Burkholderia* und anderen sind homolog zu *luxI*. Dies lässt darauf schließen, dass der Wirkmechanismus der LuxI-Varianten ähnlich zueinander sein könnte (González und Keshavan, 2006).

1.1.2.3 Degradation von AHLs

Quorum sensing unterstützt oft Prozesse, die andere Organismen in der Umgebung schädlich beeinflussen (Taga und Bassler, 2003). Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich zahlreiche Mechanismen in verschiedensten Spezies entwickelt haben, um die bakterielle Kommunikation zu stören. Neben den bereits erwähnten abiotischen Degradationsmechanismen wie beispielweise pH-abhängiger Hydrolyse können die Signalstoffe auch durch enzymatische Aktivitäten abgebaut und inaktiviert werden (Englmann et al., 2007). Dieses „Ausschalten“ des Signalstoffes spielt sowohl bei der Regulation des Quorum sensing als auch bei der Interaktion verschiedener Spezies eine wichtige Rolle. In Abbildung 1.5 sind die möglichen enzymatischen Angriffspunkte am AHL-Molekül dargestellt. Lactonasen sowie Decarboxylasen (1 und 2) könnten den Lactonring hydrolysieren, während Acylasen und Deaminasen (3 und 4) die Acyl-Seitenkette von der Homoserinlacton-Einheit trennen könnten. Tatsächlich nachgewiesen werden konnten von diesen vier enzymatischen Mechanismen allerdings nur zwei, und zwar die der AHL-Acylase und die AHL-Lactonase (Dong und Zhang, 2005). In Abbildung 1.6 sind die Wirkungen dieser beiden Enzyme genauer dargestellt. Beide bewirken effektiv eine Hydrolyse. Die Lactonase öffnet den Lactonring, so dass ein Acyl-Homoserin entsteht, während die Acylase die AHLs in die Homoserinlacton-Einheit und einen Fettsäurerest trennt. Beides führt zur biologischen Inaktivierung der Signalstoffe.

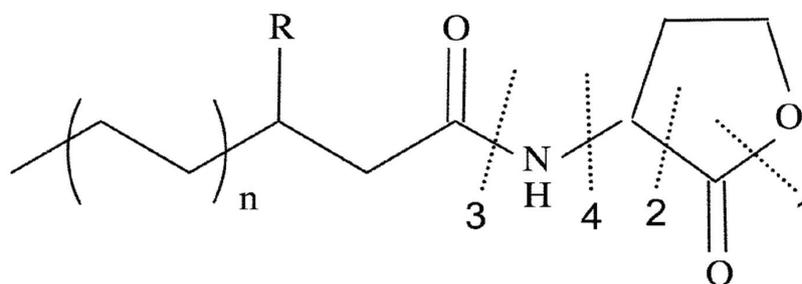


Abbildung 1.5: Mögliche Angriffspunkte für enzymatische Spaltung von AHLs nach Dong und Zhang (2005) durch Lactonase (1); Decarboxylase (2); Acylase (3); Deaminase (4).

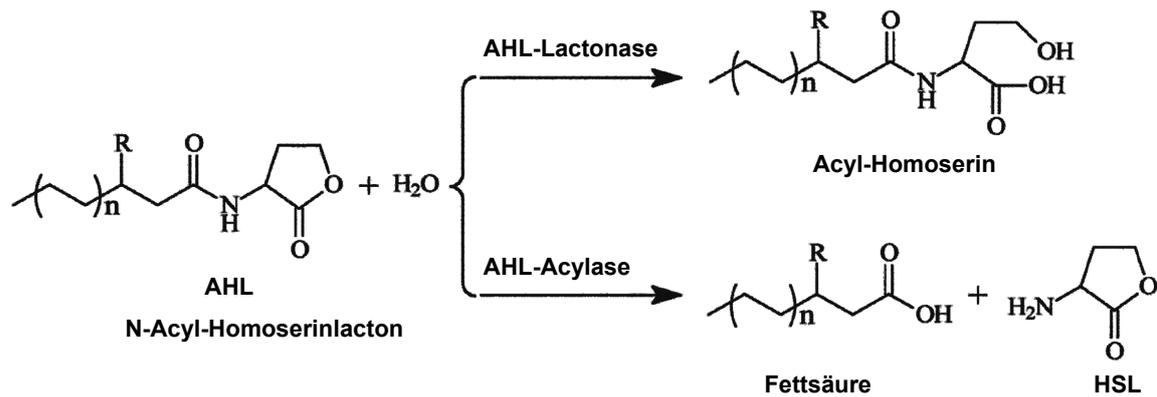


Abbildung 1.6: Wirkungsweise der AHL-Acylasen und AHL-Lactonasen nach Dong und Zhang (2005).

1.1.3 Quorum sensing in Proteobacteria

1.1.3.1 Quorum sensing in humanpathogenen Arten

Sicherlich einer der Gründe, warum AHL-basiertes Quorum sensing in den letzten Jahren solch beachtliches Interesse erfahren hat, ist die Verbindung dieser Signalmoleküle mit pathogenen Bakterien. Dies betrifft sowohl human- als auch pflanzenpathogene Spezies, bei denen zahlreiche Faktoren, die für Virulenz und den erfolgreichen Befall des Wirtes notwendig sind, unter der Kontrolle der AHL-abhängigen Zell-Zell-Kommunikation stehen.

Eine der wohl bekanntesten Gattungen der Proteobacteria, in denen AHLs als Auto-inducer nachgewiesen wurden, dürfte *Yersinia* darstellen, der unter anderem auch der Erreger der Pest, *Yersinia pestis*, zugeordnet wird. Von *Yersinia pseudotuberculosis* beispielsweise, welcher neben *Yersinia enterocolitica* zu den Erregern der meldepflichtigen enteralen Yersiniose zählt (Weber, 1982), ist bekannt, dass diese Art mindestens acht verschiedene AHLs produziert, welche in die Regulation von Zellaggregation und -motilität involviert sind; bei *Yersinia pestis* ist die Rolle des AHL-basierten Quorum sensing bei der Pathogenese allerdings noch nicht vollständig geklärt (Atkinson et al., 2006).

Neben den *Yersinia*-Pathogenen existieren zahlreiche weitere Beispiele für bakterielle Krankheitserreger, die sich das Quorum sensing zunutze machen. Die bekanntesten Arten, in denen AHL als Signalstoffe identifiziert wurden, gehören unter anderem zu den Gattungen *Pseudomonas* oder *Burkholderia*, von denen beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* als opportunistische Pathogene bekannt sind, die die Lungen von Mukoviszidose-Patienten kolonisieren (Govan und Deretic, 1996; Conway und Greenberg, 2002; Wagner et al., 2006). Im zähen Lungensekret dieser Patienten fin-

den die Keime einen idealen Nährboden und bilden unter Induktion durch AHLs Biofilme, so dass ihnen mit Antibiotika schwer beizukommen ist. Ansätze für neuartige Medikamente zur Bekämpfung solcher opportunistischer Pathogene zielen daher statt auf Abtötung oder Inhibition vielmehr auf die Störung der bakteriellen Kommunikation (Hentzer et al., 2003) und somit die Unterdrückung der Biofilm-Formation.

Auch die beiden Arten *Burkholderia mallei* und *B. pseudomallei*, die aufgrund ihrer Eignung als biologische Kampfstoffe (*B. pseudomallei*: unsichere Diagnose, schwierige Behandlung, septischer Schock) im Zuge der Angst vor Bioterrorismus erst kürzlich in den Blickpunkt der Forschung gerückt sind (Aldhous, 2005), regulieren ihre Pathogenität durch AHL-basiertes Quorum sensing (Ulrich et al., 2004 a; Ulrich et al., 2004 b). Als letzte Beispiele sollen hier *Brucella melitensis*, der Erreger der auch als Maltafieber bezeichneten Brucellose (Taminiau et al., 2002) und das Gastroenteritis verursachende Pathogen *Aeromonas hydrophila* (Williams et al., 2000) genannt werden.

1.1.3.2 Quorum sensing in pflanzenpathogenen Arten

Neben den im vorangegangenen Abschnitt besprochenen Krankheitserregern beim Menschen wirken die pflanzenpathogenen Arten der Proteobacteria vergleichsweise harmlos. Dennoch sind diese in der Lage, oft unter der Regulation durch AHL, beträchtliche Schäden in der Land- und Gartenbauwirtschaft anzurichten.

Ein Pathogen von wirtschaftlicher Bedeutung stellt beispielsweise *Pectobacterium (Erwinia) carotovorum* dar, der Erreger von Weichfäule an zahlreichen Nutzpflanzen wie zum Beispiel Kartoffeln, Möhren oder Gurken (Boşgelmez-Tinaz, 2003). Bei der Unterart *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* wird die Produktion eines Antibiotikums durch 3-oxo-C6-HSL reguliert und die Bildung von Virulenzfaktoren wie zellwanddegradierender Enzyme gesteuert, indem das AHL an ein Regulatorprotein bindet und es in diesem speziellen Falle deaktiviert, so dass die durch das Protein zuvor gehemmte Bildung dieser Virulenzfaktoren ablaufen kann (Mole et al., 2007). Die Produktion von Virulenzfaktoren wie Exoenzymen durch einige wenige Zellen würde das Pflanzengewebe nicht beeinträchtigen, sondern mit einiger Wahrscheinlichkeit eine Abwehrreaktion der Wirtspflanze auslösen. Aus diesem Grunde kommt es bei diesem Pflanzenpathogen auf die straffe Regulation des Timings an, um den Wirt erfolgreich zu befallen (Boşgelmez-Tinaz, 2003).



Abbildung 1.7: Schadsymptome von *Pseudomonas tomato* pv. *tomato* an Blättern und Früchten der Tomate. Bildquelle: The World Vegetable Center, www.avrdc.org/photos/tomato_diseases/index.html

Es ist davon auszugehen, dass vermutlich jeder Nutzgartenbesitzer schon einmal unliebsame Bekanntschaft mit *Pseudomonas*-Arten gemacht haben dürfte, den Auslösern einer ganzen Reihe von Krankheiten an verschiedensten Wirtspflanzen wie zum Beispiel an der Tomate (*Pseudomonas tomato* (*syringae*) pv. *tomato*), wo sich die Infektion durch Chlorosen und nekrotische Flecken an den Blättern bemerkbar macht (Chang et al., 2000), wie in Abbildung 1.7 gezeigt. Auch in *Pseudomonas*-Pathovaren kommen dabei AHL-basierte QS-Systeme zur Anwendung. Es werden zahlreiche Faktoren durch AHL-QS reguliert; als Beispiele seien hier Exoproteasen und die Produktion von bakteriellen Toxinen wie Tabtoxin genannt (Dumenyo et al., 1998; Heeb und Haas, 2001). Die Bedeutung der AHLs konnte auch am Beispiel transgener, AHL-produzierender Tabakpflanzen gezeigt werden, in denen die Anfälligkeit gegenüber der „wild-fire-disease“, verursacht durch *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Obwald, 1995), in frühem Stadium durch die exogene Zufuhr an AHL entscheidend reduziert war (Quiñones et al., 2005), denn dieses Pathogen etabliert erst große epiphytische Populationen an gesunden Blättern, bevor es die Krankheit initiiert (Rouse et al., 1985). Interessant ist außerdem zu wissen, dass pflanzenassoziierte Pseudomonaden häufiger AHLs zu produzieren scheinen als ihre bodenbürtigen Verwandten (Elasri et al., 2001).

Zu den am meisten gefürchteten Pflanzenkrankheiten ist mit Sicherheit der Feuerbrand an Apfel, Birne und anderen Rosaceen zu zählen. Der Trivialname rührt vom typischen Erscheinungsbild der Erkrankung her, bei dem betroffene Zweige und Äste oft den Eindruck vermitteln, als seien sie verbrannt (Abbildung 1.8). Vor kurzem wurde auch bei diesem nekrotrophen Pflanzenpathogen festgestellt, dass es Zell-Zell-Kommunikation anwendet,

und als Signalstoffe wurden AHLs identifiziert (Venturi et al., 2004). Auch Vertreter der Gattung *Xanthomonas* sind als Krankheitserreger an Pflanzen bekannt, ebenso wie einige *Pantoea*- oder *Ralstonia*-Arten und viele mehr, auf die hier nicht mehr näher eingegangen werden soll. In mehreren dieser Pflanzenpathogenen wurde AHL-basiertes Quorum sensing nachgewiesen (von Bodman et al., 2003; Pomini et al., 2006; Mole et al., 2007); dies zeigt die Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation in pflanzenpathogenen Bakterien auf.



Abbildung 1.8: Zusammenstellung einiger typischer Merkmale der Feuerbrandkrankheit, ausgelöst durch das Bakterium *Erwinia amylovora*. Kennzeichnend sind die meist dunkelbraun bis schwarz gefärbten Stiele der abgestorbenen Blüten und Blätter an den erkrankten Zweigen. Infizierte Blüten und Triebe vertrocknen und das Gewebe verfärbt sich braun oder schwarz. Eine Feuerbrand-Erkrankung ist grundsätzlich meldepflichtig. Quelle und Bildnachweis: Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten, http://www.lfl.bayern.de/ips/haus_und_kleingarten/17312/index.php

1.1.3.3 Quorum sensing in PGPR und symbiotischen Bakterien

Neben all diesen pathogenen Arten darf nicht vergessen werden, dass auch harmlose ebenso wie den Pflanzen nützliche Bakterienarten auf das Quorum sensing angewiesen sind. Die als „plant growth promoting rhizobacteria“ oder kurz PGPR bezeichneten wurzelbesiedelnden Arten zeichnen sich durch eine förderliche Wirkung auf Pflanzenwachstum und -entwicklung aus (Bakker et al., 2007). Die Verwendung von PGPR hat sich bereits in vielen Regionen der Welt zur gängigen Praxis entwickelt (Siddiqui, 2006). Sie können atmosphärischen Stickstoff fixieren, die Keimung, die Wurzelentwicklung, die Nährstoffaufnahme und die Wasseraufnahmekapazität grundlegend verbessern, toxische Verbindungen reduzieren und das Pflanzenwachstum durch die Produktion von Hormo-

nen beeinflussen (Bloemberg und Lugtenberg, 2001; Persello-Cartieaux et al., 2003; Siddiqui, 2006).

PGPR-Arten spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der Biokontrolle von Pflanzenpathogenen, denn sie sind in der Lage, ein breites Spektrum an Bakterien-, Pilz- und Nematodenkrankheiten zu unterdrücken und sogar Schutz gegen virale Pathogene zu bieten (Bloemberg und Lugtenberg, 2001; Siddiqui, 2006). Dies kann unter anderem durch die Induktion von pflanzlichen Abwehrmechanismen oder durch die Produktion von Siderophoren und Antibiotika vonstatten gehen (Persello-Cartieaux et al., 2003). Am Beispiel der beiden für Biokontrolle bekannten Arten *Pseudomonas aureofaciens* (Pierson et al., 1994) und *Pseudomonas fluorescens* (Thomashow und Weller, 1988) erfolgt dies durch die Produktion eines antibiotischen Wirkstoffes (Phenazin), welcher für die Unterdrückung der Krankheit Schwarzbeinigkeit („take-all disease“), hervorgerufen durch den Pilz *Gaeumannomyces graminis*, verantwortlich ist. Die Produktion dieses Antibiotikums unterliegt hierbei der Kontrolle durch Quorum sensing unter der Wirkung von AHL (Pierson et al., 1994).

Als Paradebeispiele für PGPR können die stickstofffixierenden Knöllchenbakterien genannt werden. *Rhizobium*- und *Bradyrhizobium*-Spezies stellen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Stickstofffixierung in Wurzeln von Leguminosen höchstwahrscheinlich die am meisten genutzten PGPR in der Landwirtschaft dar (Bakker et al., 2007). In Vertretern der Gattungen *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* und *Sinorhizobium* wurden allesamt AHL-abhängige, teils hochkomplexe Quorum sensing-Systeme nachgewiesen, welche an der Regulation von Prozessen wie der Nodulation beteiligt sind (Marketon und González, 2002; Wisniewski-Dyé und Downie, 2002; González and Marketon, 2003; Pongsilp et al., 2005). Gemäß Wisniewski-Dyé und Downie (2002) besitzen Rhizobien eine der kompliziertesten QS-Kaskaden überhaupt; in *Sinorhizobium meliloti* wurden sogar mindestens neun unterschiedliche AHLs nachgewiesen (Marketon und González, 2002). Die koordinierte Expression von spezifischen Genen ist für die erfolgreiche Etablierung der Beziehung mit dem eukaryotischen Partner erforderlich (González and Keshavan, 2006).

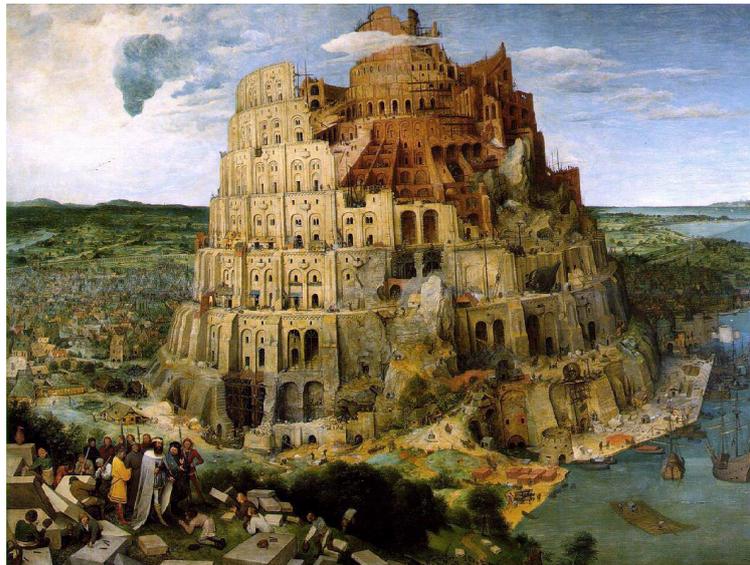


Abbildung 1.9: Der Turmbau zu Babel von Pieter Bruegel dem Älteren (1563), Kunsthistorisches Museum Wien. Bildnachweis: <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Brueghel-tower-of-babel.jpg>

1.2 Interaktion von Signalstoff und Pflanze

„Crosstalk“; „Quorum quenching“; diese Begriffe sind in den letzten Jahren vermehrt in der Literatur zu finden. Nachdem die Bedeutung des Quorum sensing von mit Mensch, Tier und Pflanze assoziierten Mikroorganismen mittlerweile in ihrem vollen Umfang erfasst zu werden beginnt, wächst auch das Interesse an Mechanismen, die eukaryotische Spezies entwickelt haben, um der Kommunikation der Bakterien entweder zu lauschen, sie zu stören oder gar zu unterbinden. Die Idee ist im Grunde nicht neu. Im übertragenen Sinne findet sich schon im Alten Testament mit der Erzählung vom Turmbau zu Babel (Abbildung 1.9) ein Beispiel für die Bedeutung störungsfreier Kommunikation. In der Natur ist allerdings keine höhere Macht vonnöten, um Bakterien an der Koordination ihrer Aktionen zu hindern oder sie zu erschweren. Eukaryoten inklusive Algen und höherer Pflanzen produzieren verschiedene Verbindungen, die mit dem bakteriellen Quorum sensing interferieren. Solche Komponenten imitieren entweder das Signalmolekül in seiner Struktur oder Funktion oder verhalten sich antagonistisch zu den Signalstoffen (González and Keshavan, 2006). Bakterien selbst bekämpfen sich untereinander allerdings ebenso. Als ein bekanntes Beispiel für die Unterdrückung der Kommunikation, auch als Quorum quenching bezeichnet, zwischen Bakterien selbst sei hier *Bacillus spec.* genannt, bei dem in bodenbürtigen Isolaten nachgewiesen wurde, dass es gramnegative Konkurrenten mittels einer Lactonase außer Gefecht setzt (Dong et al., 2000; Dong et al., 2001). Ein Stamm von *Variovorax paradoxus* ist sogar imstande, AHLs als einzige Energie- und

Stickstoffquelle zu nutzen (Leadbetter und Greenberg, 2000), und als Schlüsselenzym des Abbaus wird AHL-Acylase vermutet. Ähnliche Ergebnisse wurden für auch für AHL-Lactonase in *Arthrobacter spec.* (Park et al., 2003) und in mindestens 10 anderen Bakterienspezies gezeigt. Die Enzyme nehmen aber auch regulative Funktionen ein wie zum Beispiel beim Übergang in die stationäre Phase in *Agrobacterium tumefaciens* (Dong und Zhang, 2005).

Wo gesprochen wird, wird auch gelauscht. Bakterien stellen hierbei keine Ausnahme dar, denn einige Arten können zwar selbst kein eigenes Signalmolekül produzieren, doch auf AHLs reagieren, die von anderen Spezies abgesondert werden. Ein bekanntes Beispiel findet sich bei *Escherichia coli*, welches ein LuxR-ähnliches Rezeptorprotein namens SdiA besitzt, aber keine passende AHL-Synthase (Michael et al., 2001). Aminosäuretransport, Metabolismus und Regulation von Transkription können in *Escherichia coli* durch fremde AHLs beeinflusst werden (Fuqua et al., 1994; McDougald et al., 2006).

Auch Algen und Pflanzen haben einige trickreiche Mechanismen entwickelt, um mit bakterieller Kommunikation zu interferieren. Das prominenteste Beispiel ist wohl die marine Rotalge *Delisea pulchra*, die AHL-ähnliche Stoffe, sogenannte „AHL mimics“ produziert, welche die Kommunikation von *Serratia liquefaciens* stören und verhindern, dass diese auf ihrer Blattoberfläche unerwünschte Bakterienfilme bildet. Im Falle von *Delisea pulchra* handelt es sich bei den AHL mimics um halogenierte Furanone (Rasmussen et al., 2000; Bauer und Mathesius, 2004, siehe Abbildung 1.10). Auch L-Canavanin aus Leguminosensamen wird als AHL-Antagonist diskutiert (González und Keshavan, 2006). Solche AHL-Analoga binden an die Rezeptorproteine, aktivieren sie jedoch nicht, und können so durch die Blockade des Rezeptors die Quorum sensing-Kaskade zum Stillstand bringen. Dass dies möglich ist, wurde schon an einigen Bakterien inklusive *Vibrio fischeri*, *Agrobacterium tumefaciens* und *Aeromonas salmonicida* gezeigt (De Kievit und Iglewski, 2000).

Die Leguminose *Medicago truncatula* scheint weiterhin mindestens 15 bis 20 Substanzen zu produzieren, die in QS-Reporterbakterien spezifische stimulierende oder hemmende Antworten auslösen können, dabei primär solche, welche die AHL-abhängige Regulation betreffen (Gao et al., 2003). Zu den Pflanzen, die QS stören oder manipulieren können, gehören auch Nutzpflanzen wie Erbse, Sojabohne, Reis oder Tomate. Die verantwortlichen Substanzen sind noch nicht identifiziert, scheinen sich aber chemisch von

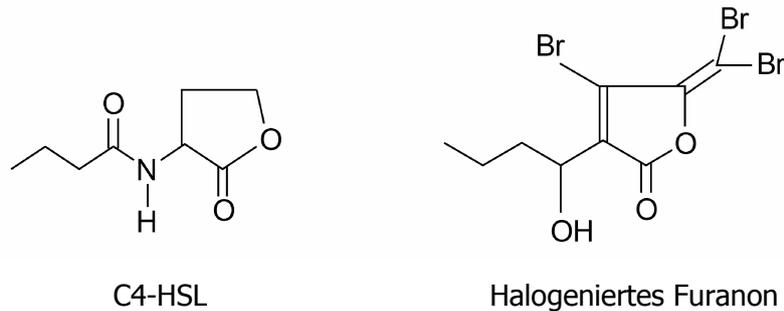


Abbildung 1.10: Struktureller Vergleich eines halogenierten Furanons aus *Delisea pulchra* mit dem Beispiel C4-HSL. Quelle: Bauer und Mathesius (2004)

AHLs zu unterscheiden (Bauer und Robinson, 2002; Bauer und Mathesius, 2004).

Pflanzen sind aber auch zu einer zielgenauen Störung des QS befähigt. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass Pflanzen unter Befall mit *Pectobacterium carotovorum* die Befallsstelle alkalisieren und so den pH-Wert auf über 8,2 anheben, um die AHLs zu hydrolysieren (Nachin und Barras, 2000; Byers et al., 2002). In Keimlingen des Hornklees *Lotus corniculatus* wurde eine natürliche Fähigkeit zur Inaktivierung von mehreren AHLs wie C6-HSL nachgewiesen. Viele Anhaltspunkte sprechen dafür, dass es sich bei dieser Aktivität um eine pflanzliche Lactonase handelt (Delalande et al., 2005). Dieser Befund dürfte wegweisend für alle zukünftigen Untersuchungen der AHL-Pflanzen-Interaktion sein, da er belegt, dass ein bislang nur in Bakterien nachgewiesenes Quorum quenching-Enzym in der Tat auch von bakterienassoziierten Pflanzen gezielt eingesetzt wird.

In derselben Studie zeigte sich außerdem, dass die Fähigkeit zur Signalinaktivierung auch bei anderen Leguminosen vorhanden sein könnte, jedoch nicht oder bestenfalls in geringem Maße in monokotyledonen Pflanzen wie Weizen oder Mais. Bedenkt man die natürliche Verbundenheit der Fabaceae zu stickstofffixierenden Rhizobien, so erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass Leguminosen im Laufe der Symbiose hätten lernen können, gezielt in die bakterielle Kommunikation einzugreifen. Da andere Nutzpflanzen wie die monokotyledonen Graminaceen keine solch spezielle Verbindung zu Bakterien entwickelt haben, auch wenn ihre Wurzeln durchaus von PGPR und anderen kolonisiert werden können, ist die Fähigkeit zur Interferenz für diese womöglich weniger essentiell als für Leguminosen. Wie auch immer, sehr wenige Fakten sind tatsächlich zu diesem Thema veröffentlicht; in dieser Arbeit wird sich jedoch dieser Fragestellung unter Vergleich einer Getreideart mit einer Leguminose (siehe Kapitel 2.1.1) angenommen werden.

In den letzten Jahren beginnt sich also vermehrt zu zeigen, dass nicht nur Bakterien, sondern auch Pflanzen zum „crosstalk“ beim Quorum sensing befähigt sind. In Folge dessen stellt sich auch die Frage, ob Signalstoffe wie AHLs in den Pflanzen noch weitere Reaktionen auslösen können als offensichtliche Abwehrmechanismen wie die Absonderung von Inhibitoren und degradierenden Enzymen. Hierzu sollen im Folgenden zunächst die in dieser Arbeit untersuchten Parameter näher vorgestellt werden.

1.2.1 Pigmente

Chlorophylle sind die Schlüsselsubstanzen der Photosynthese. Bei Chlorophyll a handelt es sich laut Lichtenthaler (1987) um das Haupt- und bei Chlorophyll b um ein Hilfspigment, welche in einem Verhältnis von circa 3:1 in der Pflanze vorkommen und der Absorption von Strahlungsenergie in der Photosynthese dienen. Die Carotinoide teilen sich auf in die Carotine und die Xanthophylle, welche beide auf einem C₄₀-Carotingerüst basieren; sie erscheinen gelb bis rot gefärbt und dienen neben ihrer Funktion in der Photosynthese auch als Schutz vor Radikalen des Sauerstoffs. Der Schutz der Zellen vor Singulett-Sauerstoff ¹O₂ wird nach gängiger Meinung durch Carotinoide bewerkstelligt (Mittler et al., 2004). Die Chlorophylle und die photosynthetisch aktiven Carotinoide bilden den „light-harvesting-complex“ und die Chlorophyll-Antennen (Nultsch, 1996). Eine möglicherweise durch AHL-Behandlung hervorgerufene Veränderung der Pigmente würde eine Pflanze erheblich beeinflussen und wurde deswegen in dieser Arbeit untersucht.

1.2.2 Glutathion und Glutathion S-Transferasen

1.2.2.1 Das Tripeptid Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein reichlich und ubiquitär vorhandenes Thiol in Pilzen, Pflanzen und Tieren (May et al., 1998; Potters et al., 2002). Die reduzierte Form des Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin) ist ein Tripeptid (Noctor und Foyer, 1998), wie in Abbildung 1.11 dargestellt. Die chemische Reaktivität der Thiogruppe, die relativ hohe Stabilität sowie die gute Wasserlöslichkeit machen GSH zu einem besonders geeigneten Elektronenakzeptor oder -donator in physiologischen Reaktionen. Durch Oxidation werden zwei reduzierte Moleküle mittels einer Cystein-Disulfidbrücke verbunden; diese oxidierte Form des Glutathion wird als GSSG bezeichnet (Potters et al., 2002). Glutathion gilt als die

bedeutendste Form eines freien Thiols in den meisten höheren Pflanzenarten, wobei einige Leguminosen Homoglutathion (hGSH; γ -Glutamyl-Cysteinyl- β -Alanin) anstelle von Glutathion enthalten (Lamoureux und Rusness, 1989). GSH als das häufigste intrazelluläre Thiol kann in Konzentrationen von 0,2-10 mM (Komatsu und Obata, 2003) bzw. 1-4,5 mM in Chloroplasten (Potters et al., 2002) vorliegen. Die Aufgaben des GSH sind sehr vielfältig. Gemäß Noctor und Foyer (1998) können sie in die zwei Kategorien Schwefelmetabolismus und Abwehr eingeteilt werden. GSH ist gemäß erster Kategorie involviert in die Lagerung und den Transport von reduziertem Schwefel und dessen Aufnahme durch die Wurzel, in die Modulation der redoxregulierten Signaltransduktion, in die DNA- und Proteinsynthese, oder dient als Redoxpuffer; in seiner Abwehrfunktion dient es als Substrat für die Entgiftung von organischen elektrophilen Xenobiotika und bestimmter Metaboliten wie Anthocyanine durch Glutathion S-Transferasen, als Antioxidans bei der Abwehr von oxidativem Stress, als Vorläufer der Phytochelatine, als Regulator von Abwehrgenen oder generell als Toleranzfaktor gegenüber abiotischem und biotischem Stress (Sen, 1997; May et al., 1998; Noctor und Foyer, 1998; Matamoros et al., 1999; Xiang et al., 2001; Potters et al., 2002).

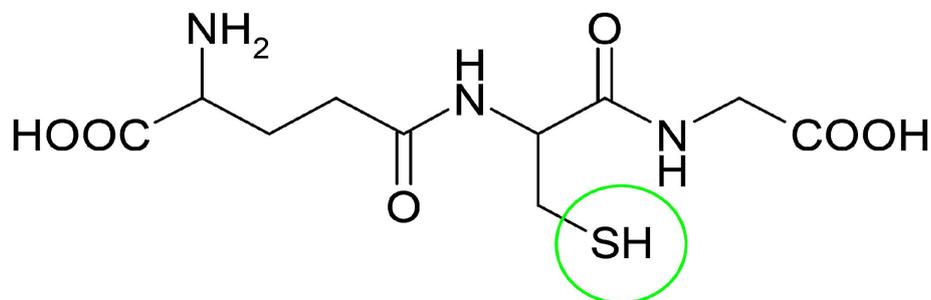


Abbildung 1.11: Die chemische Struktur des Tripeptids Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin). Die reaktive Thiogruppe ist hervorgehoben (Diekmann, 2005).

1.2.2.2 Pflanzliche Glutathion S-Transferasen und ihre Bedeutung

Die Glutathion S-Transferasen (EC 2.5.1.18, Cho et al., 2007) oder kurz GSTs wurden erstmalig im Tier beschrieben. Neun Jahre später, im Jahre 1970, wurden durch Frear und Swanson die ersten pflanzlichen GSTs im Mais nachgewiesen (in Schröder, 2001). Die Entdeckung der Regulation der Biolumineszenz durch Quorum sensing (Nealson et al., 1970) und die der pflanzlichen GSTs fiel also kurioserweise in den gleichen Zeitraum.

GSTs sind häufig vorkommende Proteine aus einer hochdivergenten alten Genfamilie. Pflanzen besitzen 25 und mehr für GSTs kodierende Gene, wobei die Proteine untereinander weniger als 10 % Aminosäurehomologie aufweisen (Edwards et al., 2000). In Maisblättern beträgt der Anteil der GSTs am gesamten löslichen Protein mehr als 1 %. Sie setzen sich typischerweise aus zwei 23-29 kDa großen Untereinheiten zusammen und können Homo- ebenso wie Heterodimere ausbilden (Marrs, 1996). Individuelle GST-Isoenzyme sind zur selektiven Entgiftung spezifischer Xenobiotika befähigt, wobei die Herbizidselektivität in verschiedenen Spezies durch unterschiedliche Spezifität und Kapazität variieren kann (Edwards et al., 2000).

GSTs katalysieren die Konjugation von Xenobiotika mit GSH. Die Xenobiotika weisen dabei typischerweise ein elektrophiles Zentrum mit geringer Elektronendichte auf, welches in der Lage ist, mit einem nukleophilen Donor eine kovalente Bindung einzugehen (Marrs, 1996; Schröder, 2006). Bei diesem Donor handelt es sich im ungünstigsten Fall um Proteine und Nukleinsäuren, worin das Gefährdungspotential der elektrophilen Fremdstoffe besteht (Neustifter, 2007); eine effektive Entgiftung solcher Xenobiotika ist daher entscheidend für die tierische wie die pflanzliche Zelle.

Man unterscheidet drei Mechanismen der GST-katalysierten Entgiftung von Xenobiotika durch Konjugation mit Glutathion: nukleophile Substitution, nukleophile Addition oder Michael-Reaktion sowie Konjugation an sogenannten „non-carbon sites“, wobei die nukleophile Substitution den am häufigsten beobachteten Reaktionstyp darstellt (Lamoureux und Rusness, 1989; Schröder 2001; Schröder und Collins, 2002).

Eine typische, durch GST katalysierte Konjugationsreaktion durch nukleophile Substitution ist in Abbildung 1.12 am Beispiel des CDNB dargestellt. Bei CDNB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol) handelt es sich um das geläufigste Substrat zur Bestimmung der Aktivität von GST (Marrs, 1996; Pflugmacher et al., 2000), welches erfahrungsgemäß in cytosolischen Extrakten die höchsten Umsatzraten aufweist.

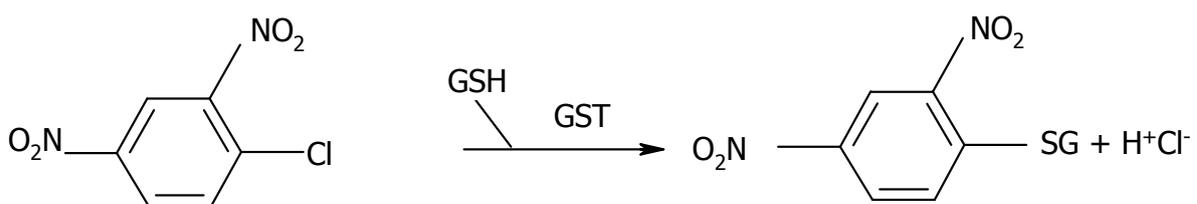


Abbildung 1.12: GST-katalysierte Konjugationsreaktion mit Glutathion (GSH) am Beispiel des CDNB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol) (Lyubenova, 2007).

In dieser Arbeit wurden zudem vier weitere Substrate der GSTs getestet. Es handelt sich dabei zum einen um das dem CDNB ähnliche DCNB (1,2-Dichlor-4-nitrobenzol), für welches allerdings häufig keine oder nur geringe Aktivitäten gemessen werden. Neben CDNB und DCNB wurden hier auch die Substrate NBC (4-Nitro-Benzylchlorid) und NBOC (4-Nitro-Benzoylchlorid) untersucht, welche sich zueinander ähnlich verhalten wie erstgenannte Komponenten, da die Umsatzraten des NBC im Cytosol für gewöhnlich höher und häufiger nachzuweisen sind als die für NBOC. Als letztes Substrat wurde in diesen Experimenten das Diphenyletherherbizid Fluorodifen ausgewählt. Fluorodifen unterscheidet sich von den anderen Substraten durch eine spezielle Funktion der GST (siehe Abbildung 1.13), bei der in einer nukleophilen Additionsreaktion (Schröder und Collins, 2002) die Etherbindung des Moleküles geöffnet und anschließend das S-(2-Nitro-4-Trifluoromethylphenyl)-Glutathionkonjugat unter gleichzeitiger Entstehung von 4-Nitrophenol gebildet wird (Lamoureux und Rusness, 1989).

Allen Mechanismen ist gemein, dass als Folge der Reaktion mit Glutathion ein weniger toxisches, hydrophileres und leichter transportierbares Produkt entsteht (Schröder, 2006).

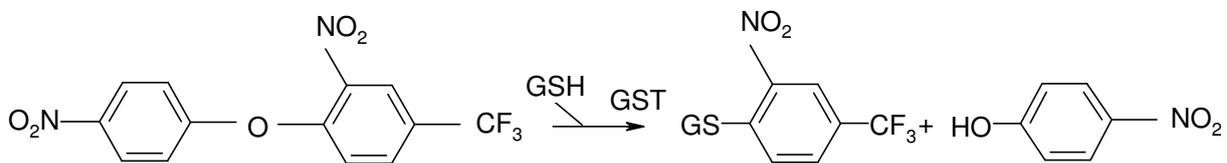


Abbildung 1.13: GST-katalysierte Konjugationsreaktion von Fluorodifen mit Glutathion (GSH) unter Entstehung des S-(2-Nitro-4-Trifluoromethylphenyl)-Glutathionkonjugats sowie 4-Nitrophenol (Lamoureux und Rusness, 1989; Lyubenova, 2007).

1.2.3 Enzyme des antioxidativen Systems

Der große Widerspruch des aeroben Lebens besteht in der Abhängigkeit von Sauerstoff und dem gleichzeitigen Gefährdungspotential dieses Elementes. Das Bedürfnis nach Sauerstoff verschleiern die Tatsache, dass es sich um ein toxisches, mutagenes Gas handelt und dass Aerobier nur überleben, weil sie antioxidative Abwehrmechanismen ausgebildet haben (Halliwell, 2006). Alle intrazellulären Kompartimente aerober Zellen produzieren aktivierte Sauerstoffspezies und -radikale (Elstner et al., 1996). Oxidativer Stress durch schädliche Reaktionen des Sauerstoffs wurde daher auch als die bedauerliche

Konsequenz des Lebens eines jeden aeroben Organismus (Bowler et al., 1992) bezeichnet. Die negativen Folgen einer nicht kompensierten Aussetzung von Zellen gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) äußern sich in vielfältigen Symptomen wie der Desintegration von Membranen bis hin zur Veränderung genetischen Materials und zum Tod der Zelle. ROS können jedoch auch regulative Funktionen in der Pflanze einnehmen. Ihre Rolle in vielerlei Prozessen wie Wachstum, Seneszenz, Fruchtreifung oder dem programmierten Zelltod (PCD) wurde inzwischen beschrieben (Jiménez et al., 1997; Mittler et al., 2004).

Reaktive Sauerstoffspezies sind Formen des atmosphärischen Sauerstoffs O_2 . Sauerstoff ist trotz seiner Eigenschaft als Biradikal relativ unreaktiv (Scandalios, 1993) und wird erst nach Anregung oder Elektronentransfer zu aktivierten Sauerstoffspezies wie dem Singulett-Sauerstoff (1O_2), dem Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) oder in weiterer Reaktion zum äußerst reaktiven Hydroxylradikal ($OH\cdot$) mit einem Redoxpotential nahe +2 V und einer Lebensdauer von weniger als einer Mikrosekunde, aber auch zum stabilen Wasserstoffperoxid H_2O_2 oder organischen Peroxiden (Elstner et al., 1996), wobei diese zwar zu den ROS zählen, aber keine Radikale darstellen (Halliwell, 2006). Im Gegensatz zum atmosphärischen Sauerstoff sind ROS hochreaktiv, toxisch und zur unlimitierten Oxidation zellulärer Komponenten befähigt (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004; Halliwell, 2006).

Die Notwendigkeit einer effektiven Entgiftung und Regulation potentiell gefährlicher Sauerstoffspezies in Pflanzen steht daher außer Frage. In der Pflanze sind zahlreiche Mechanismen in die Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies involviert. Zu den wichtigsten antioxidativ wirksamen Enzymen zählen die Katalasen, Peroxidasen, Superoxiddismutasen und jene aus dem Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Palma et al., 2006; Tejera Garcia et al., 2007), der auch als Halliwell-Asada-Zyklus bekannt ist. Dieser bedeutende antioxidative Zyklus involviert die vier Enzyme Ascorbatperoxidase, Monodehydroascorbatreduktase, Dehydroascorbatreduktase sowie die Glutathionreduktase (Vanacker et al., 1998). Daneben zählt auch die Glutathionperoxidase zu den ROS-entgiftenden Enzymen in der Pflanze (Mittler et al., 2004). Ein vereinfachtes Schema der *in planta* hochkomplexen Abläufe der antioxidativen Regulation ist in Abbildung 1.14 dargestellt, welches außer den Peroxidasen alle im folgenden besprochenen Enzyme beinhaltet.

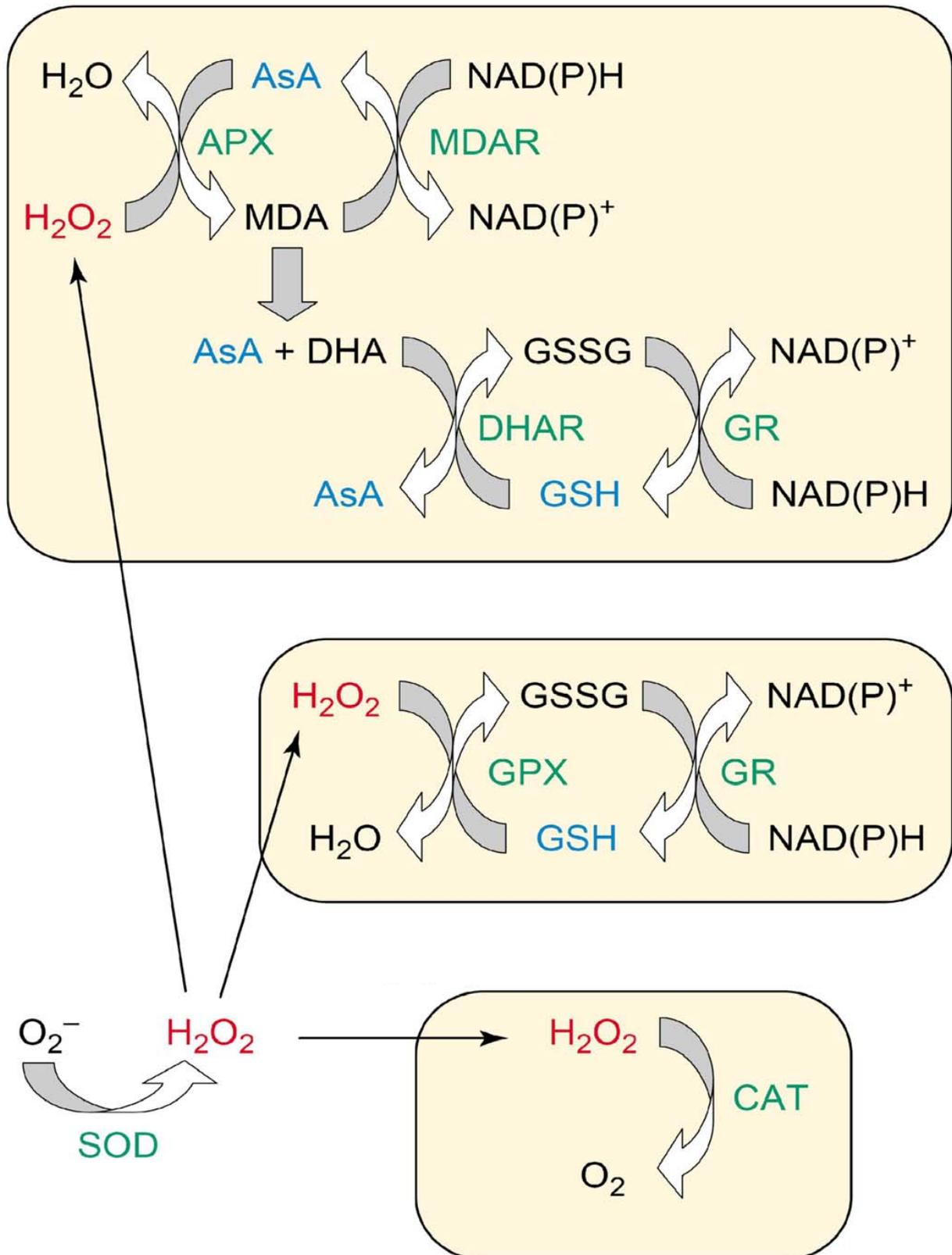
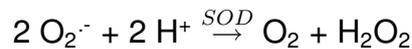


Abbildung 1.14: Schema der Entgiftungswege von ROS in Pflanzen nach Mittler (2002). ROS sind rot, Antioxidantien blau und Enzyme in grün dargestellt. Das obere Feld zeigt den Ascorbat-Glutathionzyklus, das mittlere Feld die Funktionsweise der Glutathionperoxidase, und im untersten Feld ist die Wirkung der Katalase dargestellt. Alle Enzyme werden in den folgenden Kapiteln näher besprochen.

1.2.3.1 Superoxiddismutase

Das Enzym Superoxiddismutase (EC 1.15.1.1), im weiteren als SOD abgekürzt, kann in Chloroplasten, Mitochondrien, Mikrosomen, Cytoplasma bzw. Cytosol und auch im Apoplasten nachgewiesen werden (Alscher et al., 2002; Mittler, 2002; Palma et al., 2006). SOD katalysiert folgende Dismutation (Scandalios, 1993):



Diese Reaktion geht auch ohne Enzym vonstatten, wird jedoch durch die SOD drei- bis vierfach beschleunigt (Lederer, 2002). Die drei Typen der SOD werden durch ihren metallischen Kofaktor klassifiziert: Eisen (FeSOD), Mangan (MnSOD) und Kupfer/Zink (Cu/ZnSOD) (Bowler et al., 1992). FeSOD wurde in allen bisher untersuchten Pflanzen als chloroplastenlokalisiert beschrieben, während die MnSODs in Mitochondrien und Mikrosomen vorkommen und die Cu/Zn-SODs überall in der Pflanzenzelle anzutreffen sind (Alscher et al., 2002).

1.2.3.2 Katalase

Die Katalase (H_2O_2 : H_2O_2 Oxidoreduktase, EC 1.11.1.6, (Tejera Garcia et al., 2007)) wird laut verschiedener Quellen als überwiegend bis ausschließlich peroxisomales bzw. mikrosomales Enzym und Marker dieser Organellen beschrieben (Heinze und Gerhardt, 2002; Lederer, 2002; Mittler, 2002; Mizuno et al., 2005; Palma et al., 2006). Sie katalysiert die Dismutation von H_2O_2 zu Wasser und O_2 (Tseng et al., 2007). Die Katalase ist ein Enzym mit hoher Umsatzrate (> 40.000 Moleküle s^{-1} , Qureshi et al., 2007) bei gleichzeitig schwacher Affinität (k_m nahe 1 M) zum Substrat H_2O_2 (Foyer, 1993). Die Aufgabe der Katalase scheint somit überwiegend in der Beseitigung eines Übermaßes an ROS zu liegen (Mittler, 2002). Die Katalasen sind tetramere Enzyme mit je einer Hämgruppe pro Untereinheit und Eisen als Zentralatom des Häm. Sie stellen 10-25 % des peroxisomalen Proteins (Heinze und Gerhardt, 2002; Tejera Garcia et al., 2007). Nachweise von Katalase in anderen Kompartimenten als den Peroxisomen oder im Apoplasten (Zellwand) werden von Heinze und Gerhardt (2002) aufgrund von Limitierungen in den Extraktionsmethoden und der Fragilität der Peroxisomen als unsicher angesehen.

1.2.3.3 Peroxidasen

Peroxidasen (POX) nehmen in der Pflanze eine prominente Stellung ein, da sie nicht nur Peroxide inklusive H_2O_2 entgiften, sondern auch an der Zellelongation und dem Aufbau und der Differenzierung der Zellwand beteiligt sind (Passardi et al., 2004). Pflanzliche Hämperoxidasen werden in drei Klassen eingeteilt (Hiraga et al., 2001; Teixeira et al., 2004), wobei die Beseitigung von H_2O_2 in der Pflanze neben anderen Enzymen durch die „klassischen“ Peroxidasen (class III) wie der Meerrettich-POX vonstatten geht, die im Cytosol, in der Vakuole oder in der Zellwand lokalisiert sind, jedoch nicht in den Organellen vorkommen (Shigeoka et al., 2002). In *Arabidopsis* werden diese Enzyme von einer 73 Gene umfassenden Familie codiert (Tognolli et al., 2002), in Reis gar von doppelt so vielen (Passardi et al., 2004). Die hier untersuchten Peroxidasen (EC 1.11.1.7) werden aufgrund ihres Kosubstrates auch als Guajacol-Peroxidasen bezeichnet (Noctor und Foyer, 1998). Sie katalysieren dementsprechend den Abbau von H_2O_2 zu Wasser unter Oxidation des Guajacol zum mesomeriestabilisierten Guajacylradikal.

1.2.3.4 Glutathionperoxidase

Glutathionperoxidase (GPOX; EC 1.11.1.9) wird zwar der Familie der tierischen Peroxidasen zugeordnet, sie ist aber auch in der Pflanze zu finden (Hiraga et al., 2001). Dieses Enzym ist auf GSH als Kosubstrat angewiesen, welches im Verlaufe der Reaktion zu GSSG oxidiert wird. Sie katalysiert unter der Anwesenheit von GSH als H-Donor die Reduktion von H_2O_2 , organischen Hydroperoxiden und Lipidperoxiden (Ursini et al., 1995). Im Gegensatz zum tierischen Enzym enthalten sie Cystein statt Selenocystein am aktiven Zentrum. Einige pflanzliche GPOX reduzieren Peroxide effizienter oder ausschließlich durch Thioredoxin (Rouhier and Jacquot, 2005). In *Arabidopsis thaliana* wurde GSH-abhängige GPOX bislang im Cytosol und den Chloroplasten nachgewiesen (Rodriguez Milla et al., 2003), die thioredoxinabhängige GPOX hingegen in fast allen Kompartimenten der Zelle (Rouhier and Jacquot, 2005).

1.2.3.5 Ascorbatperoxidase

Die Ascorbatperoxidase (EC 1.11.1.11) oder kurz APOX nimmt eine grundlegende Rolle in Pflanzen ein. In Chloroplasten, der Hauptquelle für Superoxid und H_2O_2 , fehlt die Kata-

lase, so dass H_2O_2 durch die Reaktion mit Ascorbat, die von der APOX beschleunigt wird, entgiftet werden muss. Das Enzym findet sich jedoch auch im Cytosol und den Peroxisomen (Noctor und Foyer, 1998; Teixeira et al., 2004). Die Funktion der APOX besteht in der Reduktion von H_2O_2 zu Wasser. Als Elektronendonator fungiert das Ascorbat, welches im Zuge der Reaktion zum Monodehydroascorbatradikal (MDHA) oxidiert wird (Shigeoka et al., 2002). Die APOX spielt zusätzlich eine Rolle in der Feinabstimmung des ROS-Signalling, im Gegensatz zur Katalase, deren Aufgabe überwiegend in der Beseitigung von Übermaß an ROS liegt (Mittler, 2002).

1.2.3.6 Monodehydroascorbatreduktase

Monodehydroascorbat (MDHA) kann entweder spontan disproportionieren oder durch Ferredoxin oder das NAD(P)H-abhängige Enzym Monodehydroascorbatreduktase (MDHAR; EC 1.6.5.4) direkt zu Ascorbat reduziert werden (Lederer, 2002; Shigeoka et al., 2002). MDHAR kommen als 55 kDa-Form in Chloroplasten und als 47 kDa-Form im Cytosol vor, wurden aber auch in Mitochondrien und Mikrosomen nachgewiesen. Sie katalysieren die Reaktion von 2 MDHA und NAD(P)H zu 2 Ascorbat und NAD(P). Trotz der effizienten Regeneration des Ascorbat durch MDHAR ist es unvermeidlich, dass ein gewisser Anteil der MDHA-Radikale spontan zu Ascorbat und Dehydroascorbat disproportioniert (Polle, 2001; Lederer, 2002).

1.2.3.7 Dehydroascorbatreduktase

MDHA-Radikale, die nicht wie vorher beschrieben durch enzymatische Aktivität reduziert werden, disproportionieren laut Morell et al. (1997) mit einer Rate von $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ zu Ascorbat und zu Dehydroascorbat (DHA). Das instabile DHA wird durch die Aktivität der Dehydroascorbatreduktase (DHAR, EC 1.8.5.1) wieder in den Ascorbat-Pool zurückgeführt und so ein irreversibler Ascorbatverlust (Lederer, 2002) vermieden. Das Enzym wurde als Monomer mit einem Molekulargewicht von 23 kDa und k_m -Werten von 2,5 mM für GSH sowie 0,07 mM für DHA beschrieben (Hossain und Asada, 1984). Neben der DHAR können noch viele andere Enzyme in der Pflanze diese Reaktion mit unterschiedlicher Effizienz katalysieren (Mittler et al., 2004). Die Bedeutung und Identität der DHAR wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert (Morell et al., 1997; Potters et al., 2002).

1.2.3.8 Glutathionreduktase

Der Zyklus schließt sich mit der Glutathionreduktase (GR; EC 1.6.4.2), einem Enzym mit Molekulargewichten zwischen 90 und 140 kDa mit gewöhnlich zwei Unterheiten (Qureshi et al., 2007), welches das in den von DHAR und GPOX katalysierten und in anderen teils nichtenzymatischen Reaktionen entstandene GSSG unter Oxidation von NAD(P)H zu 2 GSH reduziert (Apel und Hirt, 2004). Auf diese Weise liefert die GR stets reduziertes GSH, unter anderem für den Ascorbat-Glutathionzyklus, und stellt sicher, dass das Verhältnis GSH/GSSG in einer normal gesunden Zelle hochgehalten wird. Der Verbrauch von NAD(P)H agiert als energetischer „sink“ (Qureshi et al., 2007) und stellt NAD(P) wieder zur Verfügung.

1.2.3.9 Cytosol und Mikrosomen

Im Cytosol finden sich mit Ausnahme der Katalase alle vorher besprochenen Enzyme der Detoxifizierung und des Ascorbat-Glutathionzyklus, wobei die Existenz einer cytosolischen Katalase kontrovers diskutiert wird (Scandalios, 1993; Heinze und Gerhardt, 2002). Beim Cytosol handelt es sich um die lösliche Fraktion des Cytoplasmas ohne Organellen und Membranfraktionen (Nultsch, 1996).

Bei den hier allgemein als Mikrosomen bezeichneten Organellen (auch bekannt als Peroxisomen, Mikrokörper oder Microbodies) handelt es sich um ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorkommende kugelförmige kleine Körper mit einem Durchmesser zwischen 0,1 und 1 μm , die eine feinkörnige Matrix enthalten und von einer einfachen Membran umgeben sind (Schrader und Fahimi, 2004). In den höheren Pflanzen spielen Mikrosomen eine zentrale Rolle in drei Stoffwechselwegen, nämlich dem Lipidabbau, der Photorespiration und der Entgiftung von H_2O_2 ((Lopez-Huertas et al., 2000; Hayashi and Nishimura, 2003). Sie werden daher in Glyoxysomen, Blattperoxisomen und unspezialisierte Peroxisomen unterteilt (Minorsky, 2002). Die Katalase kommt in allen drei Subtypen vor (Hayashi and Nishimura, 2003). Pflanzliche Mikrosomen enthalten neben SOD und Katalase die Enzyme des Ascorbat-Glutathionzyklus (Jiménez et al., 1997; Palma et al., 2006), keine GPOX (Mittler, 2002; Rodriguez Milla et al., 2003) oder Peroxidasen (Mittler, 2002), jedoch mikrosomale GSTs (Pflugmacher et al., 2000), hier kurz als mGST bezeichnet, die sich evolutionär von löslichen GSTs unterscheiden (Frova, 2003).

1.3 Fragestellungen

Berücksichtigt man den langen Zeitraum, in dem Bakterien und Eukaryoten nebeneinander existierten, so ist es nicht allzu überraschend, dass sich die Fähigkeit zur „Dechiffrierung“ von Signalen zwischen den Reichen entwickelt hat (Shiner et al., 2005). Unter diesem Aspekt wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen behandelt:

- Gibt es Quorum quenching-Mechanismen gegenüber den hier gewählten AHLs? In der Studie von Delalande et al. (2005) zeigte sich, dass enzymatische Signalinaktivierung typischerweise bei Leguminosen zu beobachten ist, jedoch kaum in monokotyledonen Pflanzen wie Weizen oder Mais. In dieser Arbeit soll daher der Abbau von AHLs anhand der Leguminose Yambohne und der Gerste verglichen und festgestellt werden, ob und in welcher der Pflanzen es zu signifikanter Degradation von AHLs kommt.
- Bislang existieren keine Informationen über eine mögliche Aufnahme und Translokation von AHLs *in planta*. Neben der Untersuchung des AHL-Abbaus durch die Einwirkung von Pflanzen soll hier deshalb auch das Schicksal des Signalstoffes in Kontakt mit der Pflanze geklärt werden. Werden AHLs in die Wurzel oder gar in den Spross aufgenommen? Gibt es, wenn ja, Unterschiede zwischen den beiden Pflanzenspezies und den drei unterschiedlichen AHLs? Findet eine Metabolisierung der AHLs in der Pflanze statt?
- Ist ein Einfluss von bakteriellen AHLs auf morphologische und physiologische Parameter der Pflanzen zu beobachten? Kommt es durch die Signalstoffe zu Veränderungen der Biomasse, der Sprosslänge, oder zu Variationen in den Pigmentgehalten, wie beispielsweise durch „greening“-ähnliche Effekte oder, in konträrer Wirkung, durch erhöhte Seneszenz? Treten Veränderungen in der Strukturierung der Wurzeln oder des pH-Wertes auf?
- Kann die Pflanze die Qualität des Signals „erkennen“? Anhand der drei AHLs C6-HSL, C8-HSL und C10-HSL soll überprüft werden, ob die strukturelle Variation in der Acylkette sich im Kontakt mit der Pflanze in unterschiedlichen Reaktionen äußern kann. Dies soll sowohl bei den verschiedenen pflanzlichen Parametern als auch bei den Enzymaktivitäten und der Charakterisierung des Schicksals der AHLs im axeni-

schen System im direkten Vergleich aller drei Komponenten untersucht werden.

- Sind Auswirkungen des AHL-Signals auf die Entgiftungskapazitäten der Pflanze zu beobachten? Der Fokus soll hierbei auf der Entgiftung von Xenobiotika durch GST und dem antioxidativ wirksamen Ascorbat-Glutathionzyklus liegen. Wird die Pflanze eher Abwehrmechanismen aktivieren, sich unbeeinflusst zeigen oder diese reduzieren? Sind die Reaktionen in Leguminosen und anderen Pflanzen vergleichbar?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Die Versuchspflanzen Gerste und Yambohne

2.1.1.1 Gerste, *Hordeum vulgare* L., Kultivar „Barke“

Die Gerste (*Hordeum vulgare* L., siehe Abbildung 2.1), eine der bedeutendsten Getreidearten weltweit, wird von der Welternährungsorganisation FAO mit einer Erntemenge von ca. 140 Mio. Tonnen im Jahr 2005 als die fünftwichtigste Nutzpflanze eingestuft. Sie kann wie viele andere Gramineen als typischer Vertreter monokotyledoner Pflanzen gelten. Der Bekanntheitsgrad dieser Nutzpflanze erübrigt eine detaillierte Vorstellung. Zahlreiche Sorten finden als zwei- oder mehrzeilige Züchtungen ihre Verwendung in der Ernährung von Tier wie Mensch. In diesen Versuchen wurde die Sommerbraugerste „Barke“ als Modellpflanze ausgewählt. Sie ist eine derzeit noch aktuelle Sorte, die vor allem wegen ihrer Mehlauresistenz und Braueigenschaften geschätzt, aber allmählich von anderen Sorten abgelöst wird. „Barke“ wird jedoch zur Zeit für einen Microarray-Chip sequenziert und daher häufig als Modellgerste für biochemische und molekulare Untersuchungen gewählt.

Saatgut dieser Sommerbraugerstensorte wurde von der Firma Saatzucht Josef Breun GdbR in Herzogenaurach zur Verfügung gestellt. Das Gerstensaatgut wurde kühl, trocken und dunkel gelagert und behielt eine stets ausreichende Keimfähigkeit.

2.1.1.2 Yambohne, *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban „EC 550“

Die tropische Leguminose *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban erfreut sich im Gegensatz zur Gerste eines weit geringeren Bekanntheitsgrades, obwohl es sich bei dieser Spezies um eine äußerst interessante und nachhaltige Nutzpflanze für den Anbau in vielen tropischen und subtropischen Ländern der Erde handelt, da sie hohe Ertragsleistungen bei bescheidenen Ansprüchen bringt (Belford, 2004).

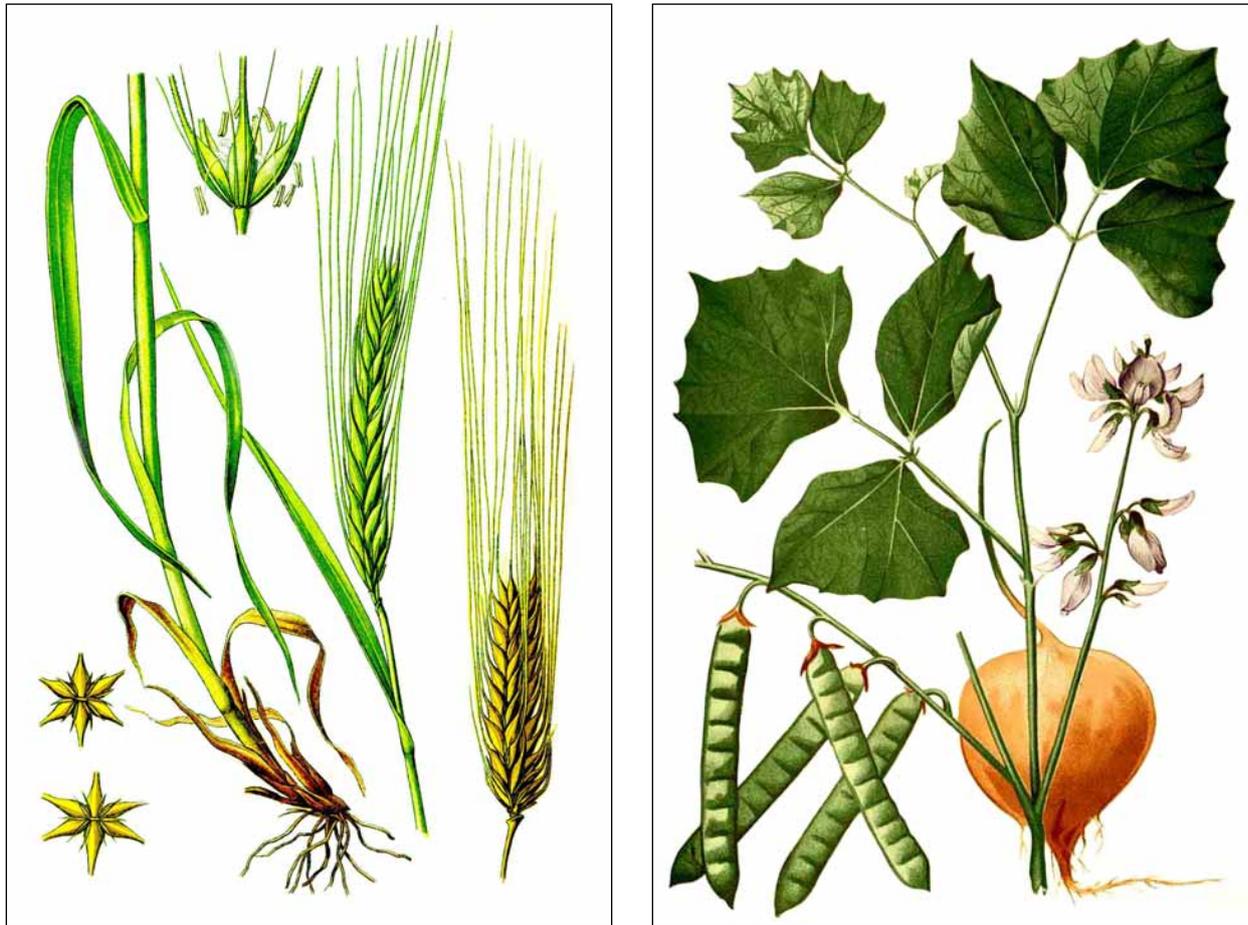


Abbildung 2.1: Die Versuchspflanzen Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Yambohne (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban). Bildquellen: <http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de>; <http://de.wikipedia.org/wiki/Yambohnen>.

Der aus dem Altgriechischen stammende Name „Pachyrhizus“ bedeutet in der Übersetzung „dicke Wurzel“, in Anlehnung an die stärkehaltigen und nahrhaften Wurzelknollen, die diese Pflanze ausbildet. Sie kann sowohl in Zentralamerika wie auch in Südostasien in kultivierter Form gefunden werden. *Pachyrhizus erosus* ist dort unter Namen wie „Jicama“ (Mexiko), „bang kuang“ (Indonesien) oder allgemein als „Mexikanische Yambohne“ bekannt (Zanklan, 2003). Der Einfachheit halber wird im folgenden Text nur von „Yambohne“ gesprochen, auch wenn diese Bezeichnung generell ebenso für andere *Pachyrhizus*-Arten (Belford, 2004) Verwendung finden kann. Die Gattung wird der Familie der Fabaceae, Unterfamilie Faboidae, Stamm Phaseoleae, Unterstamm Diocleinae zugeordnet und steht verwandtschaftlich den Glycininae und Phaseolinae nahe (Zanklan, 2003). Drei *Pachyrhizus*-Spezies, die Mexikanische Yambohne *P. erosus* (L.) Urban, die Anden-Yambohne *P. ahipa* (Wedd.) Parodi und die Amazonas-Yambohne *P. tuberosus* (Lam.) Sprengel (Zanklan, 2003) werden landwirtschaftlich genutzt, wobei *P. erosus* die am häufigsten kultivierte Art ist, was vor allem auf die höheren Erträge zurückzuführen

ist (Sørensen, 1996).

Pachyrhizus erosus (Abbildung 2.1) ist eine krautige kletternde Kurztagspflanze mit dreigeteilten Blättern, deren Umriss je nach Standort sehr stark schwanken kann (Sørensen, 1996). Je nach Sorte sind die Blätter gezahnt oder gelappt mit variabler Behaarung. Die zwittrigen, selbstbefruchtenden Blüten finden sich in Ständen von vier bis 11 Blüten an der Pflanze (Diethelm, 2005). Die Knollen werden in Größen von 350 g in Thailand bis über 1200 g in Mexiko vermarktet (Sørensen, 1996). Die Yambohne liefert im Vergleich zu den traditionellen Knollenpflanzen wie Süßkartoffel oder Maniok drei- bis fünfmal mehr Protein (in Santos et al., 1996). Sie kann roh wie gekocht verzehrt werden und verfügt über einen neutral-süßlichen Geschmack und eine apfelartige Konsistenz (Diethelm, 2005). Die glatten Samen der hier verwendeten Sorte „EC 550“ wiesen eine flach-runde Form und eine olivgrüne bis dunkelbraune, gleichmäßige Farbe auf. Anders als bei vielen Hülsenfrüchten sind die Samen von Yambohnen aufgrund ihres hohen Rotenon-Gehaltes (rund 1 % des Korngewichtes) nicht zum Verzehr geeignet (Santos et al., 1996). Die Substanz hat dafür eine nützliche insektizide Wirkung aufzuweisen (Zanklan, 2003). Diese vielen positiven Eigenschaften verdeutlichen das ökonomische Potential der bislang zu wenig genutzten Kulturpflanze Yambohne (Belford, 2004).

Saatgut der Yambohne (*Pachyrhizus erosus*) wurde von Dr. E. Belford, Universität Freetown, Sierra Leone, zur Verfügung gestellt. Die Sorte EC 550 wurde am Department of Biological Sciences, Fourah Bay College, Freetown, Universität von Sierra Leone vermehrt. Das Saatgut wurde wie das der Gerste kühl, trocken und dunkel gelagert und zeigte über drei Jahre hinweg kein Nachlassen der Keimfähigkeit.

2.1.2 Simulationskammern

Die Anzucht der **Gersten** erfolgte in einer Heraeus-Vötsch Großraumzelle vom Typ VEZ-PHL. Die Tagphase wurde mit 14 Stunden Belichtung von 6 bis 20 Uhr simuliert. Während der Tagphase wurde die Temperatur auf 15 °C reguliert, während der Dunkelphase auf 12 °C. Die Luftfeuchtigkeit stellte aufgrund des geschlossenen Anzuchtssystems keinen Einflussfaktor dar. An der Unterkante der Anzuchtgefäße (Abstand von 108 cm zur Lampendecke) wurden folgende Größen gemessen:

PAR, Photosynthetisch aktive Strahlung (400-700 nm) 34,35 W/m²

UV-A (315-400 nm) 0,9106 W/m²

UV-B (280-315 nm): 0,2739 W/m²

Die Anzucht axenischer **Yambohnen** erfolgte in einem Heraeus-Vötsch Klimaschrank vom Typ VSK 04/500/U/S. Die Temperaturbedingungen in der Großraumzelle hatten sich als zu kalt für die Leguminose erwiesen. Die Pflanzen erhielten wie Gerste 14 Stunden Licht, jedoch bei konstanter Temperatur von 20 °C, da eine Tag-Nacht-Regulation der Temperatur bauartbedingt nicht möglich war. Folgende Werte wurden an der Unterkante der Anzuchtgefäße (im Abstand von 61 cm zur Lampendecke) ermittelt:

PAR, Photosynthetisch aktive Strahlung (400-700 nm) 19,45 W/m²

UV-A (315-400 nm) 0,35 W/m²

UV-B (280-315 nm): ca. 0,1 W/m²

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Oberflächensterilisierung wurde nach der Methode von Rothballer (2003) durchgeführt. Grundsätzlich wurde bei allen Schritten steriles destilliertes Wasser aus einer MilliQ-Anlage verwendet. Zunächst wurden je circa 40 (Yambohne) bis 60 (Gerste) Samenkörner 2 min lang in einer 1 %igen (v/v) Tween 20-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bei niedriger Umdrehung gerührt. Die Rührgeschwindigkeit wurde so gewählt, dass das Saatgut zwar bewegt, aber nicht beschädigt wurde. Beim zweiten Schritt wurde die Tween-Lösung durch ein gleiches Volumen an 70 % EtOH (v/v) ersetzt und 5 min gerührt. Anschließend wurde das Saatgut 2-3mal in H₂O dd gewaschen. Danach wurden die Körner mit rund 30 mL NaClO (circa 8-12 % aktives Chlor, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) versetzt und 20 min gerührt. Die Samen der Yambohne waren nach dem anschließenden zweimaligen Waschen in Wasser bereits ausreichend oberflächensteril. Gerstenkörner hingegen wurden nach dem ersten Schritt unter langsamer Rührbewegung über 4 Stunden in sterilem H₂O dd, welches zwischenzeitlich gewechselt wurde, vorgequollen. Dieser Schritt diente der Verbesserung der Zugänglichkeit der Kornoberfläche und der Lockerung der Deckspelze der Gerstenkörner. Danach erfolgte eine 10-minütige Behandlung mit NaClO, worauf das Saatgut 2-3mal in H₂O dd gewaschen wurde. Die oberflächensterilisierten Samenkörner wurden nun auf NB-Agar-Platten (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.2.2)

verteilt. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen, in lichtdichte Behälter verpackt und in der jeweiligen Klimakammer (Gerste in Typ VEZ-PHL, Yambohne Typ VSK 04/500/U/S) vorgekeimt. Gerstenkeimlinge wurden nach 4 Tagen in das sterile System umgesetzt, Yambohnkeimlinge nach 7 Tagen, da die Pflanzen zu dieser Zeit optimale Wurzellängen für die Umsetzung aufwiesen. Bei der Auswahl der Keimlinge wurden nur solche berücksichtigt, welche ohne sichtbare bakterielle oder pilzliche Kontamination auf den NB-Agarplatten geblieben waren. Diese Keimlinge wurden gemäß Rothballer (2003) und Kutter et al. (2006) als axenisch und somit endophytenfrei betrachtet. Die Methode, mittels Mikrowellenbehandlung (Hengen, 1997) oberflächensteriles Gerstensaatgut zu erhalten, erbrachte zwar keimfreie Samen, jedoch unter zu hohen Verlusten an Keimfähigkeit.

Als Anzuchtgefäße wurden Duran-Reagenzgläser (Schott, Mainz) mit 30 mm Öffnungsdurchmesser verwendet. Die Gläser wurden vor Verwendung mit anderen in Frage kommenden Anzuchtgefäßen, dem PhytoTray (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) sowie einer transparenten Kunststoffdose auf ihre Licht- und UV-Durchlässigkeit getestet und verglichen, wobei die Duran-Reagenzgläser im Schnitt die besten Eigenschaften aufwiesen (Tabelle 2.1). Die Reagenzgläser wurden mit 50 g Glasperlen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Tabelle 2.1: Licht- und UV-Durchlässigkeit verschiedener Anzuchtgefäße.

	Offene Einstrahlung	Duranglas	PhytoTray	Dose
UV-A (W/m ²)	66,6	43,7	37,9	34,7
UV-B (W/m ²)	3,49	1,14	2,6	1,6
PAR (μmol/m ² /s)	2100	1500	1500	1400

vom Durchmesser zwischen 1,7 und 2 mm befüllt, anschließend mit Alusteckkappen verschlossen und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Stammlösungen von N-Hexanoyl- (C6-HSL), N-Octanoyl- (C8-HSL) und N-Decanoyl-homoserinlacton (C10-HSL), alle von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), wurden mit EtOH p.a. in einer Konzentration von 10 mM angesetzt. Mineralisches Medium (Zusammensetzung siehe Seite 55) wurde mit sterilem H₂O dd hergestellt und anschließend AHL-Stammlösungen zur Endkonzentration von 10 μM AHL appliziert. Die Konzentration des EtOH in der Lösung betrug hierbei 0,1 %. Kontrollen erhielten nur reinsten Ethanol im selben Verhältnis. Je 10 mL der Lösungen wurden durch sterile CA-Membranen (0,22 μm, Schleicher & Schuell) in ein steriles Anzuchtgefäß filtriert und anschließend je ein Keimling appliziert. Die Pflanzen wurden in der jeweiligen Klimakammer untergebracht und wuchsen 17 Tage (Gerste) oder 21 Tage (Yambohne)

in den Anzuchtgefäßen. Nach dieser Anzucht befanden sich beide Arten in einem vergleichbaren Wachstumsstadium, was die unterschiedliche Wuchsdauer begründet. Alle Pflanzen, welche verkümmert waren oder im Vergleich zu den anderen Pflanzen ein nicht-konformes Wachstum z.B. aufgrund Beschädigung während der Oberflächensterilisierung aufwiesen, wurden verworfen. Insgesamt betrug die Ausbeute an korrekt gewachsenen, axenischen Pflanzen in den einzelnen Chargen daher zwischen 54 % und 92 %.

Im Bakterienversuch wurden die Keimlinge wie beschrieben axenisiert und anschließend unter sterilen Bedingungen 1 Stunde in PBS-Lösung inkubiert, welche Bakterien in der Dichte von $OD=1,0$ enthielt. Die beimpften Keimlinge wurden danach in das sterile System überführt, welches reines MS-Medium enthielt, und wie die AHL-behandelten Pflanzen angezogen. Als Versuchorganismus wurde *Pseudomonas putida* gewählt, da hier neben einem AHL-produzierenden Stamm (IsoF) eine AHL-negative Mutante (F117) zum direkten Vergleich verfügbar war.

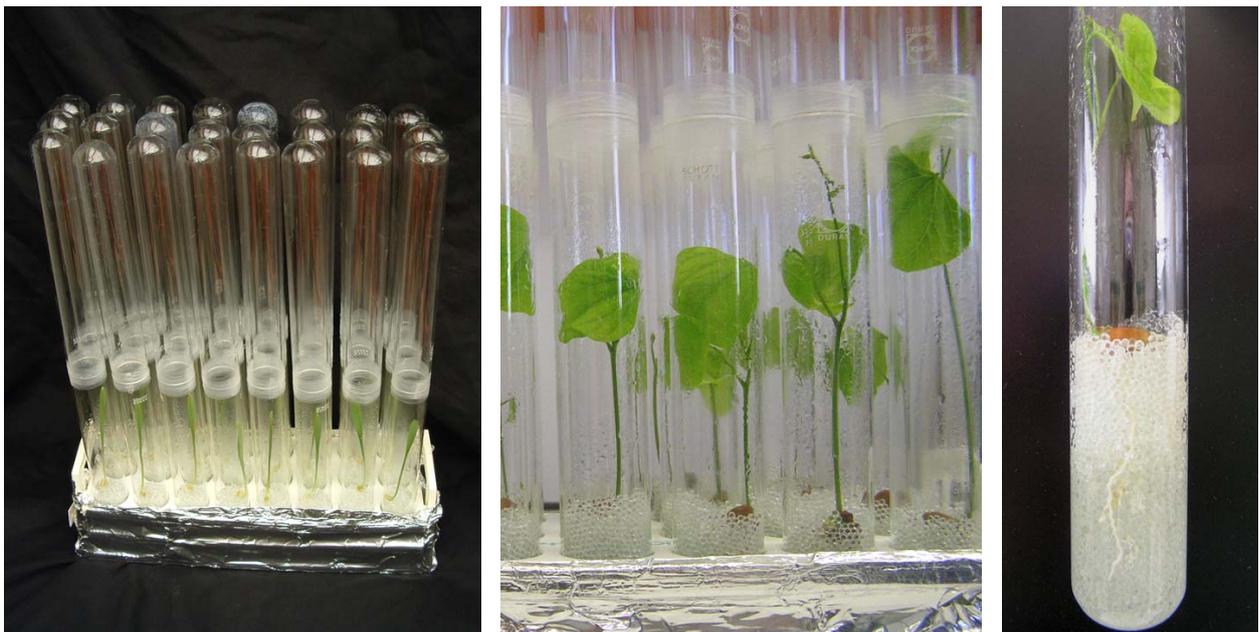


Abbildung 2.2: Das axenische System mit Gerste (linkes Bild) und Yambohne (Mitte). Zur rechten die Darstellung einer Einzelpflanze von Yambohne mit Wurzelbereich.

2.2.2 Medien

Das von der Firma Duchefa Biochemie BV (Niederlande) bezogene Medium nach Murashige und Skoog (1962) wurde 1:1 verwendet. Es wies die in Tabelle 2.2 beschriebenen Konzentrationen von Makro- und Mikronährelementen auf. NB-Platten wurden aus Nähr-

bouillon (8 g/ L, Merck, Darmstadt) und Agar-Agar (15 g/ L) hergestellt.

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Mediums nach Murashige und Skoog (1962).

Makronährelement	Konzentration	Mikronährelement	Konzentration
CaCl ₂	2,99 mM	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,11 µM
KH ₂ PO ₄	1,25 mM	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,1 µM
KNO ₃	18,79 mM	FeNaEDTA	0,1 mM
MgSO ₄	1,5 mM	H ₃ BO ₃	0,1 mM
NH ₄ NO ₃	20,61 mM	KI	5 µM
—	—	MnSO ₄ * 4H ₂ O	0,1 mM
—	—	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	1,03 µM
—	—	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	29,91 µM

Zur Trennung des MS-Mediums von den Glasperlen, die bei der axenischen Anzucht verwendet wurden, wurde der Inhalt eines Reagenzglases in eine 60 mL-Spritze mit Luer-Lock (Brand, Wertheim) umgefüllt und der wässrige Anteil mittels Luftdruck von den Glasperlen separiert. Die so gewonnenen Medienproben wurden in sterilen Falcon-Röhrchen aus Polyethen (PE) aufbewahrt. In Polystyrol-Gefäßen (PS) war eine stärkere Adsorption der AHLs zu beobachten, insbesondere bei C10-HSL.

Die Bestimmung des pH-Wertes im Medium erfolgte durch ein pH-Meter der Firma Hanna Instruments (Kehl am Rhein) mit Referenzelektrode für Temperaturmessung.

2.2.3 Untersuchung der AHL-Dynamik im axenischen System

2.2.3.1 Probenvorbereitung aus Medium und Pflanze

Abiotische Verluste in diesem Versuchsdesign wurden ermittelt, indem das sterile System exakt wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben angesetzt wurde, jedoch ohne Pflanzen. Zur Untersuchung möglicher Einflüsse von abiotischen Prozessen wie zum Beispiel photokatalysierter Oxidation wurde das sterile System außerdem ohne Glasperlen angesetzt. Alle Ansätze wurden unter identischen Konditionen wie im Pflanzenexperiment inkubiert und hierbei zusätzlich die beiden unterschiedlichen Klimabedingungen (siehe 2.1.2) auf Unterschiede in den abiotischen AHL-Verlusten miteinander verglichen. Von jeder Behandlung wurde zum Zeitpunkt des Ansetzens eine sogenannte „T=0“-Probe (Zeitpunkt Null) entnommen. Nach der Inkubation wurde das Medium durch sterile CA-Membranen (0,22 µm, Schleicher & Schuell) filtriert, wobei im Adsorptionsversuch das Medium erst mittels Luftdruck von den Glasperlen getrennt wurde. Die pH-Werte der Proben wurden

vor und nach der Inkubation geprüft und lagen stets unter pH 6. Da es sich um rein mineralisches Medium handelte, war eine Vorbehandlung der Proben vor der Messung an der UPLC nicht nötig. Es zeigte sich außerdem, dass die im Folgenden beschriebene UPLC-Methode ausreichend sensitiv war und sich somit eine Aufkonzentration bei Proben aus Mineralmedium erübrigte.

Die Proben aus Pflanzengewebe von Gerste und Yambohne wurden zunächst unter Stickstoffkühlung sehr fein gemörsert und anschließend 1 g Spross- bzw. 0,5 g Wurzelmaterial in 10 mL kaltem Acetonitril (25 % v/v) homogenisiert. Nach 20 min im Ultraschallbad wurden die Proben bei 5.000 x g (15 min) zentrifugiert und die Überstände vorsichtig entnommen. Der pH-Wert der Überstände betrug 6,5 und konnte als wenig problematisch für Hydrolyse betrachtet werden. Die Proben wurden anschließend mittels SPE nach der Methode von Li et al. (2006) aufgereinigt. Hierzu wurde eine MegaBond Elute C18-Säule (Varian, Darmstadt) bei einer Flussrate von 1 mL/min bei Raumtemperatur mit je 2 mL MeOH und Wasser konditioniert und danach 10 mL der Probe aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 4 mL 15 % MeOH (v/v) gewaschen, unter Vakuum getrocknet und die gesuchte Fraktion mit 2 mL Hexan/Isopropanol-Mischung (25/75 v/v) eluiert. Das Eluat wurde unter Stickstoff getrocknet, in 0,5 mL 30 % ACN (v/v) aufgenommen und durch 0,22 µm PTFE-Membranen (VWR, Darmstadt) filtriert.

2.2.3.2 AHL-Nachweis an UPLC

Die Analyse mittels der Acquity Ultra Pressure Liquid Chromatography oder kurz UPLC (Waters, Eschborn), ausgestattet mit einem 2996 PDA-Detektor, erfolgte unter Verwendung einer BEH C18-Säule von Waters mit einem Partikeldurchmesser von 1,7 µm und der Säulenabmessung 100 x 2,1 mm. Der Säulenofen wurde auf 60 °C temperiert, der Autosampler auf 27 °C. Bei einer Flussrate von 0,9 mL/min bei rund 900 bar wurde ein über „full loop“ injiziertes Volumen von 20 µL Probe gemessen. Der lineare Gradient begann mit 10 % ACN (J.T. Baker, Niederlande) in Wasser (v/v) und stieg in 1 min auf 100 % ACN (Li et al. 2006). Die AHLs wurden bei einer Wellenlänge von 197 nm analysiert. Vor allen Messungen wurden 5-Punkt-Kalibrationen durchgeführt, welche hohe Linearität aufwiesen (siehe Abbildung 2.3).

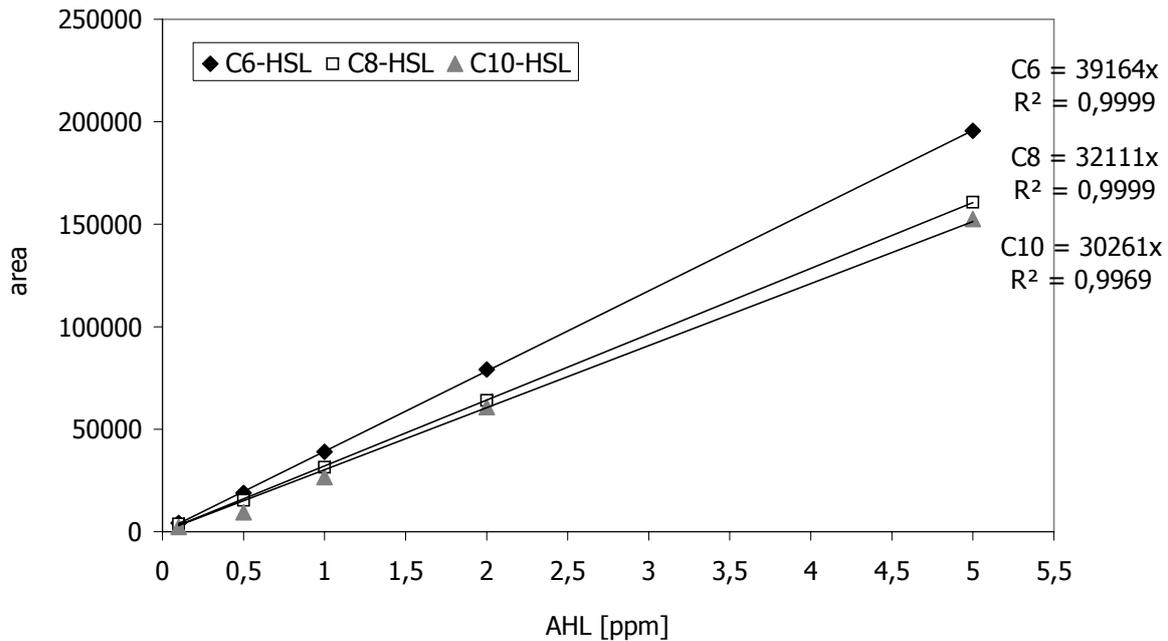


Abbildung 2.3: Beispiel für 5-Punkt-Kalibriergeraden zum AHL-Nachweis an der UPLC.

2.2.3.3 AHL-Nachweis am FTICR-MS

Die qualitative AHL-Analyse wurde an einem Apex Qe 12 T FTICR-MS (Bruker Daltonics, Bremen), ausgestattet mit einer APOLLO II „Ion Source“ ESI-Quelle, im positiven Modus bei einer Mikrospray-Infusion von 120 $\mu\text{L}/\text{h}$ durchgeführt. Die Spektren wurden im Breitband-Modus mit einer Scanrate von 256 ermittelt und extern mit Arginin (10 mg/L in 50 % MeOH (v/v) mit 0,1 % Ameisensäure) unter Bestimmung der Arginin-Cluster (m/z siehe Anhang, Tabelle 7.1) bei einem maximal akzeptierten Fehler von 0,01 ppm kalibriert. Vor jeder Messung wurde zunächst die Hamilton-Spritze zweimal mit MeOH gespült und anschließend die Spray-Einheit des FTICR-MS mit zweimal 100 μL MeOH, zweimal 100 μL 50 % MeOH (v/v) mit 0,1% NH_3 und 100 μL MeOH in dieser Reihenfolge gereinigt und danach mit mindestens 10 μL der jeweilig folgenden Probe vorgespült. m/z, deren „signal-to-noise“-Verhältnis einen Wert von 4 überschritten, wurden in eine Liste exportiert. Auf diese Weise wurden pro Messung über 6500 m/z gelistet, welche zunächst einer internen Kalibration durch Abgleich mit Diestern („solvent impurities“, m/z siehe Tabelle 7.1 im Anhang) mit einem maximal akzeptierten Fehler von 0,01 ppm unterzogen und danach mittels einer Software (www.python.org) nach möglichen protonierten und Na-kationisierten Homoserinlacton-Massen überprüft wurden. Die Massengenauigkeit trug einen Fehler von 1 ppm, was eine relative Abweichung von 0,0001 % bedeutet.

Die Identität der AHLs wurde neben der hohen Genauigkeit der Messung durch das Auffinden beider AHL-Formen im positiven Messmodus ($[M+H]$ und $[M+Na]$) sowie durch die Präsenz der respektiven ^{13}C -Isotopenpeaks verifiziert.

2.2.3.4 Szintillation Tritium-markierter AHLs

Tritium ($[^3H]$)-markiertes C8- und C10-HSL wurde synthetisiert von Dr. Květoslava Fuksová an der First Faculty of Medicine, Charles University in Prag, Tschechische Republik. Als Ausgangsstoffe dienten N-(Trans-2-Octenoyl)-Homoserinlacton und N-(Trans-2-Decenoyl)-Homoserinlacton, welche unter Katalyse durch Palladium tritiert wurden. Die gesamte Radioaktivität der Produkte lag bei 8,1 GBq (220 mCi) für $[^3H]$ -C8-HSL und bei 6,3 GBq (170 mCi) für $[^3H]$ -C10-HSL. Die radioaktiven AHLs wurden in Ethylacetat gelagert, welches vor Verwendung der Stoffe evaporiert und durch EtOH p.a. ersetzt wurde.

Der $[^3H]$ AHL-Versuch wurde in zwei Ansätze gegliedert. In ersten Teil des Experimentes wurden axenische Pflanzen in Durangläsern exakt wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben angezogen, wobei das Medium in der Gesamtkonzentration von 10 μM AHL einen Anteil von 3,7 MBq (100 μCi) $[^3H]$ AHL pro 10 mL Medium bzw. Anzuchtgefäß enthielt. Gerstenkeimlinge wurden nach der Vorkeimung auf NB-Medium direkt im $[^3H]$ AHL-haltigen Medium inokuliert. Da die Pflanzen von Beginn an in Kontakt mit AHL standen, wurde dieser Ansatz als „frühe Applikation (FA)“ bezeichnet.

In einem zweiten Ansatz, der sogenannten „späten Applikation (SA)“, sollte die Kinetik der Aufnahme des radioaktiven Signals von $[^3H]$ AHL in bzw. an die Wurzel und insbesondere in den Spross der Gerste untersucht werden. Da in den ersten Tagen der Anzucht nach der Inkubation der Gersten deutliche und nicht kalkulierbare Schwankungen in der Geschwindigkeit des Aufwuchses der Keimlinge beobachtet worden waren, wurde dieses Experiment mit Pflanzen durchgeführt, welche zunächst 5 Tage ohne AHL angezogen und dann einer Auslese nach möglichst einheitlichem Erscheinungsbild unterzogen wurden, um den Einfluss der pflanzlichen Variabilität auf die Ergebnisse möglichst zu minimieren. Hierzu wurden die Gersten ohne Zusatz von AHL für 5 Tage in 9,5 mL Mineralmedium in Spezialgläsern vorgezogen und anschließend in Wuchs und Gestalt vergleichbare Pflanzen ausgewählt. Durch Silikon-Septen an speziell gefertigten seitlichen Auslässen (siehe Abbildung 2.4) wurden mit Spritzen 0,5 mL einer AHL-Mixtur steril appliziert. Die Mixtur enthielt $[^3H]$ -markiertes und nicht radioaktives AHL in einer Menge, die im fertigen



Abbildung 2.4: Spezialglas zur sterilen Applikation von AHL und Entnahme von Proben. Der seitliche Auslass wurde mit einem autoklavierbaren Silikonseptum verschlossen. Applikation und Entnahme erfolgten mittels steriler Hamilton-Spritzen.

Ansatz von 10 mL- wie bei der frühen Applikation- eine Konzentration von 10 μM und 3,7 MBq (100 μCi) Aktivität ergab. Proben wurden 4, 29, 54, 145, 197 und 315 Stunden nach AHL-Applikation entnommen. Das weitere Verfahren war bei beiden Applikationen identisch. Wurzeln wurden in zwei Hälften geteilt und eine Hälfte 30 s unter fließendem dest. H_2O zur Entfernung oberflächlicher Mediumreste gewaschen, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Danach wurden umgehend die Frischgewichte der Pflanzenproben bestimmt. Die Extraktion wurde durchgeführt, indem die vollständige Probe in 1 mL 25 % ACN (v/v) mittels eines Ultra-Turrax T25 (IKA, Staufen) gleichmäßig homogenisiert wurde. Nach 20 min im Ultraschallbad wurden die Extrakte bei 5000 x g 15 min zentrifugiert und die Überstände abgezogen. 250 μL des Extraktes wurden in 5 mL Szintillations-Flüssigkeit Rotiszint eco plus (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) homogenisiert und je 5 min auf einem LS 6500 Szintillations-Zählgerät (Beckman, USA) gemessen. Proben aus dem Medium wurden ohne Vorbehandlung analysiert.

2.2.3.5 Chirale Trennung von D/L-AHL

Die chirale Trennung der AHLs wurde von Dr. I. Gebefuegi am Institut für Ökologische Chemie (Helmholtz Zentrum München) nach folgendem Protokoll wie bei Götz et al.

(2007) beschrieben an einem GC 3900 Gaschromatographen mit einem Saturn 2100T Massenspektrometer (beides Varian, Darmstadt) durchgeführt. 5 mL Aliquots der Proben aus Mineralmedium wurden im Stickstoffstrom getrocknet und in 200 μ L Dichlormethan resuspendiert. Die Salze fielen hierdurch aus, so dass der salzfreie Überstand entnommen werden konnte. 1 μ L der Probe wurde im „splitless mode“ (2 min) unter ultrareinem Helium bei einer Flussrate von 1,3 mL/min und „pulse mode injection“ (0,25 min bei 15 psi pro Puls) injiziert. Bei der Trennsäule handelte es sich um eine Fused-Silica-HYDRODEX β -TBDAC-Säule der Dimension 0,25 mm Durchmesser x 25 m Länge (Macherey-Nagel, Düren) mit einem 0,25 mm Film Heptakis-(2,3-di-O-Acetyl-6-O-t-Butyldimethyl-Silyl)- β -Cyclodextrin. Die Temperatur stieg von 80 °C über Schritte von 30 °C/min auf 220 °C. Die Konditionen des Massenspektrometers waren wie folgt: Ionenquelle 70 eV, Massenspektrometer-Falle bei 500 mA und 190 °C.

2.2.3.6 Analyse von AHL-Metaboliten

Zur Suche nach während der Zeitdauer der Anzucht durch pflanzliche Aktivität entstandenen Metaboliten der AHLs wurde die vorher beschriebene FTICR-MS-Methode zur qualitativen Bestimmung angewandt. Als Proben wurden hierzu neben den Spross- und Wurzelproben aus Gerste und Yambohne (siehe Kapitel 2.2.3.1) die Mineralmedien aus der Pflanzenanzucht inklusive Kontrollen sowie die dazugehörigen T=0-Proben herangezogen. Zur Aufreinigung der Zielmoleküle aus dem Mineralmedium wurde SPE mit Bakerbond „light load“ C18-Säulen (J.T. Baker, Niederlande) durchgeführt. Nach Konditionierung der Säulen mit MeOH und Wasser wurden 0,5 mL der Probe appliziert, mit 0,3 mL Wasser gespült und anschließend mit 0,3 mL MeOH eluiert. Ausgehend von der Annahme, dass AHL-Metaboliten in Pflanzenextrakten in nur sehr geringen Konzentrationen vorliegen würden, wurden zusätzlich Aliquote der Extrakte aus Spross und Wurzel vor der Messung alkalisch hydrolysiert und im „negative-ion“-Modus analysiert. Die intern kalibrierten Spektren (siehe Anhang, Tabelle 7.1) mit bis zu 6000 m/z-Werten wurden mit der FORMULAE-Software (AG BioGeoanalysis, Helmholtz Zentrum München) auf theoretisch mögliche AHL-Derivate durchsucht. Hierbei wurden alle m/z verworfen, die folgende Kriterien nicht erfüllten: $N \neq 1$; $3 < O > 5$; C ungerade. Die resultierenden Dateien wurden unter Verwendung einer Software der AG BioGeoanalysis (Helmholtz Zentrum München) mit Referenzlisten zu AHL bzw. HS abgeglichen und dadurch gemäß Masse oder Mole-

külkomposition unpassende m/z eliminiert. Auf diese Weise verblieben zwischen 4 und 29 m/z in den Listen. Zur Vermeidung falsch positiver Treffer wurden alle in den Proben aus der Zeit nach Pflanzenanzucht gefunden Massen mit den Listen der korrespondierenden Kontrollen (Matrix-Abgleich) und die Proben aus dem Mineralmedium zusätzlich mit den Listen der T=0-Proben abgeglichen.

2.2.4 Pigmentanalyse

Die Extraktion von Chlorophyll und Carotinoiden in Gerste und Yambohne erfolgte nach der Methode von Lichtenthaler (1987). Tiefgefrorenes Blattmaterial aus einer axenischen Anzucht wurde in flüssigem Stickstoff zu einem sehr feinen Pulver gemahlen. Hiervon wurden jeweils 0,5 g mit 10 mL kaltem 80 % (v/v) Aceton (Fluka, Steinheim) versetzt. Die Mischung wurde homogenisiert und anschließend bei 39.250 xg für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um eine komplette Extraktion der Pigmente zu gewährleisten, wobei die resultierenden Überstände zu 30 mL vereinigt wurden. Das letztendlich weiß entfärbte Pellet wies auf die Vollständigkeit der Extraktion hin. Die Extrakte wurden vor der Messung durch sterile CA-Membranen (0,22 µm, Schleicher & Schuell) filtriert. Die Pigmentbestimmung folgte direkt im Anschluss an die Extraktion in 1,5 mL Kunststoffküvetten (Brand, Wertheim). Die Absorptionswerte der Pigmente wurden bei Raumtemperatur bei den Wellenlängen 663,2 nm (Chlorophyll a, C_a), 646,8 nm (Chlorophyll b, C_b) sowie 470 nm (Carotinoide, C_{x+c}) an einem Beckman DU640-Spektrophotometer bestimmt und anschließend mit folgenden Gleichungen nach Lichtenthaler (1987) in die tatsächlichen Konzentrationen (µg Pigment /mL Pflanzenextrakt) und daraus folgend die Gehalte in µg/g Frischgewicht umgerechnet:

$$C_a = 12,25A_{663,2} - 2,79A_{646,8}$$

$$C_b = 21,5A_{646,8} - 5,1A_{663,2}$$

$$C_{a+b} = 7,15A_{663,2} + 18,71A_{646,8}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 1,82C_a - 85,02C_b)/198$$

2.2.5 Bestimmung von Wurzelparametern

Zur Untersuchung der Wurzelmorphologie von axenischer Gerste und Yambohne wurden die folgenden Parameter bestimmt: Durchmesser, Wurzelgesamtlänge, Zahl der Wurzel-

spitzen, Gesamtoberfläche, Gesamtvolumen sowie die Verteilung der Wurzellängen bezogen auf Durchmesserklassen. Die Wurzeln wurden vom Spross und dem verbliebenen Samenkorn getrennt und als Ganzes in einem abgedunkelten und wassergefüllten Plexiglasbehälter auf einem Epson Perfection 3170 Scanner im Graustufenmodus (600 DPI) als jpg-Bild gescannt. Anschließend erfolgte die Auswertung mit Hilfe der Software WinRHIZO 2005 Pro (Régent Instruments, Kanada) nach Anleitung des Herstellers. Aus den genannten Daten wurde von jedem einzelnen Wurzelgeflecht der mittlere Durchmesser sowie die Gesamtlänge aller Wurzeln durch die Software errechnet und daraus für jede Wurzel einzeln die Werte für Gesamtoberfläche und Gesamtvolumen abgeleitet. WinRHIZO ermittelte weiterhin die Zahl an Wurzelspitzen sowie die Verteilung der Gesamtwurzellänge in Durchmesserklassen. Da der Punkt, an dem die Wurzelpakete vom Spross getrennt worden waren, als Spitze erfasst wurde, wurde von jeder Wurzelspitzenzahl der Wert 1 subtrahiert. Es bleibt anzumerken, dass die Erfassung der sehr feinen Wurzelhaare besonders von Gerste auch bei höchster Auflösung nicht möglich war und diese somit nicht in die Berechnungen eingeflossen sind.

2.2.6 Blattflächenmessung

Die Bestimmung der Blattflächen von Gerste und Yambohne nach AHL-Behandlung wurde in Anlehnung an die Methode von O'Neal et al. (2002) durchgeführt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auch hier nach dem bereits beschriebenen axenischen Verfahren. Bei den Gersten wurden hierzu die Blätter am Ansatz der Spreite getrennt und im Graustufenmodus (600 DPI) eingescannt. Die beiden voll entwickelten Blätter der Yambohne wurden getrennt vom Spross gescannt. Zur Kalibration der Messung wurde ein Lineal neben den Proben mit gescannt. Die Bilddaten wurden zunächst von Fehlerquellen wie Schatten oder Flecken digital bereinigt und anschließend in Schwarzweiß-Bitmap konvertiert. Diese modifizierten Dateien wurden anschließend mittels einer Software (ScnImage 4.0.3, Scion Corp., USA) wie bei O'Neal et al. (2002) beschrieben verarbeitet.

2.2.7 Extraktion cytosolischer und mikrosomaler Enzyme

Die Extraktion der Enzyme aus der cytosolischen und der mikrosomalen Fraktion erfolgte auf modifizierte Weise nach der bei Belford (2004) und Menone und Pflugmacher (2005) beschriebenen Methode. Hierzu wurden zunächst 2 g Pflanzenmaterial unter flüssigem

Stickstoff zu einem sehr feinen Pulver gemahlen. Zu jeweils 1 g des entstandenen Pulvers wurden 5 mL Extraktionspuffer zugesetzt und 10 min lang auf Eis gerührt. Der Extraktionspuffer wies folgende Zusammensetzung auf: 0,1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 6,5) mit 20 % Glycerin, 1 mM EDTA, 1 % PVP K90 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 14 mM DTE (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) sowie 0,66 % Protease-Inhibitor Cocktail Set VI (Calbiochem, Merck, Darmstadt). Der Ansatz wurde ohne DTE und Protease-Inhibitoren über Nacht kühl gelagert, um das PVP vorzuquellen. Letztere Zutaten wurden dem Extraktionspuffer erst kurz vor Verwendung frisch zugegeben. Die Verwendung eines Protease-Inhibitor Cocktails war bei der Yambohne unerlässlich, da bei dieser Spezies Enzymdegradation durch Proteasen beobachtet wurde. Bei Gerste wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit der Aufarbeitungspuffer in identischer Zusammensetzung verwendet. Nach der Homogenisierung von Puffer und Pflanzenmaterial wurde der Extrakt durch eine Lage Miracloth (22-25 µm Porengröße, Calbiochem, Merck, Darmstadt) filtriert, um grobe Partikel abzusondern. Anschließend wurde der Extrakt für 10 min bei 10.000 xg und der daraus resultierende Überstand 60 min lang bei 39.500 xg zentrifugiert. Hieraus ergab sich ein Pellet mit dem mikrosomalen Anteil sowie löslicher cytosolischer Extrakt als Überstand. Die Mikrosomen wurden in 0,5 mL Na-Phosphat-Puffer (20 mM; pH 7,0) mit 20 % Glycerol und 1,4 mM DTE aufgenommen und homogenisiert. Der Überstand wurde einer Ammoniumsulfatfällung von 35 % bis 80 % in zwei Schritten unterzogen. Das Salz wurde vor Verwendung fein gemörsert. Die Menge des hierzu benötigten Ammoniumsulfats für beide Schritte wird wie folgt berechnet (Jaenicke, 1984):

$$\text{Ammoniumsulfatmenge [g]} = V * 1,77 * (S-s) / (3,5-S)$$

S: gewünschte Konzentration an Ammoniumsulfat (als Dezimalbruchteil von 1)

s: vorgelegte Konzentration an Ammoniumsulfat (als Dezimalbruchteil von 1)

Ammoniumsulfat wurde dem Überstand in kleinen Portionen zugegeben und vollständig gelöst. Nach der ersten Fällung zu 35 % wurde der Rohextrakt 20 min lang bei 20.000 xg zentrifugiert, das Pellet verworfen und anschließend der zweite Fällungsschritt zu 80 % Ammoniumsulfat durchgeführt. Diesem folgte eine Zentrifugation bei 30.000 xg für 30 min. Das nach diesem Schritt erhaltene Pellet wurde mittels PD10-Säulen (GE Healthcare, Freiburg) nach Angaben des Herstellers entsalzt und in Na-Phosphat-Puffer (20 mM; pH 7,0) resuspendiert. Die Extrakte wurden bei -85 °C gelagert.

2.2.8 Enzymatische Assays

Enzymassays wurden in Mikrotiterplatten mit dem 96-well-Spektrophotometer Spektra-Max Plus 384 (Molecular Devices, Ismaning) durchgeführt und mit der Software „Soft-Max Pro 4.6“ ausgewertet. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Tests 5 min lang bei konstanten 25 °C in 15-sekündigen Intervallen gemessen und enthielten im endgültigen Volumen 5 % Proteinextrakt. Für Messungen im UV-Wellenlängenbereich wurden speziell durchlässige Platten (Greiner, Frickenhausen) verwendet, während bei den übrigen Wellenlängen 96-well-Platten der Marke Nunc (Brand, Wertheim) eingesetzt wurden. Kontrollmessungen wurden mit Puffer statt Enzymextrakt durchgeführt. Die Aktivität der Enzyme wurde in μkat (= $\mu\text{mol/s}$) ausgedrückt.

2.2.8.1 Substrate der Glutathion S-Transferasen

Glutathion S-Transferasen, hier kurz als GSTs bezeichnet, haben geringe Substratspezifität und können zahlreiche Substrate konjugieren. Die hier gewählten Substrate sind in Tabelle 2.3 dargestellt, wobei die Wellenlänge der jeweiligen Messung in nm angegeben ist und ϵ hier für den molaren Extinktionskoeffizienten mit der Einheit $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ steht. Alle Tests wurden mit Tris/HCl-Puffer (0,1 M; pH 6,4) durchgeführt, lediglich beim Substrat DCNB wurde ein Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 verwendet. Die Konzentration des GSH betrug im fertigen Ansatz 1 mM, ebenso wie die von CDNB und DCNB. NBC und NBOC lagen im Ansatz 0,5 mM vor. Alle Chemikalien wurden in HPLC-Grade-Qualität ($\geq 99\%$, Fluka, Steinheim) verwendet.

Tabelle 2.3: Verwendete Substrate der Glutathion-S-Transferasen.

Substrat	Abkürzung	Wellenlänge	Ext.koeff. ϵ
1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	CDNB	340 nm	$9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
1,2-Dichlor-4-nitrobenzol	DCNB	345 nm	$8,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
4-Nitro-Benzylchlorid	NBC	310 nm	$1,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
4-Nitro-Benzoylchlorid	NBOC	310 nm	$1,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.2.8.2 Fluorodifen

GST-Aktivität für die Konjugation von Fluorodifen (Pestanal-Standard von Fluka, Steinheim) wurde nach der Methode von Scalla und Roulet (2002) gemessen. Dieser Assay

bestimmte die Bildung des 4-Nitrophenol aus Fluorodifen (50 μM) in einem Glycin-NaOH-Puffer (0,1 M; pH 9,5) unter Zusatz von GSH (1 mM) 60 min lang bei einer konstanten Temperatur von 30 °C. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ der Messung bei 400 nm betrug 17,2 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Fluorodifen wird von GSTs zum *S*-(2-Nitro-4-Trifluoromethylphenyl)-Glutathionkonjugat unter gleichzeitiger Entstehung von 4-Nitrophenol umgewandelt (Lamoureaux and Rusness, 1989). Da in zu niedrigen pH-Bereichen das 4-Nitrophenol auch nichtenzymatisch gebildet wird (R. Scalla, persönliche Kommunikation), wobei ein spontaner Zerfall oder die nichtenzymatische Bildung des GSH-Konjugats angenommen werden kann, wurde hier um dies auszuschließen die spezifizierte Methode nach Scalla und Roulet (2002) angewandt.

2.2.8.3 Superoxid-Dismutase, SOD

Aktivität der Superoxid-Dismutase wurde ähnlich dem bei Kröniger (1994) beschriebenen Epinephrin-Test (Adrenalin-Test) bestimmt. Adenochrombildung wurde bei einer Wellenlänge von 480 nm und 25 °C gemessen. Der Ansatz enthielt neben Natriumcarbonat-Puffer (62,5 mM; pH 10,4; mit 125 mM EDTA) 130 U/mL Katalase aus Rinderleber (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) sowie 10 % Epinephrin-Lösung (25 mg (-)-Epinephrin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)) in 30 mL 0,1 N HCL. Die Epinephrin-Lösung wurde so eingestellt, dass sich im nachstehend beschriebenen Adenochromabgleich ein Endpoint-Wert (OD) von circa 0,024 ergab. Die Messung wurde nach Zugabe von Enzymextrakt (10 % des Gesamtvolumens) gestartet. Neben dem aus Puffer und Epinephrin-Lösung bestehenden Null-Blank wurde zusätzlich ein Adenochromabgleich gemessen, welcher den kompletten Ansatz, allerdings statt Enzymextrakt nur ein gleiches Volumen an Wasser enthielt und folglich die Umsatzrate von Epinephrin zu Adenochrom ohne Hemmung durch SOD angab. Durch Zusatz von SOD-haltigem Enzymextrakt in den Testansatz wird diese Umsatzgeschwindigkeit erniedrigt. Die Umsatzraten unter Hemmung wurden vom Adenochromabgleich subtrahiert und stellten die Aktivität der SOD als Hemmung der Adenochrombildung ($\mu\text{mol Adenochrom s}^{-1} \text{mg}^{-1}$) dar. Als Extinktionskoeffizient wurde $\epsilon = 4,02 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ verwendet (Lara-Nuñez et al. 2006).

2.2.8.4 Katalase, CAT

Der Katalase-Test nach Verma und Dubey (2003) wurde in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) mit 200 mM H₂O₂ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) ohne weiteres Substrat durchgeführt. Der Ansatz enthielt im Endvolumen 6,7 % Proteinextrakt. Die Abnahme an H₂O₂ wurde bei einer Wellenlänge von 240 nm gemessen. Gelegentlich entstehende Sauerstoffbläschen wurden durch dreisekündiges Rütteln zwischen den Messungen entfernt. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ betrug 0,036 mM⁻¹ cm⁻¹. Es wurde neben der mikrosomalen Umsatzrate auch die Restaktivität der in das Cytosol übergetretenen Katalase ermittelt und diese den mikrosomalen Werten eingegliedert. Bei jeder Enzymbereinigung kann es aufgrund der Fragilität der Mikrosomen zu Membranfraktur kommen. Selbst bei schonendster Aufarbeitung tritt in der Folge immer in gewissem Maße ein Austritt der Katalase ins Cytosol auf (van Roermund et al., 1998).

2.2.8.5 Peroxidase, POX

Peroxidase-Aktivität wurde in Anlehnung an die Methode von Nepovim et al. (2004) gemessen. Der Test enthielt neben Tris/HCl-Puffer (50 mM; pH 6,0) 68 μ M Guajacol (Fluka, Steinheim) sowie 0,18 mM H₂O₂. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ für die Entstehung von Tetraguajacol betrug 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹ bei einer Messwellenlänge von 420 nm.

2.2.8.6 Glutathion-Peroxidase, GPOX

Der GPOX-Test, modifiziert nach Dixon et al. (1998), enthielt neben Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0) mit 2,5 mM Na₄EDTA außerdem 10 mM GSH, 6 U/mL Glutathionreduktase aus Bäckerhefe, 250 μ M NADPH (alles Fluka, Steinheim) sowie 1 mM H₂O₂ bei einem Anteil des Proteinextrakts am Gesamtvolumen von 10 %. Bestimmt wurde hierbei der NADPH-Verbrauch. Die Messung wurde bei 340 nm durchgeführt und mit $\epsilon = 6,22$ mM⁻¹ cm⁻¹ ausgewertet.

2.2.8.7 Ascorbatperoxidase, APOX

Vanacker et al. (1998) beschrieben die Messung der Aktivität der APOX unter Verwendung von 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0). Der Test enthielt weiterhin 1 mM H₂O₂

sowie 250 μM Ascorbat bei einem Proteinanteil von 10 %. Der Extinktionskoeffizient bei 290 nm betrug $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.8.8 Monodehydroascorbatreduktase, MDHAR

Die Aktivität des Enzyms Monodehydroascorbatreduktase wurde gemäß Vanacker et al. (1998) bestimmt. Der Testansatz bestand aus 100 mM Hepes/KOH-Puffer (pH 7,6) mit 25 μM NADPH sowie 2,5 mM Ascorbat und 0,4 U/mL Ascorbatoxidase aus *Cucurbita pepo* (AppliChem, Darmstadt), welche in gesättigter Ammoniumsulfatlösung gelagert wurde (Maritano et al. 1996). Der Test enthielt 10 Volumenprozent Protein und wurde bei 340 nm gemessen ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.2.8.9 Dehydroascorbatreduktase, DHAR

DHAR wurde ebenfalls nach einer Methode von Vanacker et al. (1998) gemessen. Neben 50 mM Hepes/KOH-Puffer (pH 7,0) enthielt der Ansatz 0,1 mM EDTA sowie 2,5 mM GSH und 0,2 mM Dehydroascorbat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Der Extinktionskoeffizient bei 265 nm war $\epsilon = 7,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.8.10 Glutathionreduktase, GR

Die Aktivität der GR wurde in Anlehnung an die Methode von Zhang und Kirkham (1996) bestimmt. Als Puffer wurde 100 mM Tris/HCl (pH 7,5) mit 100 μM EDTA verwendet. Neben 1 mM GSSG enthielt der Test im Ansatz 2 mM NADPH (alles von Fluka, Steinheim). Der Extinktionskoeffizient bei 340 nm betrug $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.8.11 Quantifizierung der Proteingehalte

Die Bestimmung der Proteingehalte der Enzymextrakte wurden nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 (Fluka, Steinheim), hier in zehnfacher Verdünnung eingesetzt, ändert sein Absorptionsmaximum unter Anlagerung von Proteinen von 465 nm auf 595 nm. Die Messung wurde mit BSA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) als Referenz kalibriert und die Proteingehalte in mg/mL Extrakt angegeben.

2.2.9 2D-PAGE

2.2.9.1 Herstellung der Gele

Zur Herstellung eines Polyacrylamid-Gels der Dimension 150 x160 x1 mm wurden 18 mL dest. H₂O mit 12 mL Acrylamid-Bis-37,5:1-Lösung (40 % w/v) und 10 mL Gelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8 mit 0,04 % (w/v) SDS) vermischt und 15 min entgast. Anschließend wurden 400 µL APS (10 % w/v) sowie 20 µL TEMED zum Ansatz pipettiert. Die Lösung wurde in eine SE 600 Ruby Gel Caster Gelgießvorrichtung (GE Healthcare) gefüllt und anschließend mit Isopropanol (70 % v/v) überschichtet. Die Lagerung der Gele erfolgte bei 4 °C für maximal 5 Tage.

2.2.9.2 Erste Dimension

Alle Schritte der ersten Dimension der 2D-Gel Elektrophorese erfolgten unter Verwendung des IPGphor-Systems und der zugehörigen Komponenten (GE Healthcare, Freiburg). Die erste Dimension der 2D-Elektrophorese wurde mittels des Gerätes „IPGphor II“ durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 20 µg Protein aus dem cytosolischen Extrakt mit Rehydratationspuffer für Gelstrips im pH-Bereich 4-7 (siehe Tabelle 2.4) versetzt. Die Lösung wurde in Ettan IPGphor „strip holders“ aus beschichteter Keramik mit Platinelektroden überführt. Ein Gelstreifen (13 cm, pH 4-7, Immobiline Dry Strip Gels) wurde blasenfrei auf die Flüssigkeit appliziert, anschließend mit 1 mL IPG Cover Fluid überschichtet und verschlossen. Die so vorbereiteten „strip holders“ wurden nun auf der nivellierten IPGphor II parallel angeordnet und anschließend die isoelektrische Fokussierung (IEF) gestartet. Diese begann mit einer zwölfstündigen Rehydratationsphase unter geringem Stromfluss (10 V, 1-2 µA), danach 500 V (1h), 1000 V (1h) und 8000 V (4h). Eine Stromstärke von 50 µA pro Gelstreifen durfte hierbei nicht überschritten werden. Auf angemessene Ionenstärke bzw. möglichst niedrigen Salzgehalt der Probe war zu achten und unter Umständen eine Entsalzung (Zeba Desalt Spin Columns, Pierce, USA) durchzuführen. Auch die gründliche Reinigung der „strip holders“ nach Verwendung stellte eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche IEF dar. Hartnäckig anhaftende Proteinreste konnten mit heißer (< 95 °C) SDS-Lösung (1 % w/v) entfernt werden, ansonsten wurden die „strip holders“ nach dem Spülen mit dest. H₂O unter Verwendung eines speziell für Keramik geeigneten Spülmittels (IPGphor strip holder cleaning solution) mit Hilfe einer weichen Zahnbürste

sorgfältig gereinigt, in dest. H₂O gespült und hernach getrocknet. Herkömmliches Spülmittel greift die Beschichtung der „strip holders“ an und darf keinesfalls verwendet werden.

Tabelle 2.4: Rehydrationspuffer für Immobiline DryStrips, pH-Bereich 4-7.

9 M Harnstoff	2 % CHAPS
0,15 % DTE oder DTT	50 µL 2,5 mM Na ₄ -EDTA
50 µL 2,5 mM EGTA	200 µL IPG-Puffer (pH 4-7)
50 µL Bromphenolblau (0,5 % w/v)	
ad 10 mL H ₂ O	

2.2.9.3 Zweite Dimension, Färbung und Auswertung

Nach erfolgreicher IEF wurde je ein Immobiline Gelstreifen mit 5 mL Equilibrierlösung B1 (Tabelle 2.5) unter leichter Bewegung 15 min inkubiert. Der Streifen wurde danach in Lösung B2 überführt und ebenfalls 15 min equilibriert.

Nach der Equilibrierphase wurden die Streifen auf das Polyacrylamidgel appliziert. Ein kleines Stück Filterpapier am rechten Rand des Geles wurde mit 3 µL „SM0661“ Marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) beladen. Auf 60 °C temperierte Agarose (0,5 % w/v in 1x Laufpuffer (1 g SDS, 3 g Tris, 14,4 g Glycin ad 1 L dest. H₂O)) wurde zur Überschichtung der auf dem Gel aufliegenden Streifen verwendet. Die so vorbereiteten Gele wurden in die mit gekühltem Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammern (SE 600 Ruby Cooled Vertical Unit) eingebracht und der Elektrophorese-Prozess bei 300 V und 300 mA gestartet. Die Kühlung während des dreistündigen Laufes erfolgte durch ein mit Kühlakkus bestücktes Wasserreservoir und eine Membranpumpe über die Kühlrippen der SE 600 Ruby-Einheit.

Nach diesem Prozess wurden die Gele aus den Glaskammern entnommen, 1 h lang in 10 % MeOH mit 7 % Eisessig (v/v) fixiert und anschließend mit 200 mL „Roti-Red“

Tabelle 2.5: Equilibrierlösungen für Immobiline Dry Strips

Stammlösung A	Lösung B1	Lösung B2
2 mL 1 M Tris/HCl pH 6,8 14,4 g Harnstoff 12 mL Glycerin (80 % v/v) 4 mL SDS (20 % w/v) ad 40 mL H ₂ O	20 mL Stammlösung A 0,4 g DTE	20 mL Stammlösung A 0,5 g Iodacetamid 70 µL Bromphenolblau (0,5 % w/v)

Fluoreszenzfärbelösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) pro Gel nach den Angaben des Herstellers gefärbt. Die Dokumentation der Gele erfolgte im TIF-Format auf einem Fuji FLA 3000 Scanner (Genomanalysezentrum des Helmholtz Zentrum München) bei einer Anregungswellenlänge von 473 nm und einem 580 nm-Filter mit 100 µm Pixelgröße, Sensitivität 1000 und 16 bits per Pixel. Die TIF-Dateien der 2D-Gele wurden schließlich mit der Definiens-„Proteom-Weaver“-Software (BioRad, München) ausgewertet. Von jeder einzelnen Proteinprobe wurden dabei insgesamt vier bis sechs Gele angefertigt, aus denen ein sogenanntes „average gel“ berechnet wurde, in welches nur solche Spots aufgenommen wurden, die in mehr als der Hälfte der Gele nachweisbar waren.

2.2.10 Bestimmung der Thiolgehalte

Die Gehalte an Cystein, γ -Glutamylcystein, Glutathion, Homoglutathion und Glutathiondisulfid (GSSG) in pflanzlichen Extrakten wurden mit dem Waters AccQ•Fluor™ Reagent Kit in Anlehnung an die bei Cohen und Michaud (1993) beschriebene Methode ermittelt. Das AccQ-Derivatisierungsreagenz 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-Carbamat reagiert mit Aminosäuren (siehe Abbildung 2.5) schnell unter Bildung eines stabilen Derivats, welches bei 250 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 395 nm detektiert werden kann. Überschüssiges Reagenz wird in einem zweiten, langsameren Reaktionsschritt unter Entstehung von 6-Aminoquinolin (AMQ), N-Hydroxysuccinimid und CO₂ hydrolysiert, so dass nach 1 min keine weitere Derivatisierung mehr stattfinden kann (Cohen und Michaud, 1993). Erwärmung auf 55 °C wird empfohlen, um labile Derivate, beispielsweise von Tyrosin, in die stabile Form zu konvertieren, und wurde hier beibehalten. AccQ•Fluor-Reagenz wird aufgrund der Reaktivität mit Wasser bei Raumtemperatur abgedunkelt unter konstantem Vakuum gelagert, da normale Luftfeuchtigkeit, wie in dieser Arbeit ermittelt wurde, bereits ausreichte, um den Abbau der Substanz herbeizuführen.

Die Extraktion der Thiole aus Pflanzenmaterial erfolgte unter Verwendung einer TCA-Lösung (5 % w/v), welche zusätzlich BPDS (1 mM) enthielt, um Oxidation des GSH vorzubeugen (Komatsu und Obata 2003). Fein gemahlene tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wurde im Verhältnis 1:10 mit TCA/BPDS-Lösung versetzt und bei 4 °C sorgfältig homogenisiert. Anschließend wurden die Suspensionen bei 48.000 x g und 4°C 20 min lang zentrifugiert. Die Überstände wurden entnommen und durch sterile Membranfilter (0,22

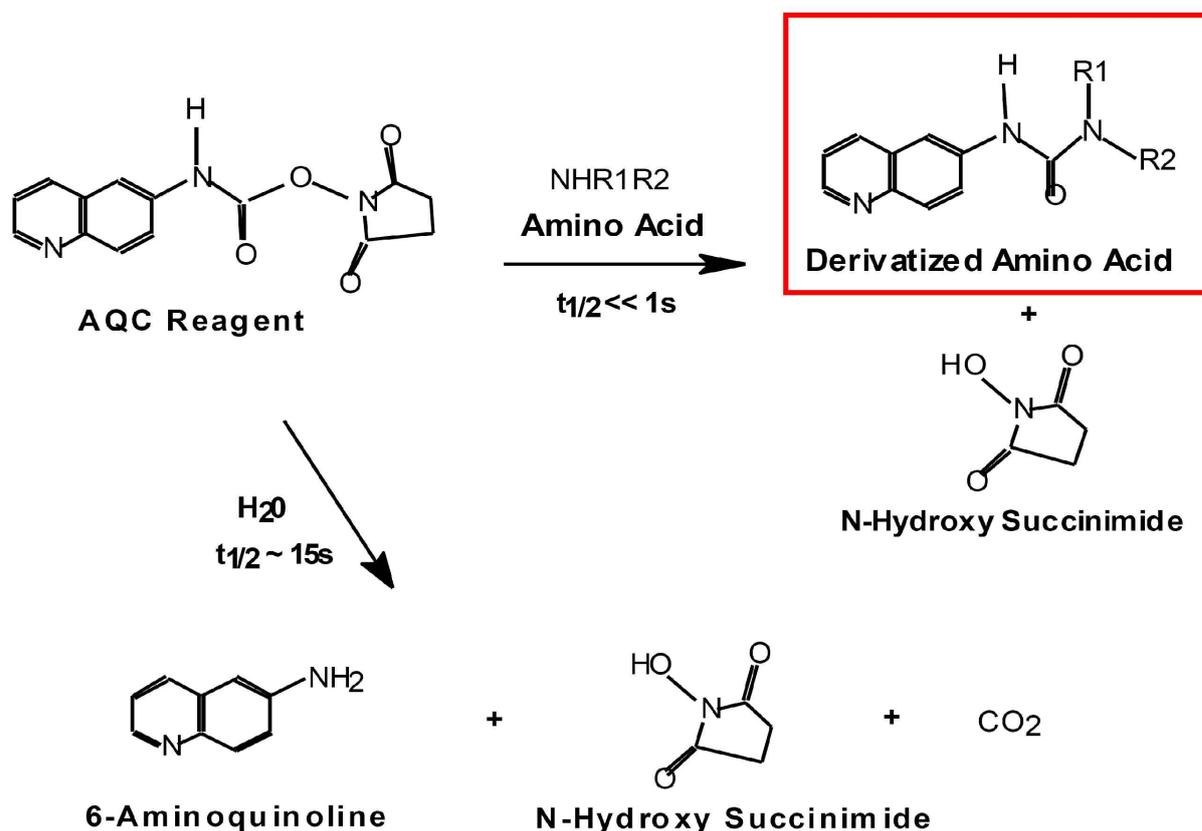


Abbildung 2.5: Reaktionsschema des AccQ•Tag™ mit Aminosäuren. © 2007 Waters Corporation

μm , Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefiltert. Danach wurde die Probe bis zur Verwendung bei $-85\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. $10\ \mu\text{L}$ der Probe wurden mit $70\ \mu\text{L}$ $200\ \text{mM}$ Boratpuffer ($\text{pH}\ 8,8$) versetzt, bevor $20\ \mu\text{L}$ der in hochreinem ACN gelösten AccQ•Fluor-Reagenz ($10\ \text{mM}$) zugegeben wurden. Nach $1\ \text{min}$ Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben bei $55\text{ }^\circ\text{C}$ im Sandbad $10\ \text{min}$ lang erhitzt. Anschließend wurde durch die Zugabe von $8\ \mu\text{L}$ TCA ($5\ \%$ w/v) der pH-Wert der Probe auf circa $\text{pH}\ 3,2$ gesenkt. Jede Messung wurde mit mindestens fünf Punkten zwischen $10\ \mu\text{M}$ und $100\ \mu\text{M}$ Thiol kalibriert, siehe Beispielgrafik 2.6. Stammlösungen wurden mit TCA/BPDS-Lösung angesetzt und anschließend wie oben beschrieben mit AccQ•Fluor-Reagenz derivatisiert.

Die Thiolgehalte der Pflanzen wurden an einer Acquity Ultra Pressure Liquid Chromatography (UPLC) (Waters, Milford, USA) unter Verwendung einer BEH C18-Säule von Waters mit einem Partikeldurchmesser von $1,7\ \mu\text{m}$ und der Säulenabmessung $100 \times 2,1\ \text{mm}$ analysiert. Der Säulenofen wurde auf $35\text{ }^\circ\text{C}$ temperiert, der Autosampler auf $27\text{ }^\circ\text{C}$. Bei einer Flussrate von $0,6\ \text{mL}/\text{min}$ und rund $750\ \text{bar}$ wurde ein über „partial loop with needle overfill“ injiziertes Volumen von $5\ \mu\text{L}$ Probe gemessen. Als polares Laufmittel wurde $0,2\ \%$ (v/v) AcOH (pH ca. $3,1$) verwendet. Der lineare Gradient begann mit $0\ \%$ ACN

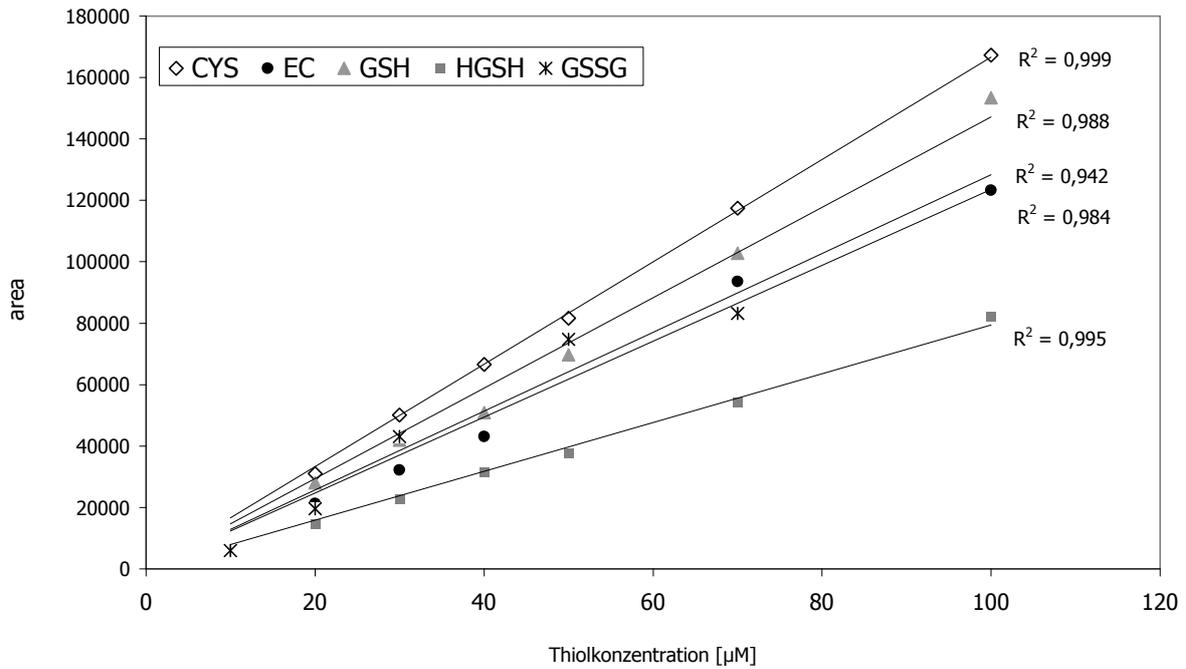


Abbildung 2.6: Beispiel für die Kalibrierung von Thiolgehalten an der UPLC.

(JT Baker) und stieg in 5 min auf 10 % ACN . Anschließend wurde der Lauf nach 1 min Spülen mit der wässrigen Phase beendet. Da zum Zeitpunkt des Experimentes noch kein adäquater Fluoreszenzdetektor mit ausreichender Auflösung für das UPLC-System verfügbar war, wurden die AccQ-derivatisierten Thiole bei 260 nm mit einem 2996 PDA-Detektor analysiert.

2.2.11 Statistische Analyse

Alle Messungen der enzymatischen Aktivitäten, der Thiolkonzentrationen sowie der AHL-Bestimmung an der UPLC wurden mindestens in Triplikaten mit Pflanzenmaterial bzw. Medien verschiedener unabhängiger Anzuchtdurchläufe unter kontrolliert gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt. Mittelwerte wurden mit der Standardabweichung aus der Stichprobe versehen.

Kenngrößen wie Frischgewicht, Blattfläche, Pigmentgehalte, Wurzelparameter etc. wurden aus unterschiedlich großen Probenumfängen von $n=17-76$ ermittelt und mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test (KS-Test) (Kirkman, 1996) sowie dem Test nach Shapiro und Wilk (1965) auf Normal- bzw. Lognormalverteilung geprüft. Zur Bestimmung der Signifikanz der Effekte einer einzelnen AHL-Behandlung gegenüber der Kontrolle wurde bei normalverteilten oder großen Datensätzen ($n>50$) der t-Test nach Student für ungepaarte

Gruppen und der KS-Test angewandt. Bei nicht normalverteilten ungepaarten Daten kam der Mann-Whitney U-Test zum Einsatz. Bei allen Tests wurde eine errechnete Überschreitungswahrscheinlichkeit p von $\leq 5\%$ bzw. $\leq 0,05$ als Signifikanz eines Effektes gewertet und mit dem Sternsymbol * gekennzeichnet. Boxplots wurden neben dem Median (durchgängige Linie) mit dem Mittelwert (gestrichelte Ausführung) sowie den 5./95. Perzentilen dargestellt. Zur Analyse und Darstellung der Daten wurden die Programme Excel (Microsoft), G*Power 3 (Faul et al., 2007), WinSTAT für Excel (R. Fitch Software, 2007) und SigmaPlot (Systat Software, Inc.), Version 10.0, herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 AHL-Dynamik im axenischen System

3.1.1 Abiotisch bedingte AHL-Abnahme

Mögliche Einflussfaktoren auf AHL im axenischen System stellen abiotische Prozesse wie photokatalysierte Oxidation oder pH-abhängige Hydrolyse dar (Yates et al., 2002). Auch Adsorption der AHLs an die Oberfläche der Glasperlen kann die Konzentration dieser Stoffe im Medium beeinflussen. Zur Klärung dieser Einflussfaktoren wurde das sterile System wie im Pflanzenexperiment vorbereitet, jedoch keine Pflanzen inkubiert, und die Gefäße den experimentellen Bedingungen in den jeweiligen Klimakammern (siehe Seite 51) ausgesetzt. Die abiotischen Faktoren Oxidation und Hydrolyse wurden untersucht, indem das axenische System ohne Pflanzen und Glasperlen angesetzt wurde. Der Einfluss von Adsorption wurde in einem separaten Versuch geklärt, bei dem die pflanzenfreien Gefäße mit Glasperlen gefüllt waren. Am Ende der jeweiligen Inkubationszeiten wurden die wässrigen Medien entnommen und mittels UPLC die verbliebenen Konzentrationen an AHL untersucht. Die pH-Werte der Proben wurden vor und nach der Inkubation geprüft und lagen stets unter pH 6. Typische UPLC-Chromatogramme aus diesem Experiment sind auf Seite 76 am Beispiel von C8-HSL gezeigt.

In Tabelle 3.1 wird deutlich, dass im Mittel weniger als 10 % der Ausgangskonzentration durch die abiotischen Prozesse der Oxidation und Hydrolyse verloren gegangen waren, wobei dieser Wert noch im Bereich der zulässigen relativen Standardabweichung der Quantifizierung (Horwitz et al., 1980) liegt. Der Einfluss der beiden letztgenannten Prozesse auf die AHL-Dynamik in diesem Versuchsdesign ist daher eher vernachlässigbar. Dies trifft auf den Prozess der Adsorption nicht zu. Tabelle 3.1 zeigt, dass die Konzentrationen an AHL bei Anwesenheit von Glasperlen nach der Inkubationszeit niedriger waren als ohne Glasperlen, mit tendenziell stärkeren Abnahmen unter den Wuchsbedingungen

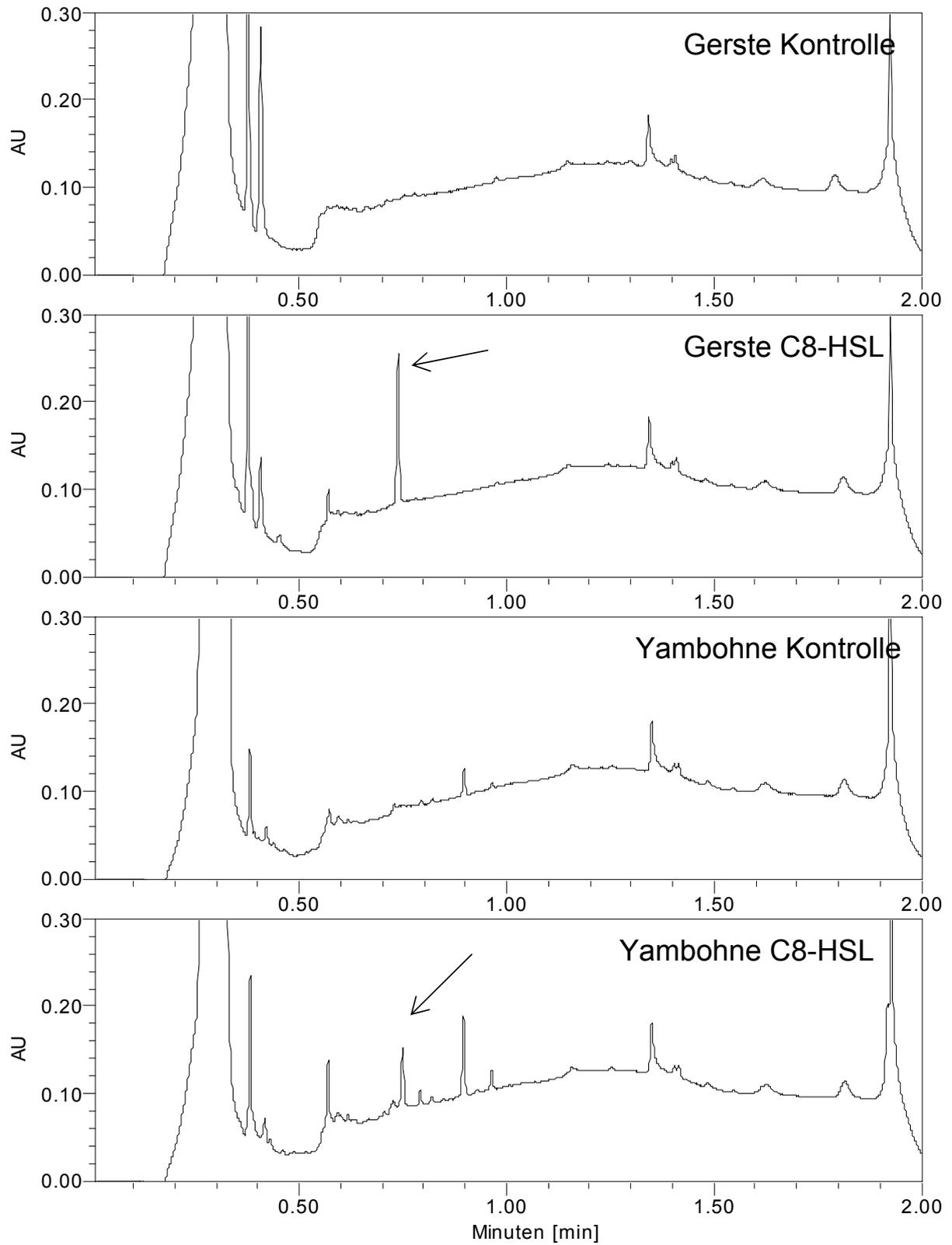


Abbildung 3.1: Beispiel-Chromatogramme für den Nachweis von C8-HSL im Medium aus der Gersten- und Yambohnenanzucht. Der Pfeil markiert den jeweiligen zu C8-HSL korrespondierenden Peak.

Tabelle 3.1: AHL-Stabilität im axenischen System ohne Pflanzen. Der Stern (*) kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zu Tag 0.

	C6-HSL %	C8-HSL %	C10-HSL %
Ohne Glasperlen (15 °C)			
Tag 0	100 ± 4,3	100 ± 1,6	100 ± 2,2
Tag 8	101,4 ± 2,3	98,2 ± 2,9	98,5 ± 2,3
Tag 17	98,3 ± 7	91,2 ± 7,5 *	91,5 ± 15
15 °C mit Glasperlen			
Tag 0	100 ± 5,1	100 ± 6,1	100 ± 11,2
Tag 8	91,3 ± 12,6	94,9 ± 4	72,7 ± 14,6 *
Tag 17	90 ± 3,7	92,7 ± 3,4	72,2 ± 5,9 *
20 °C mit Glasperlen			
Tag 0	100 ± 0,6	100 ± 2,9	100 ± 4,2
Tag 8	87,1 ± 0,5 *	85,3 ± 5 *	75,6 ± 6,3 *
Tag 21	84,6 ± 0,9 *	84,1 ± 0,9 *	73,3 ± 7,5 *

für Yambohnen bei 20 °C und 21 statt 17 Tagen, was sich mit Berichten zu temperaturabhängigen Stabilität von AHLs deckt (Yates et al., 2002; Delalande et al., 2005; Atkinson et al., 2006). Yambohnen als tropische Pflanzen wiesen einen höheren Temperaturbedarf auf als Gersten und benötigten vier Tage mehr Zeit, um einen zu Gerste vergleichbaren Entwicklungsstand zu erreichen. Während die Komponenten C6- und C8-HSL weniger stark von Adsorptionsprozessen beeinträchtigt waren, konnte eine starke Reduktion der Konzentration von C10-HSL unter beiden Temperaturbedingungen um rund 25-30 % beobachtet werden. Die Unterschiede zu den Proben von Tag 0 waren bei C10-HSL in Glasperlen stets bei $p \leq 0,05$ signifikant. Dieser Rückgang der AHL-Konzentration war mit der Adsorption des C10-HSL an der Oberfläche der Glasperlen verbunden. Die Beobachtung, dass unter den Konditionen zur Anzucht von Yambohnen bei 20 °C sichtlich höhere Verluste an C6- und C8-HSL im Vergleich zu den bei 15 °C gewonnenen Proben auftraten, jedoch die Werte für C10-HSL unter Beachtung der Standardabweichung bei beiden Anzuchtbedingungen in einem ähnlichen Bereich (72-75 %) angesiedelt waren, untermauert die These, dass Adsorption bei C10-HSL wohl den bedeutendsten abiotischen Prozess im axenischen System darstellte. In einem zeitabhängigen Adsorptionsexperiment (Abbildung 3.2) konnte dargelegt werden, dass der Vorgang der Adsorption an Glasperlen sehr schnell abläuft. Die Konzentration der AHLs im Medium änderte sich ohne Glasperlen über einen Zeitraum von rund 17,5 Stunden nicht wesentlich. Unter Verwendung der Glasperlen hingegen zeigte sich, dass die abiotische Adsorption aller getesteten AHLs

im axenischen System schon nach rund 130 min weitgehend abgeschlossen war. Die in Tabelle 3.1 beschriebenen Parameter wurden somit bestätigt: während die Verluste durch Adsorption nach etwa 1000 min bei C6- und C8-HSL im Bereich weniger Prozent angesiedelt waren, betrug die Abnahme an C10-HSL nach dieser Zeit schon rund 20 %.

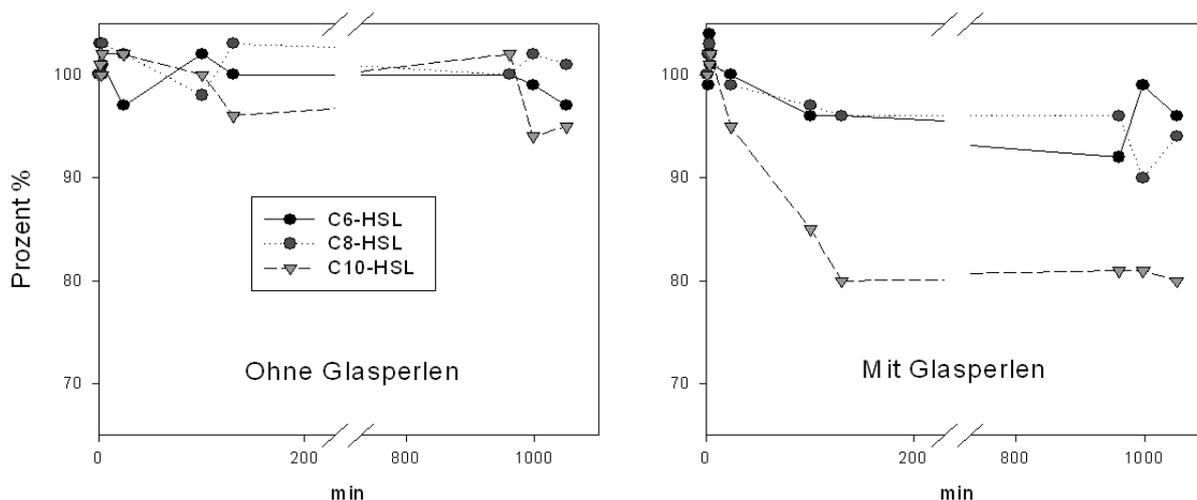


Abbildung 3.2: Zeitablauf der abiotischen Adsorption

Insgesamt kann gefolgert werden, dass die Stabilität der AHLs bezüglich abiotischer Faktoren in diesen Experimenten ausreichend war. Dies liegt auch in der Verwendung eines rein mineralischen Mediums ohne organische Bestandteile und einem günstigen pH-Wert ($5,7 \pm 0,1$) begründet. Die Neigung der AHLs zu alkalischer Hydrolyse, auch als chemische Lactonolyse bezeichnet (Byers et al., 2002; Frommberger, 2005; Wang und Leadbetter, 2005), wird, wie hier gezeigt werden konnte, unter den experimentellen Bedingungen nicht erheblich gefördert.

3.1.2 Pflanzenbedingte AHL-Abnahme

Gersten- und Yambohnepflanzen wurden nach der Anzucht vorsichtig aus den Glasperlen entfernt und das Mineralmedium zur Untersuchung an der UPLC herangezogen. Hierbei wurden die Konzentrationen der nach dem Pflanzenwachstum im Medium verbliebenen AHLs in Prozentanteilen vom Ausgangswert bestimmt. Diese sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Klar zu erkennen sind der Einfluss der Pflanzenart und der Länge der Acylketten der AHLs. Bei Yambohne wurden nach dem Aufwuchs der Pflanzen deutlich geringere Restkonzentrationen an AHL detektiert im Vergleich zur Gerste, wobei dies auch zu einem gewissen Teil durch die $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ höhere Anzuchttemperatur und die vier Tage

Tabelle 3.2: Abnahme der AHL-Konzentration im Medium unter Anwesenheit von Pflanzen.

	C6-HSL %	C8-HSL %	C10-HSL %
Gerste Tag 0	100 ± 0,64	100 ± 4,32	100 ± 11,15
Gerste Tag 17	72,51 ± 3,12	66,06 ± 5,10	37,24 ± 6,14
Yambohne Tag 0	100 ± 3,43	100 ± 9,56	100 ± 11,51
Yambohne Tag 21	36,38 ± 3,67	17,38 ± 2,80	1,63 ± 0,17

längere Dauer verursacht ist. Ebenso deutlich zeigt sich, dass AHLs mit steigender Länge der Seitenketten stärkere Konzentrationsrückgänge erfahren. In Abbildung 3.3 wird dargestellt, welchen Anteil die Restwerte an AHL sowie die Einflüsse abiotischer Prozesse an der ursprünglichen AHL-Konzentration einnehmen. Abzüglich dieser Werte ergibt sich der Anteil, welchen die Pflanzen zur Abnahme des AHLs beigetragen haben müssen. Zur Veranschaulichung aller Faktoren konzipiert, basieren die Kreisdiagramme auf den Mittelwerten und enthalten keine Standardabweichungen, diese sind jedoch den jeweiligen Tabellen (3.1 und 3.2) zu entnehmen. Die Messung bezog sich ausschließlich auf die Lactonkomponenten, das heißt, dass AHLs, welche in ihre Homoserin-Formen überführt worden waren, in der Messung nicht berücksichtigt wurden. Folglich handelt es sich bei den hier dargestellten Beobachtungen nicht nur um reine Verluste an AHLs, sondern zu gewissem Teil auch um die Abnahme der Ausgangskomponente in der Lactonform zugunsten verschiedener Derivate, wobei Homoserine wahrscheinlich die anteilmäßig bedeutendsten darstellen. Deutlich ist zu erkennen, dass Yambohnen erheblich höhere Abnahmen der zugegebenen AHLs verursachten. Während in den Gerstenmedien nicht mehr als 17 % bis 35 % der Ausgangskonzentration durch die Anwesenheit der Pflanzen umgesetzt wurden, so sind es bei der Yambohne zwischen 49 % und 71 %. Als Ursache dieser Diskrepanz zwischen den beiden Versuchspflanzen können Lactonasen in Betracht gezogen werden. Wie bereits beschrieben (Delalande et al., 2005), unterscheiden sich einige Leguminosen dadurch von monokotyledonen Pflanzen wie Gerste, dass sie zur Öffnung des Lactonringes der AHLs durch Lactonasen befähigt sind und somit die bakteriellen Signale in die respektiven Homoserine umwandeln. Ergänzende Untersuchungen (siehe Kapitel 3.1.5.2) unterstützen die Vermutung, dass der Abbau der AHLs im Medium der Yambohne von Lactonase bedingt ist. Alternative enzymatische Einflussfaktoren könnten neben der Lactonase von anderen Enzymen wie Aminopeptidasen (Acylasen) oder Dehydrogenasen ausgehen. Auch die Wirkung der β -Oxidation könnte zu Veränderungen der AHLs durch Reduktion der Acyl-Seitenketten führen. Es bleibt je-

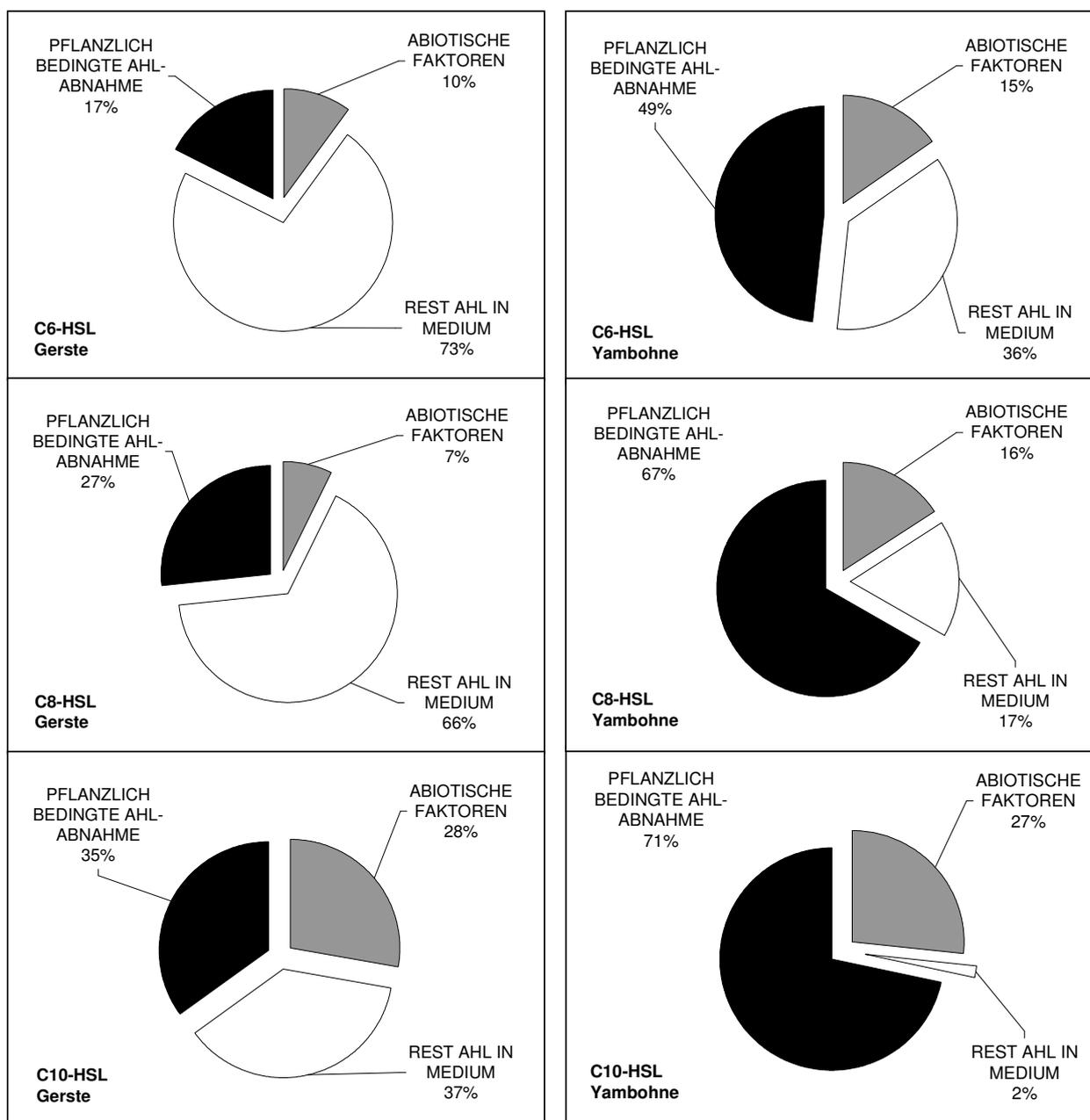


Abbildung 3.3: Einfluss abiotischer und pflanzlicher Faktoren auf die AHL-Konzentration im Medium.

doch fraglich, in welchem Maße diese Prozesse tatsächlich im Medium außerhalb des Pflanzengewebes stattfinden können. Hier scheinen Lactonasen den maßgeblichen Einflussfaktor darzustellen.

Daneben sind zahlreiche weitere Einflussfaktoren auf AHL im Medium denkbar. Besonders interessant erscheint die Möglichkeit, dass AHLs in die Pflanze aufgenommen und verteilt werden, was im Folgenden in Kapitel 3.1.4 untersucht wurde. Weiterhin könnten die bakteriellen Signalstoffe von vergleichsweise passiven Prozessen wie Adsorption an Wurzeloberflächen oder Zellwänden beeinflusst sein. In einem Nebenexperiment unter Verwendung von Spezialgläsern (siehe Seite 59 im Methodenteil) wurden zum einen in

der direkten Nähe zu Wurzeln und zum anderen am Rand des Glases in einiger Entfernung zu den Wurzeln Proben entnommen. Der Versuch wurde nur einmal durchgeführt, weshalb keine Standardabweichungen vorliegen. Die Ergebnisse, dargestellt in Tabelle 3.3, deuten auf das Stattfinden von Adsorptions- und Abbauprozessen hin, da die Konzentrationen in der Nähe zur Wurzel stets geringer waren als zum Rand des Glases hin, wobei C10-HSL offensichtlich erneut stärker betroffen war als die beiden kurzkettigeren AHLs. Die Konzentration des C6-HSL fand sich sowohl bei Gerste wie bei Yambohne in der Nähe zur Wurzel um rund 4 % im Vergleich zur Probe aus der Distanz zur Wurzel erniedrigt, während die Absenkung der Konzentration bei C8-HSL circa 9 % bei Gerste und 26 % bei Yambohne betrug. In der Nähe zur Wurzel der Gerste beträgt die Verminderung an C10-HSL etwa 44 %. Die Konzentration des C10-HSL an der Wurzel der Yambohne unterschritt das Detektionslimit der Methode, weshalb hier kein Wert angegeben werden konnte.

Tabelle 3.3: Konzentration von AHL absolut in [μM] in Distanz (D) am Rand des Glasbehältnisses und in der direkten Nähe (N) zur Wurzel.

	C6 D	C6 N	C8 D	C8 N	C10 D	C10 N
Gerste	7,35	7,09	7,22	6,61	5,81	3,28
Yambohne	3,04	2,91	1,33	0,98	0,11	n.d.

Desweiteren wurden Experimente zur Erfassung der Kinetik der AHL-Abnahme im System mit radioaktiv markiertem AHL am Institut für Experimentelle Botanik an der Tschechischen Akademie der Wissenschaften in Prag durchgeführt. Als Versuchskomponenten wurden C8- und C10-HSL ausgewählt, da aufgrund der vorhergegangenen Experimente bekannt war, dass der vergleichsweise kleine strukturelle Unterschied einer C2-Gruppe erhebliche Veränderungen der Eigenschaften wie beispielsweise bei der Adsorptionsneigung zur Folge hatte und dennoch beide Verbindungen ausreichend große Ähnlichkeit in ihrer Zusammensetzung aufwiesen, um Vergleiche zu erlauben. Als Versuchspflanze für diese Experimente wurde Gerste gewählt, da aus den vorangegangenen Versuchen zur AHL-Abnahme deutlich geworden war, dass Yambohnen einen erheblich stärkeren Rückgang der bakteriellen Signale in ihrer ursprünglichen Form verursachen als Gerste, also mehr AHLs metabolisieren. Aus diesem Grunde hätte eine Untersuchung der AHL-Aufnahme in die Pflanze, welche das primäre Ziel des Experiments darstellte, mit radioaktivem AHL bei Yambohne falsch positiven Treffern geführt, da im Gegensatz zur Unter-

suchung an UPLC und FTICR-MS bei dieser Form der Erprobung keine Unterscheidung zwischen AHL und deren Ab- und Umbauprodukten jedweder Struktur möglich gewesen wäre. Signale von Derivaten und Abbauprodukten mit radioaktiver Markierung können im $[^3\text{H}]$ AHL-Experiment nicht von denen der ursprünglichen AHLs unterschieden werden, was eine Aussage über Aufnahme und Translokation bei Yambohne erheblich erschwert hätte. Die Daten der folgenden Experimente sind daher nur für Gerste verfügbar.

In Grafik 3.4 ist der zeitliche Verlauf der Abnahme von AHLs im Medium unter dem Einfluss der Gerste dargestellt. Da zum eigentlichen Endpunkt des Versuches (408 Stunden bzw. 17 Tage) keine Probenahme möglich war, musste diese am darauf folgenden Tag durchgeführt werden. Der Verlauf des Rückgangs an AHL im Medium erscheint an-

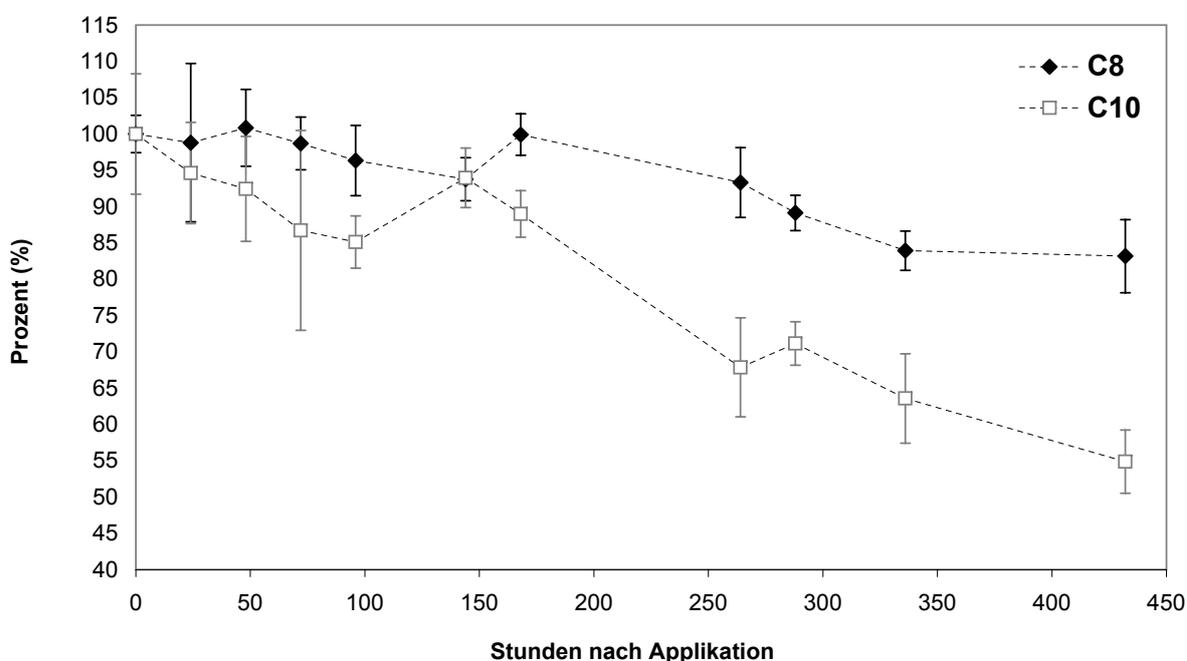


Abbildung 3.4: Abnahme des Signales aus tritiiertem AHL im Medium der Gerste im Zeitverlauf.

nähernd einem linearen Trend zu folgen. Die Regressionskoeffizienten bezüglich eines linearen Zusammenhangs betragen $R^2 = 0,9$ bei C8-HSL und $R^2 = 0,85$ bei C10-HSL und liegen somit höher als die der verglichenen Trendlinien. Allerdings erweist es sich in diesem speziellen Experiment als schwierig, den Verlauf des AHL-Rückgangs im Medium in mathematischem Zusammenhang zu charakterisieren, da verschiedene Einflussfaktoren unabhängig voneinander auf dessen Verlauf einwirken. Dies wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biomathematik und Biometrie des Helmholtz Zentrum München unter Verwendung eines mathematischen Modelles (Kapitel 3.1.4.4) ausführlich bearbeitet.

Grundsätzlich zeigt sich auch hier der Trend zur stärkeren Abnahme des C10-HSL im Medium im Vergleich zu C8-HSL, allerdings liegen die nach der Anzuchtdauer verbliebenen AHL-Konzentrationen (interpoliert auf den Zeitpunkt 408 Stunden) mit rund 84 % bei C8- und 58 % bei C10-HSL circa 20 % über den mit UPLC ermittelten AHL-Restwerten im Medium der Gerste (siehe Abbildung 3.3), was den Schluss zulässt, dass es sich bei diesen 20 % um radioaktiv markierte Ab- und Umbauprodukte der AHLs handelt, die im Medium verblieben sind. Nach Abzug der abiotischen Verluste, welche wie in Tabelle 3.1 beschrieben etwa 7 % bei C8- und 28 % bei C10-HSL ausmachen, und des mit [³H]AHL ermittelten „Restsignals“ vom Ausgangswert 100 % erscheint es, dass demnach rund 9 % des applizierten C8-HSL und etwa 14 % des C10-HSL tatsächlich aus dem Medium *entfernt* worden sein könnten, da sich diese Differenz nur durch die Pflanze erklären lässt. Der höhere Wert des C10-HSL scheint unter Berücksichtigung der lipophilen Eigenschaften plausibel, beispielsweise aufgrund stärkerer Adsorption an Wurzeloberflächen. Insgesamt kann über AHLs unter dem Einfluss von Gerste gefolgert werden, dass die in Kapitel 3.1.2 beschriebene „pflanzlich bedingte AHL-Abnahme“ im Medium sich an Annäherung wie folgt aufteilt: 18 % des C8-HSL und 21 % des C10-HSL wurden im Medium durch pflanzliche Einflüsse derivatisiert, während 9 % des C8-HSL bzw. 14 % des C10-HSL durch Adsorption an oder Aufnahme in die Pflanze effektiv aus dem Medium entfernt wurden.

3.1.3 Chirale Selektion von AHL

Mittels GC-MS wurde untersucht, ob die beiden Versuchspflanzen zur Selektion von optischen Isomeren befähigt sind. In diesen Experimenten wurden AHLs als D/L-Racemate eingesetzt, da zum Zeitpunkt des Experimentes nur eine sehr geringe Zahl an AHLs in reiner L-Form erhältlich war. Außerdem ist bislang ungeklärt, ob bei unsubstituierten AHLs wie den hier verwendeten C6-, C8- und C10-HSL nicht eine Auto-Racemisierung der Substanzen auftreten kann. Die AHL-Stereoisomere wurden am GC-MS auf einer chiralen Kapillare getrennt. Der Vergleich der D/L-Ratio in Tabelle 3.4 zeigt, dass D-AHLs im Vergleich zu den L-Isomeren im Medium verhältnismäßig angereichert wurden. In Bakterien stellen hauptsächlich L-AHLs die biologisch aktiven Komponenten dar, während D-Isomere höchstens zu vernachlässigende biologische Wirkung ausüben (Chhabra et al., 2003; Pomini et al., 2006). Insofern steht ein erhöhtes Verschwinden der L-Form nicht

Tabelle 3.4: D/L-Ratio nach Pflanzenanzucht

	D/L-C6-HSL	D/L-C8-HSL	D/L-C10-HSL
Gerste T=0	0,92	0,99	0,99
Gerste T=17	1,04	1,08	1,11
Yambohne T=0	0,97	1,02	1,07
Yambohne T=21	2,70	1,25	1,65

im Widerspruch zu der natürlichen Funktionalität der Substanz. Bei Betrachtung der beiden Spezies fällt die unterschiedlich starke Selektion auf. Gersten bewirken einen eher gleichmäßigen Anstieg des D/L-Verhältnisses um durchschnittlich 11 % bezogen auf alle drei AHLs. Stärkere Diskriminierung der D-Isomere wird in Yambohne beobachtet, allerdings mit deutlicheren Unterschieden zwischen den einzelnen Behandlungen. Während das Verhältnis D/L-AHL in den Behandlungen mit C8- und C10-HSL um 23 % beziehungsweise 54 % stieg, erhöhte sich der Anteil des D-C6-HSL im Medium der Yambohne um 177 %. Diese Daten weisen darauf hin, dass D-Isomere der AHLs durch beide Pflanzen in unterschiedlichem Ausmaß diskriminiert werden.

3.1.4 Nachweis von AHL in Pflanzenextrakten

3.1.4.1 AHL-Nachweis an UPLC

Extrakte aus Spross- und Wurzelgewebe wurden auf AHL-Gehalte mittels derselben UPLC-Methode untersucht wie bei den Proben aus Medium. In den Wurzelextrakten von Gerste konnten alle drei verwendeten AHLs nachgewiesen werden, jedoch wurden die Peaks während der Separation meist von anderen Bestandteilen des Extraktes beeinflusst oder konnten aufgrund von Ko-Elution oder der Entfernung zur Basislinie nicht verlässlich quantifiziert werden. Die respektiven Chromatogramme sind in den Abbildungen 3.5 bis 3.7 dargestellt. Im Gegensatz dazu konnten weder in den Sprossextrakten der Gerste noch in Spross und Wurzel der Yambohne Anzeichen für AHLs detektiert werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass AHLs nicht in Pflänzchen der Leguminose *Lotus corniculatus* (Gemeiner Hornklee) akkumulieren (Delalande et al., 2005). Daher war es nicht unerwartet, dass die UPLC-Messung der AHLs in keinem der Extrakte aus Yambohne einen Hinweis auf aufgenommenes AHL lieferte. Die Möglichkeit, dass das Detektionslimit der Methode (circa 0,1 μM) unterschritten war, wurde jedoch nicht außer Acht gelassen und im Anschluss eine qualitative Analyse am FTICR-MS durchgeführt.

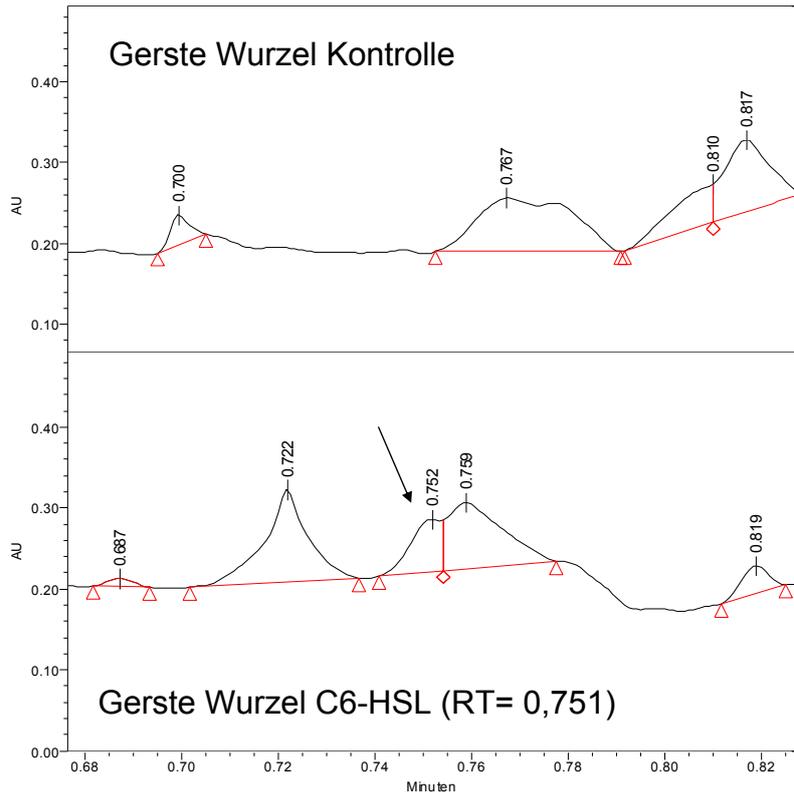


Abbildung 3.5: UPLC-Chromatogramm zum Nachweis von C6-HSL in Gerstenwurzelextrakt. Der korrespondierende Peak ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. RT= Retentionszeit des Standards.

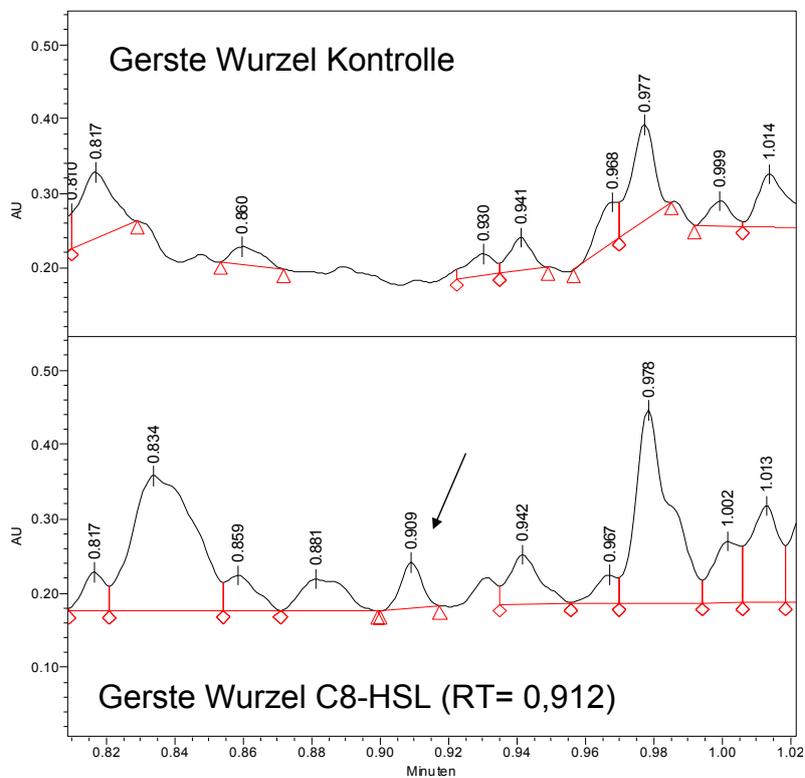


Abbildung 3.6: UPLC-Chromatogramm zum Nachweis von C8-HSL in Gerstenwurzelextrakt. Der korrespondierende Peak ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. RT= Retentionszeit des Standards.

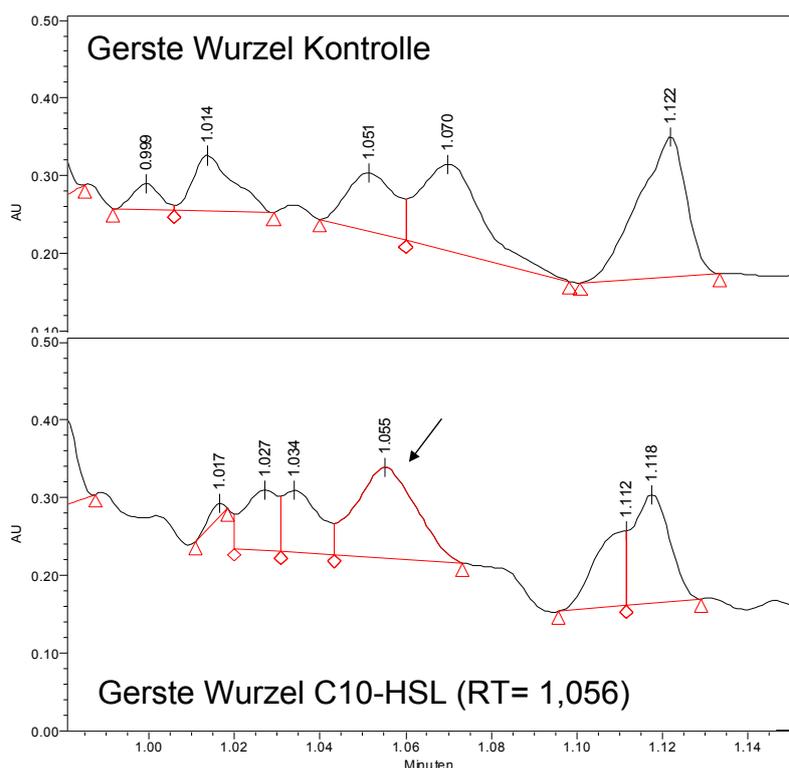


Abbildung 3.7: UPLC-Chromatogramm zum Nachweis von C10-HSL in Gerstenwurzelextrakt. Der korrespondierende Peak ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. RT= Retentionszeit des Standards.

3.1.4.2 Qualitativer AHL-Nachweis am FTICR-MS

Zur Bestätigung der korrekten Identität der AHLs in den Pflanzenextrakten wurde eine qualitative Messung am FTICR-MS durchgeführt. FTICR-MS erlaubte eine Zuordnung von Molekülen aufgrund präziser elementarer Zusammensetzung (Fehler $<2\text{ppm}$ oder $<0.0002\%$ im Vergleich zur theoretischen Masse), wenn es auch keine strukturellen Informationen bieten konnte noch eine Quantifizierung der AHL-Gehalte erlaubte. Der Nachweis der AHLs am FTICR-MS in Kombination mit den UPLC-Ergebnissen ergibt jedoch eine hohe Sicherheit bei der Identifikation des Zielmoleküls. Wie in Abbildung 3.8 gezeigt, wurden alle AHLs, welche in den Wurzelextrakten der Gerste detektiert wurden, auch durch das FTICR-MS bestätigt. C6-, C8- und C10-HSL liegen somit zweifelsfrei in den Wurzelextrakten vor. In den Kontrollen waren keine interferierenden m/z aufgetreten. In den Extrakten aus dem Spross der Gerste hingegen konnten nur C6- und C8-HSL nachgewiesen werden. Somit scheint C10-HSL nicht in den Spross der Gerste transloziert zu werden. Eine dem C10-HSL nahe m/z (278.16951) steht nicht in Zusammenhang mit AHL.

Es zeigte sich bei der Yambohne, dass mit FTICR-MS auch bei dieser Pflanze die m/z

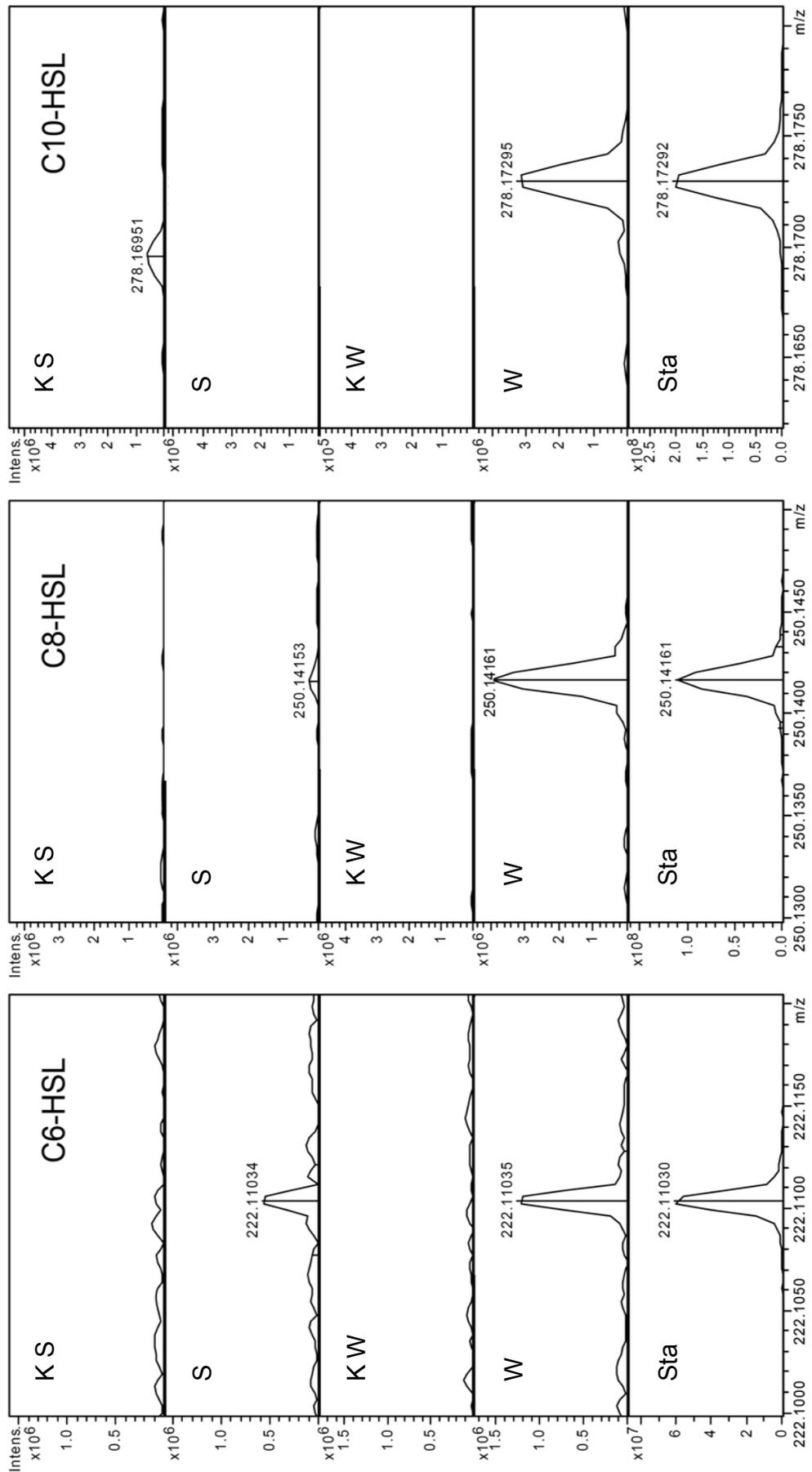


Abbildung 3.8: Nachweis von AHL (Na-Addukte) in Spross- und Wurzelextrakten der **Gerste**. K=Kontrolle; S=Spross; W=Wurzel; Sta= gemessener Standard

aller applizierten AHLs in den Wurzelextrakten nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.9), so dass die Schlussfolgerung nahe liegt, dass die Konzentrationen der Signalstoffe an der Yambohnwurzel unter dem Detektionslimit der UPLC-Methode lagen. Die einzige Signalkomponente, die im Sprossextrakt der Yambohne detektiert wurde, war C6-HSL, während die beiden längerkettigen AHLs nicht festgestellt wurden. Dies ist interessant im Rückblick auf die pflanzlich bedingten AHL-Abnahmen im Medium, welche bei Yambohne deutlich höher waren als bei der Gerste (Abbildung 3.3). Da trotz hohem Rückgang in der Konzentration an AHL im Medium keine oder nur eine sehr geringe Aufnahme in der AHL-Form mit intaktem Lactonring in den Spross der Yambohne erfolgt, spricht dies erneut für die Annahme, dass diese Leguminose die Fähigkeit besitzt, AHL gezielt zu derivatisieren, beispielsweise durch die bereits diskutierten Lactonasen.

Die Zuverlässigkeit der Identifikation der Zielmoleküle konnte neben der Kombination mit UPLC-Daten durch weitere Fakten bestätigt werden. Zum einen lagen die AHLs im positiven Messmodus sowohl in einer protonierten $[MH]^+$ -Form als auch als Na-Addukte vor $[MNa]^+$. Die m/z beider Formen wurden berechnet und mit den m/z aus den Spektren der Extrakte verglichen. Die detektierte m/z von 250.14161 im Wurzelextrakt der Gerste beispielsweise korrespondiert mit der chemischen Zusammensetzung $C_{12}H_{21}NO_3Na$ (250.14137) mit einer Abweichung von 0,96 ppm, so dass es sich hier um das Na-Addukt von C8-HSL handelt. Zusätzlich zu $[MH]^+$ und $[MNa]^+$ konnten nach erhöhter Zahl von Scans auch die korrespondierenden Isotopen- m/z einiger AHLs aufgefunden werden. All diese Fakten belegen die korrekte Identifikation der Zielkomponenten in diesem Experiment.

3.1.4.3 Translokation von radioaktiv markiertem AHL in Gerste

Zu Beginn des Versuches wurde Tritium-markiertes C8- und C10-HSL steril auf fünf Tage alte Gerstenpflanzen appliziert. Es hatte sich gezeigt, dass dieses Experiment bei Verwendung von Keimlingen, welche von Beginn an $[^3H]$ AHL-haltigem Medium ausgesetzt waren, mit zu großen Schwankungen belastet war, da die Keimlinge sich zum Teil erheblich in ihrer Entwicklungsgeschwindigkeit unterschieden. Aus diesem Grunde wurden ältere Pflänzchen verwendet, welche nach Wuchs und Größe vor der Applikation selektiert worden waren, um den Einfluss der Wachstumsgeschwindigkeit und des Habitus in diesem Versuch zu minimieren. Der Versuch erstreckte sich wie üblich über einen Zeit-

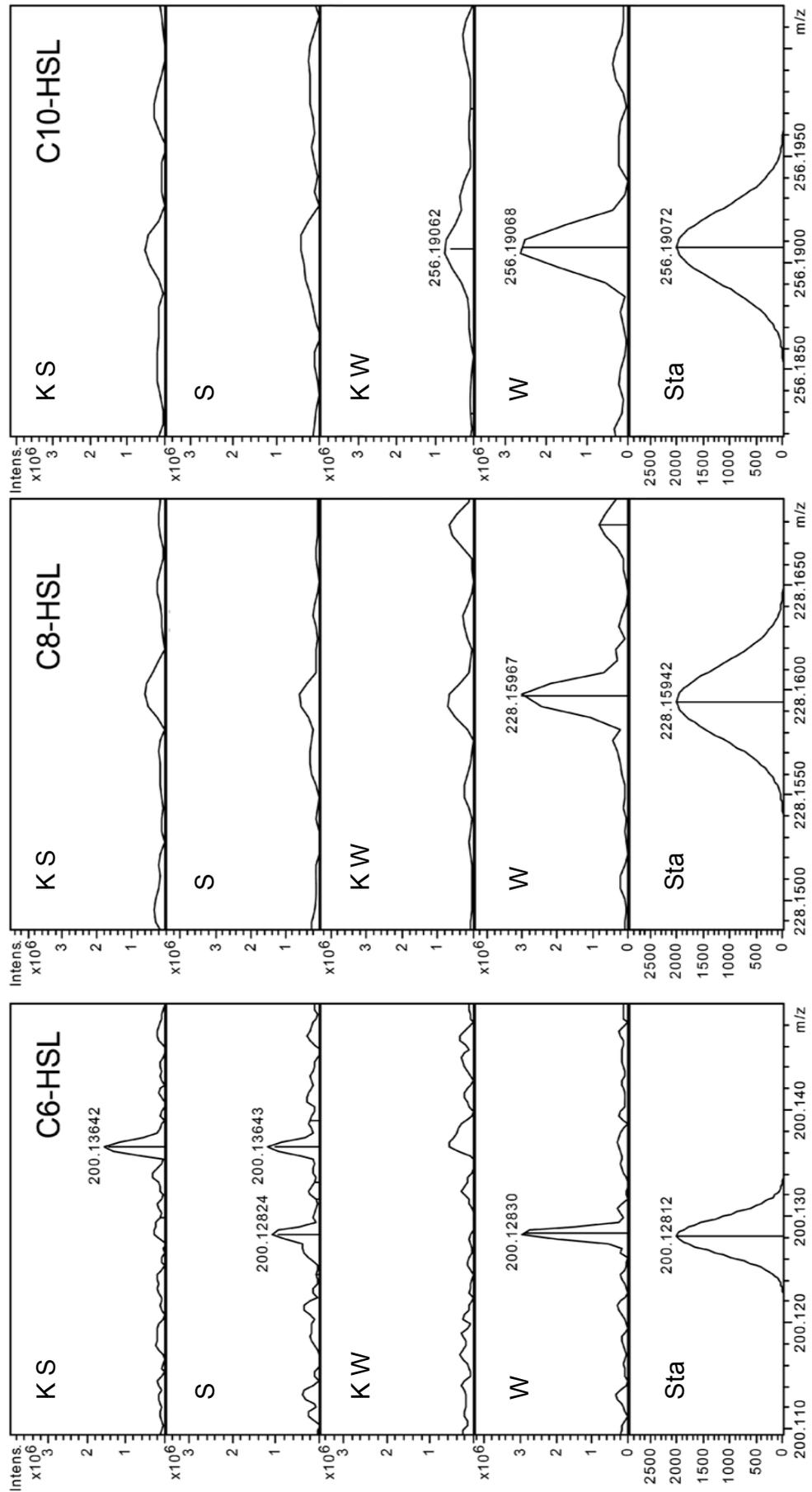


Abbildung 3.9: Nachweis von AHL (protonierte Form) in Spross- und Wurzelextrakten der **Yambohne**. K=Kontrolle; S=Spross; W=Wurzel; Sta=Theoretische m/z

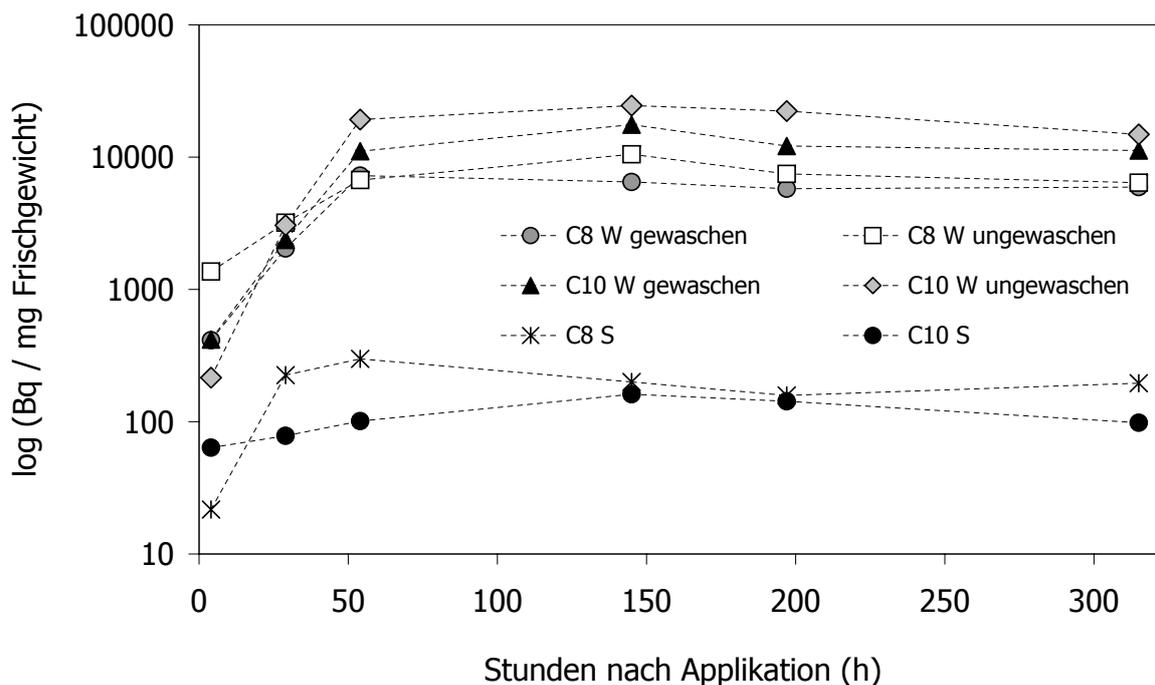


Abbildung 3.10: Verteilung des radioaktiven Signals aus $[^3\text{H}]\text{AHL}$ in Wurzel (W) und Spross (S) von Gerste.

raum von 21 Tagen, wobei die Pflanzen ungefähr 300 Stunden AHL-exponiert waren.

Abbildung 3.10 zeigt, dass das radioaktive Signal aus $[^3\text{H}]\text{AHL}$ schnell in der Pflanze akkumuliert. Nicht nur im Wurzel-, sondern auch im Sprossextrakt konnten bereits 4 Stunden nach Applikation der AHL-Mixtur die ersten ^3H -Zerfälle detektiert werden. Rund 50 Stunden nach der Auftragung schien ein gewisser Schwellenwert der AHL-Aufnahme erreicht zu sein. Zu berücksichtigen war hierbei der kontinuierliche Aufwuchs der Pflanzen, weshalb die Darstellung 3.10 auf Bq pro Frischgewicht (Bq/mg FG) bezogen wurde. Effektiv stieg zwar die Gesamtkonzentration des $[^3\text{H}]\text{AHL}$ und seiner Fragmente in der Gerste stetig an, wurde jedoch durch die gleichzeitige Steigerung der pflanzlichen Masse nivelliert. Nach 300 h schien die Zahl der gemessenen Zerfälle pro mg Frischmaterial der Pflanze sogar leicht zu sinken, was mit dem schnellen Wachstum der Gerste zu dieser Phase (Erscheinen des dritten Blattes) zusammenhängen werden kann. Insgesamt akkumulierten die Wurzeln nach rund 300 Stunden circa 6 kBq /mg FG aus C8- und durchschnittlich 12 kBq/mg FG aus C10-HSL, während in den Sprossen rund 0,2 (C8-HSL) und 0,1 kBq/mg FG (C10-HSL) gezählt wurden. Wie bereits in Kapitel 3.1.2 erwähnt, kann die radioaktive Methode allerdings nicht zwischen intaktem AHL und Derivaten oder gar Fragmenten, die das Label tragen, unterscheiden. Aus diesem Grunde

wurde Gerste als Versuchspflanze herangezogen, da aus den vorherigen Experimenten bekannt war, dass Yambohnen erheblich mehr mit AHL interagieren und deren Struktur modifizieren, was die Interpretation erschwert. Dies wird auch im Hinblick auf die in den Sprossextrakten determinierten [³H]AHL-Werte deutlich. Hier zeigt es sich, dass mittels der radioaktiven Methode im Spross sowohl C8-HSL als auch C10-HSL ermittelt wurden, während mit UPLC und FTICR-MS belegt wurde, dass nur C8-HSL im Spross der Gerste vorlag, jedoch kein C10-HSL nachgewiesen werden konnte. Die relative Konzentration des C10-HSL im Spross betrug allerdings nur rund die Hälfte im Vergleich zu C8-HSL. Insgesamt konnten zu Ende des Experiments aus der gesamten Sprossmasse etwa 40 kBq von [³H]C10-HSL extrahiert werden, was rund 1 % der anfänglich vorliegenden Radioaktivität (3,7 MBq) entspricht. Bezogen auf Gesamt-AHL würde dies einer Konzentration von 0,1 µM C10-HSL gleichkommen. Würde C10-HSL tatsächlich in dieser Konzentration als intaktes, strukturell unverändertes Molekül in der Pflanze vorliegen, so hätte dies mit den anderen verwendeten Methoden nachgewiesen werden können. Bei den aufgenommenen Komponenten muss es sich also zu erheblichem Anteil um Derivate und Fragmente des C10-HSL handeln, was sicherlich in geringerem Maße auch für C8-HSL zutreffen sollte. Die [³H]AHL-Methode stellt jedoch bei der Untersuchung der AHL-Dynamik die sensitivste Nachweisteknik dar, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein sehr niedriger Bruchteil des C10-HSL dennoch intakt in den Spross der Gerste transloziert wird.

Die Untersuchung der Wurzeln gliederte sich in zwei Teile, bei denen ein Teil der Wurzel gewaschen und von lose anhaftendem Medium befreit wurde, während die andere Hälfte ungewaschen blieb. Mit diesem Vorgehen sollte ergründet werden, wie groß der Anteil des lose assoziierten AHL in den vorangegangenen Experimenten war, da hierbei die Pflanzenteile nach der Ernte zur größtmöglichen Erhaltung von Inhaltsstoffen und insbesondere Enzymen umgehend ohne weitere Vorbehandlung eingefroren werden mussten. Sowohl bei C8- als auch bei C10-HSL ist ersichtlich, dass nach einer Schwankungen unterworfenen Anfangsphase stets höhere Werte in Bq/mg FG bei ungewaschenen denn gewaschenen Wurzelhälften gemessen wurden. Ein Teil der AHLs war also nicht an die Wurzeloberfläche gebunden, sondern durch Wasser entfernbare. Der Anteil nicht abwaschbarer Radioaktivität betrug durchschnittlich 65 ± 21 % bei C8-HSL und 67 ± 9 % bei C10-HSL. Grundsätzlich wird in Abbildung 3.10 deutlich, dass die in den Wurzel-

extrahierten messbare Radioaktivität aus [^3H]AHL unabhängig von den Waschungen ab der 50. Stunde nach Applikation bei C10-HSL stets höher war als die des C8-HSL, was erneut einen eindeutigen Hinweis auf die Bedeutung der Adsorption an Wurzeloberflächen liefert. Wie bereits beschrieben, ist im C10-HSL-behandelten Wurzelextrakt mit ungefähr 12 kBq/mg FG annähernd doppelt so hohe Radioaktivität nachweisbar wie in den Wurzelextrakten der C8-Behandlungen, so dass auch hier Adsorption einen maßgeblichen Beitrag geleistet haben muss.

3.1.4.4 Mathematische Modellierung

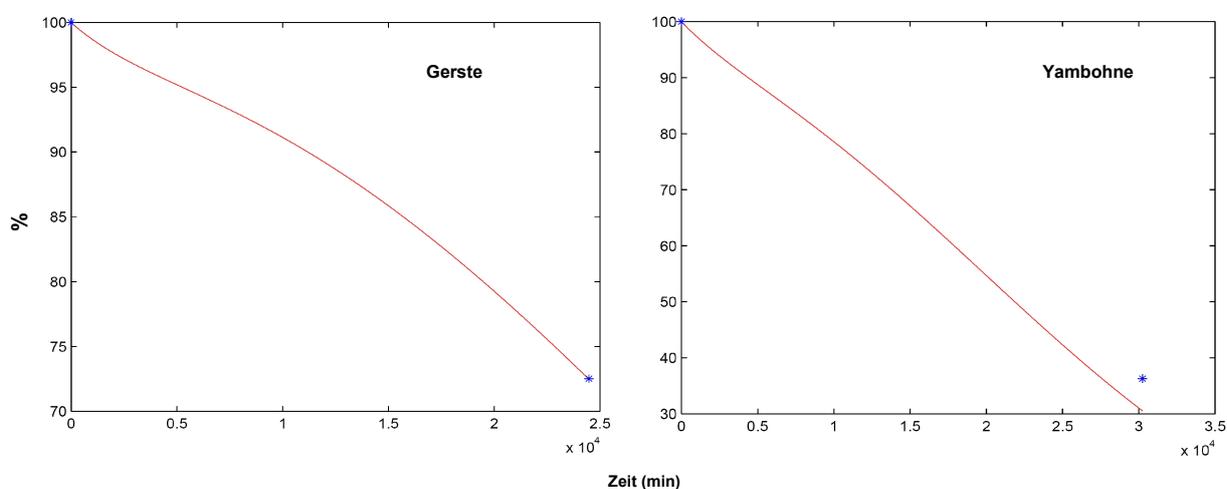


Abbildung 3.11: Beispiel der Kalkulation des zeitlichen Verlaufes der Abnahme von C6-HSL im Medium von Gerste und Yambohne unter Verwendung des mathematischen Modelles. Auf der Ordinate dargestellt ist die relative Konzentration des AHL in %, auf der Abszisse der Zeitverlauf in Minuten.

Die Daten zur AHL-Dynamik in der axenischen Modellrhizosphäre sowie der physiologischen Größen wie dem Frischgewicht der Pflanzen und insbesondere der Parameter des Wurzelsystems wurden im Zuge einer Kooperation mit dem Institut für Biomathematik und Biometrie des Helmholtz Zentrums München (IBB Research Group 3: Computational Mathematics) unter der Mitwirkung von Dr. Christina Kuttler und Maria Vittoria Barbarossa zur Erstellung eines mathematischen Modelles der AHL-Dynamik in Pflanzen herangezogen. Dieses Modell erlaubt die Darstellung der Abnahme von AHL im Medium sowie der Distribution der Signalstoffe in Spross und Wurzel im Zeitverlauf und wird Gegenstand einer Publikation sein, welche sich derzeit in Bearbeitung befindet. Mit freundlicher Genehmigung kann hier als Beispiel der Modellierung die Abnahme der Konzentration von C6-HSL unter Gerste und Yambohne im Zeitverlauf gezeigt werden (Abbildung 3.11).

3.1.5 Screening nach AHL-Metaboliten

3.1.5.1 Metaboliten in Pflanzenextrakten

Das Augenmerk lag in diesem Experiment auf der Identifizierung der jeweiligen Hydroxy- und Oxo-Derivate von C6-, C8- und C10-HSL sowie deren einfach ungesättigten Formen oder Derivaten mit verkürzten Seitenketten. Es handelt sich hierbei also um frühe Metaboliten der Originalsubstanzen. Neben der Hydrolyse des Lactonrings, welche den bedeutendsten Startpunkt für den Abbau der AHLs darstellen dürfte, kann auch die Einbringung einer reaktiven Gruppe in die aliphatische Seitenkette ungesättigter AHLs oder die Verkürzung selbiger Ketten den Metabolismus der bakteriellen Signalstoffe initiieren. AHL-Abbau durch Trennung der Acyl-Seitenkette vom Lactonring, beispielsweise durch Aminoacylasen, wurde hier aufgrund der niedrigen Massenladungszahl des spezifischen Lactonrings (m/z 102) nicht analysiert, da das Apex Qe 12 T FTICR-MS im Bereich ab m/z 150 bis 10.000 bestimmt und Fettsäuren sich bei Pflanzenextrakten aufgrund der erschweren Zuordnung zu AHL nicht als Target für die Metabolitenanalyse eignen. Die Zahl möglicher weiterer Umbauprodukte, die aus oben genannten Derivaten resultieren können, ist theoretisch groß. Aufgrund der großen Fülle potentieller Ab- und Umbauprodukte sowie der erschweren Zuordnung zum Ausgangsstoff mit fortschreitender Metabolisierung wurde die Suche in diesem Experiment auf AHL-Derivate beschränkt, die am Anfang der Verstoffwechslung stehen und sich in ihrer Struktur noch eindeutig den AHLs bzw. deren Homoserinen zuordnen lassen. Die Suche nach den Metaboliten von AHLs wurde mit den FTICR-MS-Spektren aus der Messung im positiven Modus, mit denen auch der qualitative Nachweis erbracht wurde, durchgeführt. Zusätzlich wurde je ein Aliquot der Proben einer alkalischen Hydrolyse unterzogen, was zur Überführung aller AHLs in die respektiven Homoserine diente. Diese wurden anschließend im „negative-ion“ Modus gemessen, da HS im Elektrospray leicht in negativ geladene Ionen zu überführen sind. Außerdem liefert der negative Modus geringere Hintergrundsignale als der positive Messmodus (bedingt durch „ion suppression“ nicht ionisierter Matrixbestandteile) und somit zusätzlich eine höhere Intensität der Signale der Metaboliten. Aus den so gewonnenen bis zu 6000 m/z wurde die Auswahl mittels spezieller Software auf 4 bis 14 mögliche Kandidaten pro Behandlung eingeschränkt. Die Spektren aus den AHL-behandelten Pflanzenextrakten wurden mit den jeweiligen AHL-freien Kontrollen abgeglichen (Matrix-

Abgleich). Auf diese Weise verblieben nur solche m/z in den Listen, welche bestimmten AHL-Derivaten aufgrund von Masse und Molekülzusammensetzung zuzuordnen waren, sich durch entsprechende ^{13}C - m/z verifizieren ließen oder die in ihrer Intensität über den Masseninterferenzen der Kontrollen lagen. Letzteres wurde abgesichert durch den Vergleich mit der natürlichen Schwankungsbreite der Intensitäten von m/z aus den Pflanzenproben. Hierzu wurden aus den Spektren von Gerste und Yambohne je 10 zufällige m/z ausgewählt, die in der Kontrolle und allen drei Behandlungen vorkamen und deren Standardabweichung aus diesen vier Messungen berechnet. Hieraus ergaben sich mittlere Abweichungen der Intensitäten, welche bei $\pm 26,5\%$ in den Gersten- und bei $\pm 27,4\%$ in den Yambohnen-Proben lag. Kandidaten, deren Intensitätssteigerung gegenüber den Kontrollen im Bereich dieser mittleren Schwankungen lag und die keine ^{13}C - m/z aufwiesen, wurden nicht als potentielle Metaboliten berücksichtigt.

Bei der Gerste „Barke“ konnten auf diese Weise die in Tabelle 3.5 dargestellten Metaboliten identifiziert werden. In den Sprossextrakten konnte bei keiner Behandlung ein Kandidat gefunden werden, ebenso wenig bei den mit C6-HSL behandelten Pflanzen, dafür jedoch um jeweils eine C2-Gruppe verkürzte Seitenketten in den Wurzelextrakten mit C8- und C10-HSL-Behandlung neben den jeweiligen Hydroxy-Derivaten. Zudem konnte auch ein C8-Metabolit mit einfach ungesättigter Seitenkette sowie ein Oxo-C10 nachgewiesen werden.

Tabelle 3.5: AHL-Metaboliten in Gerstenextrakten; n.d.=nicht detektierbar; ^{13}C =identische Struktur mit 1 schwerem ^{13}C -Isotop; det.=detektiert.

Behandlung	Gerste Spross	Gerste Wurzel	rel. Intensität	rel. Int. Kontrolle	^{13}C
C6-HSL	n.d.	n.d.	—	—	—
C8-HSL	n.d.	C6	1,41E+07	1,10E+06	det.
		C8:1	8,51E+06	4,94E+06	det.
		OH-C8	1,77E+07	8,25E+06	det.
C10-HSL	n.d.	C8	5,40E+06	2,27E+06	n.d.
		O-C10	6,55E+06	3,02E+06	n.d.
		OH-C10	1,75E+07	2,04E+06	det.

Tabelle 3.6 zeigt, dass in den C8-HSL-behandelten Sprossextrakten der Yambohne das OH-C8 als potentieller Metabolit nachweisbar war. Die Hydroxy-Form des C10-HSL wurde zwar im entsprechend behandelten Sprossextrakt detektiert, jedoch wurde diese aufgrund einer im Bereich der mittleren Schwankung liegenden Intensität und der fehlenden ^{13}C - m/z nicht als Kandidat berücksichtigt. In den mit C6-HSL behandelten Pflanzen

konnten, wie bei Gerste, keine möglichen Metaboliten identifiziert werden, jedoch wurden ebenfalls Hydroxy-Derivate von C8- und C10-HSL in den jeweiligen Wurzelextrakten der Yambohne gefunden, zusätzlich zu einem Oxo-C10-Derivat in den mit C10-HSL behandelten Wurzeln. Im Gegensatz zur Gerste konnten AHLs mit verkürzten Seitenketten oder Doppelbindungen bei der Yambohne nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3.6: AHL-Metaboliten in Yambohne; n.d.=nicht detektierbar; ^{13}C =identische Struktur mit 1 schwerem ^{13}C -Isotop; det.=detektiert.

<i>Behandlung</i>	Yambohne Spross	rel. Intensität	rel. Int. Kontrolle	^{13}C
C6-HSL	n.d.	—	—	—
C8-HSL	OH-C8	5,04E+06	2,53E+06	det.
C10-HSL	n.d.	—	—	—
<i>Behandlung</i>	Yambohne Wurzel	rel. Intensität	rel. Int. Kontrolle	^{13}C
C6-HSL	n.d.	—	—	—
C8-HSL	OH-C8	5,60E+06	3,74E+06	n.d.
C10-HSL	O-C10	3,27E+06	6,66E+05	n.d.
	OH-C10	5,69E+07	1,87E+06	det.

3.1.5.2 Metaboliten im Medium

AHL-Metaboliten in Mineralmedium nach Anzucht von Gerste konnten nicht nachgewiesen werden. Obwohl die Ausgangssubstanzen in hoher Intensität detektiert wurden, zeigte sich kein Kandidat für AHL-Metaboliten im Gersten-Medium. In den Medien der Yambohne hingegen wurden die gleichen Metaboliten detektiert wie in den Wurzelextrakten. Auch hier wurden keine Kandidaten bei C6-HSL gefunden, jedoch OH-C8 bzw. OH-C10 und O-C10 zusammen mit ihren Isotopen-m/z.

Das Verhältnis AHL:HS (siehe Tabelle 3.7) war gemessen an der relativen Intensität des Signals am FTICR-MS nach der Anzucht der Gerstenpflanzen stets >1 , so dass anzunehmen ist, dass die Signalstoffe im Medium der Gersten in höherer Konzentration als Lactone denn als Homoserine vorlagen. HS entstanden allerdings auch in geringem Maße während der Aufbewahrung der Proben durch Hydrolyse im wässrigen Medium, aber insbesondere im Elektrospray des FTICR-MS (A. Fekete, persönliche Kommunikation), so dass eine exakte Angabe, zu welchem Grad die Öffnung des Lactonrings durch diese abiotischen Prozesse erfolgte, nicht möglich ist. Die hier bestimmten Verhältnisse von AHL zu HS können daher nicht mehr den eigentlichen Zustand direkt nach der Ernte der Pflanzen widerspiegeln. Berücksichtigt werden muss auch, dass FTICR-MS eine rein

qualitative Methode darstellt und nur in bestimmten Fällen eine maximal semi-quantitative Auswertung erlaubt. Die Messung der hier gezeigten Proben erfolgte zeitgleich, so dass die Intensitäten der m/z zwar nicht quantifiziert, aber in ein Verhältnis gesetzt werden können, welches wie bereits erwähnt nicht auf tatsächliche Konzentrationen bezogen werden kann. Deutlich zeigt sich jedoch im Vergleich zur Yambohne, dass diese eine stärkere

Tabelle 3.7: Verhältnis AHL:HS in Gerste und Yambohne.

	C6-HSL:HS	C8-HSL:HS	C10-HSL:HS
Gerste Medium T=17	14,31	19,99	19,55
Yambohne Medium T=21	0,26	0,02	0,51

Lactonolyse der AHLs bedingt als die Gerste, wobei der pH-Wert zu berücksichtigen ist, welcher nach der Ernte in den Gerstenmedien bei $4,1 \pm 0,2$ lag, bei Yambohnemedien jedoch bei $5,8 \pm 0,3$ (Ausgangswert: pH $5,7 \pm 0,1$). Der niedrigere pH-Wert im Mineralmedium der Gersten könnte mit für die höhere Stabilität der AHLs verantwortlich sein, welche zu alkalischer Hydrolyse neigen. Der Einfluss des bereits postulierten Abbaus von AHLs durch Lactonasen in Leguminosen dürfte jedoch eine weit größere Rolle spielen, da schon in Kapitel 3.1.2 gezeigt wurde, dass vor allem bei Yambohne ein starker Rückgang von AHL im Medium stattfindet und der pH-Wert sich zudem gegenüber dem Ausgangswert nicht entscheidend erhöht hatte.

3.1.6 Nachweis von AHL aus realer bakterieller Kolonisation

In einem weiterführenden Experiment in Zusammenarbeit mit den beteiligten Arbeitsgruppen des Projektes „Molekulare Interaktionen in der Rhizosphäre“ wurde untersucht, ob neben der Translokation von reinen AHLs im axenischen System auch von wurzellozierten Bakterien produzierte Signalstoffe in die Gerste aufgenommen und verteilt werden. Als Modellbakterium wurde hierzu *Pseudomonas putida* gewählt, welches 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL und 3-oxo-C12-HSL produziert (Steidle et al., 2001). Da von dieser Art eine AHL-negative Mutante (F117) des Stammes IsoF existiert, wurden diese wegen der Möglichkeit des direkten Vergleiches von AHL-Produzent und AHL-negativer Mutante herangezogen. Die Keimlinge der Gerste wurden in einer Lösung der Bakterien inokuliert und anschließend wie in den vorherigen Experimenten angezogen. Mittels UPLC und FTICR-MS wurde nach den Zielmolekülen in den Pflanzenextrakten gesucht. Es konnte allerdings- trotz mehrfach wiederholter Messungen- keines der drei von

Pseudomonas putida produzierten AHLs, weder in Spross noch Wurzel, nachgewiesen werden.

Im Zuge des Experimentes wurden jedoch einige physiologische Parameter gewonnen, welche in der folgenden Tabelle 3.8 dargestellt sind. Hierbei war auffällig, dass unter beiden Isolaten die Pflanzen kleiner und deutlich stärker seneszent wirkten als nach der Behandlung mit reinen AHLs, was auch durch die Daten bestätigt werden konnte. Das Frischgewicht der Sprosse war außerdem durch *P. putida* F117 signifikant reduziert.

Tabelle 3.8: Einfluss zweier Isolate von *Pseudomonas putida* auf Gerste. Bei IsoF handelt es sich um eine AHL-produzierende Form, während F117 eine AHL-negative Mutante darstellt. Pigmentgehalte sind dargestellt als $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit * gekennzeichnet.

	Kontrolle	<i>P. putida</i> IsoF	<i>P. putida</i> F117
Sprosslänge (cm)	19,96 \pm 3,38	18,91 \pm 1,58*	17,82 \pm 1,54*
Chlorophyll a	18,63 \pm 1,45	14,75 \pm 1,68*	14,43 \pm 1,76*
Chlorophyll b	6,01 \pm 0,84	4,63 \pm 1,91	5,60 \pm 2,34
Chlorophyll a+b	24,54 \pm 1,97	19,39 \pm 4,60	20,03 \pm 3,86
Carotinoide x+c	5,04 \pm 0,57	4,60 \pm 0,48	4,39 \pm 0,39
a/b	3,10	3,60	2,94
a+b/x+c	4,87	4,19	4,56
Frischgewicht Spross (g)	0,47 \pm 0,06	0,43 \pm 0,07	0,41 \pm 0,06*
Frischgewicht Wurzel (g)	0,17 \pm 0,03	0,18 \pm 0,03	0,17 \pm 0,04

3.2 Einfluss von AHL auf physiologische Kenngrößen

3.2.1 Frischgewicht von Spross und Wurzel

Die Frischgewichte der Sprosse und Wurzeln der Versuchspflanzen wurden umgehend nach deren Ernte bestimmt. Die Ergebnisse sind als Boxplots in Abbildung 3.12 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass die bakteriellen Signalstoffe (alle 10 μM) auf Gerste im wesentlichen nur geringen Einfluss auf das Frischgewicht der Pflanzenteile ausübten. Keine der AHL-Behandlungen führte zu signifikanten Veränderungen bei $p \leq 0,05$ von der jeweiligen Kontrolle, bei allesamt als normalverteilt klassifizierten Datensätzen ($n > 28$). Alle Mittelwerte lagen innerhalb des zugehörigen Konfidenzintervalles der Kontrolle. Es zeigte sich jedoch die Tendenz zu höheren Sprossfrischgewichten insbesondere bei den mit C8- und C10-HSL behandelten Gersten.

Die Bestimmung der Frischgewichte bei Yambohne lieferte im Vergleich zu den Gerstendaten ein weniger einheitliches Bild. Während die Frischgewichte der mit C6- und C8-HSL behandelten Sprosse gegenüber der Kontrolle leicht absanken, so schien das mittlere Frischgewicht unter dem Einfluss des C10-HSL im Spross der Yambohne dagegen leicht anzusteigen. Signifikant unterschiedlich mit $p \leq 0,05$ laut Student's t-Test war jedoch nur der Effekt bei C8-HSL, was vom Konfidenzintervall bestätigt wird, da der Mittelwert bei C8-HSL außerhalb des Bereiches des wahren Mittelwertes lag.

Der gleiche Trend ließ sich auch bei den Frischgewichten der Wurzel verfolgen, mit leicht gesunkenen Werten bei den mit C6-HSL und C8-HSL behandelten Pflanzen, und einer leichten Steigerung bei C10-HSL-behandelten Yambohnwurzeln, wobei hier keine der Behandlungen statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrollpflanzen aufzeigte.

Insgesamt wiesen besonders die Wurzeln der beiden Arten durch die gewählten Anzuchtzeiten vergleichbare Frischgewichte auf, und auch die Werte der Sprosse lagen in einem weitgehend ähnlichen Bereich.

3.2.2 Blattflächen

Die Blattflächen der ersten drei voll entwickelten und des erscheinenden vierten Blattes von Gerste (siehe 3.13) zeigten im Mittelwert, dargestellt als gestrichelte Linie, beim Vergleich der Kontrollen zu den mit 10 μM AHL behandelten Pflanzen nur geringe Un-

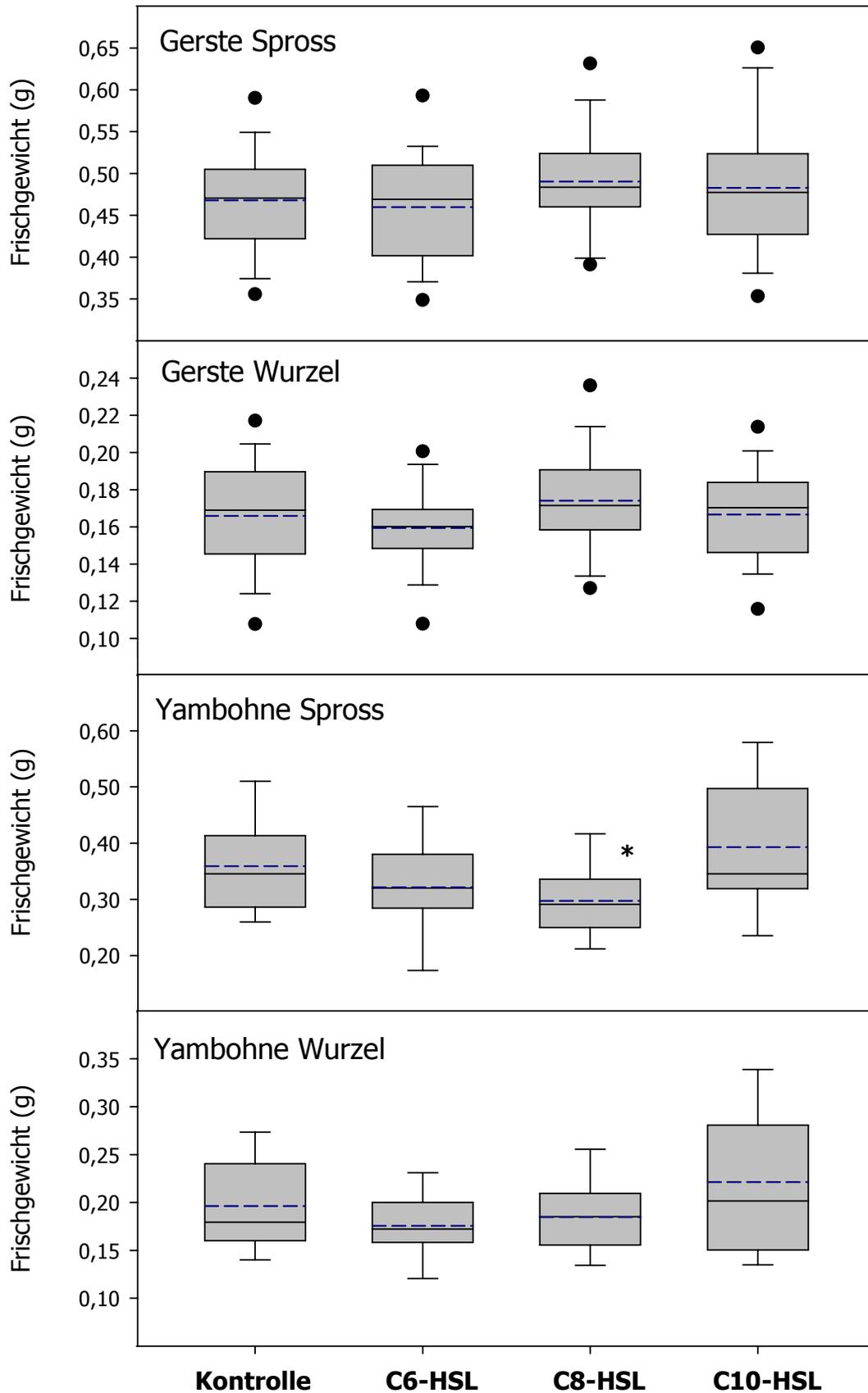


Abbildung 3.12: Frischgewichte von Spross und Wurzel der Gerste und Yambohne unter AHL-Einfluss. Der Median ist als durchgängige, der Mittelwert als gestrichelte Linie dargestellt. Das Sternsymbol * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) der Behandlung zur Kontrolle gemäß Student's t-Test und Konfidenzintervall.

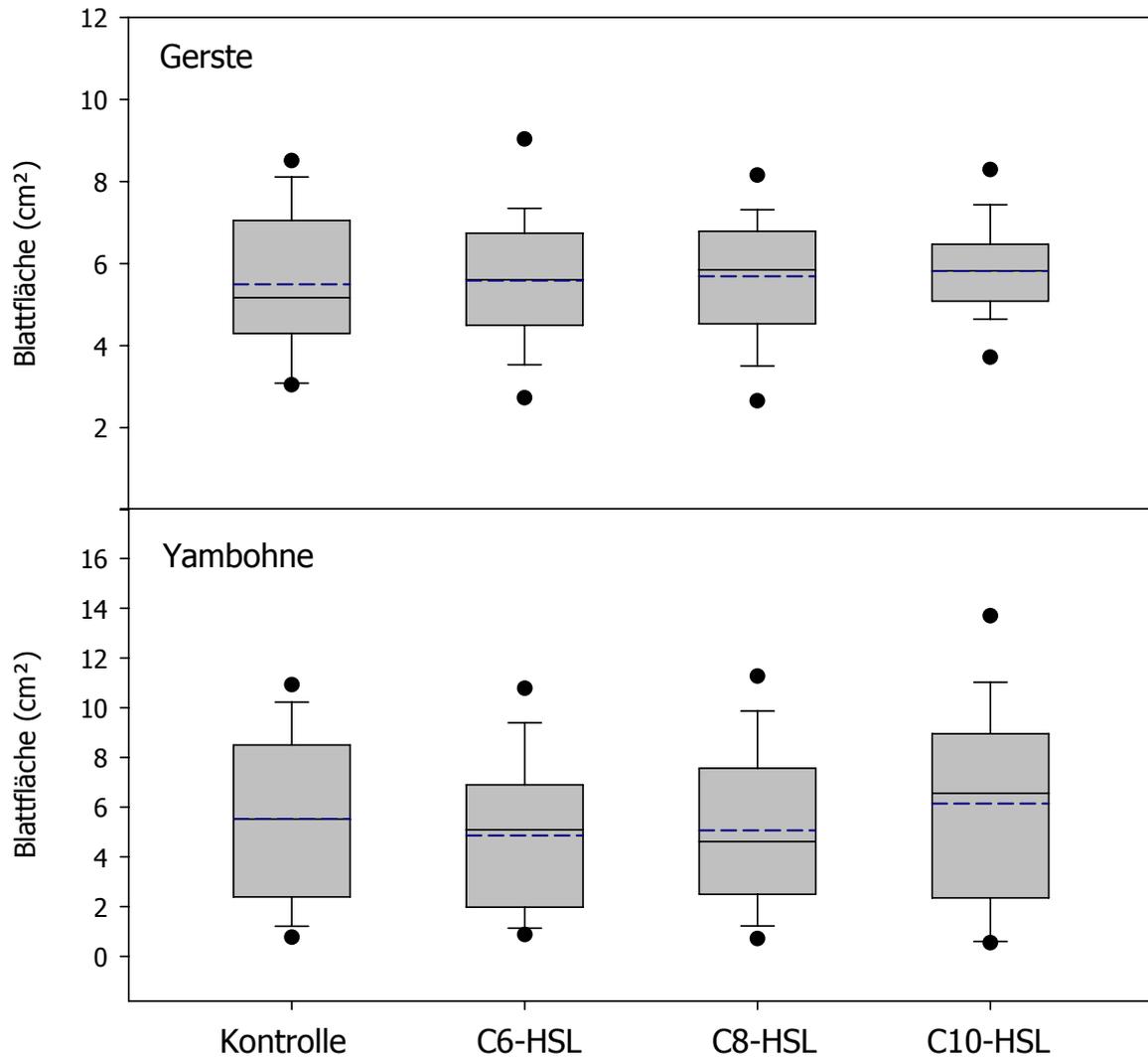


Abbildung 3.13: Absolute Blattfläche pro Pflanze in cm².

terschiede. Zum Zeitpunkt der Ernte wiesen die Pflanzen eine durchschnittliche absolute Blattfläche von rund 5,5 cm² pro Spross und Pflanze auf. Die absoluten Flächen unterschieden sich nur gering und nicht signifikant untereinander, wenn auch der Trend auf eine geringfügige Erhöhung der Blattflächen, besonders bei C8- und C10-HSL, im Vergleich zur Kontrolle hinweist. Dies stimmt mit den späteren Beobachtungen der Sprosslängen (Abschnitt 3.2.3) überein.

Die Blattflächen der Yambohne bestanden zum überwiegenden Teil aus den beiden ersten voll entwickelten Blättern, da Folgeblätter zwar oft schon erschienen, aber aufgrund ihrer anfänglichen Entwicklung selten maßgebliche Flächen aufwiesen. Nach der Entfaltung der beiden ersten Blätter konnte bei Yambohne zunächst vielmehr eine deutliche Längenentwicklung des Stengels beobachtet werden. Im Gegensatz zur Gerste waren

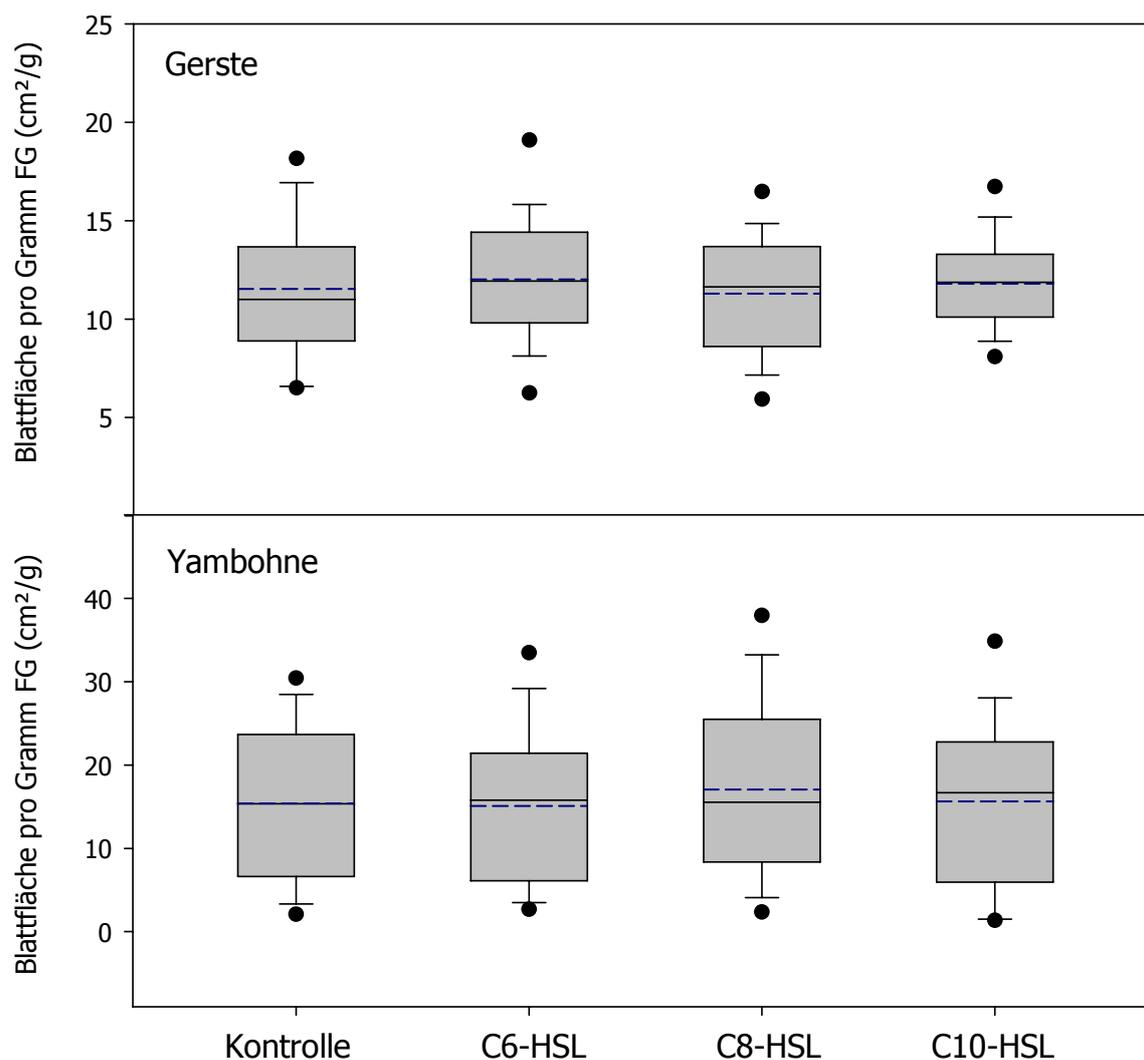


Abbildung 3.14: Blattflächen pro Gramm Frischgewicht unter AHL-Einfluss.

die absoluten Blattflächenwerte in cm^2 von *Pachyrhizus* größeren Schwankungen, wenn auch ohne signifikante Unterschiede unterworfen und folgten in ihrer Verteilung annähernd dem Verlauf des Frischgewichts (Kapitel 3.2.1). Die durchschnittliche Fläche pro Pflanze zum Erntezeitpunkt lag mit rund 5 bis 6 cm^2 jedoch in einem ähnlichen Bereich wie bei den Gersten.

Die Messung der Blattfläche wurde zusätzlich auf das Frischgewicht der Sprosse bezogen. Bei Gerste unterschied sich die verzeichnete geringe Erhöhung der mittleren Blattfläche pro Gramm Frischgewicht (Abbildung 3.14) insbesondere nach der Behandlung mit C6-HSL statistisch nicht signifikant von den Kontrollen, zumal auch schon beim Frischgewicht keine entscheidenden Veränderungen beobachtet werden konnten. Ein Einfluss der bakteriellen Signalstoffe AHL auf die Ausprägung der Blattflächen von Gerste kann

insgesamt kaum beobachtet und statistisch nicht abgesichert werden.

Abbildung 3.14 zeigt, dass die Yambohnen-Blattflächen in Bezug auf das durchschnittliche Frischgewicht unter dem Einfluss der drei AHLs ($10 \mu\text{M}$) annähernd gleich blieben. Der leichte Anstieg der Blattfläche bei den mit C8-HSL behandelten Pflanzen ergibt sich durch den vergleichsweise niedrigeren Frischgewichtwert und kann statistisch nicht belegt werden. Auch bei Yambohne konnte daher kein maßgeblicher Einfluss von AHL auf die Blattflächen nachgewiesen werden.

3.2.3 Sprosslängen der Gerste

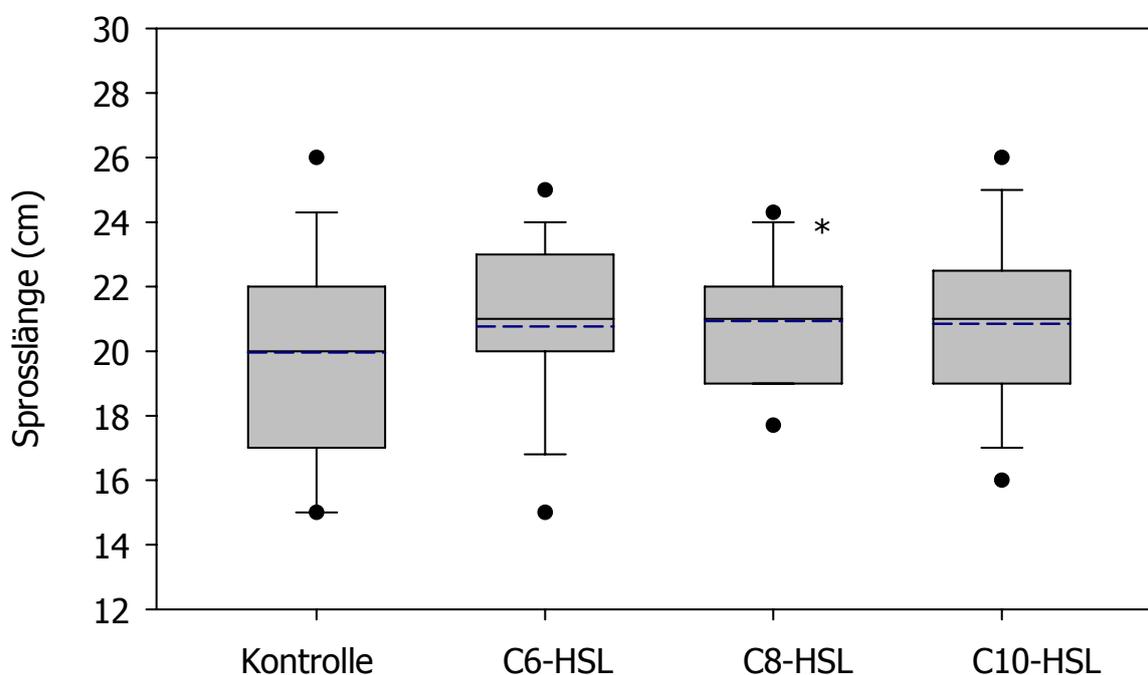


Abbildung 3.15: Länge der Gerstensprosse nach AHL-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Der Median ist als durchgängige, der Mittelwert als gestrichelte Linie dargestellt. Gemäß t-Test signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) der AHL-Behandlung zur Kontrolle sind mit * gekennzeichnet.

Wuchs und aufrechte Blattstellung der Gersten ermöglichten die Erfassung der Sprosslängen, was bei Yambohne aufgrund deren krautiger Wuchsform nicht möglich war. Die Länge wurde vom Ansatz des Sprosses an der Karyopse bis zur Spitze des jeweils längsten Blattes vermessen. Die Pflanzen unter AHL-Behandlung ($n=48-76$) wiesen im Durchschnitt allesamt eine leichte Erhöhung der Sprosslänge um rund 1 cm gegenüber der Kontrolle auf, wie in Abbildung 3.15 ersichtlich ist. Die Sprosslängen der Gerste geben daher annähernd den Trend der Frischgewichtsmessungen wieder, bei welchen ein leicht-

ter, wenn auch nicht signifikanter Anstieg bei den mit 10 μM C8- und C10-behandelten Gersten erfasst wurde. Bei den Sprosslängen erwies sich die statistische Absicherung der beobachteten Effekte bei allen erlaubten Tests als stets knappe Entscheidung. Gemäß t-Test konnte nur bei C8-HSL ($p=0,04$) ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden, wobei der Mittelwert dieser Behandlung sehr knapp an der obersten Grenze innerhalb des Konfidenzintervalls der Kontrolle lag. Nach Prüfung der Normalverteilung der Datensätze kann hier eine genügende Robustheit des t-Tests angenommen werden. Die mit C6-HSL und C10-HSL behandelten Gersten waren erst bei $p=0,15$ und $p=0,09$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Außreißer konnten bei $n \cdot \sigma=4$ und $p=0,05$ in den Datensätzen nicht identifiziert werden. Während multiple Vergleiche nach Varianzanalyse (F abgelehnt wegen $p=0,14$) bei Überschreitungswahrscheinlichkeit $p=0,05$ gemäß Scheffé und Tukey erwartungsgemäß keine signifikanten kritischen Mittelwertdifferenzen ergaben, wurde von der LSD-Methode (least significant difference) der signifikante Unterschied von C8-HSL zur Kontrolle bestätigt. Die bekannte Schwäche jenes Test liegt aber darin, dass es vorkommen kann, dass mindestens eine Mittelwertdifferenz fälschlicherweise als signifikant eingestuft wird. Eine interessante Beobachtung bei diesem Experiment war die geringe absolute Anzahl der kleineren Sprosslängen mit weniger als 19 cm bei den AHL-Behandlungen.

3.2.4 pH-Wert des Mediums

In der Literatur wurde berichtet, dass mit dem Weichfäulepathogen *Pectobacterium (Erwinia) chrysanthemi* infizierte Chicoree-Pflanzen an der Stelle der Infektion mit einer Erhöhung des pH-Wertes reagierten (Nachin und Barras, 2000). *Pectobacterium chrysanthemi* besitzt ein QS-abhängiges Genregulationssystem, bei dem z.B. im Stamm *Echr* 3937 C6-HSL und C10-HSL als Signalstoffe produziert werden (Barnard und Salmond, 2007). Da der pH-Wert mitbestimmend für die Stabilität von AHLs ist, wurde er in diesem Experiment untersucht. Dabei wurde vor jedem axenischen Experiment der pH-Wert in einem Aliquot des frisch zubereiteten mineralischen Anzuchtmediums bestimmt, in welches später die Keimlinge eingebracht wurden, und die Werte gemittelt. Diese als „T=0“ bezeichnete Probe enthielt bei der Messung des pH-Wertes bereits AHL (10 μM) bzw. EtOH (0,1 %) bei den Kontrollen. Der pH-Wert dieser Probe lag im Durchschnitt bei $5,7 \pm 0,1$. Nach der Ernte der Pflanzen wurde das Medium weitgehend von den Glasperlen getrennt und der

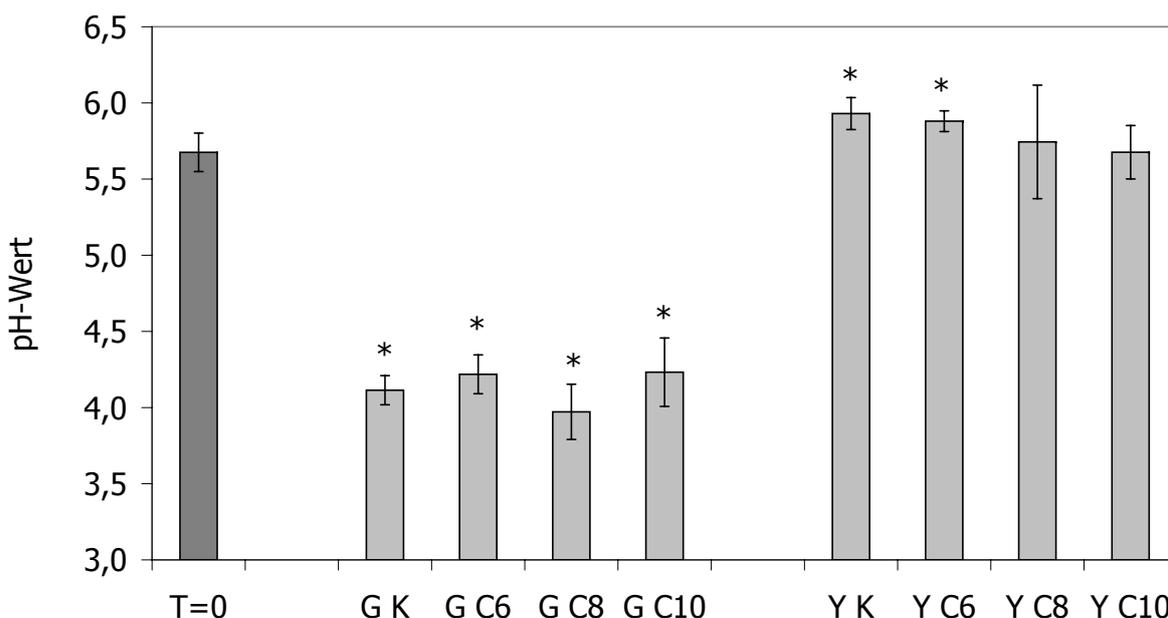


Abbildung 3.16: Änderung des pH-Wertes im Medium während der Anzuchtphase. T=0= Startpunkt des Experimentes; G= Gerste; Y= Yambohne. Das Sternsymbol * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zu T=0 gemäß Student's t-Test.

pH-Wert erneut geprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der starke Einfluss der Gerste auf den pH-Wert im Medium. Diese Spezies verursachte im Durchschnitt aller Behandlungen eine deutlich signifikante Absenkung des pH-Wertes von circa $5,7 \pm 0,1$ auf $pH\ 4,1 \pm 0,2$. Innerhalb der Behandlungen mit je $10\ \mu M$ C6-, C8- und C10-HSL (G C6 bis G C10) konnte jedoch keinerlei signifikanter Unterschied zur Gersten-Kontrolle (G K) belegt werden. Die Änderung des pH-Wertes im Anzuchtmedium der Gersten kann auf saure Exsudate aus der Wurzel zurückgeführt werden. Als wichtiger Hinweis gilt, dass die durch Gersten verursachte pH-Absenkung auf 4,1 sich günstig auf die Stabilität der AHLs auswirkt, welche im alkalischen Bereich zu rascher Hydrolyse (McDougald et al., 2006) neigen.

Bei Yambohne zeigte sich im Vergleich zur Gerste „Barke“ ein gegenläufiger Trend. Die Leguminose bewirkte insgesamt sogar eine geringfügige Erhöhung des pH-Wertes von $5,7 \pm 0,1$ auf durchschnittlich $pH\ 5,8 \pm 0,3$ nach der Anzucht der Pflanzen, was als signifikant unterschiedlich zu T=0 bewertet wurde. Die Veränderung gegenüber T=0 bezüglich der einzelnen Behandlungen war allerdings lediglich bei den Kontrollen (Y K) und den mit $10\ \mu M$ C6-HSL behandelten Yambohnen (Y C6) signifikant, während die pH-Werte bei den beiden anderen AHL-Behandlungen (Y C8 und Y C10) sich nicht von der T=0-Probe abgrenzen ließen. Wie schon bei Gerste beobachtet, unterschieden sich die

pH-Werte der AHL-behandelten Medien nach der Pflanzenanzucht nicht signifikant von der Kontrolle (Y K), so dass nicht nachgewiesen werden konnte, dass eine Behandlung mit AHL dazu führt, dass der pH-Wert im Medium der behandelten Yambohnen weniger ansteigt als bei Kontrollpflanzen ohne AHL.

3.2.5 Wurzelparameter

Mit der Software WinRHIZO konnten aus digitalen Aufnahmen verschiedene Daten zur Charakterisierung möglicher Einflüsse von AHL auf Struktur und Geometrie der Wurzelbiomasse gewonnen werden. Neben der Gesamtlänge der Wurzeln, ihrem mittleren Durchmesser, Oberfläche und Volumen wurde durch das Programm auch die Anzahl an Spitzen pro Gesamtwurzel ermittelt und eine Einteilung der Wurzeln gemäß ihrer Länge in Durchmesserklassen vorgenommen. Oberfläche und Volumen wurden aus dem jeweiligen Durchmesser und der zugehörigen Gesamtlänge einer jeden einzelnen Pflanze berechnet und anschließend die daraus erhaltenen Einzelwerte gemittelt, statt sie aus den mittleren Längen und Durchmessern zu berechnen.

Es bleibt anzumerken, dass die Erfassung der extrem feinen Wurzelhaare der jungen Gersten auch bei höchster Auflösung nicht möglich war, so dass diese nicht in die Berechnungen einfließen konnten, während an den Wurzeln der Yambohne zum Zeitpunkt der Ernte keine Wurzelhaare erkennbar waren.

3.2.5.1 Gerstenwurzeln

Die Wurzelparameter der Gerste mit ihrer für Monokotyledonen typischen homorhizen Bewurzelung sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Die Gesamtlänge der Wurzeln schwankt im Bereich zwischen 31 cm und 36 cm, wobei die Werte annähernd dem Trend der Frischgewichtsmessungen folgen. Insbesondere mit 10 μ M C8-HSL behandelte Gersten, welche im Durchschnitt eine höhere Frischmasse besaßen als die anderen Behandlungen, wiesen auch die höchste Gesamtwurzellänge auf.

Der mittlere Durchmesser der Gerstenwurzeln lag nach allen Behandlungen im Bereich von 0,8 mm. Wesentliche Unterschiede konnten hierbei jedoch aufgrund der hohen Schwankungsbreite von bis zu ± 25 % bei diesem Parameter nicht postuliert werden. Wurzelpakete der Gersten wiesen erfahrungsgemäß bezüglich der Zusammensetzung von einzelnen Wurzeln verschiedener Durchmesser eine hohe Variabilität auf. Eine ge-

Tabelle 3.9: Wurzelparameter der Gerste unter Einfluss von AHL.

	Kontrolle	C6-HSL	C8-HSL	C10-HSL
Gesamtlänge [cm]	33,8 ± 8,7	31,6 ± 5,7	35,8 ± 7,5	31,2 ± 7,0
Mittlerer Durchmesser [mm]	0,80 ± 0,15	0,82 ± 0,15	0,81 ± 0,20	0,85 ± 0,19
Gesamte Oberfläche [cm ²]	8,09 ± 1,48	7,91 ± 1,18	8,74 ± 4,53	8,44 ± 2,15
Gesamtvolumen [cm ³]	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,18 ± 0,06	0,18 ± 0,07
Zahl der Wurzelspitzen	14,1 ± 3,8	15,0 ± 3,1	17,0 ± 7,0	14,5 ± 3,8
Länge / Wurzelspitze [cm]	2,39 ± 0,61	2,11 ± 0,38	2,10 ± 0,44	2,15 ± 0,48

näherte Einteilung der Gerstenwurzeln in Durchmesserklassen, dargestellt in Abbildung 3.17, konnte jedoch verdeutlichen, dass sich rund zwei Drittel der gesamten Wurzellänge der Durchmesserklasse zwischen 0,5 mm und 1 mm zuordnen ließen. Der restliche Anteil verteilte sich überwiegend auf die beiden benachbarten Durchmesserklassen, während der Anteil der Wurzeln mit einem Durchmesser von mehr als 1,5 mm bei Gerste im axenischen System von zu vernachlässigender Bedeutung war. Die natürliche Streuung der Wurzellängen pro Durchmesserklasse umfasste einen sehr großen Bereich und wurde daher aus Gründen der Überschaubarkeit nicht dargestellt, so dass die Abbildung bei Gerste wie später auch bei Yambohne als genäherte Übersicht zu verstehen ist. Insgesamt zeigte sich bei der Verteilung der Durchmesserklassen kein expliziter Einfluss der AHL-Behandlungen.

Aus den beiden vorher beschriebenen Größen wurden die durchschnittliche Oberfläche und das Volumen der Gesamtwurzel der Gerste ermittelt. Augenscheinlich folgte auch die Veränderung der Oberfläche einem ähnlichen Muster wie vorher die Gesamtlänge, da hier C8-HSL-behandelte Gersten in Folge der erhöhten Gesamtwurzellänge die größte Oberfläche in cm² aufwiesen, gefolgt von den Pflanzen, die mit 10 µM C10-HSL behandelt wurden, deren gegenüber der Kontrolle gesteigerter Oberflächenwert aus dem leicht erhöhten mittleren Durchmesser resultiert. Dementsprechend erschienen die Volumina der mit letzteren beiden AHLs behandelten Gerstenwurzeln unter Berücksichtigung der hohen Streuung geringfügig erhöht. Anzumerken bleibt allerdings, dass alle beschriebenen Veränderungen bei Gesamtlänge, Durchmesser, Oberfläche und Volumen in diesem Setup keine signifikanten ($p \leq 0,05$) Unterschiede zu den Kontrollpflanzen zeigten.

Dies traf auch auf die Bestimmung der durchschnittlichen Zahl an Wurzelspitzen pro

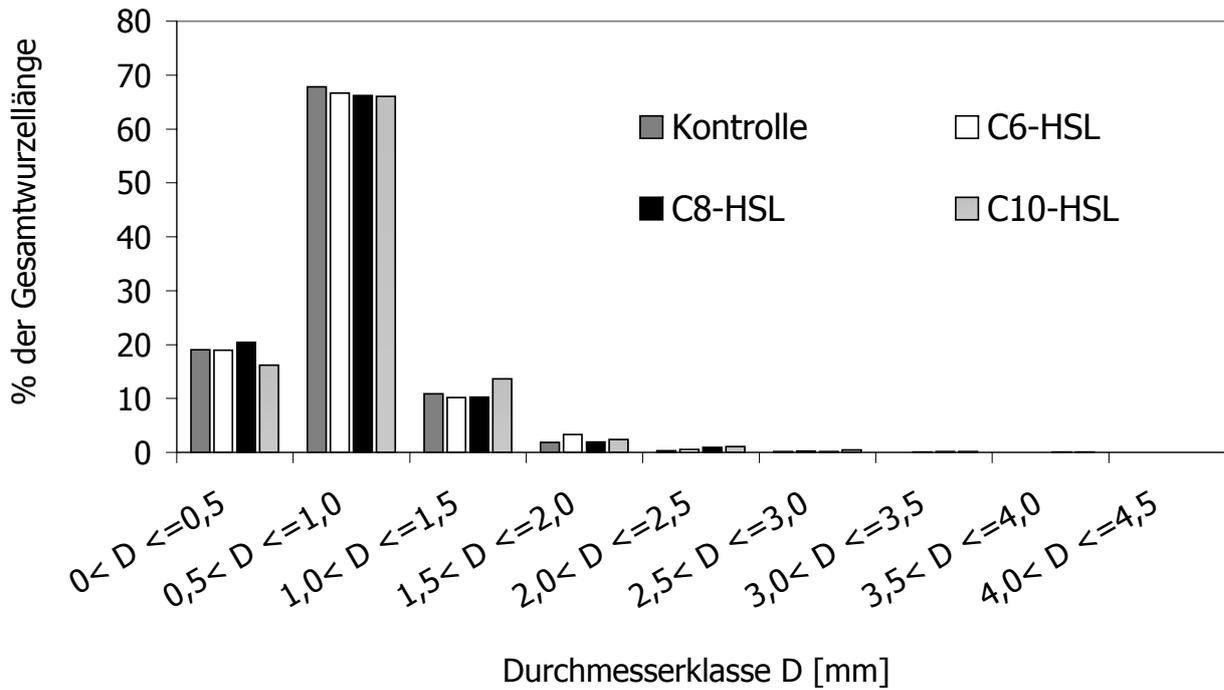


Abbildung 3.17: Einteilung der Gesamtwurzellänge der Gerste in Durchmesserklassen.

Pflanze zu, die alle unter AHL erhöht waren, wobei hier der bei C8-HSL deutlich erhöhte Wert mit $p=0,17$ als erheblich wahrscheinlicher einzustufen war als die übrigen, so dass Gersten, die dieser Behandlung unterzogen wurden, mehr Wurzelspitzen auszubilden schienen als die anderen Gersten im axenischen Experiment. Spitzen von teilweise wie voll ausgebildeten Seitenwurzeln wurden allerdings gleichwertig von WinRHIZO in diese Auswertung mit einbezogen. Berechnet man die durchschnittliche Länge pro Wurzelspitze, so nivelliert sich der Effekt aufgrund des höheren Wertes unter C8-HSL bei der Gesamtwurzellänge. Daraus kann gefolgert werden, dass insbesondere mit C8-HSL behandelte Gerstenwurzeln mehr Wurzeltriebe ausgebildet hatten als die Gersten der Kontrolle. Bei der Bestimmung der durchschnittlichen Wurzellänge pro Spitze wurde zur Vereinfachung angenommen, dass jede Spitze eine einzelne Wurzel repräsentiert. Bei allen Behandlungen mit AHL schien die durchschnittliche Länge pro Wurzel im Vergleich zur Kontrolle um rund 0,25 bis 0,3 cm zu sinken, was jedoch statistisch nicht mit genügender Sicherheit bestätigt werden konnte. Der Rückgang der durchschnittlichen Wurzellänge kann durch eine sinkende Gesamtwurzellänge wie auch durch eine Erhöhung der Zahl an Wurzelspitzen begründet sein. In diesem Falle ist der Effekt auf die beobachtete leichte Steigerung der Wurzelspitzenzahl zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, war die Erfassung der sehr filigranen Wurzelhaare der Gerstenpflanzen in diesem jun-

gen Stadium nicht möglich. Es muss daher bei der Interpretation berücksichtigt werden, dass die hier gezeigten Werte nur für die vollwertigen Haupt- und Seitenwurzeln gelten. Augenscheinlicher Bewertung zufolge schien die Behandlung mit C10-HSL einen stark fördernden Einfluss auf die Ausbildung von Wurzelhaaren auszuüben. Dies ist aufgrund der bereits erwähnten experimentellen Limitierung allerdings nicht nachweisbar.

3.2.5.2 Yambohnwurzeln

Yambohnen weisen im Vergleich zur Gerste einen allorhizen Aufbau ihrer Wurzelmasse auf, bei dem die Wurzeln ausgehend von einer Haupt- oder Primärwurzel gebildet werden, an welcher sich in späterem Stadium auch die für Ernährungszwecke verwendbaren Knollen befinden. Die Wurzelparameter der Yambohne sind in Tabelle 3.10 dargestellt. Die gesamte Länge der Wurzeln war im Bereich zwischen 19 und 24 cm angesiedelt, wo-

Tabelle 3.10: Wurzelparameter der Yambohne unter Einfluss von AHL.

	Kontrolle	C6-HSL	C8-HSL	C10-HSL
Gesamtlänge [cm]	21,9 ± 10	19,9 ± 10,5	21,1 ± 10,1	23,3 ± 13,9
Mittlerer Durchmesser [mm]	1,05 ± 0,11	1,00 ± 0,12	1,04 ± 0,16	1,08 ± 0,12
Gesamte Oberfläche [cm ²]	6,97 ± 2,67	5,93 ± 2,68	6,57 ± 2,69	7,64 ± 4,32
Gesamtvolumen [cm ³]	0,18 ± 0,06	0,14 ± 0,06	0,17 ± 0,06	0,20 ± 0,11
Zahl der Wurzelspitzen	10,0 ± 3,4	9,4 ± 3,4	9,3 ± 3,0	10,3 ± 5,8
Länge / Wurzelspitze [cm]	2,18 ± 0,99	2,11 ± 1,11	2,27 ± 1,09	2,26 ± 1,35

bei die Werte analog zur Gerste dem Trend der Frischgewichtsmessungen folgten, wenn auch nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Neben den mit 10 µM C6- und C8-HSL behandelten Yambohnen, deren durchschnittliche Gesamtwurzellänge auf niedrigerem Niveau lag als die der Kontrolle, fällt die erhöhte Gesamtlänge bei 10 µM C10-HSL auf.

Yambohnenwurzeln wiesen einen mittleren Durchmesser von rund 1 mm mit deutlich geringerer Schwankungsbreite als bei Gerste auf. Die AHL-Behandlungen unterschieden sich statistisch nicht von der Kontrolle. Die Einteilung der Gesamtlänge in Durchmesserklassen ist in Abbildung 3.18 wiedergegeben. Die größte Klasse stellte auch hier diejenige von 0,5 mm bis 1 mm dar, und weitere 25 % wurden der Klasse zwischen 1 und 1,5 mm zugeordnet. Weniger als 7 % fielen bei Yambohne der kleinsten Klasse zu. Im Gesamt-

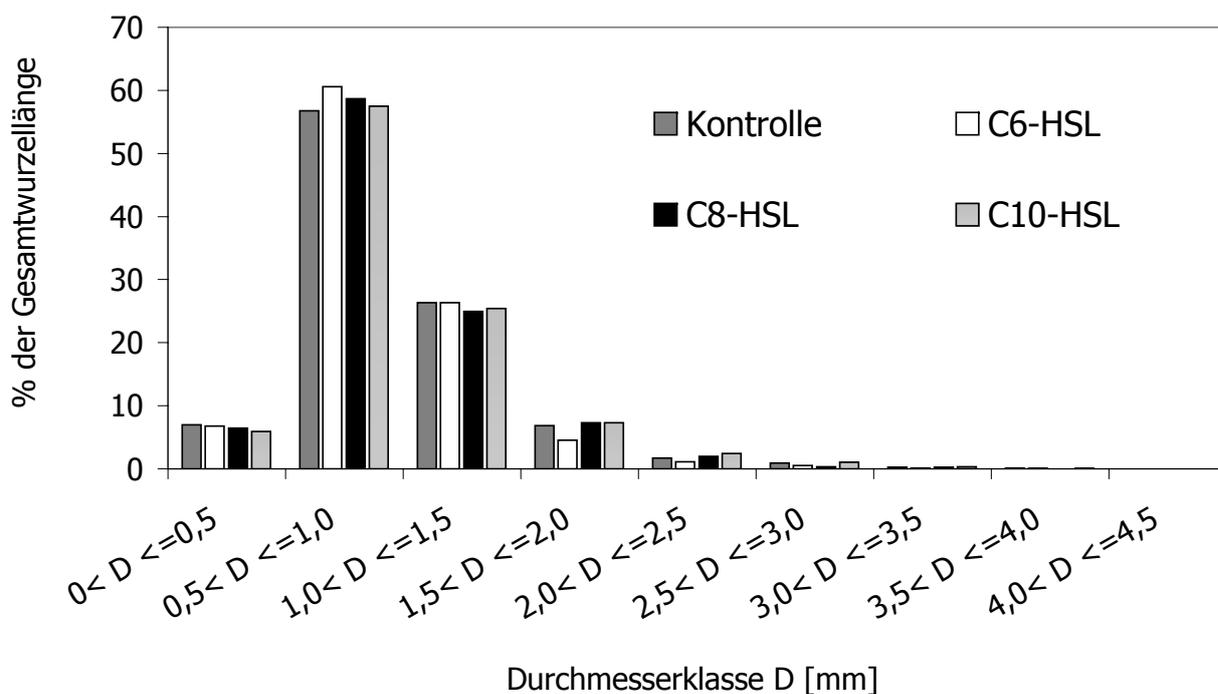


Abbildung 3.18: Einteilung der Gesamtwurzellänge der Yambohne in Durchmesserklassen.

Abbildung 3.18 zeigt sich bei der Verteilung der Durchmesserklassen wie bei Gerste kein expliziter Einfluss der AHL-Behandlungen.

Bei Oberfläche und Volumen der Wurzeln von Yambohne kamen aufgrund der relativen Ähnlichkeit der mittleren Durchmesser besonders die Unterschiede in der Gesamtlänge zum Tragen, so dass die Effekte deren Muster folgten. Die Verringerung der Oberfläche nach Behandlung mit 10 μ M C6-HSL war mit $p < 0,19$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Beim Volumen wurde die gängige Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5 % mit $p < 0,08$ nur knapp verfehlt. Die beiden anderen Behandlungen, 10 μ M C8- und C10-HSL, unterschieden sich nicht signifikant zur Kontrolle. Es kann gefolgert werden, dass die Effekte bei C6-HSL-Behandlung vor allem auf die niedrigere Gesamtwurzellänge zurückzuführen sind.

Die Yambohnen wiesen zum Zeitpunkt der Ernte im Durchschnitt etwa 10 Wurzelspitzen auf. Dieser Parameter zeigte wie auch die Berechnung der mittleren Länge pro Wurzelspitze keinen erkennbaren Effekt zwischen Kontrolle und den drei AHL-Behandlungen. Wurzelhaare, wie schon erwähnt, waren bei Yambohnen dieses Alters im axenischen Experiment nicht erkennbar.

3.2.6 Einfluss von AHL auf Pigmentgehalte

Um zu ergründen, ob die Behandlung mit AHL bei Gerste und Yambohne eine Veränderung in den Gehalten der photosynthetisch aktiven Pigmente Chlorophyll a und Chlorophyll b sowie der Carotinoide hervorrufen kann, wurden die Methode und die Gleichungen von Lichtenthaler (1987) herangezogen.

3.2.6.1 Pigmente der Gerste

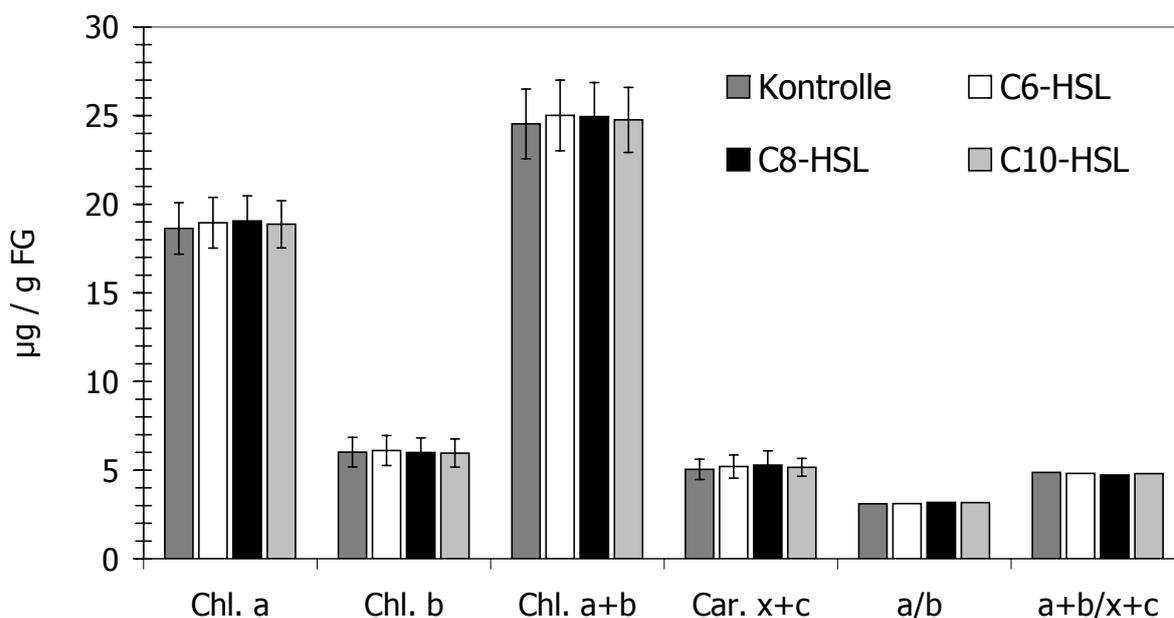


Abbildung 3.19: Pigmentgehalte der Gerste unter AHL-Einfluss.

Ein Vergleich zwischen Kontrolle und den drei Behandlungen mit C6-, C8- und C10-AHL (je 10 μM) zeigte bei den Gerstenpflanzen im axenischen Versuch keinerlei Auswirkungen auf die Konzentration der Chlorophylle und Carotinoide. In Abbildung 3.19 sind die auf $\mu\text{g/g}$ frisches Pflanzenmaterial umgerechneten Pigmentgehalte dargestellt. Das Verhältnis der Chlorophylle a und b lag in dem von Lichtenthaler (1987) beschriebenen Bereich von 3:1 und schwankte nur geringfügig und nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Letzteres traf auch für die bei Gerste gemessenen Konzentrationen an Carotinoiden zu. Dementsprechend konnte auch an den Verhältnissen von Chlorophyll a zu Chlorophyll b (a/b) bzw. der Ratio Gesamtchlorophyll zu Carotinoiden (a+b/x+c) kein entscheidender Einfluss der AHL-Behandlung festgestellt werden.

3.2.6.2 Pigmente der Yambohne

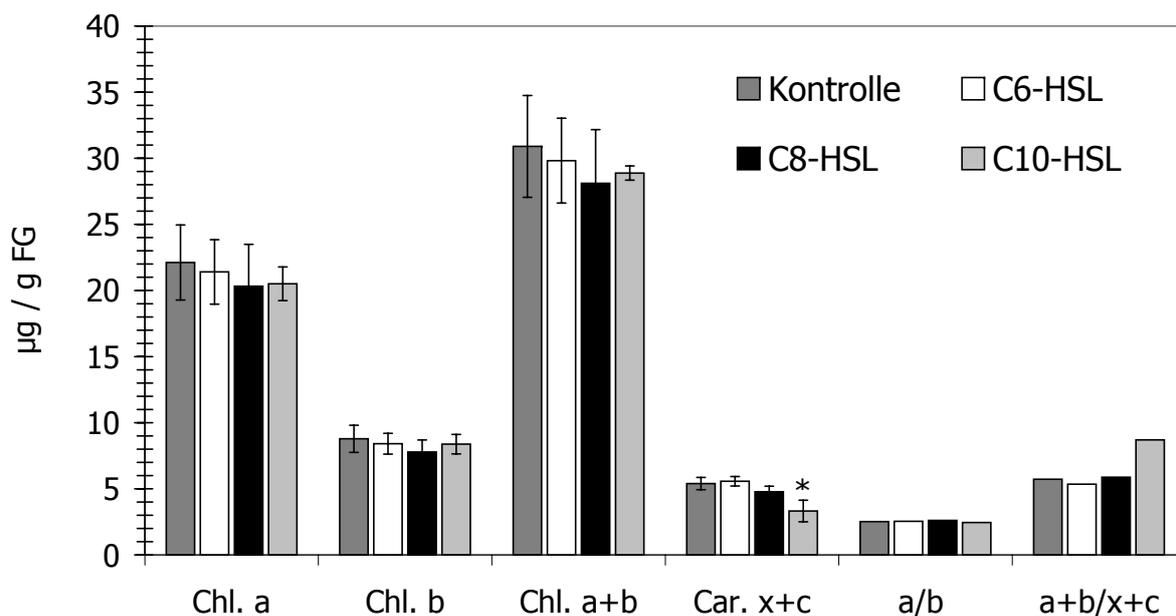


Abbildung 3.20: Pigmentgehalte der Yambohne unter AHL-Einfluss.

Ähnlich wie bei der Gerste ergaben sich bei der Yambohne (Abbildung 3.20) keine signifikanten Effekte einer AHL-Behandlung auf die Konzentration an Chlorophyllen, obwohl ein Trend zu einem geringfügigen Rückgang beobachtet werden konnte. Das Verhältnis Chlorophyll a/b zeigte keine Veränderung durch Zusatz von AHL. Es konnten hingegen Auswirkungen bei den Gehalten an Carotinoiden dokumentiert werden. Unter der Einwirkung von 10 μM C8-HSL erfolgte ein Rückgang des Carotinoidgehaltes im Vergleich zur Kontrolle um circa 0,6 $\mu\text{g/g}$ FG ($p=0,17$). Als Folge einer Behandlung mit 10 μM C10-HSL sank der Gehalt sogar um rund 2 $\mu\text{g/g}$ FG. Dies wurde als signifikant unterschiedlich zu den Kontrollpflanzen ($p=0,03$) klassifiziert. Aufgrund dieses niedrigeren Wertes stieg das Verhältnis von Chlorophyllen zu Carotinoiden (a+b/x+c) bei C10-HSL um das etwa 1,5-fache, während die anderen sich nicht wesentlich unterschieden. Als mögliche Ursache kommen Veränderungen der Parameter Blattfläche und Frischgewicht in Frage. Die absolute Blattfläche in cm^2 war unter C10-HSL im Vergleich zur Kontrolle geringfügig erhöht, ebenso das Frischgewicht der mit der gleichen Substanz behandelten Yambohnen. Daher könnte das Sinken der Carotinoidgehalte bei C10-HSL von einer relativen Verdünnung im Bezug auf gestiegene Fläche und Frischgewicht herrühren. Möglicherweise sind auch Metaboliten des C10-HSL, welches in der Yambohne starkem Abbau unterliegt, für den Rückgang der Carotinoidgehalte verantwortlich.

3.3 Ergebnisse der enzymatischen Assays

Die Ergebnisse der Enzymtests sind im folgenden Abschnitt in Form von Balkendiagrammen mit Standardabweichung dargestellt, welche die spezifische Aktivität des Enzyms, sofern nicht anders vermerkt, als $\mu\text{kat mg}^{-1}$ Protein des Rohextraktes auf der linken Ordinate wiedergegeben. Zusätzlich ist auf der rechten Ordinate der Proteingehalt mit Standardabweichung dargestellt, um die Konzentration der Enzyme im Extrakt zu zeigen. Zur schnellen und übersichtlichen Verdeutlichung der Effekte der AHLs sind im Anhang ab Seite 198 alle Veränderungen der Aktivitäten im Vergleich zur Kontrolle in Darstellungen als Netzdiagramm zusammengefasst, während die Balkendiagramme als exakte Darstellungsform mit Standardabweichungen und den zu den Aktivitäten korrespondierenden Proteingehalten konzipiert sind.

3.3.1 Cytosolische Enzyme der Gerste

3.3.1.1 cGST : CDNB in Gerste

Bei CDNB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol) handelt es sich um das geläufigste Substrat zur Bestimmung der Aktivität von GST, welches für gewöhnlich in den meisten Pflanzenarten die höchsten Konjugationsraten aufweist (Lyubenova et al., 2007). Es stellte auch für die GSTs aus dem cytosolischen Extrakt der Gerste das Substrat mit der höchsten Umsatzrate dar. Wie aus Abbildung 3.21 ersichtlich wird, führte eine AHL-Behandlung in der Wurzel zu einer Erhöhung von +32 % (C8-HSL) bis zu +72 % (C6-HSL) der GST-Aktivität gegenüber diesem Substrat. Die GSTs der Wurzel reagierten in stärkerem Maße als die des Sprosses, in welchem die Umsatzzraten nur bis zu 45 % (C6-HSL) gesteigert wurden. Die deutlichste Steigerung der cGST:CDNB-Aktivität wurde also in beiden Pflanzenteilen durch die Behandlung mit C6-HSL ausgelöst. Die Exposition zu C8-HSL verursachte bei CDNB die geringsten Erhöhungen der GST-Aktivität im cytosolischen Gerstenprotein.

3.3.1.2 cGST : NBC in Gerste

Die Behandlung der Gersten mit AHL führte in den Sprossen und den Wurzeln zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität der GST gegenüber dem Substrat NBC (4-Nitro-Benzylchlorid), wie in Abbildung 3.22 gezeigt. Insbesondere die Aktivitätssteigerung durch C6-HSL im Spross (+72 %) war auffällig, während die Werte bei C8-HSL und C10-

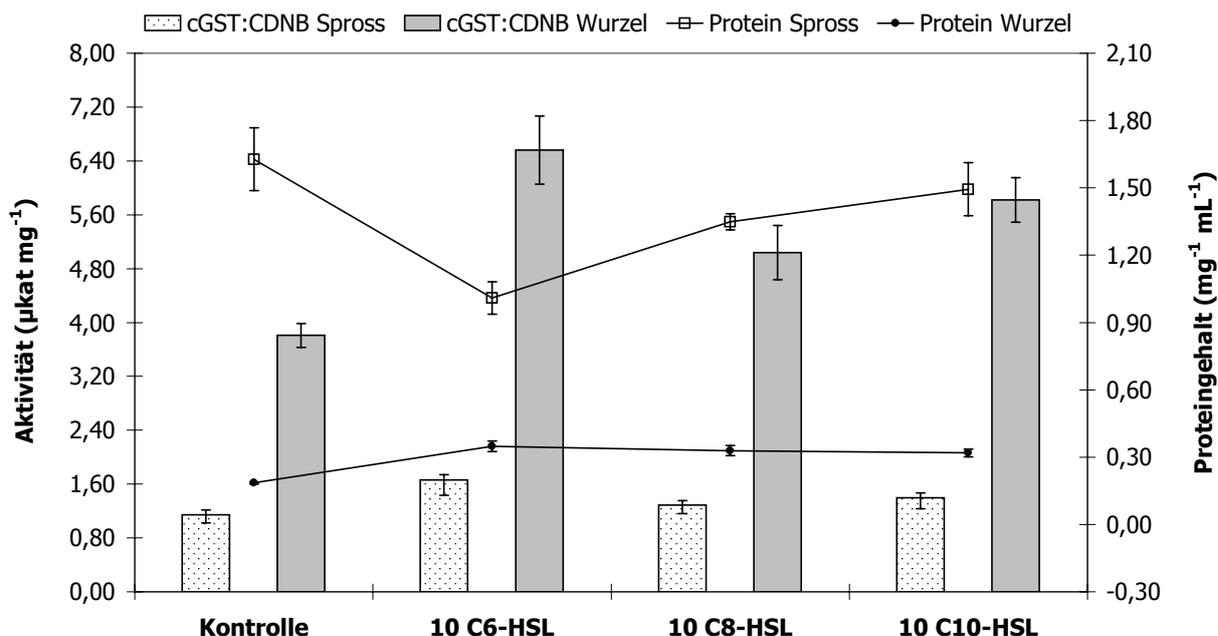


Abbildung 3.21: Spezifische cGST:CDNB-Aktivität in Gerste.

HSL im Bereich der Kontrollmessung lagen. Wie schon bei CDNB bewirkte C6-HSL in der Wurzel die deutlichsten Effekte (+67 %), gefolgt von C10-HSL (+43 %) und schließlich C8-HSL (+25 %).

Insgesamt glich der Einfluss der AHLs auf die cGST:NBC-Aktivität im Cytosol sehr derjenigen von CDNB, bei welcher ebenfalls die stärksten Effekte nach der Behandlung mit C6-HSL festgestellt wurden.

3.3.1.3 cGST : NBOC in Gerste

Auch das Umsatzmuster des Substrates NBOC (4-Nitro-Benzoylchlorid) ähnelte sehr dem des CDNB und des NBC. Erneut zeigten alle spezifischen GST-Aktivitäten unter dem Einfluss von AHL einen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit C8-HSL führte wie bei den beiden vorherigen Substraten in Spross und Wurzel stets zu einer geringeren Aktivitätssteigerung als C6-HSL und C10-HSL. In der Wurzel zeigte sich, dass bei NBOC das C6-HSL (+54 %) und das C10-HSL (+58 %) ähnlich starke Effekte auf die GST ausübten. Die Behandlung mit C6-HSL konnte auch bei NBOC die insgesamt größten Einflüsse auf die GST-Aktivität ausüben.

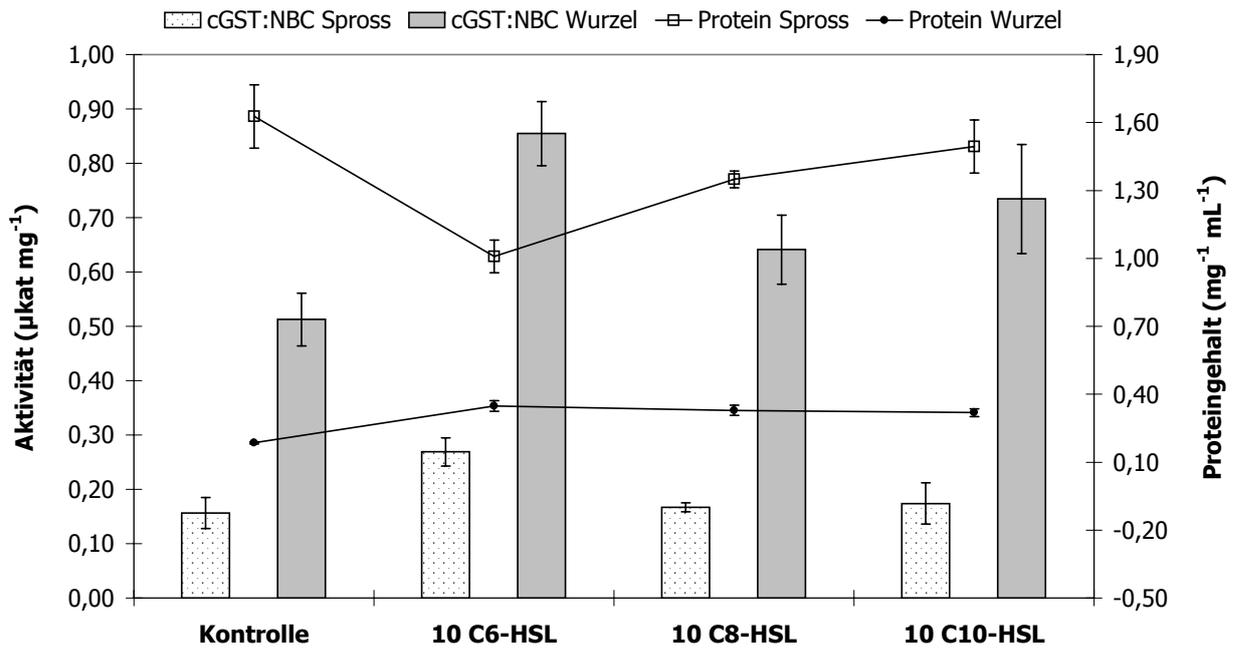


Abbildung 3.22: Spezifische cGST:NBC-Aktivität in Gerste.

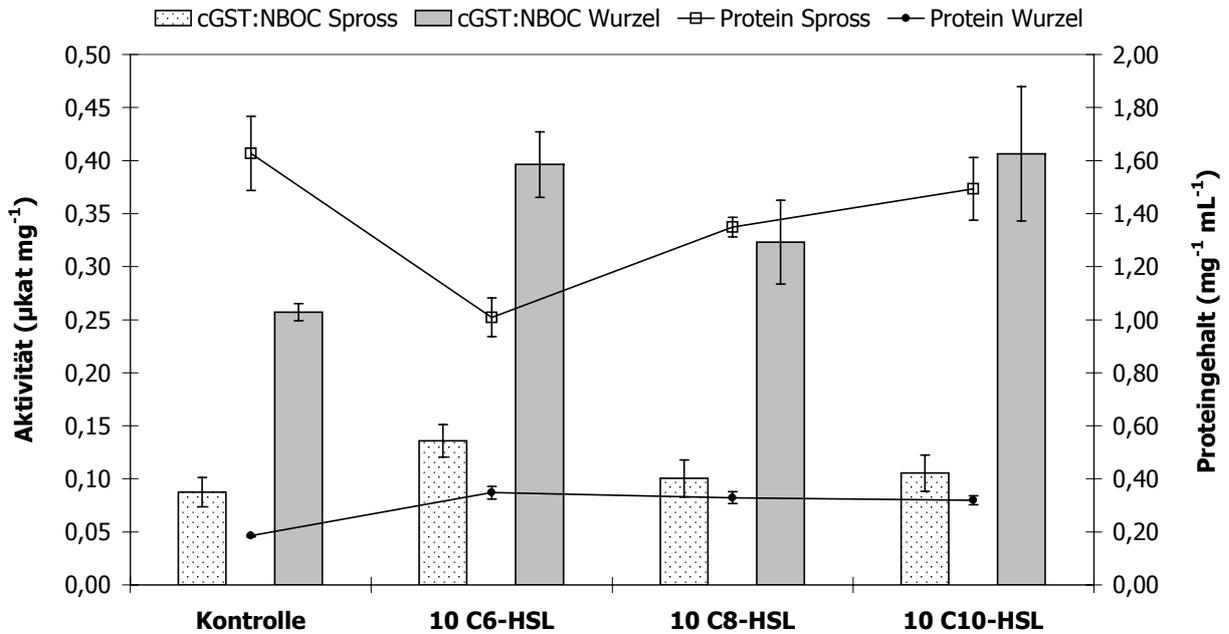


Abbildung 3.23: Spezifische cGST:NBOC-Aktivität in Gerste.

3.3.1.4 cGST : DCNB in Gerste

Anders als bei den vorher getesteten Substraten zeigte sich bei DCNB (1,2-Dichlor-4-nitrobenzol) ein gänzlich anderer Einfluss von AHL auf die Aktivität der GST, besonders in der Wurzel (Abbildung 3.24). Obwohl auch bei DCNB ein steigender Einfluss der AHL-Behandlungen im Spross verzeichnet werden konnte, war dieser gering und nur im Falle von C6-HSL (+71 %) auffällig erhöht. Der interessantere Effekt zeigte sich allerdings in den Wurzelextrakten. Hier führte eine Behandlung mit 10 μM der drei verwendeten AHLs zu einem gleichmäßigen Rückgang der spezifischen GST:DCNB-Aktivität auf jeweils rund 50 % der in den Kontrollen gemessenen Enzymaktivität. Keines der drei AHLs fiel hierbei explizit auf, denn der Rückgang der Aktivität war in allen AHL-behandelten Extrakten annähernd gleichwertig.

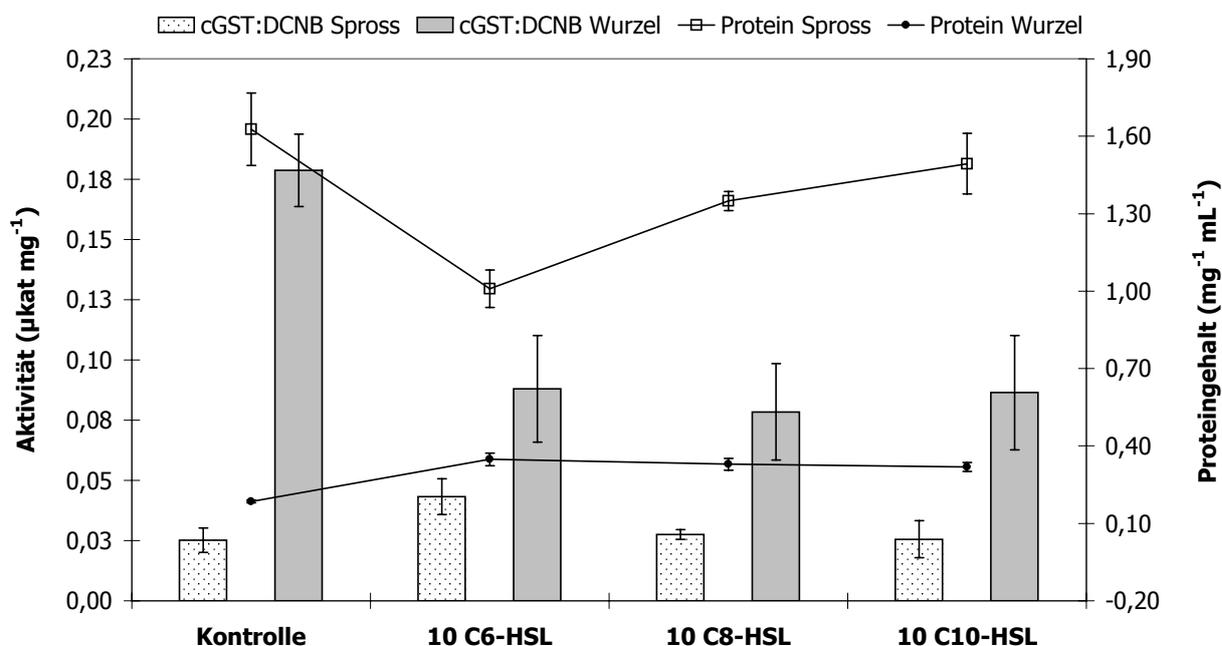


Abbildung 3.24: Spezifische cGST:DCNB-Aktivität in Gerste.

3.3.1.5 cGST : Fluorodifen in Gerste

Das Diphenylether-Herbizid Fluorodifen unterscheidet sich von den anderen Substraten durch eine spezielle Funktion der GST, bei der die Etherbindung des Moleküles geöffnet und anschließend das S-(2-Nitro-4-Trifluoromethylphenyl)-Glutathionkonjugat unter gleichzeitiger Entstehung von 4-Nitrophenol gebildet wird (Lamoureux and Rusness, 1989). Da in zu niedrigen pH-Bereichen das 4-Nitrophenol auch nichtenzymatisch ge-

bildet wird (R. Scalla, persönliche Kommunikation), wurde, um dies auszuschließen, die Methode nach Scalla und Roulet (2002) angewandt. Wie in Abbildung 3.25 ersichtlich, gleicht der Einfluss von AHL auf die cGST:Fluorodifen-Aktivität in Gerste sehr den für das Substrat DCNB ermittelten Effekten. Auch hier wurde eine Steigerung der Aktivität im Spross beobachtet, die nach der Behandlung mit C6-HSL mit +68 % am deutlichsten war. In den Wurzelextrakten der Gerste hingegen führte die Behandlung mit jedem der getesteten AHLs zu einem gleichmäßigen Rückgang der cGST-Aktivität gegenüber Fluorodifen auf rund 60 % des Ausgangswertes der Kontrolle.

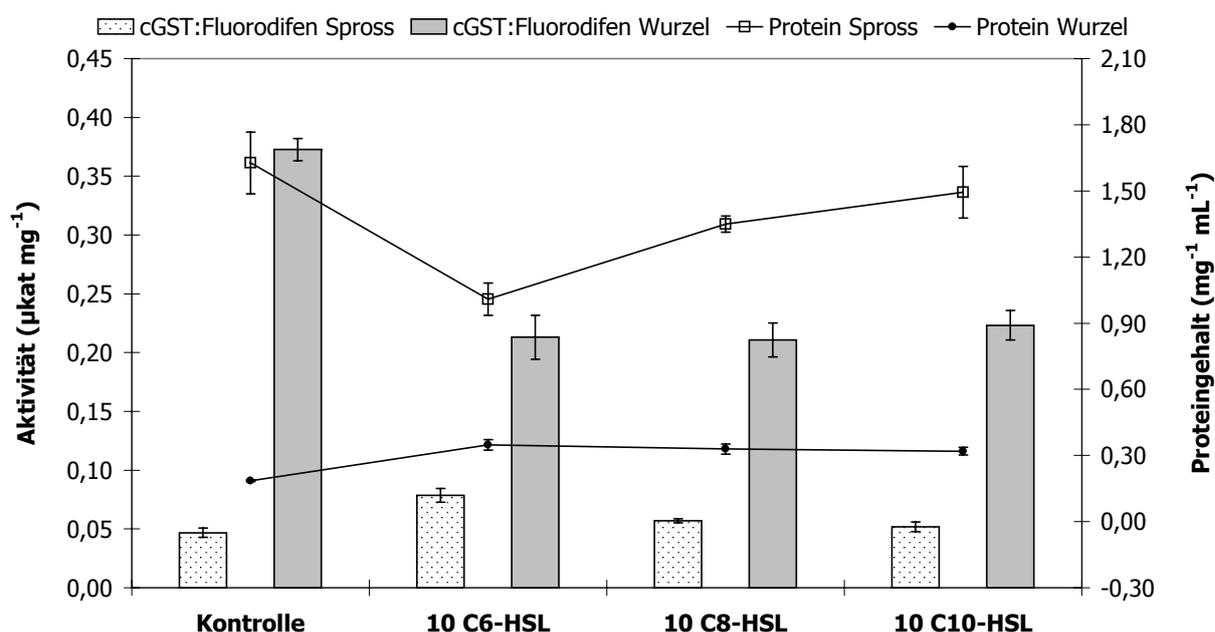


Abbildung 3.25: Spezifische cGST:Fluorodifen-Aktivität in Gerste.

3.3.1.6 SOD der Gerste im Cytosol

Wie bereits erwähnt, steht die SOD (EC 1.15.1.1) bei der Abwehr von oxidativem Stress in vorderster Reihe (Alscher et al., 2002). Das Prinzip des Assay beruht darauf, dass SOD, die Superoxidradikale zu H₂O₂ konvertiert, eine Unterdrückung der Adenochrom-Bildung bewirkt, welches sich ohne die Einwirkung der SOD aus Adrenalin durch Autoxidation im basischen Milieu mittels dem Intermediat Superoxidradikalanion bildet (Misra und Fridovich, 1971; Kröniger 1994). Die SOD in den cytosolischen Extrakten der Gerste, dargestellt in Abbildung 3.26, zeigte sich in der Wurzel stark durch die Behandlung mit AHL beeinflusst. Hier sanken die Aktivitäten der SOD auf rund ein Drittel (C8-HSL) bis etwa ein Viertel (C6-HSL, C10-HSL) der in der Kontrolle gemessenen Aktivität. Im Spross

hingegen konnte keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

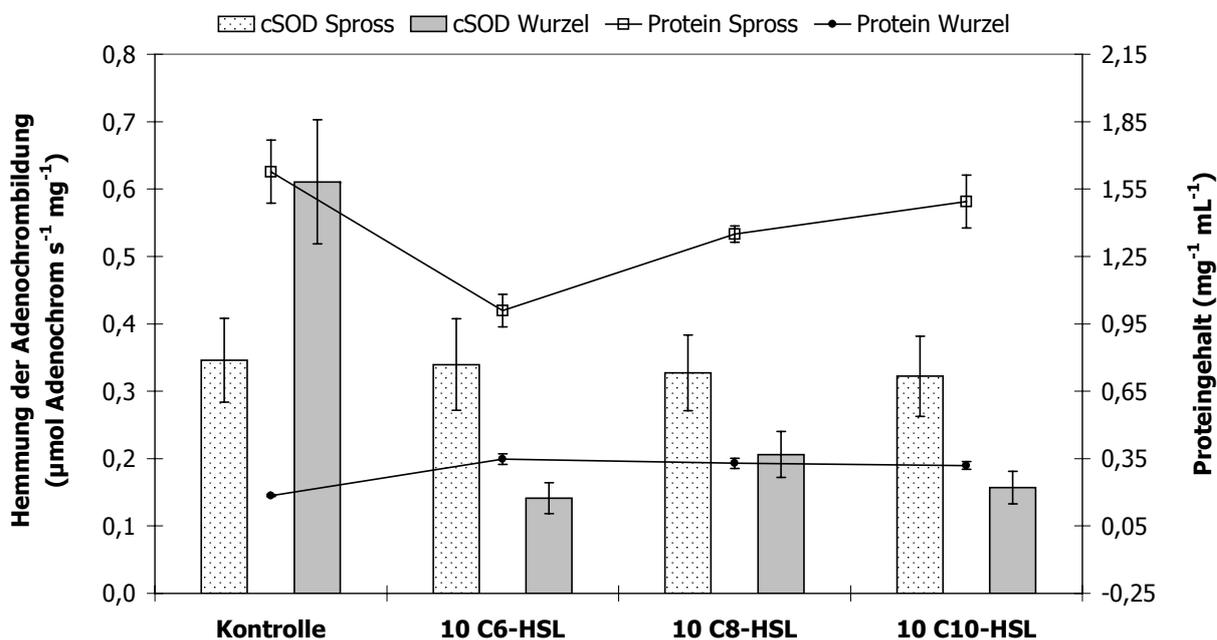


Abbildung 3.26: Spezifische cytosolische SOD-Aktivität in Gerste.

3.3.1.7 POX der Gerste im Cytosol

Die Aktivität der Guajacol-Peroxidase im Cytosol der Gerste (Abbildung 3.27) zeigte einen Anstieg in Spross und Wurzel. Während im Spross eine Steigerung zwischen +14 % (C10-HSL) und +29 % (C6-HSL) eintrat, so erhöhte sich die Aktivität der POX in der Wurzel um +64 % (C8-HSL) bis zu +84 % (C6-HSL). Es kann hier von einer Kompensationsreaktion der POX gegenüber erhöhten Konzentrationen an H_2O_2 ausgegangen werden.

3.3.1.8 GPOX der Gerste im Cytosol

Glutathionperoxidase-Aktivität im cytosolischen Extrakt der Gerste (Abbildung 3.28) folgte in seinem Muster den bei SOD festgestellten Veränderungen. Auch hier war der starke Rückgang der Aktivität in der Wurzel deutlich erkennbar. Die GPOX-Aktivitäten betragen hier unter dem Einfluss von AHL in der Wurzel nur noch rund 50 % der in den Kontrollen gemessenen Werte, wobei die Behandlung mit C6-HSL in der Wurzel mit nur 44 % des Kontrollwertes den stärksten und C10-HSL mit 52 % den vergleichsweise gerings-

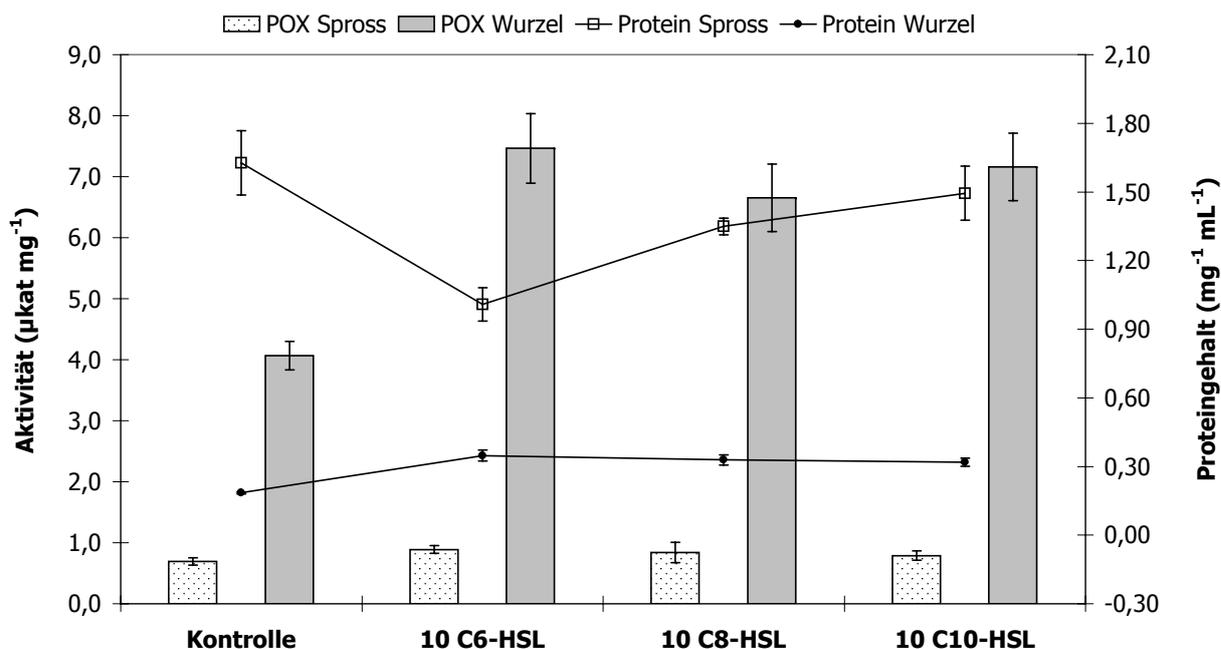


Abbildung 3.27: Spezifische cytosolische POX-Aktivität in Gerste.

ten Aktivitätsverlust auslöste. Auch im Spross erwies sich C6-HSL als das am stärksten und C10-HSL als das am schwächsten auf die GPOX wirkende AHL, allerdings kam es im Spross, ganz im Gegensatz zur Wurzel, zu einer Erhöhung der Enzymaktivität, wie es in ähnlicher Weise schon bei den GST-Substraten DCNB und Fluorodifen festgestellt werden konnte.

3.3.1.9 APOX der Gerste im Cytosol

Das Enzym Ascorbatperoxidase stellt den Startpunkt des Ascorbat-Glutathionzyklus dar, welcher der Entgiftung potentiell schädlicher Derivate des Sauerstoffs dient. Die Aktivität dieses Enzymes (Abbildung 3.29) in den Sprossextrakten der Gerste zeigte sich durch AHL-Gabe gesteigert. Wie schon bei den vorher besprochenen Enzymen beobachtet, verursachte C6-HSL im Spross auch bei der APOX mit +223 % die deutlichste Steigerung der Aktivität, während C10-HSL +180 %, aber C8-HSL eine Erhöhung von nur +68 % bewirken konnte. Die AHL-Effekte auf die APOX in der Wurzel zeigten sich sehr uneinheitlich. Während C6-HSL und C10-HSL eine Erhöhung der APOX-Aktivität bewirkten, führte die Behandlung mit C8-HSL zu einem gegenteiligen Effekt. Die hohe Schwankungsbreite der APOX-Ergebnisse sollte dabei berücksichtigt werden.

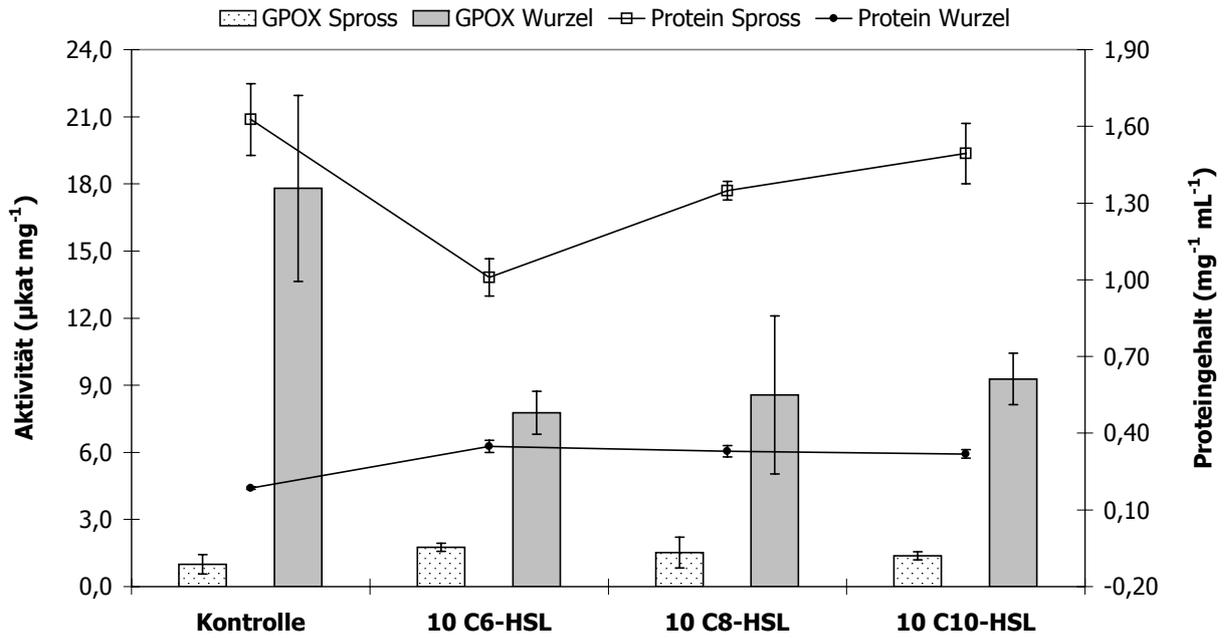


Abbildung 3.28: Spezifische cytosolische GPOX-Aktivität in Gerste.

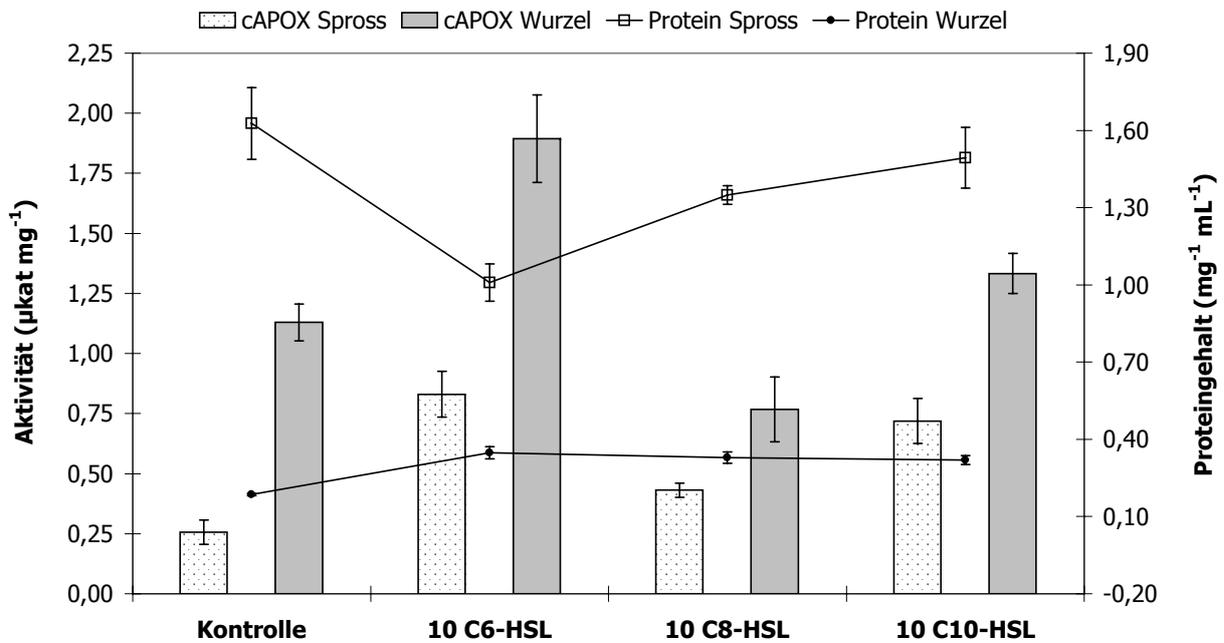


Abbildung 3.29: Spezifische cytosolische APOX-Aktivität in Gerste.

3.3.1.10 MDHAR der Gerste im Cytosol

Monodehydroascorbatreduktase überführt MDHA-Radikale im Ascorbat-Glutathionzyklus wieder in Ascorbat und ist dabei unabhängig von GSH. Die Wirkungen der AHL-Behandlungen auf dieses Enzym im Cytosol (Abbildung 3.30) zeigten Ähnlichkeit zu GPOX, vor allem in den Sprossextrakten, wo ebenfalls C6-HSL (+75 %) die höchste und C10-HSL die niedrigste Aktivitätssteigerung (+26 %) auslöste. In den Wurzelextrakten hingegen wurde eine bei allen AHL-Behandlungen sehr gleichmäßige Reduktion der MDHAR-Aktivität auf circa zwei Drittel der in den Kontrollen gemessenen Aktivität festgestellt.

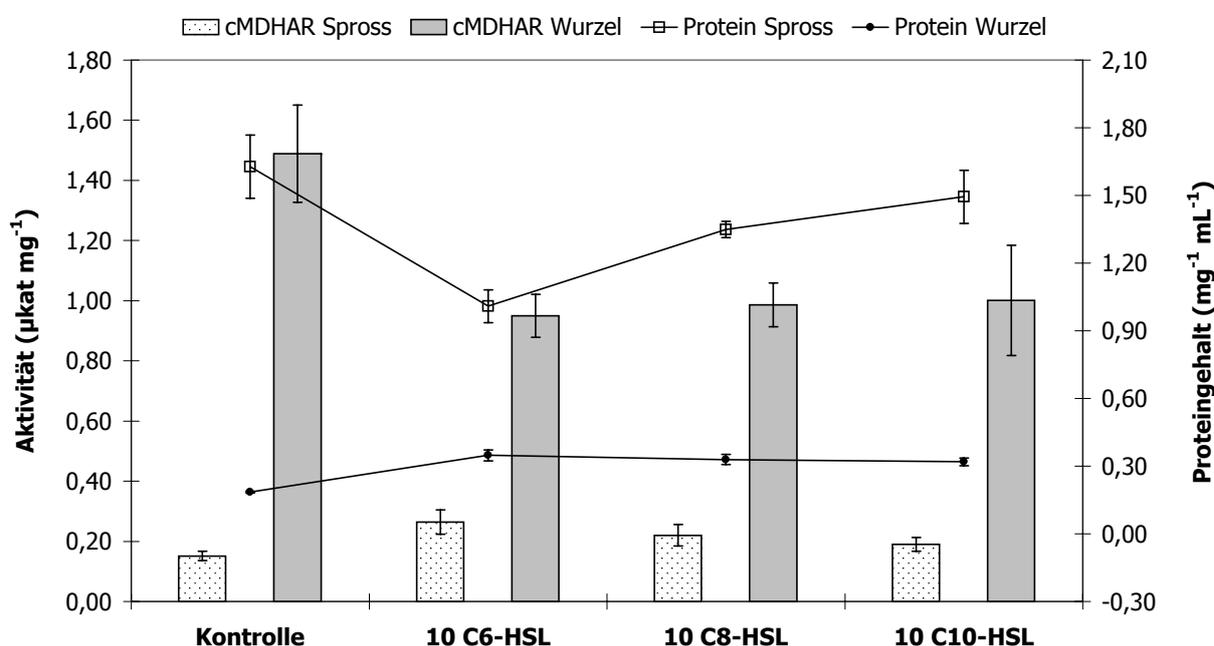


Abbildung 3.30: Spezifische cytosolische MDHAR-Aktivität in Gerste.

3.3.1.11 DHAR der Gerste im Cytosol

Das Enzym Dehydroascorbatreduktase (EC 1.8.5.1) dient der Reduktion von DHA zu Ascorbat und ist hierbei abhängig von GSH. Anders als bei den meisten bisher besprochenen cytosolischen Enzymen mit antioxidativer Wirkung erfolgte bei DHAR (Abbildung 3.31) keine Reduktion der Aktivität in der Wurzel, sondern eine geringfügige Steigerung um +13 % (C6-HSL) bis +22 % (C10-HSL). Die auffälligste Wirkung von AHL auf DHAR zeigte sich allerdings im Spross, wo Steigerungen der Aktivität zwischen +57 % (C6-HSL) und +284 % (C10-HSL) beobachtet wurden. Anders als bei den anderen Enzymen im Cy-

tosol der Gerste übte C6-HSL hier die schwächste Wirkung auf die Aktivität aus, während die deutlichsten Effekte bei C10-HSL auftraten.

3.3.1.12 GR der Gerste im Cytosol

Glutathionreduktase (EC 1.6.4.2) schließt den Ascorbat-Glutathionzyklus durch Bereitstellung von GSH und Reaktionsäquivalent NADP. Die Gabe von C8-HSL und C10-HSL löste bei der cytosolischen GR der Gerste (Abbildung 3.32) keine erheblichen Veränderungen der Aktivität dieses Enzyms aus, welche meist im Bereich der Kontrolle angesiedelt war. Einzig C6-HSL zeigte eine nennenswerte Wirkung auf GR. Unter der Einwirkung dieser Substanz stieg die Aktivität der GR im Spross um +33 % und um +26 % in der Wurzel. Dies lässt den Schluss zu, dass der Pool an Glutathion trotz der beschriebenen Änderungen der Aktivitäten der antioxidativ wirksamen Enzyme durch C8-HSL und C10-HSL noch keine Beeinflussung erfahren hatte. Andererseits zeigte sich bei C6-HSL ein Einfluss auf die GR, was wiederum mit der Beobachtung korrelierte, dass gerade dieses AHL bei den meisten anderen Enzymen ebenfalls die stärkste Wirkung ausübte.

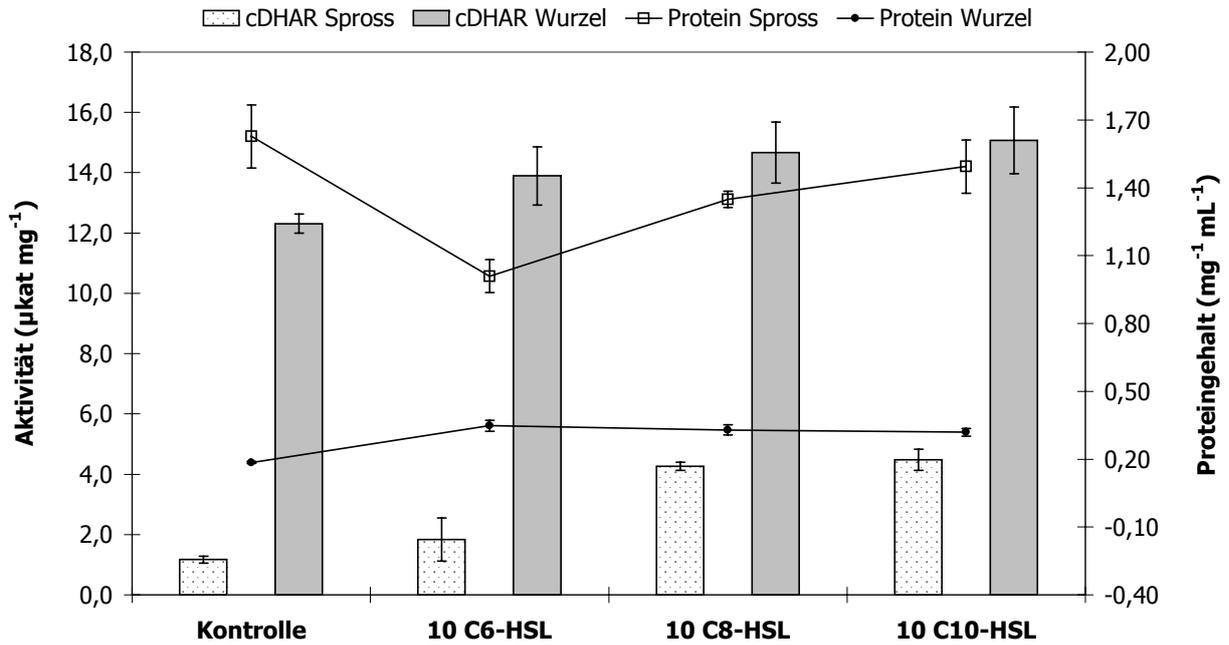


Abbildung 3.31: Spezifische cytosolische DHAR-Aktivität in Gerste.

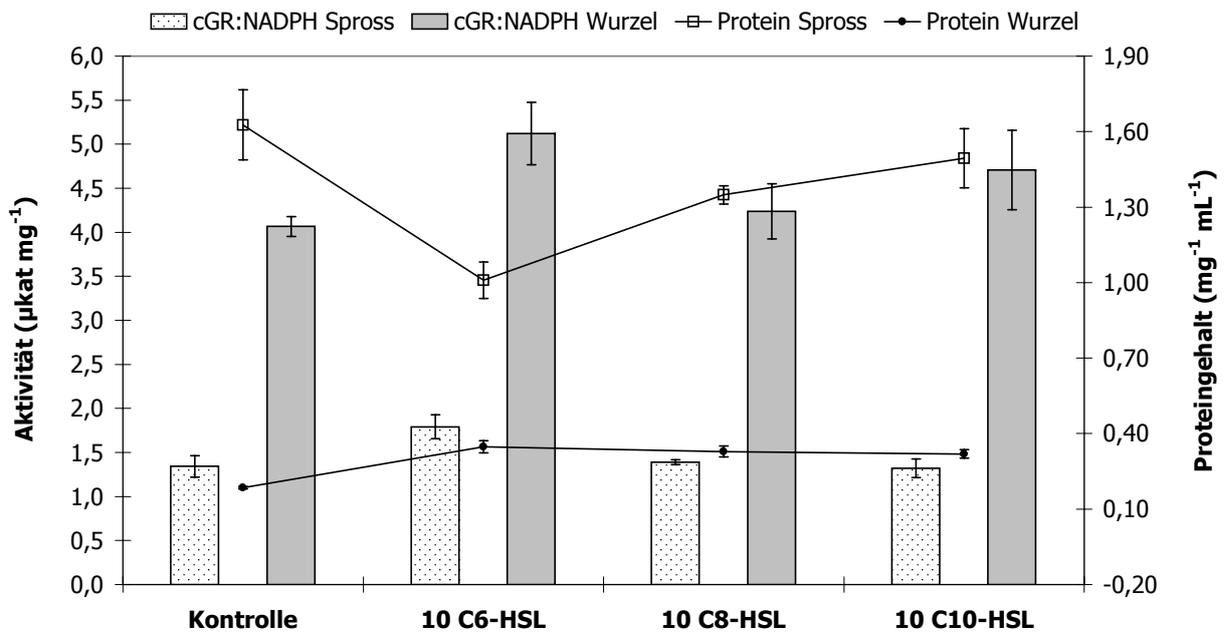


Abbildung 3.32: Spezifische cytosolische GR-Aktivität in Gerste.

3.3.2 Mikrosomale Enzyme der Gerste

3.3.2.1 mGST : CDNB in Gerste

In den Mikrosomen aus Gerste (siehe hierzu die Kapitel 1.2.3.9 und 2.2.7) änderte sich die mGST:CDNB-Aktivität nach AHL-Behandlung (Abbildung 3.33) im Vergleich zum Cytosol nur geringfügig. In beiden Pflanzenteilen bewegten sich die Umsatzraten für CDNB unter C6-HSL und C10-HSL im Bereich der Kontrollmessung, während ein schwacher Effekt des C8-HSL beobachtet werden konnte, der sich in einer Erhöhung der Aktivität im Spross (+14 %) und in der Wurzel (+24 %) bemerkbar machte. Im Gegensatz zum Cytosol war in den Mikrosomen das CDNB hinter NBC und NBOC nur das drittstärkste Substrat.

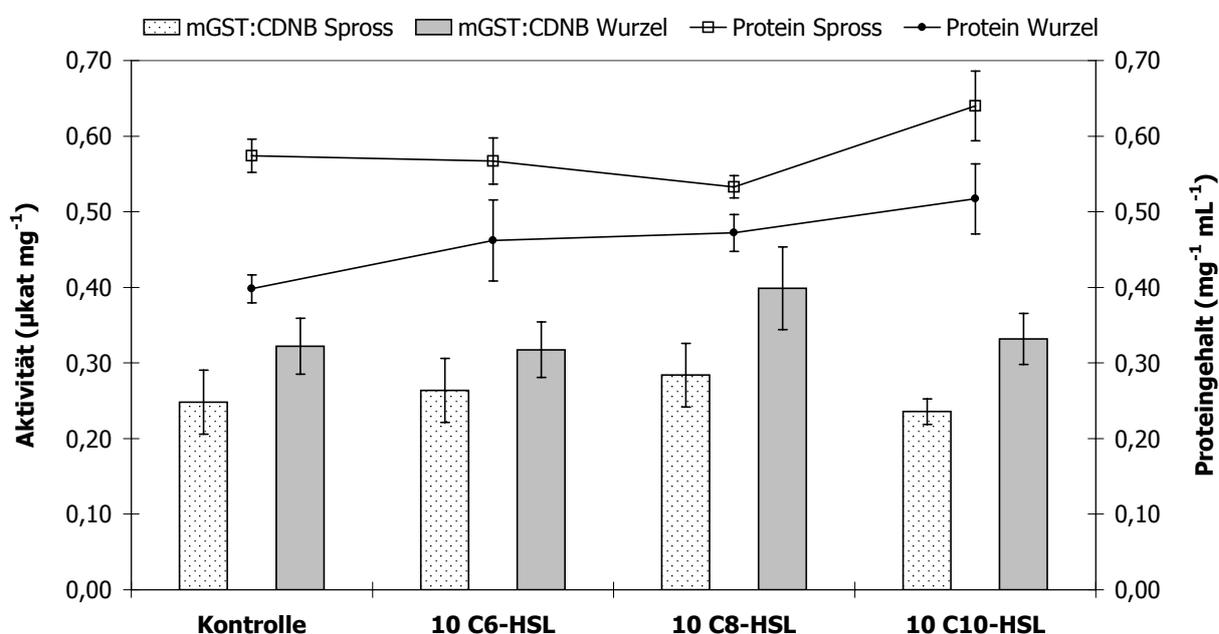


Abbildung 3.33: Spezifische mGST:CDNB-Aktivität in Gerste.

3.3.2.2 mGST : NBC in Gerste

In der mikrosomalen Fraktion des Gerstensprosses kam es zu einem relativ gleichmäßigen Anstieg der mGST:NBC-Aktivität (Abbildung 3.34) nach AHL-Behandlung zwischen +74 % und +93 %, wobei das C6-HSL die stärkste Veränderung hervorrief. In der Wurzel der Gerste war jedoch die mGST:NBC-Aktivität am stärksten durch das C10-HSL beeinflusst, wo es zu einer Erhöhung um +148 % im Vergleich zur Kontrolle kam, während C6-HSL (+46 %) und C8-HSL (+95 %) geringere, aber dennoch deutliche Steigerungen

der Aktivität verursachten. Die Effekte gleichen denen des cytosolischen Extraktes, bei dem es ebenfalls zu einer Steigerung der NBC-Umsatzraten in beiden Pflanzenteilen kam. NBC stellte in den Gerstenmikrosomen zusammen mit NBOC, welches im Mittel annähernd gleiche Raten zeigte, das Substrat mit den höchsten GST-Aktivitäten dar.

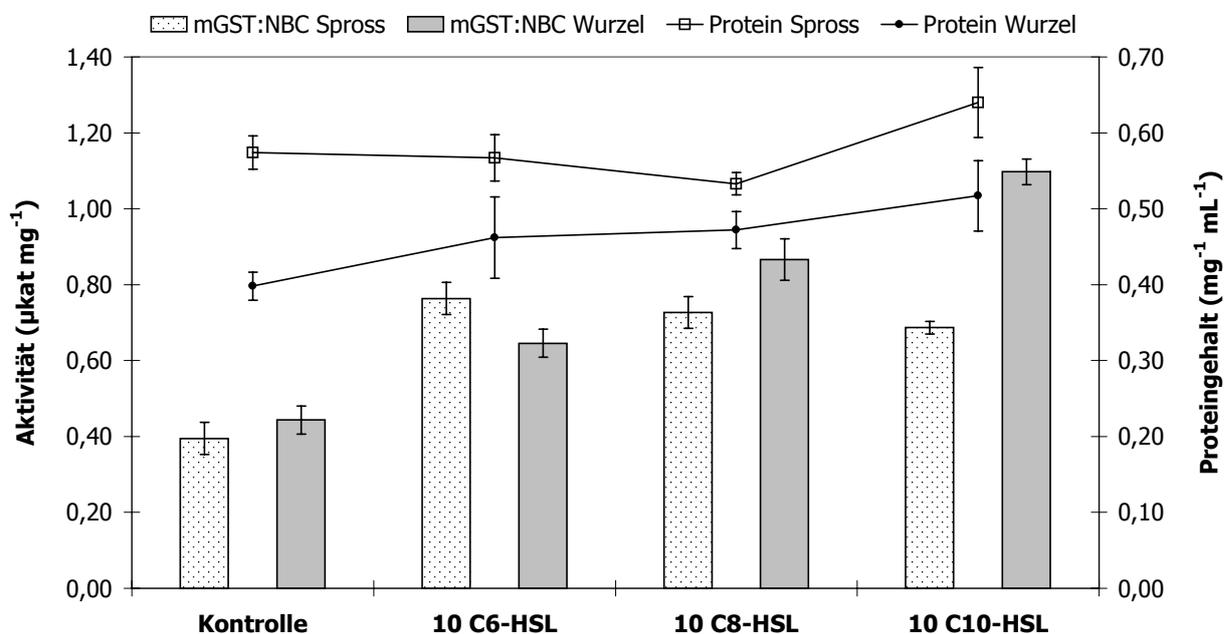


Abbildung 3.34: Spezifische mGST:NBC-Aktivität in Gerste.

3.3.2.3 mGST : NBOC in Gerste

Die mGST:NBOC-Aktivität in den Gerstenmikrosomen zeigte sich durch AHL überwiegend negativ beeinflusst. Im Spross kam es bei allen verwendeten AHLs zu einer ungefähren Halbierung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, wobei hier der stärkste Einfluss von C8-HSL ausging, welches die Aktivität auf 42 % des Ausgangswertes reduzierte. In den Wurzelextrakten hingegen gab es kein einheitliches Bild, denn während C6-HSL und C8-HSL zu einem Rückgang der mGST:NBOC-Aktivität auf 69 % bzw. 79 % des Kontrollwertes führten, erhöhte sich die Aktivität in den mit C10-HSL behandelten Gerstenwurzeln auf 157 % des Kontrollwertes. Die Effekte von AHL auf die mGST:NBOC-Aktivität in den mikrosomalen Wurzelextrakten der Gerste sind allerdings mit relativ hohen Abweichungen belastet. Das Substrat NBOC lieferte jedoch neben NBC im mikrosomalen Extrakt insgesamt die höchsten GST-Umsatzraten.

3.3.2.4 mGST : DCNB in Gerste

In der mikrosomalen Fraktion von Gerste konnte keine mGST-Aktivität für das Substrat DCNB nachgewiesen werden.

3.3.2.5 mGST : Fluorodifen in Gerste

Die Auswirkungen einer AHL-Behandlung auf die GST:Fluorodifen-Aktivität glichen sich im cytosolischen und mikrosomalen Extrakt auffällig. Wie auch bei den cytosolischen Enzymen beobachtet, kam es im Spross zu einem Anstieg des mGST:Fluorodifen-Umsatzes unter dem Einfluss der AHLs, wobei der geringste Effekt wie im Cytosol bei C10-HSL zu beobachten war (+10 %), während C6-HSL und C8-HSL eine etwa gleichwertige Steigerung der Aktivität um rund +30 % verursachten. In der Wurzel hingegen war die mGST-Aktivität gegenüber Fluorodifen nach den AHL-Behandlungen um circa 20 % reduziert. Wie bereits erwähnt, glich das Muster dem cytosolischen Extrakt, bei welchem die Effekte allerdings stärker ausgeprägt waren.

3.3.2.6 Mikrosomale SOD der Gerste

SOD der Mikrosomen konnte aus materialtechnischen Gründen (Verfügbarkeit der Katalase) nicht bestimmt werden.

3.3.2.7 Katalase der Gerste

Die Katalase (EC 1.11.1.6) aus den Mikrosomen der Gerste zeigte erhebliche Änderungen in ihrer Aktivität nach der Behandlung mit AHL (Abbildung 3.37). Im Spross bewirkten alle drei AHLs eine Reduktion der Katalase-Aktivität bis fast um die Hälfte, wobei C8-HSL (78 % des Kontrollwertes) den schwächsten Effekt auslöste. Ein noch deutlicherer Effekt der AHL-Behandlung wurde in den Wurzelfractionen gemessen, wo die Aktivität des Enzymes eine Steigerung von +100 % bis hin zu +139 % erfuhr. Die auffällig gegensätzliche Reaktion der Katalase kann als Kompensationsreaktion zum Cytosol interpretiert werden, wo es bei den Enzymen des Ascorbat-Glutathionzyklus oft zu einem Rückgang der Aktivität in der Wurzel, aber zu einem Anstieg im Sprossextrakt kam.

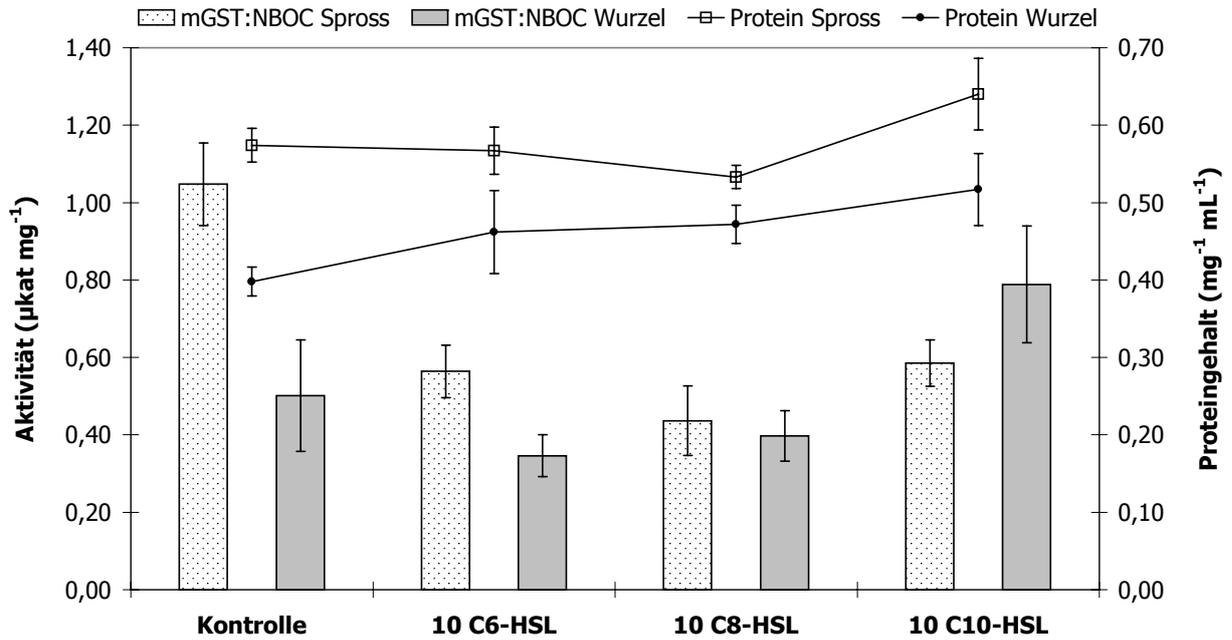


Abbildung 3.35: Spezifische mGST:NBOC-Aktivität in Gerste.

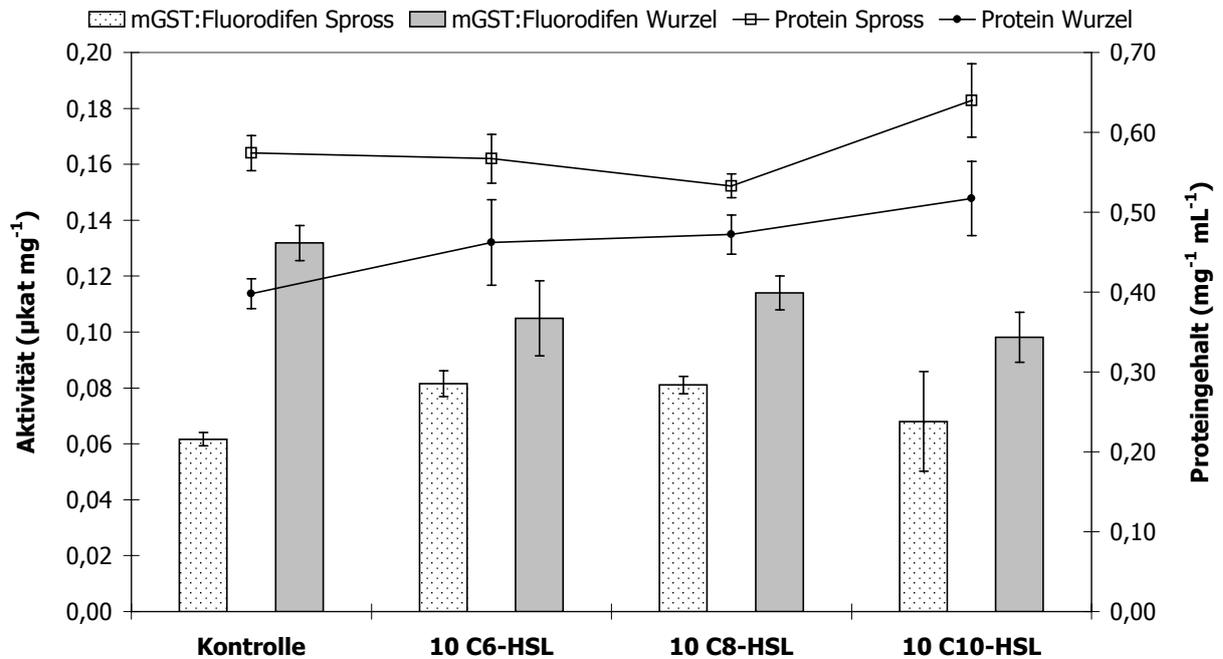


Abbildung 3.36: Spezifische mGST:Fluorodifen-Aktivität in Gerste.

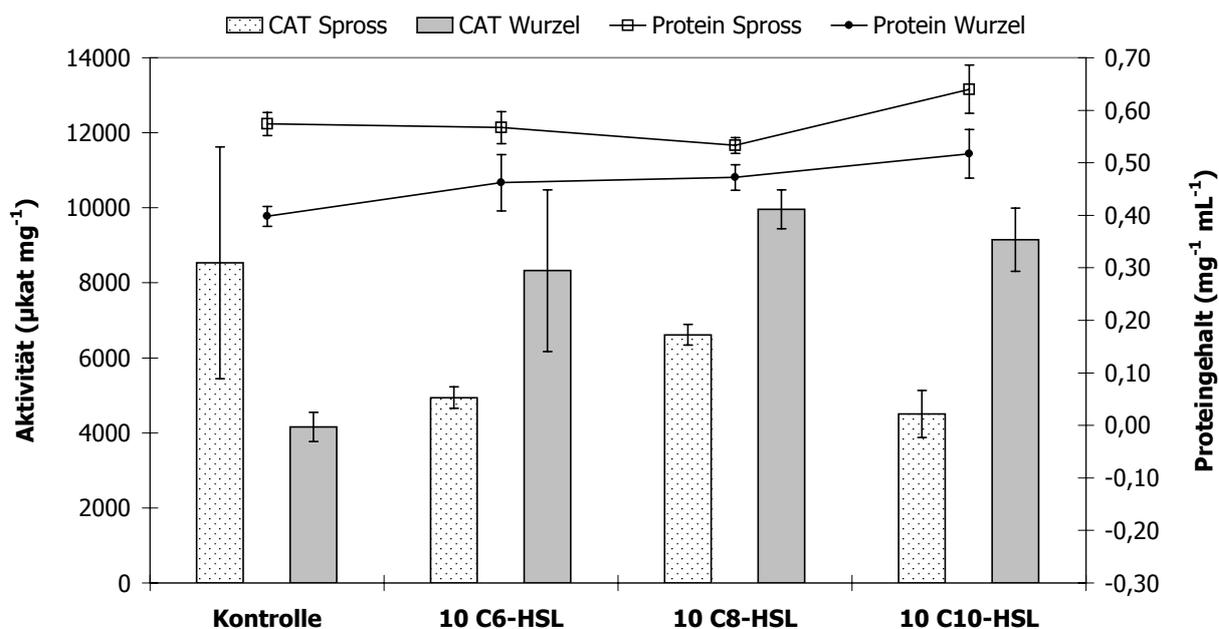


Abbildung 3.37: Spezifische Katalase-Aktivität der Gerste.

3.3.2.8 Mikrosomale APOX der Gerste

Trotz wiederholter Messung mit Abwandlungen der Konzentration an Substraten, Verdünnung der Mikrosomen oder Variation des Enzymgehaltes im Testansatz war es nicht möglich, die Aktivität der APOX (EC 1.11.1.11) im mikrosomalen Extrakt zu bestimmen. Eine erste naheliegende Erklärung für diese Beobachtung erschließt sich bei Berücksichtigung der typischen Eigenschaften der APOX. Hierzu zählt nämlich die ausgesprochene Instabilität des Enzymes bei Abwesenheit von Ascorbat. Bei Ascorbat-Konzentrationen unter 20 μM geht die APOX-Aktivität rapide verloren, wobei cAPOX und mAPOX allerdings zu den stabileren Formen zählen (Shigeoka et al., 2002). Da jedoch die hier angewandte Extraktionsmethode im Cytosol Aktivität zeigte, muss nach weiteren Ursachen gesucht werden. Hierzu kann die Betrachtung des Verlaufes der Messungen hilfreich sein, welcher bei mikrosomalen Fraktionen der Gerste und Yambohne linear korrelierte Geraden mit hohen und stabilen Werten im positiven Verlaufsbereich lieferte. Der Test zur Messung der APOX-Aktivität nach Vanacker et al. (1998) bestimmt allerdings die enzymatisch bedingte Abnahme des Ascorbats in der Lösung und sollte somit zu einem negativen δx des Testverlaufes führen. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann bei Chen und Asada (1992) gefunden werden, welche die Möglichkeit der Inhibition von APOX durch Thiole beschreiben. Thiole wie Glutathion, Mercaptoethanol, Cystein oder Dithiothreit (DTT) allein inaktivieren das Enzym zwar nicht, doch unter Anwesenheit von H_2O_2 , wie hier im

Testansatz, werden diese durch APOX zu Thiylradikalen oxidiert. Die Inaktivierung der APOX ist hierbei die Folge der Interaktion der Thiylradikale mit dem Enzym an dessen Reaktionszentrum. Wie im Kapitel 2.2.7 beschrieben, enthält der Puffer, in dem die Mikrosomen aufgenommen werden, das Thiol Dithioerythrit (DTE), ein Strukturisomer des DTT, welches bei Chen und Asada (1992) als effektivster APOX-Inhibitor aller getesteten Thiole beschrieben wird. Der positive Verlauf der Adsorption im Test erklärt sich durch die Reaktion der Thiylradikale mit ungesättigten Fettsäuren der Mikrosomen, in deren Verlauf das Pentadienylradikal mit seiner starken und charakteristischen Absorption bei 280 nm (APOX-Test: 290 nm) gebildet wird (Schwinn et al., 1998). Der Puffer für die cytosolischen Enzyme enthielt kein DTE, zur Erhaltung der Integrität und Lagerfähigkeit der Mikrosomen war es jedoch unabdingbar.

3.3.2.9 Mikrosomale MDHAR der Gerste

Der Verlauf der MDHAR-Aktivitäten in den Gerstenmikrosomen (Abbildung 3.38) kam dem beim Cytosol festgestellten Muster recht nahe. Besonders der Rückgang der Umsatzraten in der Wurzel bewegte sich mit Werten von 62 % bis 70 % der Kontrolle in einem sehr ähnlichen Bereich. Im Spross hingegen konnten weniger eindeutige Effekte nachgewiesen werden. Während unter der Behandlung mit C8-HSL und C10-HSL jeweils eine tendenzielle Erhöhung der Aktivität um +13 % bzw. +56 % auftrat, sank diese unter C6-HSL auf 87 % des Wertes der Kontrollmessung. Mit Ausnahme bei C10-HSL festgestellten Messwert überschritten sich die Werte unter C6-HSL und C8-HSL im Spross mit dem Schwankungsbereich der Kontrolle.

3.3.2.10 Mikrosomale DHAR der Gerste

Auch die Veränderung der Aktivität des Enzymes DHAR nach AHL-Behandlung glich annähernd den im Cytosol nachgewiesenen Effekten; vergleiche hierzu Abbildung 3.39. Es konnte ein Anstieg der Aktivität der mikrosomalen DHAR im Spross nachgewiesen werden, wobei einmal mehr der stärkste Effekt von C6-HSL (+150 %) ausging, welches hiermit den Umsatz rund doppelt so stark anregte wie C8-HSL und C10-HSL. In den mikrosomalen Wurzelextrakten der Gerste ergab sich hingegen eine eher gleichmäßige Reduktion der DHAR-Aktivität auf 79 % bis 70 % des Kontrollwertes.

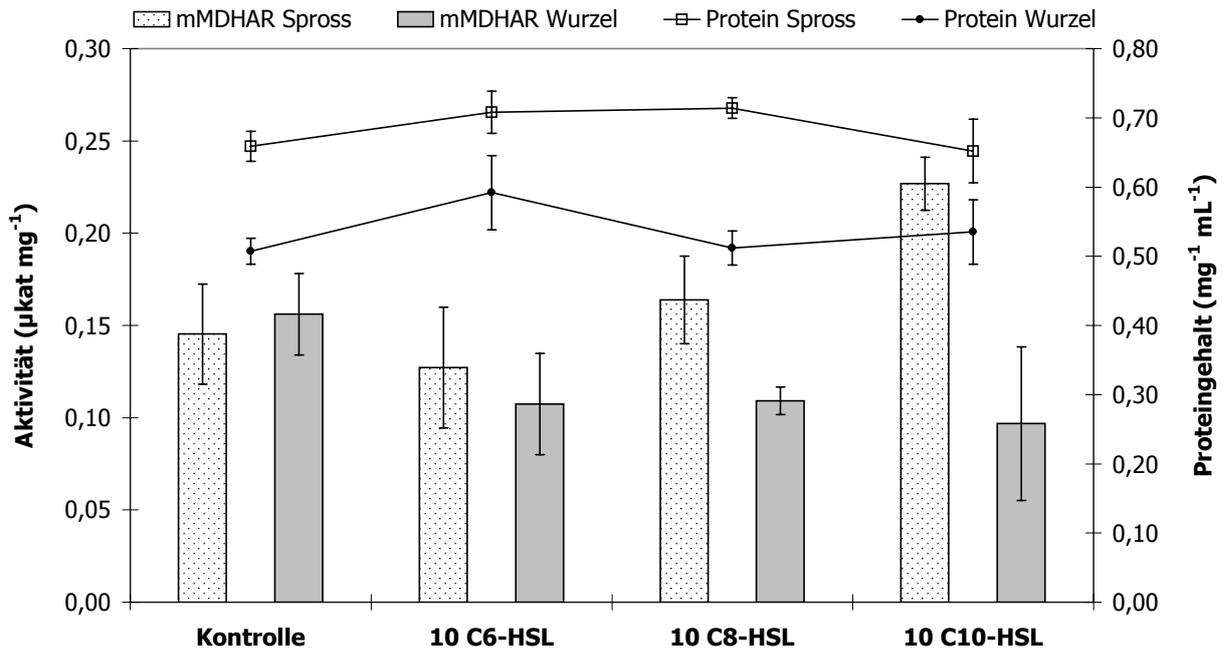


Abbildung 3.38: Spezifische mikrosomale MDHAR-Aktivität in Gerste.

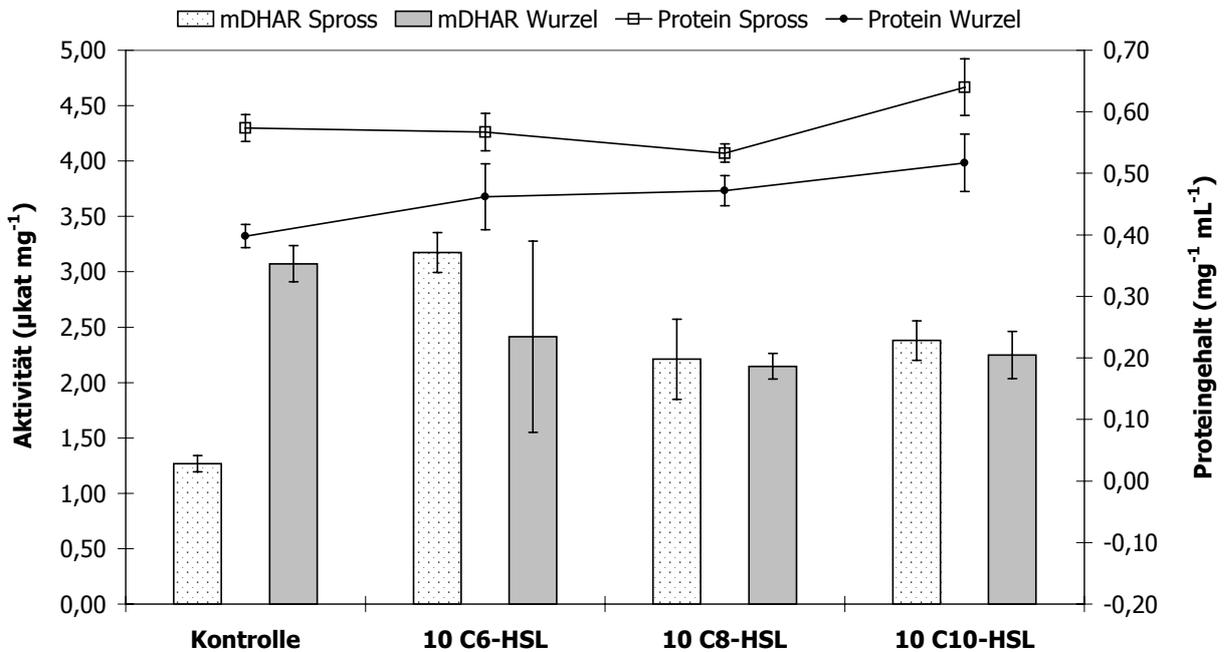


Abbildung 3.39: Spezifische mikrosomale DHAR-Aktivität in Gerste.

3.3.2.11 Mikrosomale GR der Gerste

Das Muster der mikrosomalen GR (EC 1.6.4.2) unter AHL-Einfluss ist in Abbildung 3.40 dargestellt. Übereinstimmend mit MDHAR und DHAR konnte bei der GR in den Wurzelmikrosomen ein Rückgang der Aktivität gemessen werden, welcher sich auf 54 % bis 33 % der Kontrolle belief. Im Spross lagen alle Werte im Schwankungsbereich der Kontrollmessung, ein Trend zur Abnahme der GR-Aktivität auf im Mittel etwa 80 % konnte jedoch festgestellt werden.

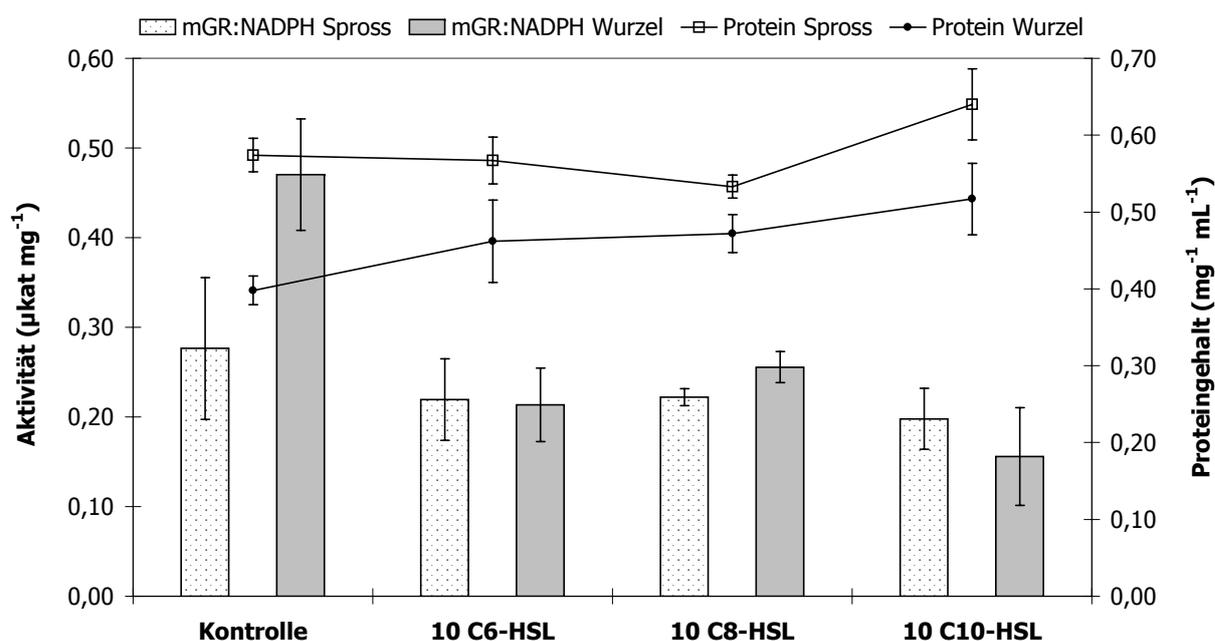


Abbildung 3.40: Spezifische mikrosomale GR-Aktivität in Gerste.

3.3.3 Cytosolische Enzyme der Yambohne

3.3.3.1 cGST : CDNB in Yambohne

Das geläufigste Substrat zur Bestimmung der GST-Aktivität, CDNB, wies auch bei der Yambohne die höchsten spezifischen Umsatzwerte aller getesteten Substrate auf, auch wenn diese insgesamt um rund die Hälfte niedriger lagen als beim cytosolischen Extrakt der Gerste. Im Gegensatz zur monokotyledonen Gerste zeigte sich die Yambohnen-GST deutlich weniger von AHL beeinflusst, wie in Abbildung 3.41 dargestellt. In der Wurzel zeigte sich keinerlei Einfluss einer AHL-Behandlung auf die cGST:CDNB-Aktivität der Yambohne. Ähnlich verhielt sich dies im Spross, wo lediglich C10-HSL einen Anstieg der Aktivität um +32 % auslösen konnte. Insgesamt kann der Effekt von AHL auf die cGST:CDNB-Aktivität in Yambohne als gering charakterisiert werden.

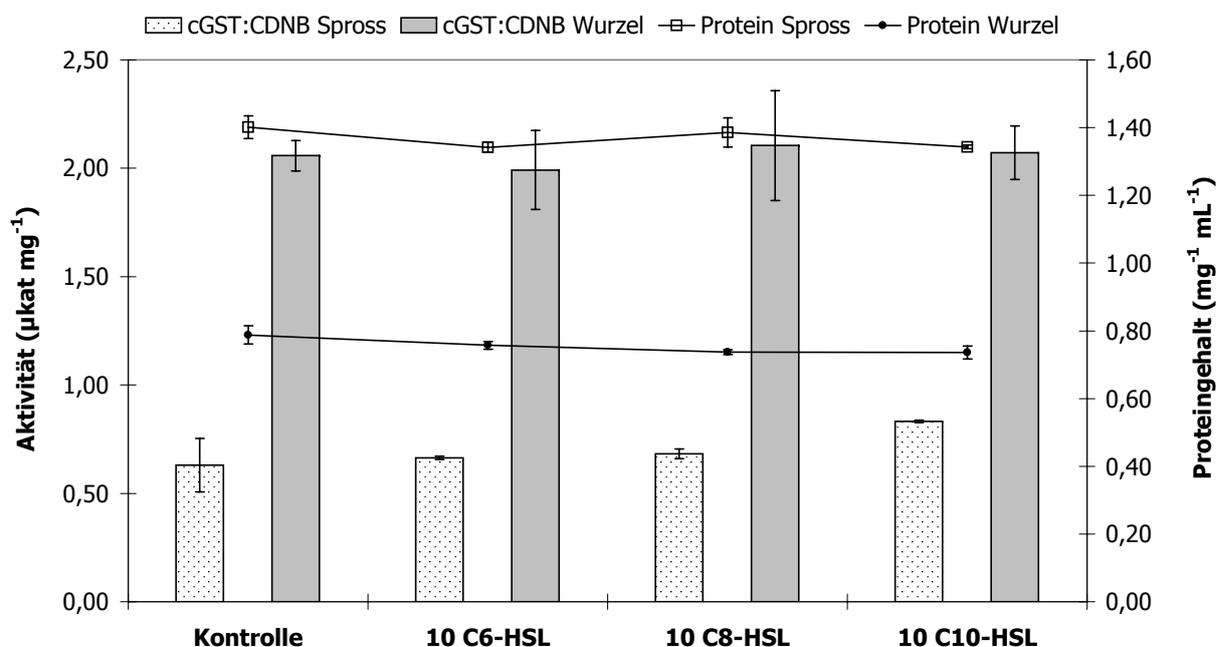


Abbildung 3.41: Spezifische cGST:CDNB-Aktivität in Yambohne.

3.3.3.2 cGST : NBC der Yambohne

Wie bei CDNB zeigte sich die cGST:NBC-Aktivität (Abbildung 3.42) der Yambohne weniger durch AHL beeinflusst als die der Gerste. C6-HSL löste die deutlichste Änderung im Vergleich zur Kontrolle aus, da die Aktivität im Spross um +26 % und um +37 % in der Wurzel anstieg. Ansonsten war auch hier der Einfluss der AHL-Behandlungen, insbesondere bei C8-HSL, geringer als bei der Gerste. Die Ergebnisse für cGST:NBC gleichen

denen für cGST:CDNB, so dass angenommen werden kann, dass gleiche Isoenzyme involviert sein könnten. Obwohl die Umsatzraten für NBC im cytosolischen Extrakt der Yambohne die zweithöchsten nach CDNB darstellten, konnte dennoch keine GST-Aktivität gegenüber dem zu NBC strukturell sehr ähnlichen Substrat NBOC festgestellt werden.

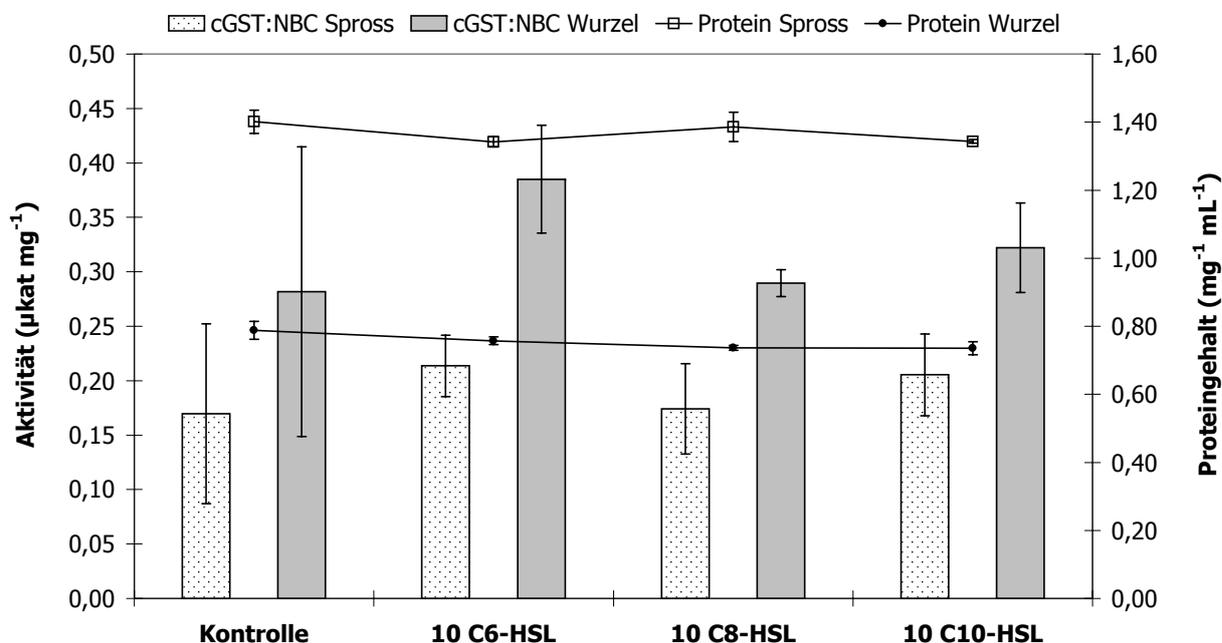


Abbildung 3.42: Spezifische cGST:NBC-Aktivität in Yambohne.

3.3.3.3 cGST : NBOC der Yambohne

Im cytosolischen Extrakt von Yambohne konnte keine cGST-Aktivität für das Substrat NBOC nachgewiesen werden.

3.3.3.4 cGST : DCNB der Yambohne

Die Aktivitäten der cGST von Yambohne zum Substrat DCNB lagen in einem niedrigen Bereich und waren verhältnismäßig hohen Schwankungen unterworfen, wie in Abbildung 3.43 ersichtlich ist. Die leichten Steigerungen der Aktivität in der Wurzel lagen im Bereich der Schwankungsbreite der Kontrollmessung. Ähnlich verhält es sich im Spross, wo der Rückgang der cGST:DCNB-Aktivität unter dem Einfluss von C10-HSL auffällig schien. Allerdings sollte bei DCNB davon ausgegangen werden, dass dieses Substrat so wie CDNB und NBC keinem ausgeprägten Einfluss durch AHL unterliegt.

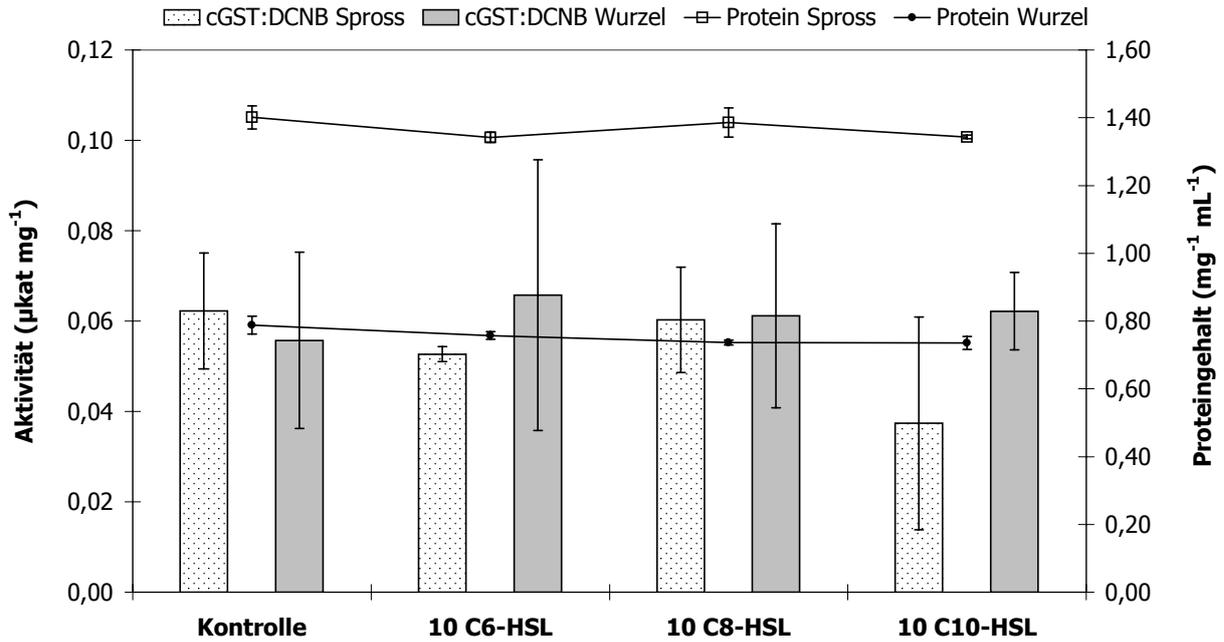


Abbildung 3.43: Spezifische cGST:DCNB-Aktivität in Yambohne.

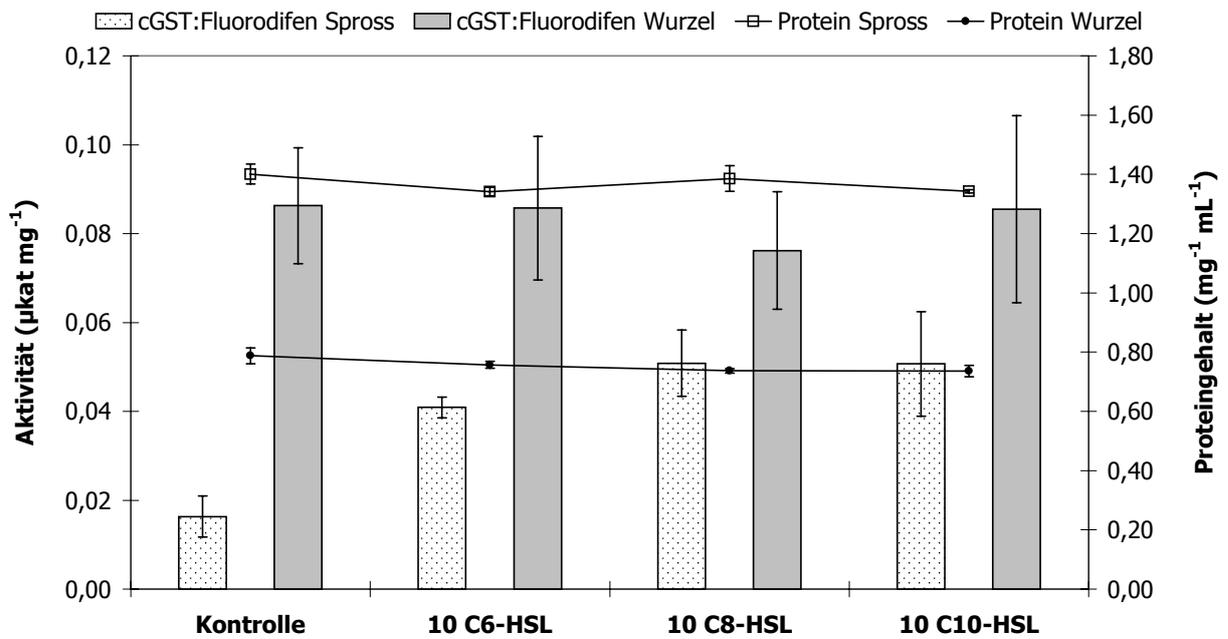


Abbildung 3.44: Spezifische cGST:Fluorodifen-Aktivität in Yambohne.

3.3.3.5 cGST : Fluorodifen der Yambohne

Fluorodifen stellte sich bei Yambohne als das Substrat mit den deutlichsten Einwirkungen einer AHL-Behandlung auf die cGST-Aktivität heraus (Abbildung 3.44). Im Gegensatz zur Wurzel, in deren Extrakten keine erheblichen Veränderungen der Aktivität beobachtet wurden, kam es im Spross zu beträchtlichen Aktivitätssteigerungen unter AHL-Einfluss. C6-HSL zeigte sich hier als das am schwächsten wirksame AHL mit einer Erhöhung der cGST:Fluorodifen-Aktivität um +150 %. C8-HSL und C10-HSL hingegen führten zu einer Steigerung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle um rund 210 %. Es ist daher anzunehmen, dass wie bei der Gerste durch AHL spezielle GST-Isoenzyme für die Konjugation des Substrats Fluorodifen induziert werden.

3.3.3.6 SOD der Yambohne im Cytosol

Bei der SOD, einem Schlüsselenzym des antioxidativen Stoffwechsels, wurde in der Yambohne keine signifikante Beeinflussung der Aktivität durch AHL festgestellt (Abbildung 3.45), was ganz im Gegensatz zur cytosolischen SOD der Gerste steht, bei der ein starker Rückgang der Aktivität in der Wurzel festgestellt wurde. Das Enzym im Cytosol der Yambohne zeigte allerdings in allen Pflanzenteilen und unabhängig von der Art des AHL keine maßgeblichen Änderungen gegenüber der Kontrolle.

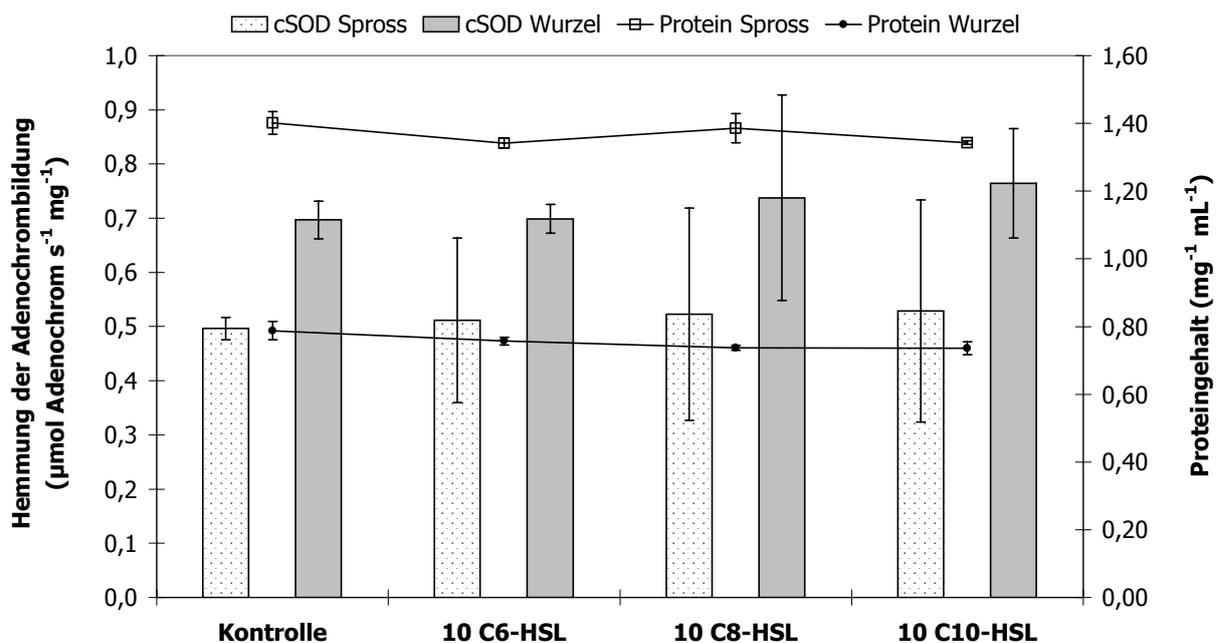


Abbildung 3.45: Spezifische cytosolische SOD-Aktivität in Yambohne.

3.3.3.7 POX der Yambohne im Cytosol

Ähnlich zur SOD konnten im cytosolischen Sprossextrakt der Yambohne keine Einwirkungen einer AHL-Behandlung auf POX festgestellt werden. Die Aktivitäten bewegten sich stets auf dem Niveau der Kontrolle. Im Wurzelextrakt kam es lediglich bei C8-HSL zu einer Reduktion der POX-Aktivität. Die Wirkung von AHL auf POX im Cytosol der Yambohne ist daher als gering einzustufen, siehe Abbildung 3.46.

3.3.3.8 GPOX der Yambohne im Cytosol

Die Untersuchung der Aktivität von Glutathionperoxidase (Abbildung 3.47) lieferte ein interessantes Muster. Während keine Änderungen in der Enzymaktivität nach der Behandlung mit C8-HSL und C10-HSL eintraten, sank diese unter dem Einfluss von C6-HSL, und zwar auf je ungefähr 70 % der Kontrolle im Spross und in der Wurzel. Dieser auffällige Effekt kann dabei nicht auf die Proteinkonzentration zurückgeführt werden.

3.3.3.9 APOX der Yambohne im Cytosol

Bei der cytosolischen APOX der Yambohne kam es in beiden Pflanzenteilen zu einer gleichmäßigen Steigerung der Aktivität durch AHL (Abbildung 3.48). Im Spross konnte die Umsatzrate durch die drei AHLs im Vergleich zur Kontrolle um +30 % gesteigert werden. In der Wurzel erfolgte eine etwa 20-prozentige Zunahme der Aktivität nach der Behandlung mit C6-HSL und C8-HSL, bei C10-HSL konnte sogar eine Steigerung um +45 % gemessen werden.

3.3.3.10 MDHAR der Yambohne im Cytosol

Die Behandlung mit den AHLs bewirkte im Spross der Yambohne eine einheitliche Aktivitätssteigerung des Enzyms MDHAR um rund +60 %, die sich deutlich von der Kontrolle unterschied. Weniger klar war der Effekt der Signalstoffe auf die Wurzeln der Yambohne, wo eine leichte Erhöhung der Aktivität bei C8-HSL und C10-HSL auftrat, die im Bereich der Abweichung der Kontrollmessung angesiedelt war, sowie keine Veränderung bei C6-HSL. Siehe hierzu Abbildung 3.49.

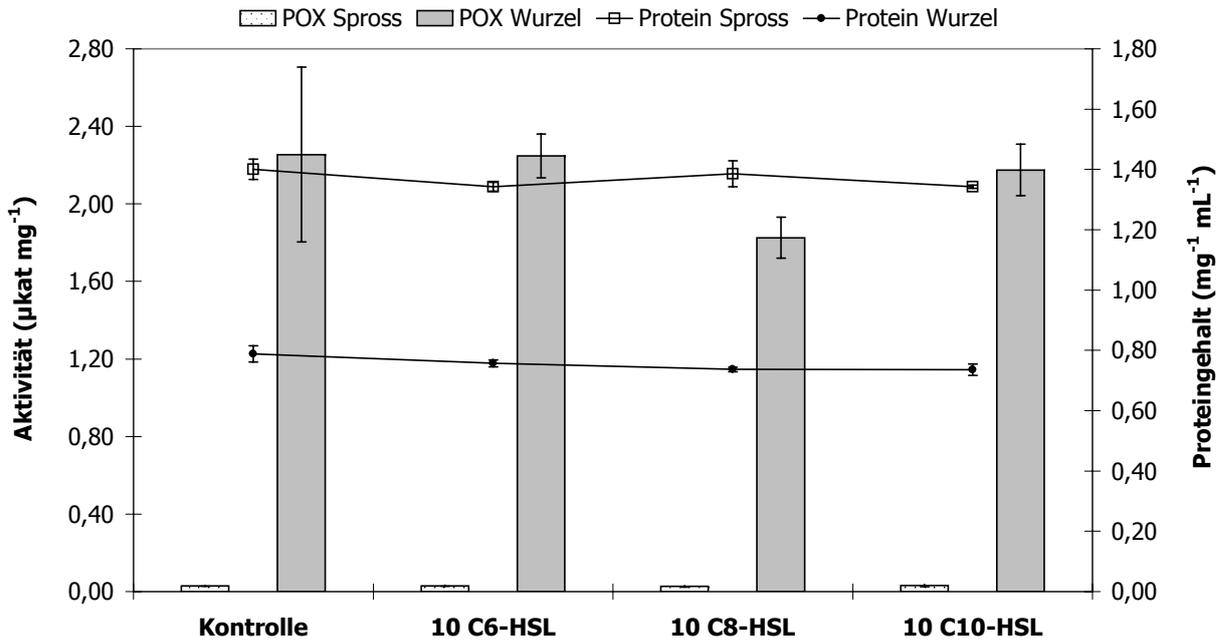


Abbildung 3.46: Spezifische cytosolische POX-Aktivität in Yambohne.

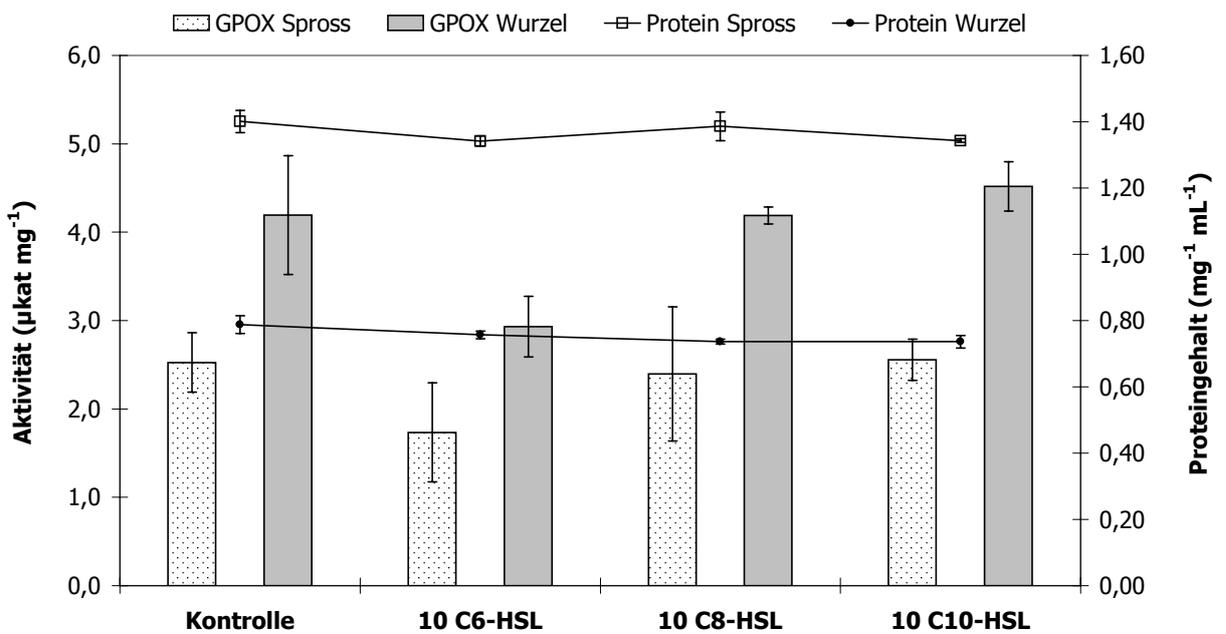


Abbildung 3.47: Spezifische cytosolische GPOX-Aktivität in Yambohne.

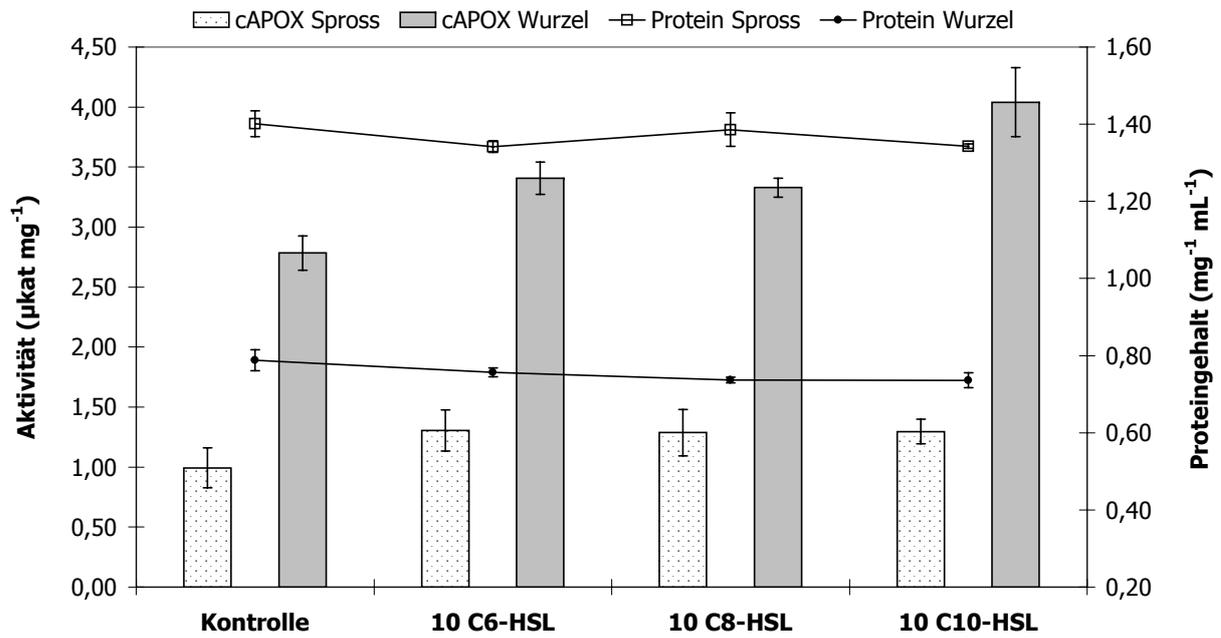


Abbildung 3.48: Spezifische cytosolische APOX-Aktivität in Yambohne.

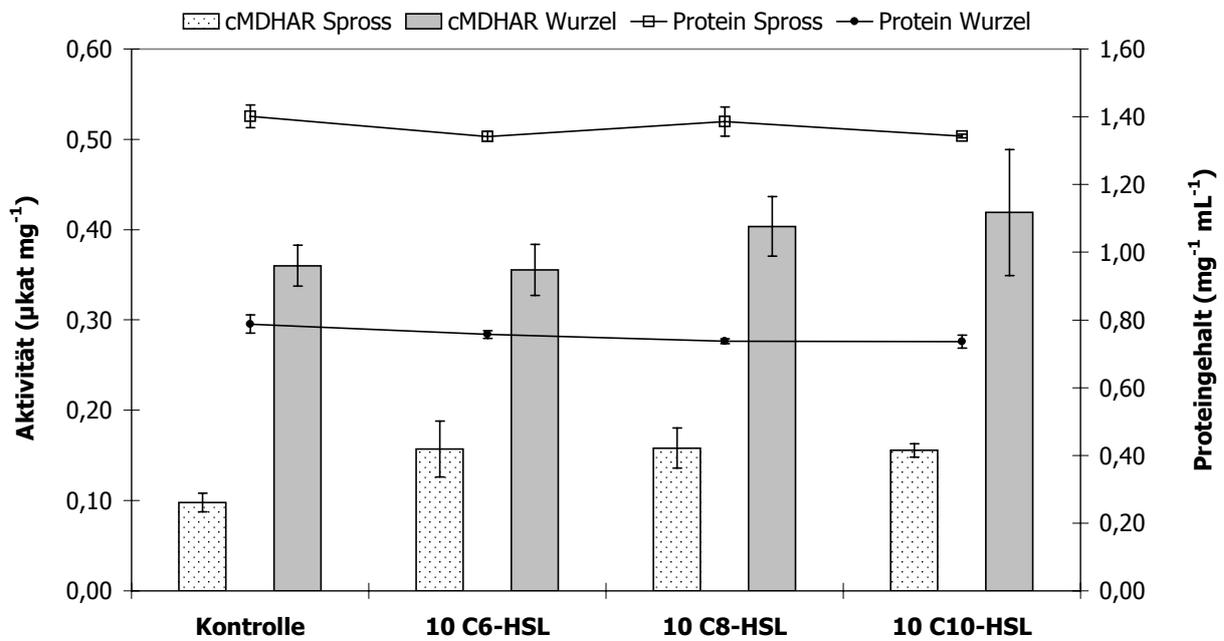


Abbildung 3.49: Spezifische cytosolische MDHAR-Aktivität in Yambohne.

3.3.3.11 DHAR der Yambohne im Cytosol

Beim Enzym DHAR konnte kein prägnanter Einfluss der AHL-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 3.50). Im Spross waren die nach AHL-Behandlung gemessenen Aktivitäten im Bereich der Kontrolle angesiedelt. In der Wurzel konnte eine tendenzielle Steigerung der DHAR-Aktivität gemessen werden, welche +13 % bei C6-HSL und +25 % bei C8-HSL betrug, während der Wert bei C10-HSL im Bereich der Kontrolle lag.

3.3.3.12 GR der Yambohne im Cytosol

Das Muster, das sich nach der AHL-Behandlung von Yambohne im cytosolischen Extrakt bei der GR ergab, glich dem, welches bei der MDHAR festgestellt wurde. Neben einem leichten Anstieg der GR-Aktivität im Spross blieben die Umsatzraten in der Wurzel unverändert. Im Spross hingegen wurde die GR-Aktivität nach AHL-Behandlung zwischen +10 % bei C6-HSL und C8-HSL bis zu maximal +20 % (C10-HSL) erhöht. Vergleiche hierzu Abbildung 3.51.

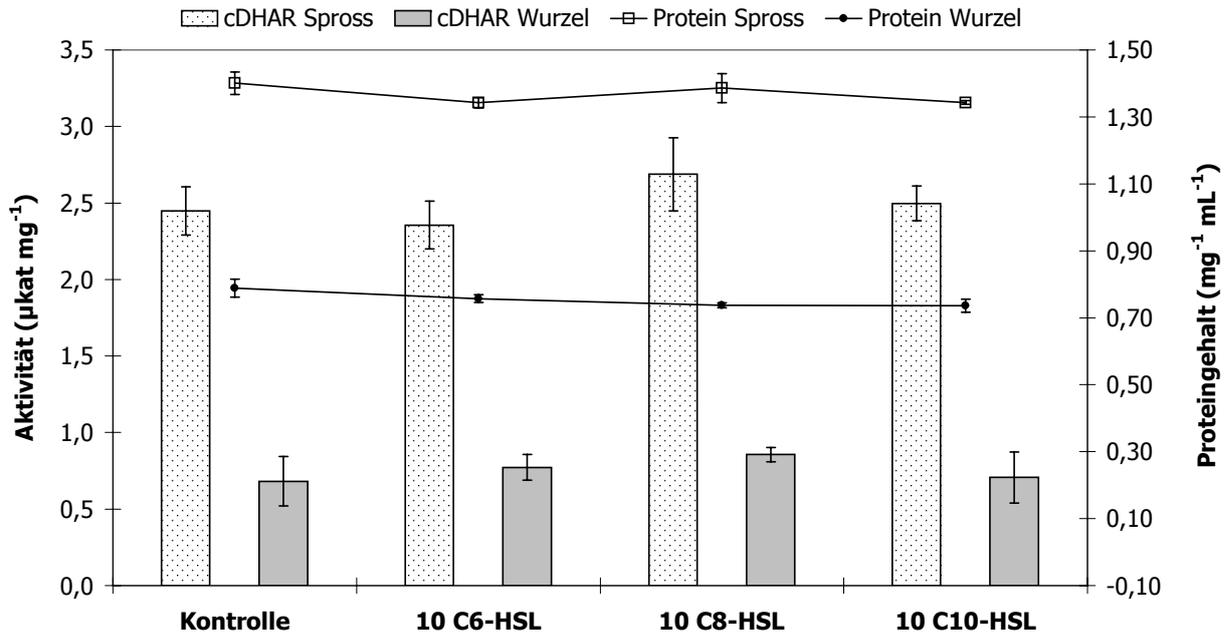


Abbildung 3.50: Spezifische cytosolische DHAR-Aktivität in Yambohne.

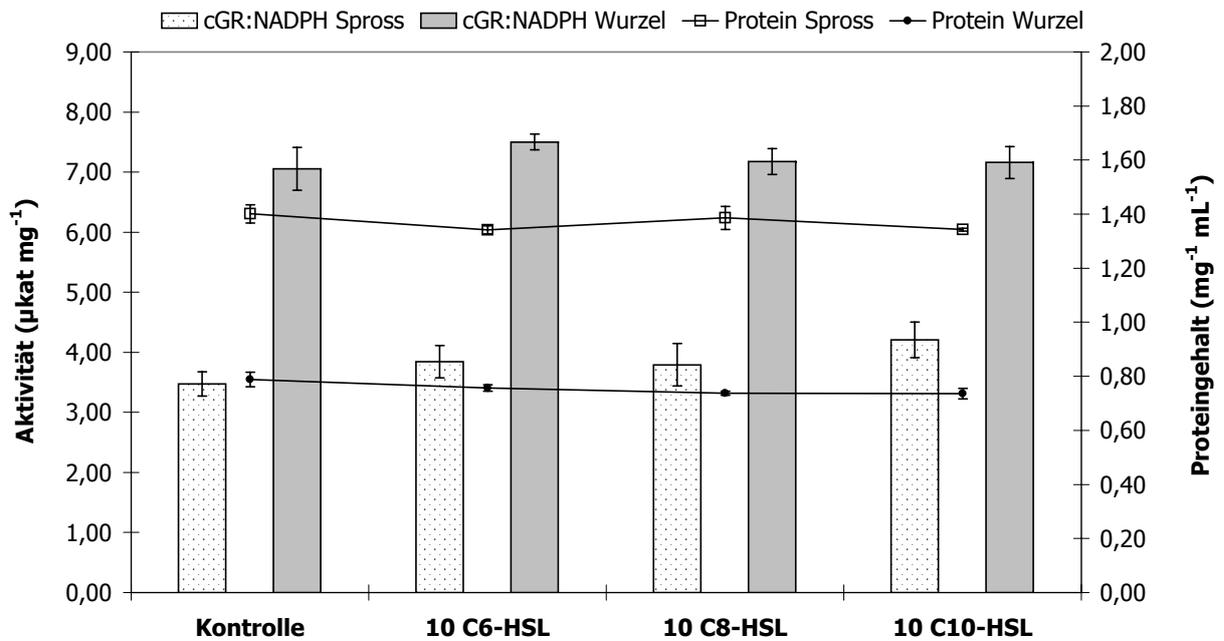


Abbildung 3.51: Spezifische cytosolische GR-Aktivität in Yambohne.

3.3.4 Mikrosomale Enzyme der Yambohne

3.3.4.1 mGST : CDNB in Yambohne

Obwohl im cytosolischen Extrakt der Yambohne keine spezifische Auswirkung auf die cGST:CDNB festgestellt werden konnte, zeigte sich die GST-Fraktion der Mikrosomen deutlich von AHL beeinflusst (Abbildung 3.52). Besonders klar war der Effekt auf die mGST:CDNB-Aktivität in den Sprossen erkennbar. Hier führte die AHL-Exposition zu einem generellen Rückgang der Umsatzrate auf circa 75 % des Kontrollwertes bei C6-HSL und C10-HSL. Die im Schnitt stärkste Wirkung war hier mit nur 62 % im Vergleich zur Kontrolle bei C8-HSL zu verzeichnen. In der Wurzel hingegen konnte durch die bakteriellen Signalstoffe die mGST:CDNB-Aktivität gesteigert werden. Neben gemäßigten Erhöhungen auf 119 % bei C6-HSL und 110 % bei C10-HSL fiel hier wie beim Spross die Wirkung des C8-HSL besonders auf, welche zu einer Aktivitätssteigerung auf 162 % der Kontrollmessung geführt hatte.

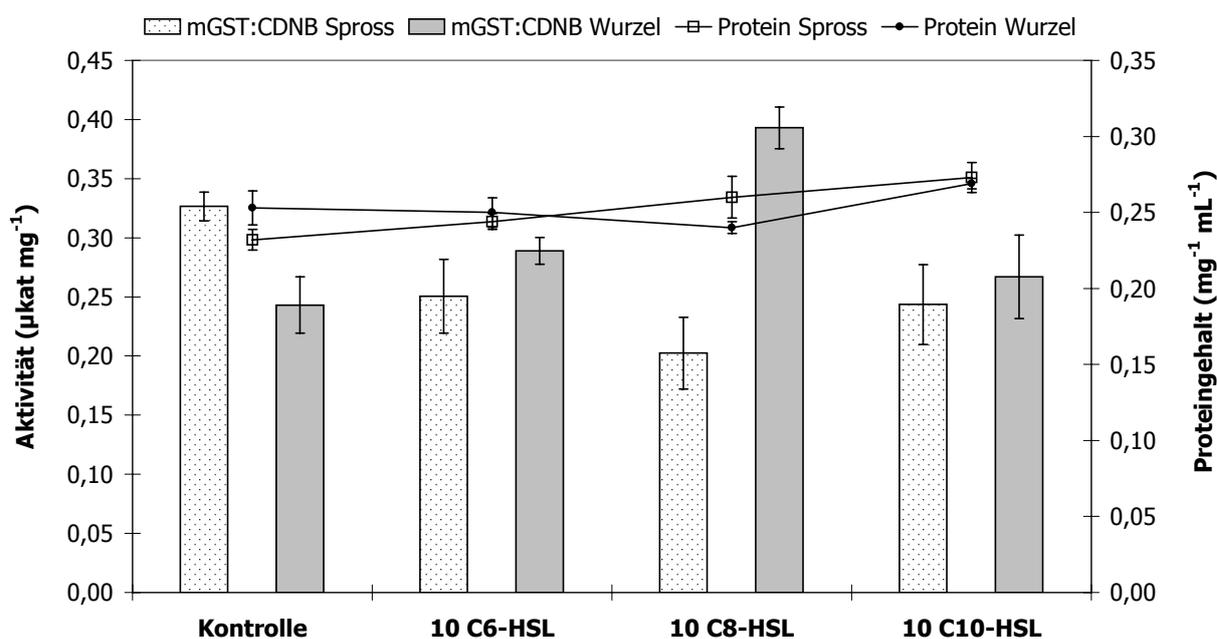


Abbildung 3.52: Spezifische mGST:CDNB-Aktivität in Yambohne.

3.3.4.2 mGST : NBC in Yambohne

Das Muster der AHL-Effekte auf die mGST:NBC-Aktivität der Yambohne, dargestellt in Abbildung 3.53, zeigt große Ähnlichkeit zum vorher besprochenen Substrat CDNB. Auch bei NBC führte die Behandlung mit AHL im Spross zu einer auffälligen Reduktion der

mGST-Aktivität auf 73 % bis etwa 60 % des Kontrollwertes, wobei der schwächste Einfluss von C10-HSL ausging, wie es auch in der Wurzel dargelegt werden konnte, wo sich die Behandlung mit C10-HSL nicht von der Kontrolle unterschied. Neben dem Anstieg der Aktivität in der Wurzel unter C6-HSL (+ 25 %) konnte wie schon bei CDNB der stärkste Effekt (+ 44 %) auf den mGST:NBC-Umsatz bei C8-HSL-behandelten Yambohnen nachgewiesen werden. Aufgrund der Ähnlichkeit im Muster der relativen Effekte im Vergleich zur Kontrolle kann vermutet werden, dass CDNB und NBC in der mikrosomalen Fraktion der Yambohne von den gleichen mGSTs umgesetzt werden. Die Anzeichen hierfür sind noch besser ausgeprägt als in der cytosolischen Fraktion, bei der eine ähnliche Korrelation beobachtet werden konnte.

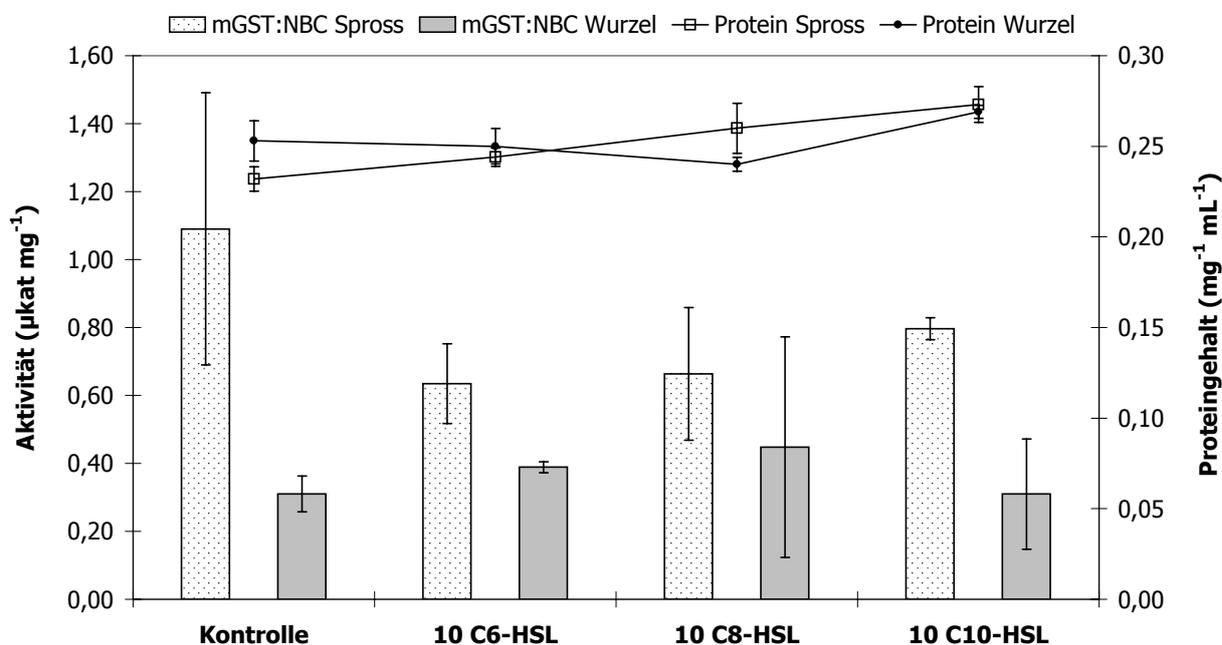


Abbildung 3.53: Spezifische mGST:NBC-Aktivität in Yambohne.

3.3.4.3 mGST : NBOC in Yambohne

NBOC repräsentiert ein sehr interessantes Substrat für die Untersuchung der GST-Aktivität in Mikrosomen der Yambohne. Nicht nur kann in den Mikrosomen der Umsatz nachgewiesen werden, wo im cytosolischen Extrakt keine Aktivität gefunden wurde, vielmehr lieferte NBOC im Schnitt außerdem die höchste GST-Aktivität aller Substrate in der mikrosomalen Fraktion von *Pachyrhizus*, was das Vorhandensein einer speziellen mGST nahelegt. Auch in der Gerste war NBOC neben NBC das am schnellsten umgesetzte Sub-

strat mikrosomaler GSTs. Die Wirkungen von AHL auf die mGST:NBOC-Aktivität wiesen eine vergleichbare Tendenz wie bei den Substraten CDNB und NBC auf. Die Ausprägung war bei NBOC jedoch weniger deutlich als bei den anderen beiden Substraten. Der Trend zur Abnahme der Aktivität im Spross und zur Steigerung in der Wurzel kann aus Abbildung 3.54 abgelesen werden, dieser ist jedoch mit teils erheblichen Schwankungen behaftet. Die deutlichsten Effekte traten im Spross bei C6-HSL (72 % der Kontrolle) und in der Wurzel bei C10-HSL (127 % der Kontrolle) auf.

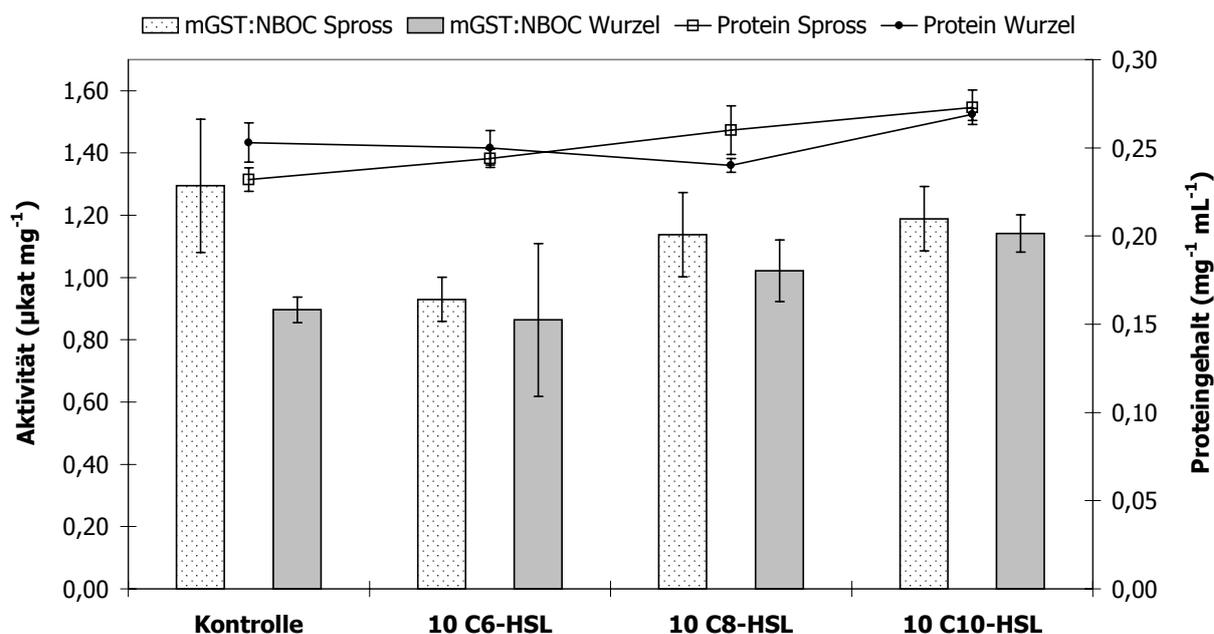


Abbildung 3.54: Spezifische mGST:NBOC-Aktivität in Yambohne.

3.3.4.4 mGST : DCNB in Yambohne

In der mikrosomalen Fraktion von Yambohne konnte wie bei Gerste keine mGST-Aktivität für das Substrat DCNB nachgewiesen werden.

3.3.4.5 mGST : Fluorodifen in Yambohne

Der Vergleich von cytosolischer und mikrosomaler GST-Aktivität gegenüber Fluorodifen zeigt ähnlich wie bei den vorangegangenen Substraten interessante Diskrepanzen zwischen diesen beiden zellulären Komponenten in der Yambohne. Während im cytosolischen Extrakt die Konjugation von CDNB und NBC kaum, die von Fluorodifen aber erheblich durch AHL-Behandlung beeinflusst war, verhält es sich in den Yambohnemi-

krosomen genau gegensätzlich. Den signifikanten Aktivitätssteigerungen bei Fluorodifen im Spross beim Cytosol steht eine annähernde Wirkungslosigkeit der AHL-Gabe in den Mikrosomen gegenüber. Kein AHL konnte in einem Pflanzenteil die mGST:Fluorodifen-Aktivität in deutlicher Weise beeinflussen.

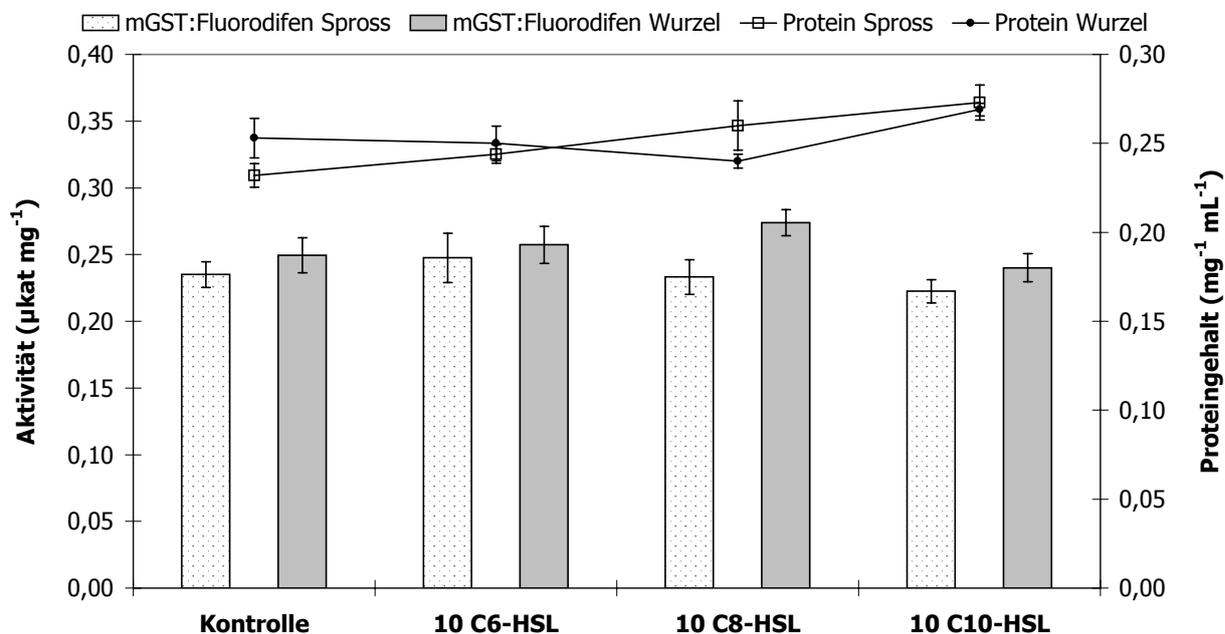


Abbildung 3.55: Spezifische mGST:Fluorodifen-Aktivität in Yambohne.

3.3.4.6 Mikrosomale SOD der Yambohne

SOD der Mikrosomen konnte aus materialtechnischen Gründen (Verfügbarkeit der Katalase) nicht bestimmt werden.

3.3.4.7 Katalase der Yambohne

Die Bestimmung der Aktivität von Katalase der Yambohne ergab in diesen Experimenten enorme Umsatzraten bis in den Bereich von mehr als 20 mkat mg⁻¹ Protein in der Wurzel, wobei die Katalase der Gerste nur etwa die Hälfte dieses Wertes erreichte, was jedoch immer noch eine beachtliche Aktivität darstellt. Das mikrosomale Enzym der Yambohne zeigte sich in den Wurzelextrakten durch AHL beeinflusst (Abbildung 3.56). Unter Zusatz aller drei bakteriellen Signalstoffe kam es zu einer Reduktion der Aktivität in der Wurzel auf 89 % bis 63 % im Vergleich zur Kontrolle. Der stärkste Effekt ging hierbei von C10-HSL aus, und im Spross war dies genauso der Fall, wo 121 % des Kontrollwertes gemessen

wurden. C6-HSL und C8-HSL konnten jedoch keine Effekte auf die Katalase im Spross bewirken, denn die Aktivitäten schwankten um die Kontrolle.

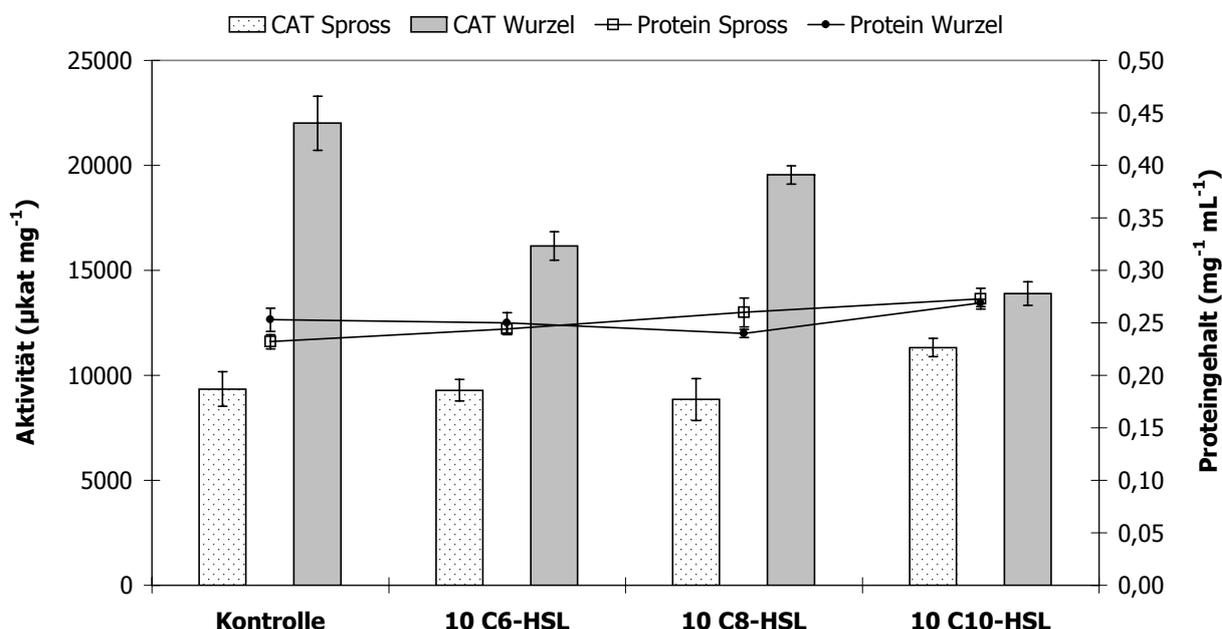


Abbildung 3.56: Spezifische Katalase-Aktivität der Yambohne.

3.3.4.8 Mikrosomale APOX der Yambohne

Bei der Messung der APOX-Aktivität in den Mikrosomen der Yambohne trat der identische Effekt wie bei den Mikrosomen der Gerste auf, so dass auch bei der Yambohne keine Angaben zur Aktivität dieses Enzymes gegeben werden können. Vergleiche hierzu den Abschnitt bei Gerste ab Seite 127.

3.3.4.9 Mikrosomale MDHAR der Yambohne

MDHAR, das Enzym zur Regeneration von Ascorbat aus Monodehydroascorbatradikalen, wurde durch die Applikation der drei AHLs insbesondere in den Mikrosomen der Wurzel beeinflusst (Abbildung 3.57). In diesem Pflanzenteil wurde ein recht einheitlicher Rückgang der Aktivität auf 45 bis 61 % der Kontrolle verzeichnet. In den Sprossextrakten war der Effekt hingegen weniger eindeutig. Trotz des niedrigeren Wertes bei C8-HSL sollte aufgrund der relativ hohen Standardabweichung der Messergebnisse davon ausgegangen werden, dass es im Spross keinen signifikanten Effekt gab.

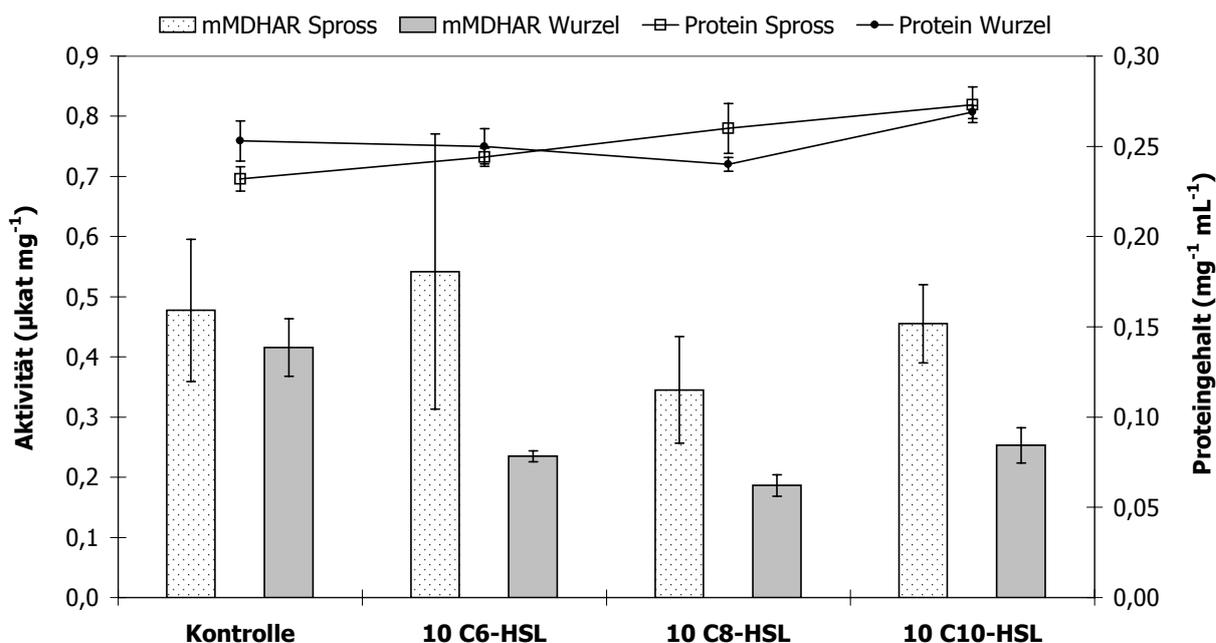


Abbildung 3.57: Spezifische mikrosomale MDHAR-Aktivität in Yambohne.

3.3.4.10 Mikrosomale DHAR der Yambohne

Die mikrosomale DHAR der Yambohne zeigte zwar insgesamt hohe Aktivitäten, jedoch keine Beeinflussung durch AHL, wie die anderen Enzyme Katalase und MDHAR würden vermuten lassen. Die Einwirkung von AHL führte im Schnitt zu keiner Beeinträchtigung der DHAR (Abbildung 3.58). In Spross wie Wurzel konnte kein Effekt der drei eingesetzten AHLs auf dieses Enzym festgestellt werden. Der leichte Rückgang in der mit C6-HSL behandelten Sprossprobe fällt in den Schwankungsbereich der anderen Messungen im Spross.

3.3.4.11 Mikrosomale GR der Yambohne

Die GR in den Yambohnemikrosomen wies eine deutliche reduktive Beeinflussung durch AHL auf, da es in beiden Pflanzenteilen zu einem Rückgang der Aktivität kam (siehe Abbildung 3.59). Der stärkste Einfluss ging hierbei, wie schon bei Katalase, von C10-HSL aus, wo in der Wurzel 55 % und im Spross 39 % der Kontrollaktivität festgestellt wurden, doch auch C6-HSL und C8-HSL führten zu einem Rückgang der GR-Raten auf 69 % und 75 % in der Wurzel bzw. 65 % und 77 % im Sprosseextrakt.

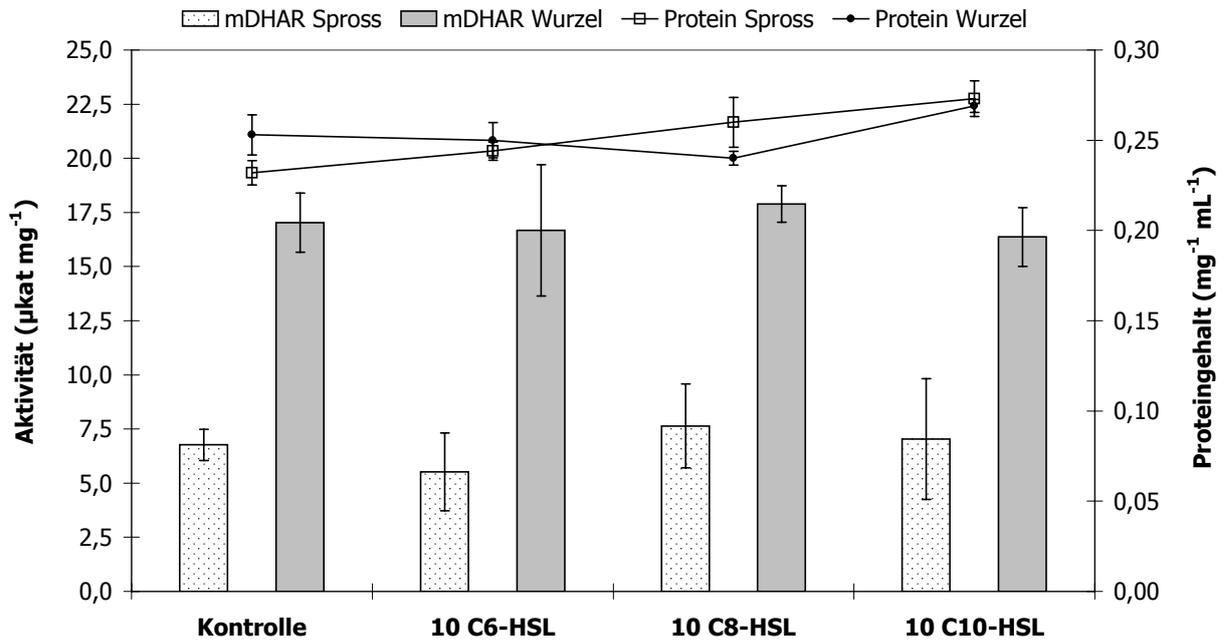


Abbildung 3.58: Spezifische mikrosomale DHAR-Aktivität in Yambohne.

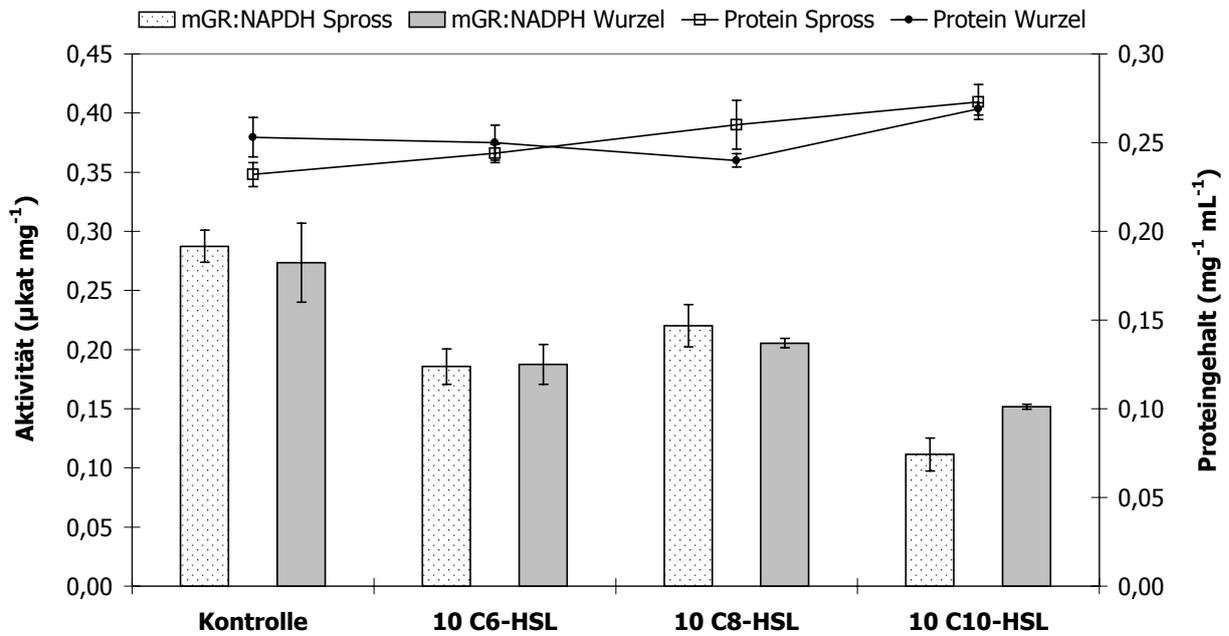


Abbildung 3.59: Spezifische mikrosomale GR-Aktivität in Yambohne.

3.4 Thiolgehalte unter AHL-Einfluss

Glutathion gilt als die bedeutendste Form eines freien Thiols in den meisten höheren Pflanzenarten, wobei einige Leguminosen Homoglutathion (γ -Glutamylcysteinyl- β -Alanin) anstelle von Glutathion enthalten (Lamoureux und Rusness, 1989). Neben diesen beiden reduzierten Formen des Glutathions wurden in diesen Experimenten auch die Gehalte an GSSG, der oxidierten Form, sowie des Grundbausteins Cystein untersucht, wobei der Peak des γ -Glutamylcysteins in beiden Pflanzenspezies Koelution anderer Peaks unterworfen war. Pro Behandlung wurden jeweils drei Proben aus unabhängigen Pflanzenaufzuchten getestet, was neben der sehr geringen methodischen Standardabweichung die hohe biologische Schwankungsbreite der Messwerte bedingte.

Die GSH-Gehalte im Spross der axenischen Gersten waren im Bereich zwischen 600 und 700 nmol g⁻¹ FG angesiedelt. Als Ausnahme hiervon betrug der Wert nach Behandlung mit C6-HSL fast 900 nmol g⁻¹ FG. Auch in der Wurzel wurde der höchste Gehalt an GSH bei C6-HSL gemessen, wobei die GSH-Gehalte unter den beiden anderen AHLs niedriger als bei der Kontrolle, bei C6-HSL jedoch höher waren. Die Untersuchung des GSSG ergab in der Wurzel und besonders im Spross hohe Gehalte. Die Konzentration an GSSG war in diesem Experiment insgesamt mit rund 70-130 nmol g⁻¹ FG bei Gerste und rund 60-100 nmol g⁻¹ FG bei Yambohne vergleichsweise hoch, was höchstwahrscheinlich durch den Stress der Oberflächensterilisierung und des unnatürlichen axenischen Aufwuchses bedingt war. Im Spross konnte gezeigt werden, dass bei C6-HSL der höchste GSSG-Messwert vorlag. In der Wurzel zeigte sich eine Tendenz zu sinkenden GSSG-Gehalten nach AHL-Behandlung. Auch beim Cystein wurde die höchste Konzentration in den mit C6-HSL behandelten Pflanzenproben detektiert werden, und das Verhältnis von Gesamtglutathion zu GSSG in der Wurzel war nach Behandlung mit C6-HSL erhöht, so dass gefolgert werden kann, dass C6-HSL den stärksten Einfluss auf die Thiolgehalte in der Gerste ausübte.

In der Yambohne lag GSH nur etwa halb so konzentriert vor wie in der Gerste. Im Ausgleich verfügte die Leguminose jedoch über das Homoglutathion (HGSH), welches in den Kontrollen in annähernd gleicher Konzentration wie das GSH vorlag. Das Cystein wurde mit circa 30 nmol g⁻¹ FG im Spross detektiert und nur bei C10-HSL war der Wert leicht reduziert. Die Gehalte an GSH waren im Spross außer bei C8-HSL niedriger als die der Kontrolle, am niedrigsten bei C6-HSL. In der Wurzel befanden sich alle Werte der

Tabelle 3.11: Gehalte an Thiolen in Gerste in nmol g^{-1} FG in den Kontrollen und nach Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ AHL. Die Ratio gibt das Verhältnis von Gesamtglutathion (GSH+GSSG) zu GSSG wieder; n.d.=nicht detektierbar.

	CYS	GSH	GSSG	Ratio
Kontrolle Spross	59 ± 35	685 ± 163	126 ± 28	6,4
C6-HSL Spross	93 ± 54	887 ± 59	187 ± 69	5,7
C8-HSL Spross	45 ± 28	695 ± 134	126 ± 8	6,5
C10-HSL Spross	25 ± 13	595 ± 135	129 ± 18	5,6
Kontrolle Wurzel	n.d.	565 ± 207	97 ± 40	6,8
C6-HSL Wurzel	n.d.	595 ± 98	74 ± 45	9,0
C8-HSL Wurzel	n.d.	513 ± 182	80 ± 52	7,4
C10-HSL Wurzel	n.d.	460 ± 160	75 ± 25	7,1

GSH-Gehalte in einem engen Bereich mit einem Trend zu höheren Gehalten nach AHL-Behandlung. Deutlicher erkennbar war dieser Effekt beim HGSH, da im Vergleich zur Kontrolle alle AHL-Behandlungen zu einer Erhöhung der HGSH-Gehalte geführt hatten. Wie bei Gerste lagen auch bei der Yambohne relativ hohe Gehalte an GSSG vor, die aber wie bereits erwähnt auf die axenische Prozedur zurückzuführen waren. Das Verhältnis des Gesamtglutathions zum GSSG schien in den Sprossen durch die AHL-Behandlungen anzusteigen, während in der Wurzel ein tendenzieller Rückgang zu beobachten war.

Tabelle 3.12: Gehalte an Thiolen in Yambohne in nmol g^{-1} FG in den Kontrollen und nach Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ AHL. Die Ratio gibt das Verhältnis von Gesamtglutathion (GSH+HGSH+GSSG) zu GSSG wieder; n.d.=nicht detektierbar.

	CYS	GSH	HGSH	GSSG	Ratio
Kontrolle Spross	34 ± 6	329 ± 64	386 ± 135	98 ± 21	8,3
C6-HSL Spross	32 ± 5	224 ± 84	401 ± 162	57 ± 30	12,0
C8-HSL Spross	36 ± 23	355 ± 102	522 ± 167	91 ± 24	10,6
C10-HSL Spross	21 ± 6	249 ± 112	518 ± 231	67 ± 29	12,4
Kontrolle Wurzel	n.d.	315 ± 96	510 ± 295	64 ± 42	13,9
C6-HSL Wurzel	n.d.	344 ± 114	613 ± 355	74 ± 41	13,9
C8-HSL Wurzel	n.d.	337 ± 28	615 ± 256	106 ± 66	10,0
C10-HSL Wurzel	n.d.	356 ± 11	663 ± 386	100 ± 51	11,2

3.5 2D-Gelelektrophorese

Separation von Proteinen aus den cytosolischen Extrakten nach Aufarbeitung erfolgte mittels des IPGphor-Systems und der zugehörigen Komponenten von GE Healthcare (Freiburg, ehemals Amersham Biosciences). Bei dieser Methode werden Proteine im ersten Schritt oder der „ersten Dimension“ mittels eines fixierten pH-Gradienten und schwachem Strom gemäß ihres isoelektrischen Punktes fokussiert. Die so separierten Proteine können danach in der sogenannten „zweiten Dimension“ auf einem Polyacrylamidgel nach kDa aufgetrennt werden. Der große Vorteil dieses Verfahrens im Vergleich zur 1D-Elektrophorese liegt darin, dass auch Proteine mit ähnlicher Masse oder identischen isoelektrischen Punkten aufgetrennt und in Form sogenannter „Spots“ sichtbar gemacht werden. Diese Rohdaten wurden durch die Software „ProteomWeaver“ (BioRad) analysiert, indem mehrere Gele vom Extrakt aus einer Behandlung angefertigt und anschließend diese innerhalb von Gruppen miteinander abgeglichen wurden, um so die Variabilität der Gele untereinander zu berücksichtigen.

Bei Gerste wurden die Kontrollpflanzen mit den C6-, C8- und C10-HSL (je 10 μ M) behandelten Pflanzen innerhalb von Gelgruppen verglichen. Hierzu wurden die aus den Einzelgelen errechneten „Average Gels“ bzw. Durchschnittsgele herangezogen.

In den Abbildungen 3.60 bis 3.62 sind die AHL-Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle bei den Gersten dargestellt, welche stets auf der linken Hälfte platziert ist. Aus den nebenstehenden Abbildungen sind die Veränderungen des cytosolischen Sprossproteinextrakts ersichtlich. Die hierbei verwendeten gelben, blauen und roten Markierungen kennzeichnen die sogenannten „matches“, bei denen ein bestimmter Spot einem korrespondierenden Spot aus dem Durchschnittsgel der Kontrolle zugeordnet und mit dessen relativer Intensität abgeglichen werden konnte. Die rot umrandeten Spots indizieren, dass dieses Protein im Vergleich zur Kontrolle eine dreifach höhere relative Intensität aufweist, während die blaue Umrandung eine dreifache Reduktion kennzeichnet. Bei den gelb markierten Spots lagen die Intensitäten im Bereich der Kontrolle. Der relative Intensitätsfaktor errechnete sich dabei mittels der durchschnittlichen Intensität eines Spots im „average gel“ einer Gelgruppe. Die Intensität dieses Spots der auf der X-Achse aufgetragenen Gelgruppe (der AHL-Behandlung) wurde hierbei durch jene des korrespondierenden Spots der Kontrollgruppe, aufgetragen auf der Y-Achse, geteilt. Wies der relative Intensitätsfaktor einen Wert auf, der im Vergleich zur Kontrollgruppe mindestens um Faktor 3 erhöht oder ernied-

rigt war, so wurde dies als signifikante Änderung gewertet. Neben den „matches“ finden sich in den Gelen der AHL-Behandlungen auch grün umrandete Spots, welche zwar in das Durchschnittsgel aufgenommen worden waren, denen die Software „ProteomWeaver“ jedoch kein Pendant in der Kontrolle zuordnen konnte.

Anhand der Auswertung der Regulation einzelner Proteinspots wird der Einfluss von AHL auf die Gerste auch auf der Proteinebene deutlich. Die unter den Durchschnittsgelen gezeigten „Scatter Plots“ visualisieren die relative Regulation in Bezug auf die Kontrolle. Punkte im Bereich der gestrichelten Mittellinie deuten an, dass die Spots in beiden Gelgruppen ähnliche relative Intensitäten aufzeigten. Erst Unterschiede ab Faktor 3, wie oben bereits erwähnt, wurden als signifikant gewertet. Spots oberhalb der „1/3“-Linie waren daher gegenüber der Kontrolle in ihrer Intensität dreifach reduziert, solche unter der Linie „3“ dreifach induziert. In den Durchschnittsgelen der Gerste konnte gezeigt werden, dass in den Extrakten der Gersten, die mit AHL behandelt worden waren, Proteine im Vergleich zur Kontrolle unterschiedlich reguliert worden waren. Insgesamt wurden in den Behandlungen 20 (C6-HSL), 25 (C8-HSL) und 21 Spots (C10-HSL) als induziert bewertet, während 28 (C6-HSL), 37 (C8-HSL) und 38 Spots (C10-HSL) im Vergleich zur Kontrolle schwächer exprimiert waren.

Dies kann die bei den Enzymtests beobachteten Effekte auf die GSTs im Spross allerdings nicht erklären, denn gerade im Bereich der GSTs zwischen den Markern 20 kDa und 30 kDa war nur eine geringe Zahl von Spots differentiell reguliert. Dies widerspricht vor allem den unter dem Einfluss von C6-HSL gemessenen Aktivitätssteigerungen der GSTs im Spross. Zu erklären ist dies mit dem Erscheinen von Spots, welche in der Kontrolle nicht aufzufinden waren. In dem Durchschnittsgel von C6-HSL zeigte sich die Expression neuer Spots im Bereich der GSTs (circa 20-30 kDa, pI 4,5-5,4. Siehe Anhang, Abbildung 7.9) besonders deutlich. Dies deutet darauf hin, dass hier spezielle GST-Isoenzyme induziert worden sein könnten, was sich auch mit den Ergebnissen der Enzymtests deckt, wo ein expliziter Anstieg im Umsatz der selteneren Substrate DCNB und Fluorodifen festgestellt wurde. Fehlende „matches“ zur Kontrolle bedeuten jedoch nicht zwingend, dass das entsprechende Protein in der Kontrolle nicht vorhanden war, denn die hier streng gesetzten Kriterien für Spotradius und -intensität sowie die Limitierung, dass ein Spot nur dann in ein Durchschnittsgel übernommen wurde, wenn er in mehr als 60 % der Gele vorlag, konnten die Nichtbeachtung eines Spots verursachen.

Die deutlich erhöhte Zahl an Spots, vor allem in den Gelen von C6- und C10-HSL, lässt jedoch durchaus die Schlussfolgerung zu, dass im Bereich der GSTs neue Proteine induziert wurden.

Wie schon bei Gerste, so zeigte sich die Mehrzahl der dominierenden Spots im GST-Bereich auch bei der Yambohne (ab Abbildung 3.63) nicht unterschiedlich zur Kontrolle reguliert. Insgesamt konnte jedoch nachgewiesen werden, dass mehr Proteine durch eine AHL-Behandlung verändert worden waren als bei der Monokotyledonen. Im Rohextrakt der Yambohne konnten aus zeitlichen Gründen jedoch nur die Behandlungen C8-HSL und C10-HSL mit der Kontrolle verglichen werden. 29 (C8-HSL) und 53 Spots (C10-HSL) wurden als induziert und 44 (C8-HSL) bzw. 24 Spots (C10-HSL) im Vergleich zur Kontrolle als schwächer exprimiert bewertet. Damit sind unterschiedliche Reaktionen auf AHLs mit verschiedenen Kettenlängen bei der Yambohne klar nachweisbar. Die Gerste zeigte bei allen AHLs eine sehr ähnliche Tendenz bei der Proteinregulation, da stets eine höhere Zahl an Spots in ihrer Intensität reduziert als induziert war. Im Gegensatz dazu reagierte die Leguminose sehr unterschiedlich auf C8-HSL und C10-HSL, da bei letzterem eine vergleichsweise hohe Zahl an Spots intensiver als in der Kontrolle war. Da bei Yambohne keine Affinitätschromatographie durchgeführt werden konnte, wurde der pI der Yambohnen-GST auf den Bereich zwischen 4,5 und 6 geschätzt. Interessanterweise konnte im Gegensatz zu den nicht beeinflussten GST-Aktivitäten beobachtet werden, dass in diesem Bereich dennoch viele Proteine differentiell reguliert waren, deren Identität aber noch ungeklärt ist. Es erschienen aber auch in den Sprossen der Yambohne im Bereich der GSTs neue Spots, die nicht mit der Kontrolle abgeglichen werden konnten, bei welchen es sich möglicherweise um GSTs aus einem speziellen Cluster handeln könnte, welche für die auffällig gesteigerten Umsatzraten des Herbizids Fluorodifen verantwortlich sein könnten.

Natürlich stellte sich bei der Yambohne die Frage nach der Regulation einer potentiellen Lactonase, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit für den Abbau der AHLs zu Homoserinen verantwortlich ist, und ob diese im nicht direkt AHL-exponierten Pflanzenteil ebenso induziert sein könnte. Gemäß Angaben der Literatur wurde eine entsprechende AHL-Lactonase aus *Bacillus* sp. als Enzym mit einer molekularen Masse von 28 kDa (Wang et al., 2004) und einem pI von 4,7 (Dong et al., 2000) charakterisiert. In den Sprossextrakten der Yambohne konnte in diesem Bereich ein Spot detektiert werden, bei dem es sich

aufgrund der Ähnlichkeit der Eigenschaften (circa 25 kDa, pI rund 4,8) um eine Lactonase handeln könnte. Dieser Spot war zudem in den Behandlungen mit C8-HSL und C10-HSL deutlich gegenüber der Kontrolle induziert.

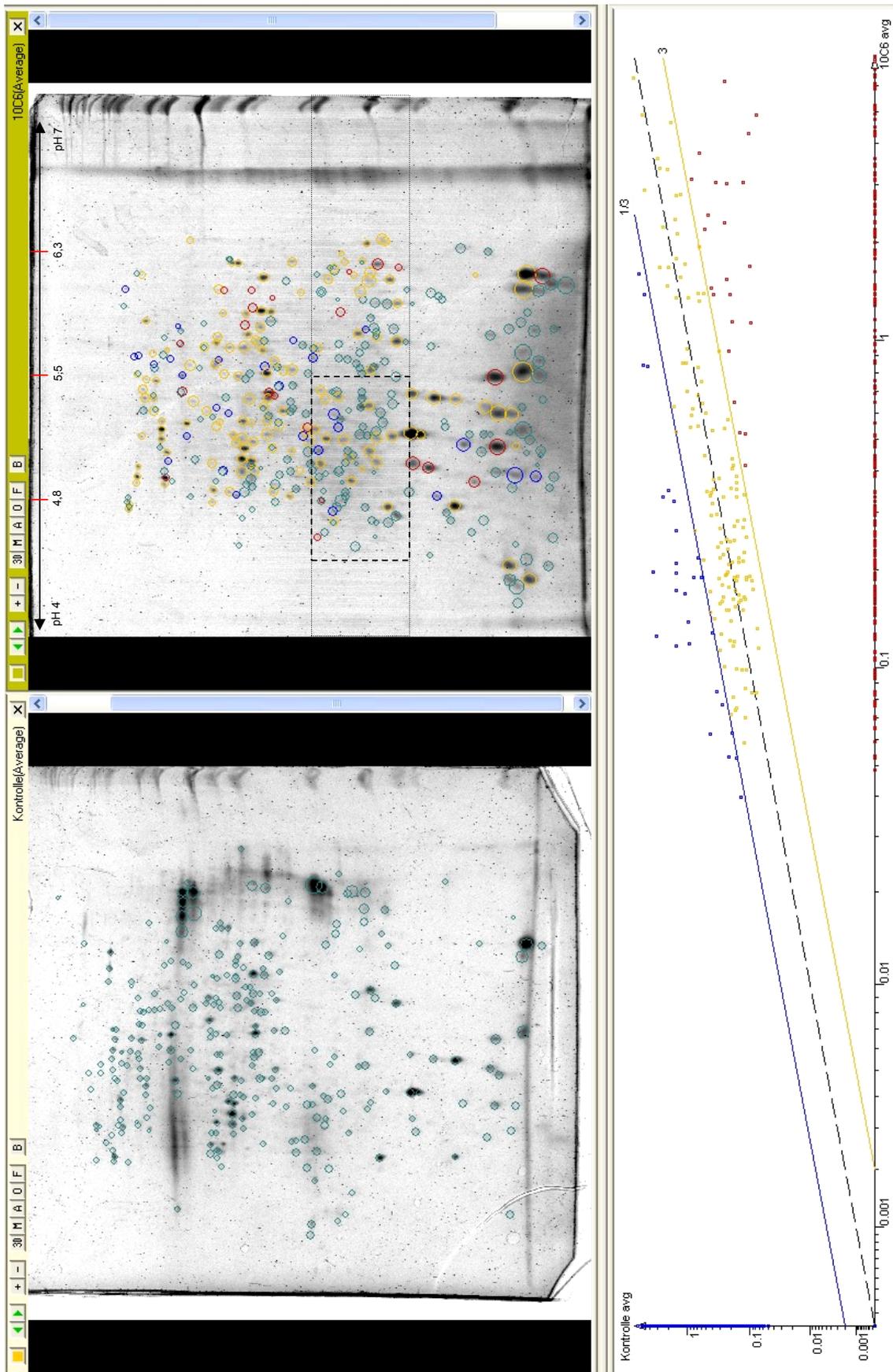


Abbildung 3.60: Gele aus dem Rohproteinextrakt von Kontrolle und 10C6-Behandlung der Gerste. Der pH-Gradient der isoelektrischen Fokussierung betrug von links nach rechts pH 4-7. Am rechten Rand ist der kDa-Marker gezeigt und hierbei der Markerbereich von 20 bis 30 kDa hervorgehoben. Die Bande in der Mitte markiert 25 kDa.

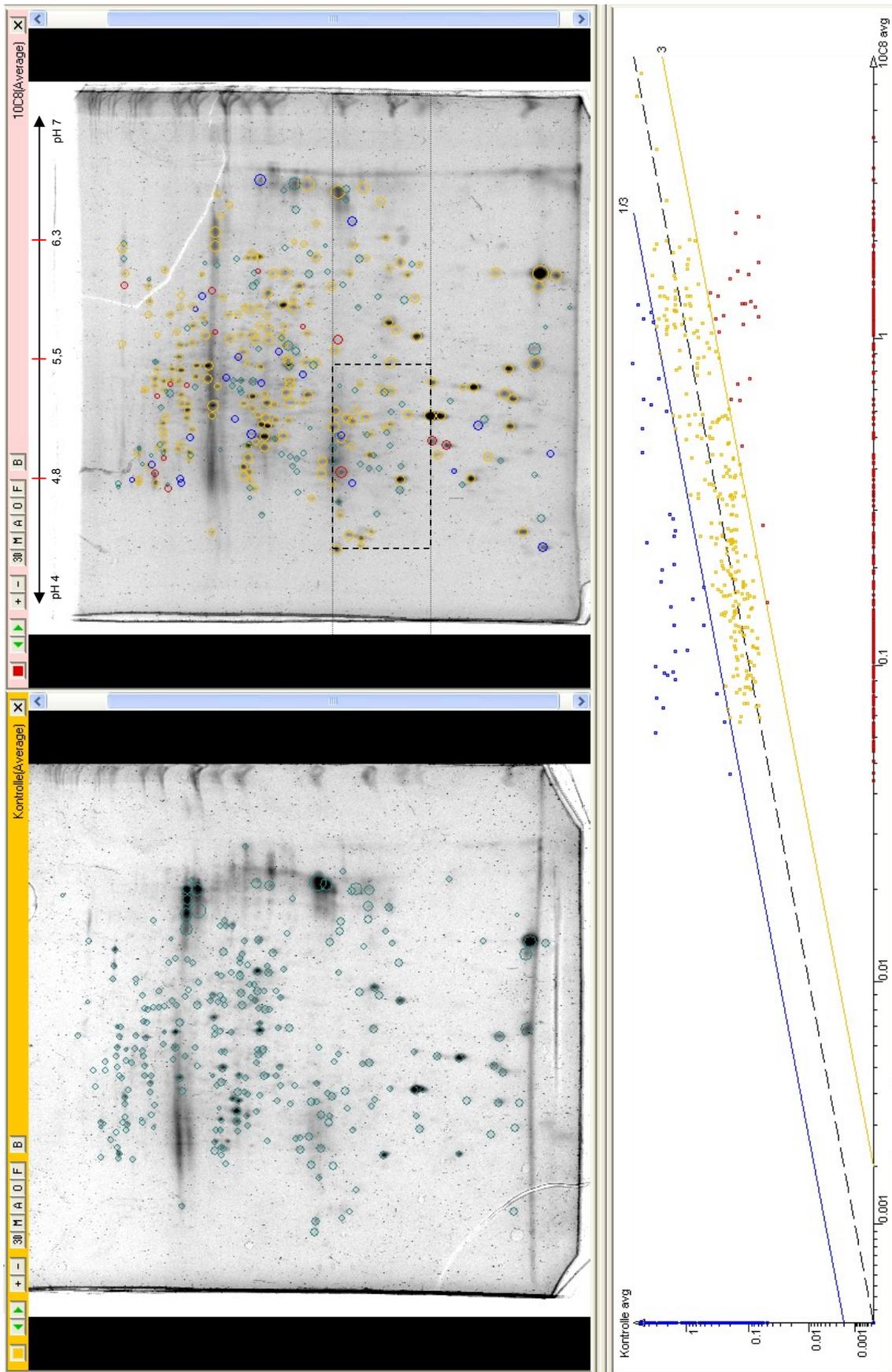


Abbildung 3.61: Gele aus dem Rohproteinextrakt von Kontrolle und 10C8-Behandlung der Gerste. Der pH-Gradient der isoelektrischen Fokussierung betrug von links nach rechts pH 4-7. Am rechten Rand ist der kDa-Marker gezeigt und hierbei der Markerbereich von 20 bis 30 kDa hervorgehoben. Die Bande in der Mitte markiert 25 kDa.

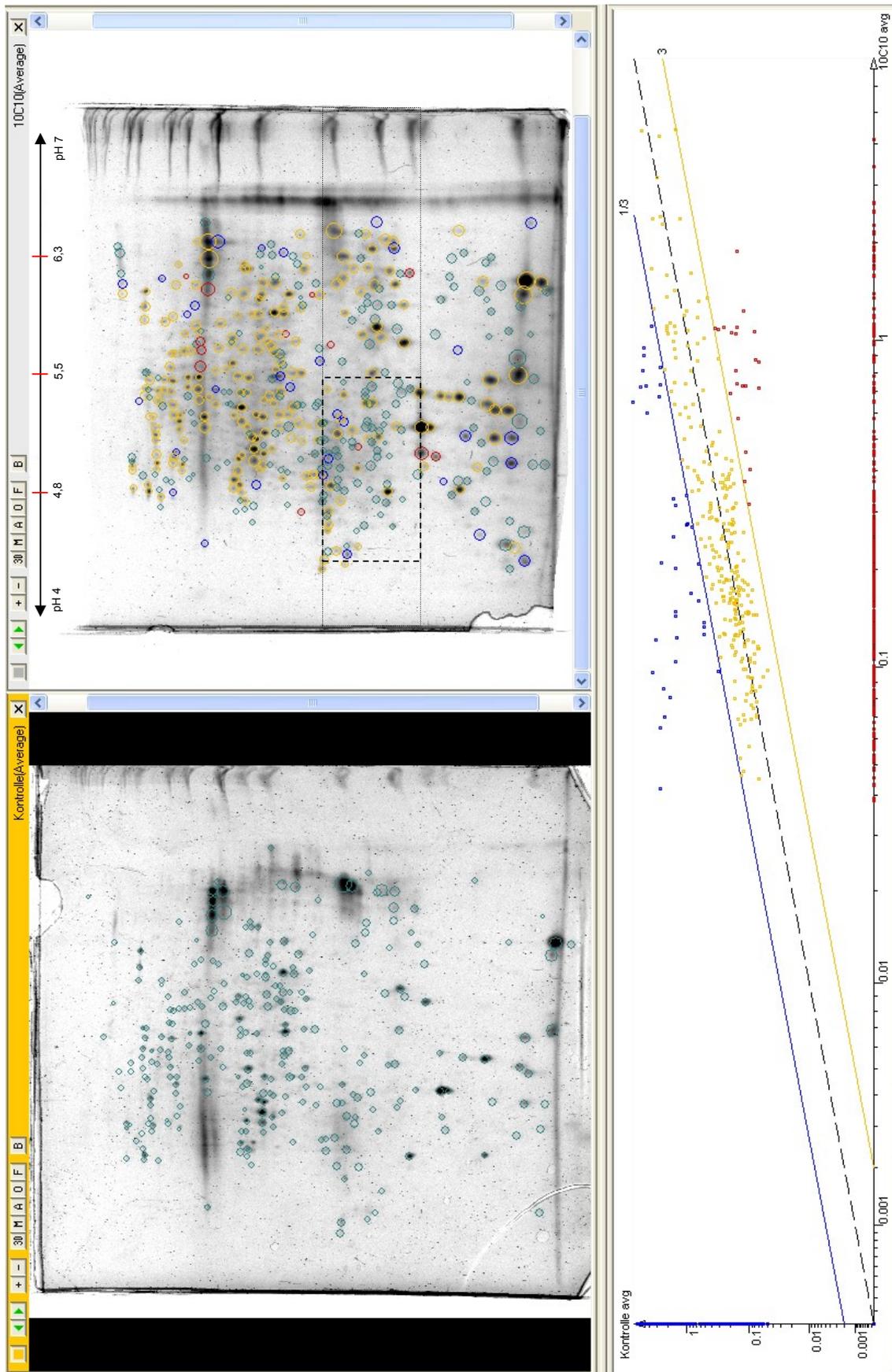


Abbildung 3.62: Gele aus dem Rohproteinextrakt von Kontrolle und 10C10-Behandlung der Gerste. Der pH-Gradient der isoelektrischen Fokussierung betrug von links nach rechts pH 4-7. Am rechten Rand ist der kDa-Marker gezeigt und hierbei der Markerbereich von 20 bis 30 kDa hervorgehoben. Die Bande in der Mitte markiert 25 kDa.

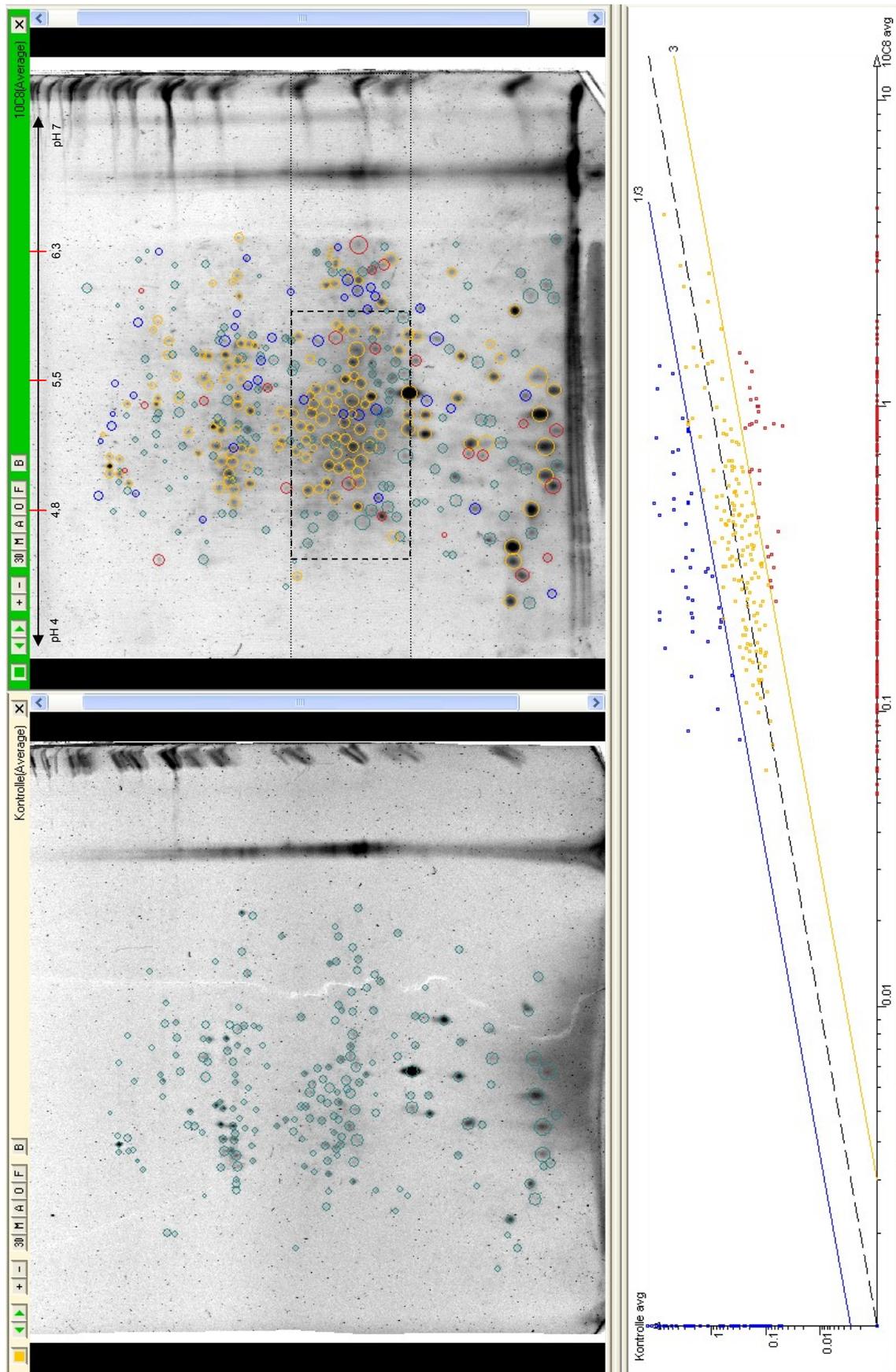


Abbildung 3.63: Gele aus dem Rohproteinextrakt von Kontrolle und 10C8-Behandlung der Yambohne. Der pH-Gradient der isoelektrischen Fokussierung betrug von links nach rechts pH 4-7. Am rechten Rand ist der kDa-Marker gezeigt und hierbei der Markerbereich von 20 bis 30 kDa hervorgehoben. Die Bande in der Mitte markiert 25 kDa.

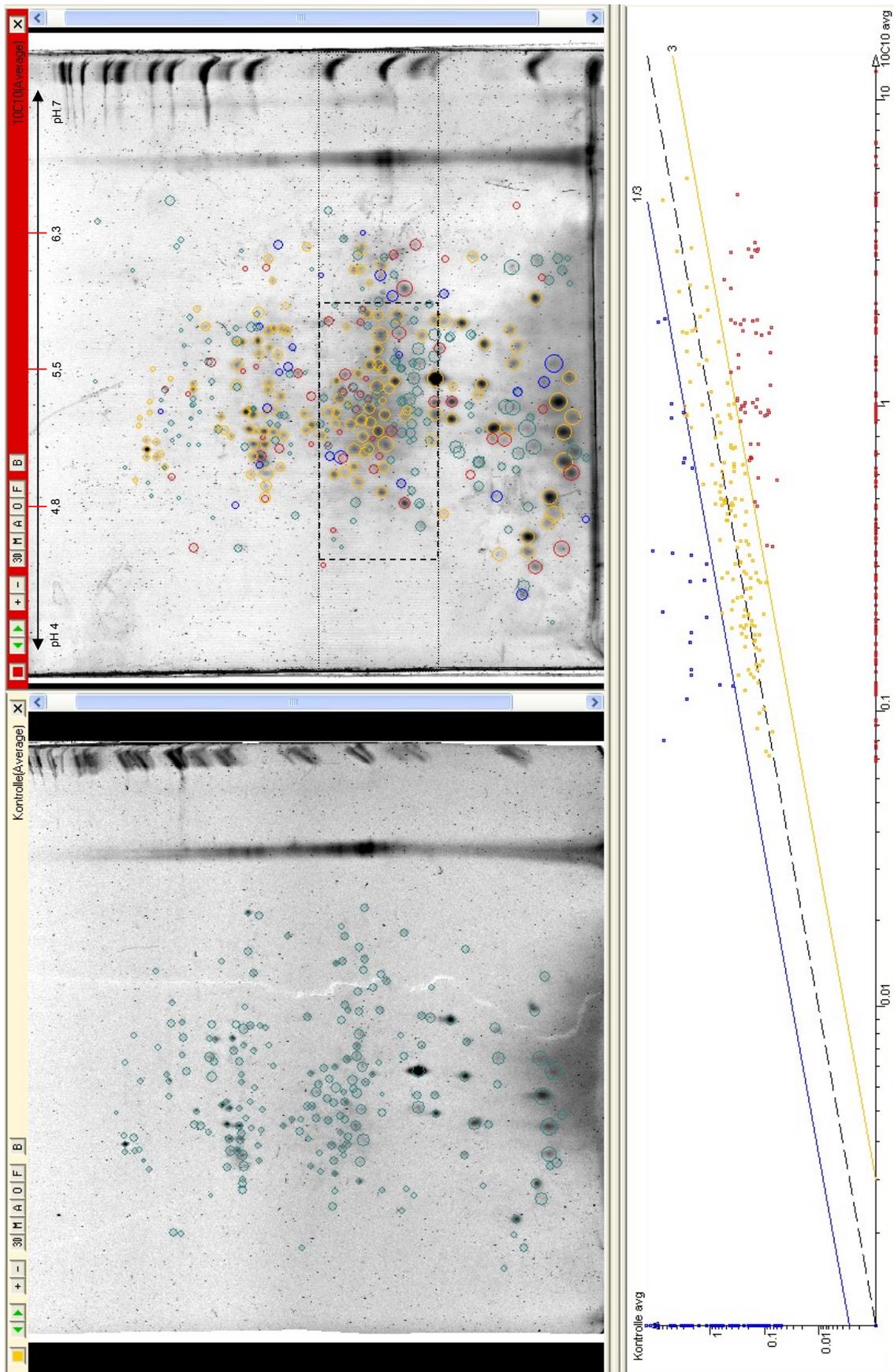


Abbildung 3.64: Gele aus dem Rohproteinextrakt von Kontrolle und 10C10-Behandlung der Yambohne. Der pH-Gradient der isoelektrischen Fokussierung betrug von links nach rechts pH 4-7. Am rechten Rand ist der kDa-Marker gezeigt und hierbei der Markerbereich von 20 bis 30 kDa hervorgehoben. Die Bande in der Mitte markiert 25 kDa.

4 Diskussion

Es wird zunehmend klar, dass an Oberflächen von Pflanzen bakterielle Kommunikation vonstatten geht, und die Beteiligten sind längst nicht nur die Produzenten des Signals, sondern ebenso die „Lauscher“ und die Pflanze selbst. Die Produktion von AHL-mimics und AHL-degradierenden Enzymen durch Pflanzen lässt vermuten, dass diese gelernt haben, AHL als Schlüsselmolekül zu benutzen, um so die Interaktion von Mikroben und Pflanzen zu beeinflussen (Loh et al., 2002).

Um den Einfluss reiner AHLs auf Pflanzen zu ergründen, wurden hier zwei unterschiedliche pflanzliche Spezies, die Leguminose Yambohne und die monokotyledone Gerste in einer weitmöglichst vereinfachten, axenischen Modellrhizosphäre mit den bakteriellen Signalstoffen behandelt. Aus der Vielzahl der möglichen AHL-Strukturen wurden in diesen Experimenten, in denen erstmalig der turnover dieser Signalstoffe unter Berücksichtigung abiotischer wie biotischer Einflüsse mittels Kombination mehrerer hochsensitiver analytischer Techniken charakterisiert wurde, das C6-HSL, das C8-HSL und das C10-HSL ausgewählt. Obwohl besonders die AHLs mit Oxo-Substitution an der Position C3, wie beispielsweise das 3-oxo-C6-HSL als wichtigstes Signalmolekül in Enterobacteriaceae (Gram et al., 1999), eine sehr bedeutende Klasse von AHLs im bakteriellen Quorum sensing darstellen, wurden in diesen Versuchen gezielt AHLs ohne Substitution oder Doppelbindungen in der Acyl-Seitenkette ausgewählt, da eine möglichst hohe Stabilität der AHLs für die hier durchgeführten Versuche zum abiotischen und biotischen Abbau von AHL in einem axenischen System von großer Bedeutung war. Um diese Parameter zu bestimmen, war es notwendig, Fehlerquellen durch Instabilität der Komponenten zu minimieren. Wie bereits erwähnt, zählen AHLs mit unsubstituierten Acylgruppen ohne Doppelbindungen die stabilsten AHLs (Cataldi et al., 2007; A. Fekete, persönliche Kommunikation).

Nach Vorversuchen und in Absprache mit den anderen beteiligten Arbeitsgruppen des Überzeichnungsprojektes wurden stets 10 μ M AHL pro Pflanze appliziert. Zu geringe oder zu hohe Konzentrationen sollten vermieden werden, einerseits um mit gewisser Sicherheit

Effekte zu erhalten und andererseits, um mit einer realistischen Dosis im Vergleich zu den in reellen Bakterienpopulationen gebildeten Mengen zu arbeiten. Die Konzentration von $10 \mu\text{M}$ liegt in den Grenzen, die von verschiedenen Quellen als Bereich der natürlichen AHL-Produktion von weniger als 1 nM bis über $600 \mu\text{M}$ beschrieben werden (Charlton et al. 2000; Mathesius et al., 2003; Frommberger, 2005; Schuhegger et al., 2006; Woppe-
rer et al., 2006) und welche gemäß eines mathematischen Modelles bis zu millimolare Konzentrationen erreichen kann (Fekete et al., 2007).

Neben der bekannten Gerstensorte „Barke“ wurde hier aufgrund der bereits vorhandenen Kenntnisse über *Pachyrhizus erosus* als Modellleguminose in der Arbeitsgruppe (vergleiche die Arbeiten von Belford (2004) und Diethelm (2005)) diese Spezies zur Untersuchung der AHL-Interaktionen gewählt. Die Art bot sich zudem durch die Größe der Samenkörner an, die für die Anzuchtgefäße mit Glasperlen gut geeignet waren, sowie durch die im Vergleich zu Modellpflanzen wie *Medicago truncatula* höhere Produktion von Biomasse. *Pachyrhizus erosus* baut wie andere Leguminosen eine Symbiose mit stickstofffixierenden Knöllchenbakterien auf, wobei es sich in ihrem Fall um Rhizobien und Bradyrhizobien handelt (Sørensen, 1996). Somit wird diese tropische Leguminose unter natürlichen Bedingungen stets dem Signalstoff AHL ausgesetzt sein.

4.1 AHL-Dynamik im axenischen Modellsystem

4.1.1 Wechselwirkung von AHL und Pflanzen im Medium

Vor der Untersuchung der Einwirkung von Pflanzen auf AHLs war es notwendig, die nicht durch Pflanzen bedingten AHL-Verluste im Medium zu analysieren. Es zeigte sich, dass der Einfluss von abiotischen Abbauprozessen in dem Modellsystem mit Glasperlen bei allen drei AHLs wenig bedeutend war. Dies traf bei C6-HSL und C8-HSL auch für die Adsorption an die Glasoberflächen zu. Beim C10-HSL hingegen kam es zu einem drastischen Rückgang der Konzentration an freiem AHL im Medium um fast 30 %. Dieser Rückgang der AHL-Konzentration war mit der Lipophilie ($\log K_{ow} = 2,96$) des C10-HSL und der damit einhergehenden raschen Adsorption an der Oberfläche der Glasperlen verbunden. Trotz der Beeinflussung der Gehalte an C10-HSL durch Adsorption an der Oberfläche stellten die Glasperlen in diesem experimentellen Ansatz das am besten geeignete Mittel zur Stabilisation der Pflanzen und der Simulierung eines Untergrundes dar. Die alternative axenische Anzuchtmethode nach Battke et al. (2003) führte zu einem über 80-prozentigen Verlust an C10-HSL durch Adsorption am verwendeten Polyethylengranulat. Andere Stoffe wie autoklavierter Quarzsand oder Boden schieden aufgrund zahlreicher Einflussfaktoren wie mangelnder Homogenität, zu großer Oberflächen oder interagierender Stoffe generell aus.

Unter dem Einfluss von Pflanzen wurden nach der Ernte deutlich reduzierte AHL-Gehalte im Medium gemessen. Die Pflanzenart ebenso wie die Länge der Acylkette der AHLs konnten hierbei als die bestimmenden Faktoren ermittelt werden. Die Leguminose Yambohne reduzierte den AHL-Gehalt im Medium deutlich stärker als die einkeimblättrige Gerste. Nach Kalkulation des Anteils der abiotischen Faktoren konnte gezeigt werden, dass die von Yambohne hervorgerufene AHL-Abnahme stets mindestens doppelt so hoch war wie bei der Gerste. Erstaunlicherweise spielte, wie bereits erwähnt, die Struktur der AHLs eine entscheidende Rolle. Mit jeder zusätzlichen C2-Einheit an der Acylgruppe kam es zu einer kontinuierlichen Steigerung des durch die Pflanze bedingten AHL-Abbaus, welcher bei Gerste sogar linear mit $\log P$ korrelierte. Der abweichende Wert bei C10-HSL in der Yambohne kann hierbei durch die starke Interaktion der adsorptiven Prozesse bedingt sein.

Dass es an der Wurzel zu Adsorption kommt, kann auch durch die Feststellung be-

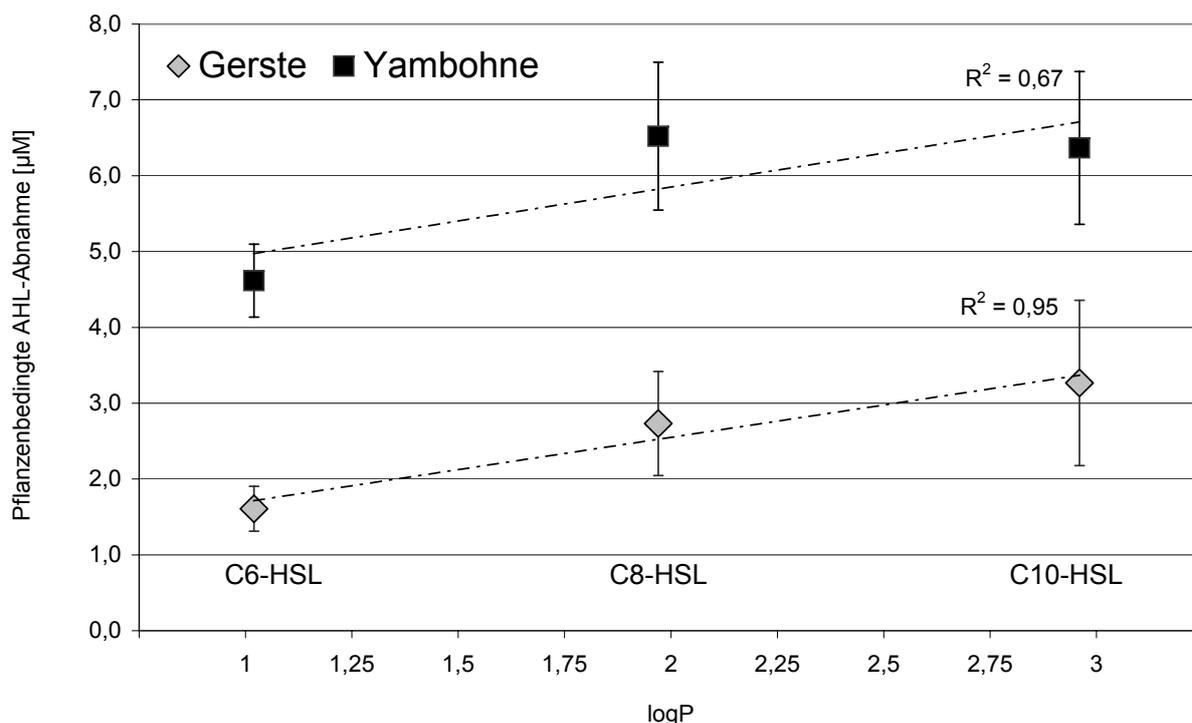


Abbildung 4.1: Pflanzenbedingte AHL-Abnahme in Relation zu logP. Die Daten sind dargestellt als Differenz zur vorgelegten Konzentration (10 µM), bereinigt von abiotischen Verlustfaktoren.

legt werden, dass in der Nähe zur Wurzel niedrigere AHL-Konzentrationen als in einiger Distanz am Rand des Glasbehältnisses gemessen werden konnten. Dies kann durch diffusive Prozesse zur Wurzeloberfläche hin vonstatten gehen, jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass in unmittelbarer Nähe zur Wurzel eine erhöhte Konzentration von AHL-beeinflussenden Faktoren wie degradierende Enzyme vorliegen dürfte, die neben der Adsorption zu einem Rückgang des AHL durch Abbau beitragen können.

Der deutliche Verlust an AHL im Medium der Yambohne provoziert die Frage nach dem Mechanismus der Deaktivierung des Signalstoffes. In Bakterien zählen AHL-Lactonasen zu den sehr bedeutenden Quorum quenching-Enzymen, und inzwischen wurde auch die Existenz einer pflanzlichen Lactonase in einer Leguminose postuliert, während in Monokotyledonen keine solche Aktivität nachweisbar war (Delalande et al., 2005). In dieser Arbeit konnten zwar mit FTICR-MS, wie schon in den Ergebnissen beschrieben, keine für Acylase typischen Fragmente untersucht werden, jedoch lieferte die Auswertung der relativen Intensitäten im Medium von AHL und HS, welche hier aufgrund des zeitgleichen Ablaufes und des identischen Setups erlaubt war, einen sehr klaren Hinweis auf die Lactonase als die Ursache der AHL-Abnahme bei der Yambohne, da hier das Verhältnis AHL:HS im Gegensatz zur Gerste stets <1 war. Es ist daher als sehr wahrscheinlich

einzustufen, dass die Leguminose Yambohne ebenso wie *Lotus corniculatus* tatsächlich über eine pflanzliche Lactonase-Aktivität verfügt und somit gezielt in das Quorum sensing eingreift. Dies wird auch aus den Ergebnissen der 2D-PAGE klar. Die AHL-Lactonase z.B. aus *Bacillus* sp. wird zudem als Enzym mit exzellenter Temperaturstabilität unter 37 °C beschrieben (Wang et al., 2004), so dass eine langzeitige und effektive Aktivität dieses Enzyms aufgrund der hier gewählten Temperaturen in jedem Falle realistisch ist. Die AHL-Verluste bei Gerste, die erheblich niedriger waren als bei der Yambohne, können dagegen nicht eindeutig auf einen bestimmten Faktor zurückgeführt werden. Wenn die Pflanze über eine Acylase oder Lactonase verfügen sollte, dann wäre deren Effizienz als eher gering zu bewerten. Es ist daher eher anzunehmen, dass andere Einflüsse als Enzyme den Rückgang der AHLs verursacht haben könnten. Die Interaktion mit Exsudaten aus der Gerstenwurzel wie zum Beispiel phenolischen Substanzen könnte eine Erklärung liefern, es darf jedoch nicht vergessen werden, dass bei Gerste auch eine erheblich höhere Anreicherung der AHLs an und im Gewebe als bei Yambohne stattgefunden hat. Außerdem wirkt sich der niedrigere pH-Wert in Mineralmedium der Gersten günstig auf die Stabilität der AHLs aus, welche zu alkalischer Hydrolyse neigen.

In einem Experiment unter Verwendung tritierter AHLs wurde das Schicksal der beiden Signalstoffe C8-HSL und C10-HSL im Medium näher untersucht. Es hatte sich gezeigt, dass zwischen diesen beiden Substanzen eine Schwelle bezüglich des Verhaltens im axenischen System zu liegen schien. C8-HSL zählt noch zu den kurzkettigen AHLs, während das C10-HSL schon als langkettig gilt (González und Keshavan, 2006), und auch in den lipophilen Eigenschaften unterscheiden sich beide AHLs grundlegend. C8-HSL glich in diesen Untersuchungen eher dem C6-HSL und kaum dem C10-HSL, welches auch aufgrund seiner hohen Adsorptionskapazität deutlich von den beiden kurzkettigen AHLs abzugrenzen war und außerdem unter dem Einfluss der Pflanzen die stärksten Verluste im Medium erfuhr. Nachdem sich gezeigt hatte, dass Yambohnen einen deutlich drastischeren Rückgang der AHL-Konzentration im Medium verursachten, wurden die Versuche mit Gerste durchgeführt, da hier weniger falsch positive Signale durch metabolisierte AHLs zu erwarten waren. Wie bereits erwähnt, ist bei der radioaktiven Methode im Gegensatz zur Untersuchung an UPLC und FTICR-MS keine Unterscheidung zwischen AHL und deren Ab- und Umbauprodukten möglich. In diesem Experiment konnte unter Verwendung tritierter AHLs aufgrund der Differenz zu den mit vorhin genannten Methoden gemessenen

AHL-Restwerten im Medium nachgewiesen werden, dass ein Teil der pflanzenbedingten AHL-Abnahme tatsächlich dadurch bedingt ist, dass AHL mit den Pflanzen entfernt wird, während der andere Teil der AHLs durch degradierende Prozesse im Medium strukturell umgewandelt wird, beispielsweise durch Hydrolyse des Lactonringes.

AHLs sind optisch aktive Substanzen. Es ist bekannt, dass die L-Form der chiralen AHLs das biologisch überwiegend aktive Isomer in Bakterien darstellt (Chhabra et al., 2003; Pomini et al., 2006). Unter Verwendung von D/L-Racematen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es im Medium der Gerste lediglich zu einer geringfügigen Anreicherung der biologisch unbedeutenden D-Isomere kommt, während diese von der Yambohne, besonders das C6-HSL, deutlich stärker diskriminiert wurden. Mögliche Ursachen hierfür könnten entweder verstärkte Aufnahme oder schnellerer Abbau der L-AHLs darstellen, da die lipophilen Eigenschaften der Stereoisomere sich nicht unterscheiden. AHL-Lactonasen beispielsweise werden als sehr stabile Enzyme mit hoher Substratspezifität für L-AHL beschrieben (Wang et al., 2004; Dong and Zhang, 2005), wobei keine Daten für D-AHL vorliegen. Es stellt sich daher die Frage, ob diese Spezifität sich nicht auch auf optische L-Isomere beschränkt. Interessanterweise zeigte eine AHL-Lactonase aus *Bacillus* bei C6-HSL die höchste Aktivität von 10 getesteten AHLs (Wang et al., 2004), und auch bei Yambohne wurde die höchste Anreicherung bei dem D-C6-HSL beobachtet. Die Yambohnen könnten weiterhin auch über einen Ausschlussmechanismus für D-Isomere verfügen. Als weitere Möglichkeit kommt das Wirken von Isomerasen in Betracht. Wie schon in der Einleitung beschrieben, sind Pflanzen in der Lage, die Kommunikation von Bakterien durch Interferenzen mit deren Signalstoffen zu stören. Daher ist es denkbar, dass auch die Umwandlung von L-AHLs in ihre im Signalling unbedeutenderen D-Isomere zu den Strategien von Pflanzen bei der Unterdrückung von Bakterienpopulationen gehören könnte.

4.1.2 Nachweis von AHL und seinen Metaboliten in Pflanzen

Bislang war es unklar, ob AHLs in die Pflanze aufgenommen und wenn ja, ob und wie sie in den verschiedenen Pflanzenteilen verteilt werden. Durch die Kombination mehrerer sensitiver analytischer Methoden konnte dieser Fragestellung in diesen Experimenten zielgenau nachgegangen werden. Auch hier wurde der erhebliche Unterschied zwischen den beiden Pflanzenspezies deutlich. Während in der Gerste alle AHLs in den Wurzel-

extrakten sowohl mit FTICR-MS als auch UPLC nachgewiesen werden konnten, wurden in den Wurzelextrakten der Yambohne zwar alle AHLs gefunden, jedoch nur mit FTICR-MS; die Konzentrationen der AHLs an der Yambohnwurzel lagen also im Gegensatz zur Gerste unter dem Detektionslimit der UPLC-Methode (unter circa 0,1 μM). Im Spross der Gerste wurden mittels FTICR-MS das C6-HSL und das C8-HSL detektiert, aber ein Nachweis von C10-HSL in seiner ursprünglichen Struktur gelang nicht. Bei der Yambohne hingegen konnte nur das C6-HSL im Spross nachgewiesen werden, aber kein weiteres AHL. Die Vermutung, die sich hier stellt, deutet darauf hin, dass aufgrund des bereits erwähnten deutlich höheren Abbaus der AHLs durch die Leguminose praktisch kaum bis kein AHL in intakter Form in den Spross gelangt. Da allerdings auch bei Gerste kein C10-HSL im Spross gefunden wurde, muss bedacht werden, dass speziell bei diesem AHL erneut die lipophile Beschaffenheit eine entscheidende Rolle beim Transport der AHLs spielen dürfte, da es im Wurzelgewebe festgelegt worden sein kann.

Dass dem so ist, zeigten Messungen, bei denen das radioaktive Signal von C8-HSL und C10-HSL in der Gerste verfolgt wurde. In den Wurzelextrakten der Gerste zeigte sich erneut die signifikante Bedeutung des Prozesses der Adsorption. Zum einen konnten stets nur rund 30 % der in der ungewaschenen Wurzel bestimmten AHL-Konzentration durch einen Waschschrift von den Wurzeln entfernt werden, andererseits wurden beim lipophilen C10-HSL im Mittel aller Proben fast doppelt so hohe AHL-Gehalte detektiert wie beim kurzkettigen C8-HSL.

Obwohl keine der anderen Nachweismethoden einen Hinweis auf die Translokation von C10-HSL in den Spross lieferte, konnte in diesem Pflanzenteil die Anreicherung des Signales aus [^3H]AHL gezeigt werden. Bei der Szintillation handelt es sich um die sensitivste aller hier verwendeten Methoden, dennoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Fragmente und Metaboliten der AHLs, welche das radioaktive Signal tragen, zu einem falsch positiven Signal geführt haben können. Die relativen Gehalte im Spross bezogen auf das Frischgewicht waren bei beiden AHLs zu Ende des Experimentes im Vergleich zur Wurzel rund 30-mal (C8-HSL) bis 120-mal (C10-HSL) geringer, wobei im Spross effektiv etwa doppelt so viel C8-HSL wie C10-HSL in Bq/mg Frischgewicht vorhanden war. Jedenfalls ergab sich bei der Bestimmung des [^3H]AHL-Signales im Spross- und Wurzelextrakt bei beiden AHLs ein annähernd als Sättigung charakterisierbarer Verlauf, welcher sicher auch dadurch bedingt ist, dass sich das Frischgewicht der Pflanzen

im Zeitverlauf ständig erhöht und somit trotz einer steten Anreicherung an [³H]AHL die relative Konzentration nivelliert wird.

Die genaue Zusammensetzung des radioaktiven Signals in den Sprossextrakten muss hier weitgehend ungeklärt bleiben; die Vielfalt möglicher aus AHL resultierender Strukturen kann von Homoserinen, verkürzten Ketten, Lacton- und Fettsäurekomponenten hinunterreichen bis zu einem hypothetischen [³H]-markierten Bruchstück, dessen Moleküle womöglich schon in den Stoffwechsel der Pflanze integriert wurden. Die Spektren aus der FTICR-MS-Messung wurden jedoch mit spezieller Software nach potentiellen Metaboliten der AHLs durchsucht, um der Frage nach dem Abbau der Signalstoffe in den Pflanzen nachzugehen. Aus der Fülle möglicher Produkte wurden hier die „primären“ Metaboliten der AHLs als Targets ausgewählt. Hierunter ist in diesem Falle die Einbringung einer reaktiven Gruppe (Oxo- und Hydroxygruppen, Doppelbindungen) in das Molekül zu verstehen, welche neben der bereits besprochenen Hydrolyse des Lactonringes als Startpunkt für den weiteren Abbau dienen kann.

Die Suche nach solchen Metaboliten lieferte ein klares Ergebnis, da in beiden Pflanzen die hydroxylierten Formen von C8-HSL und C10-HSL als die dominierenden Metaboliten vorkamen, welche bei Yambohne sogar im Medium nachgewiesen werden konnten. Zu den Enzymkandidaten zählen hierbei die Cytochrom P450-Monooxygenasen, welche in der pflanzlichen 3-Phasen-Entgiftung in Phase I den GSTs vorgelagert sind und durch Elektronen aus NADPH die Aktivierung von Sauerstoff katalysieren, um hydrophobe Substrate in ein reaktiveres und hydrophileres Produkt umzuwandeln (Belford, 2004). Sie sind in der Lage, die Einbringung einer Hydroxy-Gruppe in einen aliphatischen Rest zu katalysieren. Daneben konnten in den Extrakten auch einige korrespondierende Oxo-Formen sowie ein möglicherweise durch Dehydrogenasen entstandenes C8-HSL mit Doppelbindung nachgewiesen werden.

Interessanterweise wurden in den Gerstenextrakten auch AHLs mit verkürzten Seitenketten detektiert. Dass die Gerste diesen Schritt durchführt, der bei Yambohnen nicht gezeigt werden konnte, könnte als Ausgleich für fehlende Enzyme zur AHL-Degradation wie Lactonase interpretiert werden. Beiden Pflanzen hingegen ist gemein, dass von C6-HSL keinerlei Metaboliten in einem der Pflanzenteile detektiert wurden. Hinzu kommt, dass C6-HSL auch als einziges AHL im Spross der Yambohne nachweislich auffindbar war. Dies legt nahe, dass C6-HSL nicht nur am leichtesten aufgenommen und transportiert,

sondern auch strukturell am wenigsten durch die Pflanze angegriffen wird und hierdurch möglicherweise die häufig beobachtete stärkste Wirkung auf die untersuchten Enzyme zeigt.

Zusammenfassend kann hier also bestätigt werden, dass die Struktur, in diesem Falle bestimmt durch die Länge der Acylseitenkette, bestimmend für die Adsorption, die Aufnahme, die Translokation und die Metabolisierung von AHLs ist.

4.1.2.1 AHL aus realer bakterieller Kolonisation

In den Extrakten der mit dem Modellbakterium *Pseudomonas putida* behandelten Gersten konnte weder in der Wurzel noch im Spross eines der von dieser Art produzierten AHLs (3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL und 3-oxo-C12-HSL) nachgewiesen werden. Der Abgleich von Extrakten aus der Behandlung mit der AHL-negativen Mutante F117 im Vergleich zum AHL-Produzenten IsoF lieferte keine Unterschiede geschweige einen Hinweis auf die Translokation der Signalstoffe aus bakterieller Besiedlung innerhalb des Pflanzengewebes. Es ist als sehr wahrscheinlich anzunehmen, dass die gegenüber den unsubstituierten AHLs erheblich instabileren oxo-Verbindungen durch die Pflanze, möglicherweise durch die Bakterien selbst, aber auch in jedem Fall durch abiotische Einwirkungen derart rasch metabolisiert worden waren, dass es zu keiner messbaren Anreicherung der Signalstoffe im Pflanzengewebe kommen konnte.

Nachdem die geringe Stabilität der oxo-AHLs bekannt ist, läge die Durchführung dieses Versuches mit anderen gramnegativen Bakterien wie beispielsweise *Burkholderia cepacia* oder *Serratia liquefaciens* nahe, welche Quorum sensing mittels gesättigter, unsubstituierter AHLs ausüben. Zum Zeitpunkt dieser Experimente waren jedoch außer IsoF und F117 von *Pseudomonas putida* keine AHL-negativen Mutanten von Stämmen anderer Arten verfügbar. Die Durchführung des Versuches unter Verwendung von AHL-Produzent und Mutante ist aber zwingend erforderlich, um die Chromatogramme sowie die mittels FTICR-MS gewonnenen Spektren mit mehreren tausend m/z auf Interferenz anderer unbekannter Substanzen bakteriellen Ursprunges abgleichen zu können. Im jeden Fall stellt dieser Versuch einen interessanten Ansatzpunkt für weiterführende Projekte dar, wenn adäquate Linien zur Verfügung stehen.

4.2 Einfluss von AHL auf morphologische und physiologische Parameter

Der nächste Punkt der Diskussion ist der Einfluss von AHL auf verschiedene physiologische und morphologische Parameter. Das Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen war die Charakterisierung von möglichen Auswirkungen einer AHL-Behandlung auf morphologische Kenngrößen wie die Frischgewichte, die Blattflächen, Sprosslängen bei Gerste sowie verschiedener Wurzelkenngrößen. In einer früheren Arbeit wurde bereits nachgewiesen, dass Homoserin und das AHL-Fragment Homoserinlacton die stomatare Leitfähigkeit von Bohne beeinflussten, AHL selbst allerdings nicht (Joseph und Phillips, 2003). Es stellte sich daher die Frage, ob auch oben erwähnte Parameter durch AHL beeinflusst werden könnten.

Laut Mathesius et al. (2003) kam es auch bei der Applikation von hohen lokalen AHL-Dosen nie zu sichtbaren Verbräunungen oder Nekrosen. Dieses Ergebnis konnte in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Pflanzen wirkten gesund und entwickelten sich normal. Im Gegensatz zu den Gersten, die in einem späteren Experiment *Pseudomonas putida* ausgesetzt waren, wiesen die mit reinen AHLs behandelten Pflanzen stets eine höhere Biomasse und geringere Seneszenzerscheinungen auf (vergleiche Seite 97). AHLs scheinen der Pflanze also nicht als generelle Elicitoren eines Pathogenbefalls zu dienen, sondern eher als wichtige qualitative wie quantitative „Informationsquelle“ (Mathesius et al., 2003).

Die oben genannten Untersuchungen führten größtenteils zu dem Ergebnis, dass kein signifikanter Einfluss einer AHL-Behandlung nachgewiesen werden konnte. Das Frischgewicht beider Pflanzen schwankte in dem Niveau der Kontrollen, und auch die Blattflächen unterlagen keiner maßgeblichen Veränderung durch die bakteriellen Signalstoffe. Obwohl die Sprosslängen unter Zusatz von AHL rund 1 cm längere Sprosse aufwiesen, konnte dieser Effekt außer bei C8-HSL statistisch nicht abgesichert werden. Die Erhöhung der Sprosslänge korrespondiert jedoch mit dem tendenziellen Anstieg des Frischgewichts der Sprosse nach Behandlung mit C8- und C10-HSL.

Obwohl die AHLs keine Veränderung des pH-Wertes im Medium gegenüber der Kontrolle bewirkten, zeigte die Untersuchung dennoch interessante Hinweise auf die unterschiedlich saure Exsudation der beiden Testpflanzen. Während der pH-Wert bei der Yam-

bohne in einem ähnlichen Bereich lag wie der aus der T=0-Probe, die vor der Anzuchtphase genommen wurde, verursachten die Gersten einen starken Rückgang des pH-Wertes im Medium. Dies ist insofern bedeutend, als dass die AHLs zur alkalischen Lactonolyse neigen und der niedrigere pH-Wert zu ihrer Stabilisierung beitragen kann.

Die Wurzelparameter von Gerste und Yambohne wiesen aufgrund der hohen natürlichen Variabilität der Wurzelbildung keine als statistisch signifikant beschreibbaren Unterschiede zwischen der Kontrolle und den AHL-Behandlungen auf, es konnten aber dennoch interessante Tendenzen der AHL-Wirkung bei beiden Pflanzen beschrieben werden. Auffällig ist, dass sowohl bei der Leguminose als auch bei der Getreideart das kurzkettige C6-HSL zu einer Reduktion im Wurzelsystem zu führen schien, welche besonders stark bei der Wurzeloberfläche zum Tragen kam, die stets niedrigere Werte aufwies als die der weiteren drei Proben. Auch die anderen Parameter wie zum Beispiel die Gesamtlänge entwickelten sich nach Gabe von C6-HSL meist unterdurchschnittlich im Vergleich zur Kontrolle, zu C8-HSL und zu C10-HSL. Es erscheint demnach, als ob C6-HSL eine leicht reduktive Wirkung auf das Wurzelsystem der Pflanzen ausübte. Der zweite interessante Effekt war bei der Auswertung der Länge pro Wurzelspitze bei Gerste zu beobachten, denn hier führte jede der AHL-Behandlungen zu einem klaren Rückgang der Ratio, während bei der Yambohne hingegen das Verhältnis außer beim C6-HSL leicht anstieg. Bei der Gerste kann der Effekt dabei primär auf die erhöhte Zahl an Wurzelspitzen pro Pflanze zurückgeführt werden. AHLs schienen also die Ausbildung neuer Lateralwurzeln anzuregen, was auf einen Effekt ähnlich einem Phytohormon (z.B. Cytokinin) hindeuten könnte.

Zuletzt wurde eine Bestimmung der Pigmentgehalte durchgeführt. Weder bei der Gerste noch bei der Yambohne konnte ein signifikanter Einfluss festgestellt werden, lediglich bei den Carotinoiden der Yambohne zeigte sich bei C10-HSL ein Rückgang der Konzentration, dessen Ursache bislang ungeklärt bleiben musste. Es kann insgesamt gefolgert werden, dass die Exposition zu AHLs die Pigmentgehalte in Gerste und Yambohne überwiegend nicht beeinflusst.

4.3 Antioxidativer und detoxifizierender Stoffwechsel auf Proteomebene

Es wurden bereits Untersuchungen angestellt, die den Einfluss von AHLs auf Pflanzen auf breiterer Basis untersucht haben, und auch diese Arbeit hat sich mit dieser Fragestellung beschäftigt. Der Einfluss bakterieller AHLs auf pflanzliche Enzyme konnte zum Beispiel an der Leguminose *Medicago truncatula* gezeigt werden. Mathesius et al. (2003) legten dar, dass AHLs in dieser Modellpflanze bereits in nanomolaren Konzentrationen die Akkumulation von 154 Proteinen aus Wurzelextrakten signifikant beeinflussten. 99 dieser Wurzelproteine wurden identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass ungefähr 23 % davon eine Rolle in Abwehrmechanismen und Stressantwort einnahmen. Schuegger et al. (2006) stimmen der Bedeutung von AHLs als Mediatoren der Kommunikation zwischen Pro- und Eukaryoten zu. In Experimenten mit Tomate konnten die Autoren die Funktion von AHLs bei der Induktion von systemischer Resistenz und der Expression von Abwehrgenen belegen.

Anhand von Gerste und Yambohne sollte nun untersucht werden, ob selbiges Ergebnis auch auf diese beiden Spezies übertragbar ist. Daher wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von bakteriellen AHLs mit besonderer Berücksichtigung der Entgiftungsenzyme GSTs sowie repräsentativer Enzyme des antioxidativen Stoffwechsels untersucht.

4.3.1 Glutathion S-Transferasen

Bei den cytosolischen GSTs der Gerste konnten zwei unterschiedliche Wirkungen der AHLs dokumentiert werden. Die Aktivität dieser Entgiftungsenzyme stieg gegenüber den Substraten CDNB, NBC und NBOC in beiden Pflanzenteilen an, während es bei DCNB und Fluorodifen nur im Spross zu einer Erhöhung der Aktivität kam. In den Wurzeln zeigte die Umsatzrate für diese beiden Komponenten einen deutlichen Rückgang auf rund die Hälfte der Kontrollmessung. Fluorodifen unterscheidet sich von den anderen Substraten, da die Etherbindung des Moleküles geöffnet und anschließend das S-(2-Nitro-4-Trifluoromethylphenyl)-Glutathionkonjugat unter gleichzeitiger Entstehung von 4-Nitrophenol gebildet wird (Lamoureux and Rusness, 1989). Auch das DCNB gehört zu den Substraten, die im allgemeinen seltener konjugiert werden und zudem geringe Konjugationsraten in Pflanzen aufweisen. Anscheinend wurden in der Wurzel der Gerste unter

dem Einfluss der AHLs solche GST-Isoenzyme angesprochen, die speziell an der Konjugation der Substrate DCNB und Fluorodifen beteiligt sind. Einzelne Substrate können auf verschiedene GST-Cluster der Pflanze hinweisen, die ähnliche Charakteristika besitzen (Lyubenova et al., 2007). Dass in den anderen Pflanzenteilen und Substraten die GST-Aktivitäten stiegen, spricht für eine erhöhte Detoxifizierungskapazität der cytosolischen Gersten-GSTs gegenüber Xenobiotika nach AHL-Behandlung.

In den Mikrosomen der Gerste blieb die Aktivität der GST zu CDNB überwiegend unverändert, während die Behandlung mit AHL um das rund 2,5fache gesteigerte Umsatzraten für das Substrat NBC verursachte. Das strukturell ähnliche NBOC verhielt sich dazu gegensätzlich, da die Raten unter dem Einfluss von AHL im Vergleich mit der Kontrolle sanken. Beim Substrat Fluorodifen konnte ein leichter Anstieg der Aktivität im Spross bei einer gleichzeitigen geringen Reduktion in der Wurzel dokumentiert werden. Die Effekte der bakteriellen Signalstoffe auf die kompartimentierten mikrosomalen GSTs der Gerste unterscheiden sich daher grundlegend von denen des Cytosols.

Die Entgiftungsenzyme aus der cytosolischen Fraktion der Yambohne zeigten eine lediglich geringe Beeinflussung durch eine Behandlung mit den drei AHLs. Als einzige Ausnahme kam es in den Sprossen der Leguminose zu einem extremen Anstieg der Umsatzraten für das Herbizid Fluorodifen um das 2,5- bis 3fache im Vergleich zur Kontrolle, was wiederum für das Vorhandensein von speziellen Isoenzym-Clustern spricht. Dies lässt auch die rückläufige Tendenz im Spross beim Substrat DCNB vermuten.

Wie schon bei der Gerste gezeigt, reagierten die mikrosomalen GSTs auch bei der Yambohne nicht entsprechend der cytosolischen Fraktion. Bei den drei Substraten CDNB, NBC und NBOC standen reduzierte Umsatzraten in den Sprossextrakten einem gleichzeitigen Anstieg der GST-Aktivität in den Wurzeln gegenüber. Während die Umsatzraten für Fluorodifen durch eine AHL-Gabe nicht beeinflusst wurden, konnte analog zur Gerste keine Aktivität für das Substrat DCNB ermittelt werden.

Im direkten Vergleich von Gerste und Yambohne zeigten die GSTs aus der monokotyledonen Pflanze die stärkeren Reaktionen auf die bakteriellen Signalstoffe, insbesondere im Cytosol. Die GST-Aktivitäten gegenüber den Substraten CDNB und NBC wiesen überwiegend eine Steigerung auf, so dass die AHLs im Falle der Gerste von der Wirkung her am besten mit einem Elicitor oder Safener verglichen werden können. Die Yambohne hingegen hat eine Symbiose mit AHL-Produzenten entwickelt. Diese Pflanze leitete keine

Abwehrreaktion ein und ließ außer beim Substrat Fluorodifen keine eindeutigen Anzeichen für die Notwendigkeit einer Erhöhung der Entgiftungskapazität erkennen.

Die auf einem Lacton basierende Struktur der AHLs weist interessante Analogien zu bekannten GST-Aktivatoren ebenso wie GST-Inhibitoren auf. Studien an furanhaltigen Naturprodukten beispielsweise deuten darauf hin, dass die Furaneinheit für die Induktion von GSTs verantwortlich ist (Lam et al., 1989). Auf die strukturelle Ähnlichkeit von AHLs mit pflanzlichen Furanonen wurde schon auf Seite 35 hingewiesen. Außerdem konnten Sparrins et al. (1982) zeigen, dass auch bestimmte Lactonverbindungen direkt zu einer Aktivierung von GSTs in menschlichem Gewebe führen können. Andererseits existieren GST-Inhibitoren, die ebenfalls deutliche strukturelle Homologien mit AHLs aufweisen. Zu den wirksamsten GST-Inhibitoren sind die Haloenollactone zu zählen. Diese Stoffe bilden Thioesterverbindungen mit dem Cys-47 von pi-GSTs in Säugern, was zur Inhibition der katalytischen Fähigkeit führt (Mahajan und Atkins, 2005). Interessanterweise werden solche Haloenollactone nicht nur als potente und irreversible Inhibitoren beschrieben, sondern auch als selektiv für GST-Isoenzyme (Zheng et al., 1996).

Unter Berücksichtigung genannter Interaktionen mit GSTs führt die Interpretation der hier ermittelten GST-Daten zu dem Schluss, dass die Lactoneinheit der Signalstoffe auch in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen muss. Bei der Gerste konnte der Rückgang der Aktivität spezieller GST-Cluster in der Wurzel gezeigt werden; AHLs könnten bei diesen zu einer selektiven Inhibition ähnlich den Haloenollactonen geführt haben. Tatsächlich konnte in einem Nebenexperiment (Anhang, Tabelle 7.2) festgestellt werden, dass die ursprünglich gemessene GST:CDNB-Aktivität eines Gerstenextraktes durch Zugabe einer äquimolaren Konzentration von C8-HSL um bis zu 42 % reduziert wurde. Neben dem inhibierenden Effekt ist auch die Nutzung von AHL als Substrat der GSTs denkbar. Im Gegenzug wirkten die AHLs bei den anderen Substraten und im Spross der Gerste induzierend auf die GST-Aktivität, was wiederum für die bereits erwähnte Funktion von Lactonen und ähnlichen Verbindungen als Aktivator spricht. Die Induktion im Spross erklärt sich im Hinblick auf die Translokation der AHLs, welche besagt, dass sie in der Wurzel erheblich stärker angereichert werden als im Spross. Letztere sind daher nicht gleichermaßen den Signalstoffen exponiert wie die Wurzeln mit ihrem direkten Kontakt.

Bei der Yambohne zeigte sich im Cytosol außer bei Fluorodifen, was wiederum auf spezielle GSTs deutet, kein Effekt. Unter der Voraussetzung der Notwendigkeit einer intakten

Lactoneinheit lässt sich dies im Zusammenhang mit der Untersuchung der AHL-Dynamik im System erläutern, wo gezeigt wurde, dass die Yambohne über einen effektiven Weg, mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das Enzym Lactonase, zur Hydrolyse der Lactonbindung verfügt. Der Verlust dieser für die biologische Funktionalität entscheidenden Gruppe könnte auch die Einwirkung auf Yambohnen-GSTs verhindert haben.

Bei beiden Pflanzen war in den Mikrosomen insgesamt auffällig, dass keine DCNB-Aktivität messbar war und die Fluorodifenumsatzraten im Gegensatz zum Cytosol deutlich weniger bis gar nicht durch die AHL-Behandlung beeinflusst wurden. Es ist schwierig zu ergründen, welchem Reiz die GSTs der Mikrosomen exakt unterlagen. Aufgrund der Kompartimentierung der Mikrosomen durch die einfache Membran und das Vorkommen spezieller mikrosomaler GSTs (Pflugmacher et al., 2000; Schröder, 2001), die sich evolutionär von löslichen GSTs unterscheiden (Frova, 2003), ist es zu erwarten, dass mGSTs anderen Effekten durch AHLs unterliegen als die cGSTs. Grundsätzlich unterschied sich die mikrosomale Fraktion vom Cytosol durch die Aufteilung der GST-Cluster, denn in ersteren waren stets NBC bzw. NBOC die am effektivsten konjugierten und am deutlichsten durch AHL beeinflussten Substrate, während im Cytosol das CDNB, das häufigste Substrat zur Bestimmung von GST-Aktivität, die höchsten Umsätze lieferte, was wiederum für spezielle Cluster von GST-Isoenzymen spricht, die auf AHL ansprechen.

4.3.1.1 Nutzung von AHLs zur Pflanzenstärkung?

GSTs zählen zu den prominentesten detoxifizierenden Enzymen in zahlreichen Spezies. In der Pflanze nehmen sie durch ihr Potential zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegenüber Umweltgiften eine bedeutende Stellung ein. Durch die Applikation stimulierender Substanzen, z.B. Safenern, kann die Aktivität dieser Entgiftungsenzyme in Nutzpflanzen signifikant erhöht werden. Die Idee, mittels der Aufbringung natürlich vorkommender Komponenten wie den AHLs zu einer Steigerung der Widerstandskraft dieser Nutzpflanzen zu gelangen, bietet sich daher durchaus an. AHLs oder deren Derivate in Zukunft zur Stärkung der pflanzlichen Abwehr und damit der nachhaltigen Erzeugung gesünderer Lebensmittel zu nutzen, ist ein äußerst interessanter Ansatz.

Dieser Idee stehen einige der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Interaktion von Pflanzen und AHLs entgegen. Zum einen muss berücksichtigt werden, dass die GST-Effekte der AHL-Behandlung bei der Yambohne deutlich schwä-

cher ausgeprägt waren als bei der Gerste. Dies rührt sicherlich von der Koevolution der Leguminosen mit AHL-produzierenden Rhizobien her. AHLs scheinen sich bei den Fabaceen nicht als Safener zu eignen, nicht nur aufgrund der geringeren GST-Effekte, sondern auch aufgrund des raschen Abbaus der Signalstoffe in der Rhizosphäre sowie der kaum geklärten Auswirkungen einer externen AHL-Applikation auf die symbiotischen Knöllchenbakterien. Andererseits spricht auch die Labilität und die von der Kettenlänge abhängige rasche adsorptive Festlegung der Komponenten gegen eine industrielle Nutzung dieser Signalstoffe. Mit strukturellen Modifikationen zur Verbesserung der genannten Schwachpunkte mag es jedoch durchaus möglich sein, AHL-Derivate in Zukunft zur Stärkung von Nutzpflanzen, möglicherweise speziell der Monokotyledonen, einzusetzen.

4.3.2 Antioxidativer Stoffwechsel und Thiole

Die Entstehung von ROS speziell in Pflanzen kann vielerlei Ursachen haben. Einerseits können sie als Nebenprodukte des gängigen Metabolismus wie der Photosynthese, der Fettsäureoxidation, der Photorespiration und sogar bei den von Cytochrom katalysierten Entgiftungsreaktionen entstehen (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004), aber auch durch externe Faktoren bedingt sein. Zu den bekanntesten Auslösern von oxidativem Stress zählen anthropogene Quellen wie Xenobiotika und Pestizide aus Industrie und Landwirtschaft und der Eintrag von Schwermetallen ebenso wie biotische Faktoren, sei es Pathogenbefall oder Verwundung durch Fraßfeinde, doch auch abiotische Einwirkungen von Dürre, Wasserstress, Salzstress, Licht- und UV-Strahlung oder Belastung mit gasförmigen Stoffen wie beispielsweise Ozon oder SO₂ (Mittler, 2002; Belford, 2004). Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise sind Pflanzen einer weit größeren Reihe von schädlichen Substanzen ausgesetzt und deutlich verletzbarer (Belford, 2004) als andere Organismen.

Die Pflanze ist daher gezwungen, sich gezielt und effektiv gegen oxidativen Stress zu wappnen. Zusätzlich zu der Aufgabe, die Toxizität der ROS zu kontrollieren, muss die regulative Funktion der ROS sichergestellt sein; dies scheint in *Arabidopsis* ein großes Netzwerk aus mindestens 152 Genen zu erfordern (Mittler et al., 2004), um die komplizierte Balance aus Signalwirkung und Toxizität aufrecht zu erhalten.

In photosynthetisierenden grünen Blättern entsteht H₂O₂ vorwiegend in den Peroxisomen während der Photorespiration und in den Chloroplasten durch Mehler-Reaktion mit anschließender Dismutation des Superoxids (Tejera Garcia et al., 2007). In den Peroxiso-

men wird H_2O_2 während der Photorespiration, der Fettsäure- β -Oxidation und der Disproportionierung von Superoxidradikalen generiert (Jiménez et al., 1997). ROS können aber auch durch enzymatische Aktivität wie die der NADPH-Oxidasen entstehen, um anschließend durch eine Reihe von ROS-entgiftenden Enzymen beseitigt zu werden (Mittler, 2004).

Die Enzyme des antioxidativen Stoffwechsels zeigten sich bei der Gerste in Cytosol wie Mitochondrien ähnlich beeinflusst, da die Aktivitäten in der Wurzel typischerweise sanken, während im Spross ein Anstieg zu verzeichnen war. Besonders deutlich zeigte sich der Rückgang der Umsatzraten in der Wurzel, besonders bei der SOD. Dem wirkte jedoch die Induktion anderer ROS-Entgiftungsenzyme wie der POX oder der mikrosomalen CAT entgegen. Die Balance zwischen SOD und den verschiedenen H_2O_2 -entgiftenden Enzymen wird als grundlegend für ein stabiles Niveau an H_2O_2 angesehen (Mittler et al., 2004). Es kann angenommen werden, dass durch AHLs in der Gerstenwurzel Sauerstoffstress ausgelöst wird, welcher zu einer Inhibition der SOD durch das Peroxid H_2O_2 (Bowler et al., 1992) führt. In den Wurzeln der Gerste werden demnach die in Cytosol und Mitochondrien gesunkenen Aktivitäten der Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus und der SOD durch die gesteigerten Umsatzraten der Peroxidasen bzw. der Katalase ausgeglichen. Es scheint folglich eine deutliche Verschiebung der Aktivitäten von der regulativen Funktion des antioxidativen Zyklus hin zur Notwendigkeit der ROS-Entgiftung stattgefunden zu haben. Hierfür spricht auch, dass diese Reaktion besonders gravierend in dem direkt AHL-exponierten Pflanzenteil auftrat, während im Spross überwiegend eine Induktion der Enzymaktivitäten zu verzeichnen war. Dies deutet auf die Ausbildung einer systemischen Antwort hin. Schuegger et al. (2006) konnten bereits bei Tomate zeigen, dass AHL-Moleküle systemisch von Salicylsäure und Ethylen abhängige Abwehrgene induzieren. Dafür spricht, dass die meisten Enzyme des Ascorbat-Glutathionzyklus in den Sprossextrakten eindeutig induziert wurden, während die Aktivität der Katalase sank. Die stärkste Wirkung ging hierbei meist vom C6-HSL aus.

Als einziges der untersuchten Enzyme verhielt sich hierbei die cytosolische GR widersprüchlich zu den Reaktionen der ihr vorgeschalteten Enzyme. GR zeigte im cytosolischen Extrakt keine Beeinflussung durch C8- und C10-HSL, sondern war nur nach der Behandlung mit C6-HSL in Spross und Wurzel erhöht. In den Mitochondrien hingegen glich das Muster dem der übrigen Enzyme mit der Reduktion der Aktivität in der Wurzel, auch

wenn die Aktivität im Spross leicht sank. Es lässt sich daraus folgern, dass die cytosolische GR noch nicht an die Grenzen ihrer Kapazität gelangt war und ihre Umsatzraten für die Veränderungen unter AHL-Einfluss ausreichend waren. Lediglich die Behandlung mit C6-HSL verursachte die erwähnte höhere Aktivität der GR. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass der Gehalt am freien Thiol GSH durch C6-HSL sowohl im Spross wie auch in der Wurzel erhöht war. Da die Konzentrationen an Cystein und oxidiertem Glutathion, dem GSSG, ebenfalls erhöht waren, kann gefolgert werden, dass das C6-HSL, durch dessen Einfluss in den meisten Enzymen die höchsten Aktivitätsveränderungen verursacht wurden, eine Steigerung der Entgiftungskapazität in der Gerste notwendig machte. Insofern schien die Gerste durch C6-HSL einen erheblich intensiveren oxidativen Stress zu erfahren als durch die beiden langkettigeren Komponenten.

Die Reaktionen der Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus von Yambohne zeigten einen grundlegenden Unterschied zu denen der einkeimblättrigen Gerste. Zwar konnte bei APOX sowie bei MDHAR und GR im Spross eine Erhöhung der Aktivität festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass auch die Yambohne das AHL-Signal durchaus wahrnimmt, jedoch fiel diese Erhöhung im Vergleich zur Gerste schwächer aus. Zudem konnte in den Mikrosomen sogar eine rückläufige Tendenz der Enzymaktivitäten festgestellt werden, was dafür spricht, dass die Leguminose sich durch den Signalstoff nicht in gleichem Maße wie die Gerste gegen einen oxidativen Stress wappnet oder wappnen muss, zumal weder SOD noch POX eine eindeutige Reaktion auf die AHL-Behandlung erkennen ließen. Der interessanteste Effekt konnte in der Yambohne dagegen bei der GPOX festgestellt werden, wo das C6-HSL einen bemerkenswerten Einbruch der GPOX-Aktivität bewirken konnte. Im Spross der Yambohne wurden unter C6-HSL auch gesunkene GSH-Gehalte nachgewiesen, jedoch nicht in der Wurzel, wo der Effekt möglicherweise von anderen Faktoren überlagert wurde. Wichtig ist es außerdem zu bedenken, dass C6-HSL als einziges AHL in seiner intakten Form in die Yambohne transportiert und transloziert wurde, so dass eine Hemmung der GPOX durch dieses AHL in den Bereich des Möglichen fällt.

Leguminosen wie Yambohne stellen ein interessantes Material zur Untersuchung der Thiole dar, nicht nur weil in den Wurzelknöllchen ein aktiver Ascorbat-Glutathion-Zyklus nachgewiesen ist, sondern auch weil der kontinuierliche Nachschub an Glutathion die Stickstofffixierung vor giftigen ROS schützt (Dalton et al., 1986). Bei der Interaktion von

Leguminosen mit Bakterien spielen GSH und HGSH demnach eine wichtige Rolle bei der Nodulation, denn Defizite an diesen beiden Thiolen führen zur Inhibition der Knöllchenbildung (Frendo et al., 2005). Es war daher zu erwarten, dass die Behandlung der Yambohne mit diversen AHLs zu einer Steigerung der Gehalte an freien Thiolen in der Wurzel führen würde, nachdem die Gabe der AHLs den Pflanzen die Anwesenheit eines potentiellen Symbionten signalisieren könnte. Es konnte in der Tat bestätigt werden, dass es in der Wurzel zu einer Erhöhung der Gehalte an GSH und HGSH kam, die bei HGSH besonders deutlich ausfiel. Bei dieser Form des Glutathions konnte auch im Spross der steigernde Einfluss der AHLs gezeigt werden, während die Werte des GSH keinen eindeutigen Trend aufwiesen.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Yambohne, die aufgrund der Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien ständig deren Signalstoffen ausgesetzt ist, die AHLs wahrnimmt und aufgrund der Reaktion der Thiole in der Wurzel auch zu „erkennen“ scheint, aber im Gegensatz zur monokotyledonen Gerste keinem ausgeprägten oxidativen Stress oder einer Abwehrantwort unterliegen dürfte.

4.3.3 2D-PAGE Analyse

Mathesius und Mitarbeiter konnten 2003 eine bemerkenswerte Veränderung des Proteoms der Wurzel von *Medicago truncatula* nach Behandlung mit AHL dokumentieren. Dies geschah sowohl unter der Behandlung mit einem AHL aus *Pseudomonas aeruginosa* (3-oxo-C12-HSL) als auch einem für die symbiotische Art *Sinorhizobium meliloti* spezifischen AHL (3-oxo-C16:1-HSL). Die bakteriellen Signalstoffe beeinflussten in der Modellpflanze bereits in nanomolaren Konzentrationen die Akkumulation von 154 Proteinen aus Wurzelextrakten signifikant. Rund 2/3 der Proteine zeigten bei beiden AHLs die gleichen Veränderungen, während das restliche Drittel der Proteine untereinander abweichend reagierte. Dies lässt vermuten, dass *Medicago truncatula* neben einem Satz allgemeiner AHL-Antworten auch über die Fähigkeit verfügt, auf unterschiedliche AHLs spezifisch zu reagieren (Mathesius et al., 2003), zumindest in der Wurzel. Nachdem bislang jedoch keine Daten über eine mögliche Beeinflussung von Proteinen der oberirdischen Pflanzenteile verfügbar waren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von AHLs auf das Sprossproteom von Gerste und Yambohne untersucht.

Obwohl die oberirdischen Sprosstteile nicht direkt AHL-exponiert waren wie die Wurzel-

fraktion, so konnte der bei Mathesius et al. (2003) in den Wurzeln beschriebene Effekt der bakteriellen Signalstoffe in den Sprossen von Gerste und Yambohne ebenso beobachtet werden. Zwischen 20 und 53 mit der Kontrolle abgleichbare Proteinspots („matches“) wurden je nach Pflanze und Typ des AHL nachweislich durch die Zugabe von AHL in ihrer Intensität im Vergleich zur Kontrolle differentiell reguliert. Dies legt nahe, dass der Einfluss der AHLs in beiden Pflanzen gegeben war. Daneben konnte festgestellt werden, dass im Bereich der GSTs nach der AHL-Behandlung neue Spots detektierbar waren, welche für die bereits besprochenen Induktionen von Aktivitäten gegenüber den Substraten wie DCNB und vor allem Fluorodifen verantwortlich sein könnten. Obwohl die Änderungen im antioxidativen System und den GSTs bei der Yambohne mit wenigen Ausnahmen gemäß enzymatischer Bestimmungen schwächer waren als bei der Gerste, so kam es bei der Leguminose insgesamt in der hier verwendeten cytosolischen Fraktion des Proteoms zu größeren Veränderungen als bei der Gerste. Die Yambohne schien dementsprechend gezielter oder selektiver auf das AHL-Signal zu reagieren, während die Monokotyledone in großen Teilen die Symptomatik einer Stressantwort aufwies. Zuletzt wurde im Extrakt der Yambohne ein Proteinspot beobachtet, welcher deutlich hochreguliert war und sowohl nach molekularer Masse wie auch isoelektrischem Punkt einen Kandidaten für die putative Lactonase der Leguminose darstellt.

4.4 Schlussfolgerungen

- AHLs unterliegen gemäß ihrer physikochemischen Eigenschaften unterschiedlich stark abiotischen Prozessen, wobei die Adsorption an lipophilen Oberflächen in Abhängigkeit von steigender Kettenlänge zum maßgeblichen Faktor wird.
- Der von Delalande et al. (2005) postulierte Abbau von C6-HSL durch Leguminosen konnte in dieser Arbeit an der Yambohne bestätigt und auf C8-HSL und C10-HSL erweitert werden. Als maßgebliche Ursache für die AHL-Verluste im Medium der Yambohne gilt das Enzym Lactonase. In der Gerste waren keine derart expliziten Quorum-quenching-Mechanismen nachweisbar, was unterstreicht, dass die Hydrolyse durch Lactonase eine für Leguminosen spezifische Fähigkeit darstellt.
- Die drei AHLs C6-, C8- und C10-HSL werden in Abhängigkeit von der Länge der Ketten unterschiedlich schnell im Medium abgebaut, wobei die Degradation mit steigender Kettenlänge deutlich zunimmt. Der Einfluss der Pflanzenart wurde nachgewiesen, da bei der Yambohne erheblich größere AHL-Abnahmen messbar waren als bei der Gerste.
- AHLs wurden aufgenommen und schnell in der Pflanze verteilt. Kürzere Ketten bedingten eine höhere Aufnahme und Anreicherung des Signalstoffes im Spross. In der Yambohne war nur C6-HSL im Spross nachweisbar, bei Gerste außerdem das C8-HSL, während das C10-HSL nur metabolisiert, aber nicht in intakter Struktur in den Spross zu gelangen schien, wie mit Tritium-markiertem AHL gezeigt werden konnte. In den Wurzelextrakten konnten alle AHLs bei beiden Pflanzen nachgewiesen werden, welche sicher dort auch an Oberflächen anlagern.
- Beide Pflanzen wandelten extern applizierte AHLs in Metaboliten um, wobei die AHLs mit Hydroxy-Substitution am C3 die typischen Produkte darstellten. In Yambohne waren Metaboliten der AHLs auch im Spross und im Medium nachweisbar, bei Gerste nicht. Gerste erzeugte im Gegensatz zur Leguminose jedoch zusätzlich AHLs mit verkürzten Seitenketten. Die hier nachgewiesenen Metaboliten stellen neben dem Wirken der Acylasen und Lactonasen einen möglichen ersten Schritt bei der Degradation der AHLs im Pflanzengewebe dar.
- Der Einfluss von bakteriellen AHLs auf morphologische und physiologische Parame-

ter der Pflanzen war in diesen Experimenten selten deutlich ausgeprägt. Es konnten im Allgemeinen keine eindeutig signifikanten Veränderungen der Biomasse, der Blattflächen, der Wurzelparameter oder der Pigmentgehalte durch AHL-Behandlung festgestellt werden. Die interessante Tendenz zu einer Anregung des Sprosslängen- und Lateralwurzelswachstums speziell bei Gerste war jedoch gegeben. Bei Yambohne wurde ein Rückgang der Carotinoidgehalte speziell bei C10-HSL dokumentiert. Die pH-Werte waren durch die Pflanzen, nicht aber wesentlich durch AHL beeinflusst, können aber mit der Stabilität der Signalkomponenten interagieren.

- Die Pflanzen erkannten das AHL-Signal, weil spezielle Isoenzym-Cluster der GSTs reagierten. Es zeigte sich, dass das C6-HSL in beiden Pflanzen und besonders bei Gerste die stärkste Wirkung auf die Enzymaktivitäten ausübte. Im Gegensatz zur Gerste wies die Yambohne geringere Anzeichen einer Stress- oder Abwehrreaktion als Folge der AHL-Exposition auf, obwohl die Zahl der regulierten Proteine im cytosolischen Extrakt höher war als bei Gerste. Bei letztgenannter Art schien dagegen eine deutliche Verschiebung der Aktivitäten von der regulativen Funktion des antioxidativen Zyklus hin zur Initiierung der Detoxifizierung stattgefunden zu haben.
- Die weiterführende Untersuchung der Wirkung von AHLs auf Pflanzen stellt eine interessante Herausforderung für weitere anschließende Experimente dar. Viele Fragen, die sich aus den hier gewonnenen Ergebnissen ableiten lassen, zum Beispiel nach der genauen Funktion des innerpflanzlichen Transports, der Entstehung der AHL-Metaboliten oder nach der Signaltransduktion der Enzymantwort werden nach ihrer Beantwortung durch anschließende Untersuchungen mit Sicherheit zu einem besseren Verständnis der Interaktion bakterieller Signalstoffe und Pflanzen beitragen.

5 Zusammenfassung

Das Phänomen der bakteriellen Kommunikation hat in den letzten Jahren vermehrte Aufmerksamkeit erfahren, da die Bedeutung des sogenannten „Quorum sensing“ für die menschliche Gesundheit wie auch den Bereich der Umwelt und der mikrobiellen Ökologie immer deutlicher wird. Bei letzteren wird insbesondere über den möglichen Einfluss bakterieller Signalstoffe auf die Interaktion mit Nutzpflanzen diskutiert, sei es zu deren Stärkung, zur Förderung von PGPR oder zur Bekämpfung von pathogenen Arten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, welchen Einfluss die *N*-Acyl-Homoserinlactone (AHLs) als Botenstoffe Gram-negativer Bakterien auf die Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und die tropische Leguminose Yambohne (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban) ausüben. Die AHLs dienen den Mikroorganismen zur Regulation verschiedenster wichtiger Prozesse wie Virulenz, Biofilmformation, Produktion von Antibiotika oder Motilität. Mittels Quorum sensing wird dabei sichergestellt, dass ein metabolischer Aufwand zu einem möglichst effizienten Zeitpunkt geschieht, also dann, wenn räumliche und zeitliche Gegebenheiten ebenso passend sind wie die Populationsdichte.

Über das Schicksal der AHLs in Kontakt mit der Pflanze liegen allerdings derzeit nur limitierte Kenntnisse vor, auch wenn eine zunehmende Zahl an Publikationen darauf hindeutet, dass Pflanzen durchaus in der Lage sind, dem Signal der Bakterien zu „lauschen“ und entsprechende Antworten auszubilden. Informationen darüber, welchen Wechselwirkungen der Signalstoff mit der Pflanze unterliegt, ob er abgebaut, adsorbiert oder unter Umständen gar in die Pflanze transportiert wird, existierten bislang kaum. Aus diesem Grunde wurde selbige Fragestellung in dieser Arbeit untersucht. Hierzu wurde eine spezielle axenische Modellrhizosphäre aus Glasröhren verwendet, die zur Stabilisierung mit Glasperlen befüllt war. Als Signalstoffe wurden das *N*-Hexanoyl- (C6-HSL), das *N*-Octanoyl- (C8-HSL) sowie das *N*-Decanoyl-Homoserinlacton (C10-HSL) eingesetzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die hier untersuchten AHLs in Abhängigkeit von ihrer strukturellen Konformation in unterschiedlich starkem Maße abgebaut, metabolisiert und

in der Pflanze verteilt werden. Maßgeblicher Faktor hierbei war die Länge der Acylkette bzw. der lipophile Charakter des Signalmoleküls. Verluste vor allem durch Adsorption bei C10-HSL an der Glasoberfläche von rund 25-30 % waren gegenüber den beiden kurzkettigen AHLs deutlich höher. Mittels radioaktiv markiertem Signalstoff wurde zudem belegt, dass erhöhte Adsorptionsraten von C10-HSL auch an der Wurzeloberfläche auftraten (ca. doppelt so hoch wie bei C8-HSL). Im Spross lag dagegen C8-HSL doppelt so hoch konzentriert vor wie C10-HSL. Der Transport in den Spross der Pflanzen ging dabei gemäß der Ergebnisse in dieser Arbeit umso leichter vonstatten, je kürzer die Seitenkette war, da das kurzkettige C6-HSL als einziges im Spross beider Pflanzen nachgewiesen werden konnte, C8-HSL nur bei Gerste, C10-HSL hingegen in keiner der beiden Pflanzen. Die AHLs unterlagen neben Adsorption an abiotischen wie pflanzlichen Oberflächen genauso aktiver Degradation durch die Pflanzen, speziell durch die Yambohne. Diese Leguminose zeigte im Gegensatz zur Gerste einen aktiven Abbaumechanismus auf, dem das Enzym Lactonase zugrunde gelegt wird. Während die ursprüngliche Konzentration an AHL durch den Einfluss der Gerste im Medium nur um 17-35 % reduziert wurde, kam es bei der Yambohne zu pflanzlich bedingten AHL-Abnahmen von 49-71 %. Außerdem trat im Nährmedium der Yambohne eine erheblich stärkere Anreicherung des als Signal unbedeutenden D-AHLs gegenüber dem L-Stereoisomer (bis 177 %) auf als dies in der Gerste (ca. 11 %) beobachtet werden konnte. Eine Untersuchung der Metaboliten von AHL im Pflanzengewebe zeigte klar, dass in beiden Pflanzen vor allem hydroxylierte Formen der Signalstoffe als primäre Metaboliten gebildet worden waren. Bei keiner der beiden Pflanzen wurden Metaboliten des C6-HSL nachgewiesen, dafür jedoch AHLs mit um eine C2-Einheit verkürzten Seitenketten im Gewebe der Gersten.

Während die AHL-Behandlung auf physiologische Parameter wie das Frischgewicht, die Blattflächen, den Wurzelaufbau oder die Pigmentgehalte nur vereinzelte Effekte mit einem Hinweis auf eine Änderung der Wurzelarchitektur (Förderung der Ausbildung von Seitenwurzeln) und Erhöhung der Sprosslängen um rund 1 cm zeigte, wurde der Einfluss der Signalstoffe auf die Glutathion S-Transferasen (GSTs) und die Enzyme des antioxidativen Ascorbat-Glutathionzyklus deutlich. Die Leguminose Yambohne schien aufgrund ihrer natürlichen Exposition zu AHL-produzierenden Knöllchenbakterien besser als Gerste diesen Signalstoffen angepasst zu sein, was aus dem gezielten Abbau der Substanzen ebenso ersichtlich ist wie aus einer sehr gemäßigten enzymatischen Beeinflussung. Die

geringe Reaktion der untersuchten Enzyme von Yambohne, mit Ausnahme einer um das bis zu dreifache erhöhten Aktivität einer GST für die Konjugation eines Diphenyletherherbizids, könnte hierbei allerdings auch durch den zeitigen Abbau der Signalstoffe bedingt sein. In der Gerste wurden Isoenzym-Cluster der GSTs gemäß der verschiedenen untersuchten Substrate (CDNB, DCNB, NBC, NBOC, Fluorodifen) unterschiedlich reguliert, was auf eine differenzierte AHL-Antwort schließen lässt. Wie bei den GSTs, so zeigte sich auch der antioxidativ wirksame Ascorbat-Glutathionzyklus bei der Yambohne deutlich weniger durch die AHL-Gabe beeinflusst als die Gerste, bei der die Aktivitäten der involvierten Enzyme tendenziell in der Wurzel einem Rückgang unterlagen, sich jedoch im Spross erhöht zeigten. Die Enzymaktivitäten in den Mikrosomen unterschieden sich bei beiden Pflanzen in ihrer Reaktion auf AHL von denen der cytosolischen Fraktion, was mit deren Kompartimentierung in der Zelle und dem Vorkommen spezieller Isoenzyme mikrosomaler GSTs begründet werden kann. Mittels 2D-Gelelektrophorese konnte schließlich gezeigt werden, dass in beiden Pflanzenarten eine bestimmte Zahl an Proteinen des Sprosses (Gerste bis zu 38, Yambohne bis zu 53 Spots) einer Regulation durch die AHL-Exposition unterlag. Im Bereich der GST konnten zwar kaum differentiell regulierte Proteinspots gezeigt werden, das Erscheinen neuer Spots im GST-Bereich besonders bei der Gerste liefert jedoch einen Hinweis auf die Expression von Isoenzymen nach AHL-Behandlung. Ein Proteinspot, der gemäß pI und Molekulargewicht eine putative Lactonase darstellen kann, konnte in der Yambohne als signifikant induziert (>3fach im Vergleich zur Kontrolle) beschrieben werden.

Die hier erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass Pflanzen durchaus auf den bakteriellen Signalstoff AHL reagieren können. Leguminosen wie die Yambohne scheinen durch ihre Symbiose mit Knöllchenbakterien dem Signal evolutionär besser angepasst zu sein als die Gerste. Bemerkenswert ist sicherlich der Befund, dass nicht nur Bakterien zum „Quorum quenching“, also der gezielten Interferenz mit Signalmolekülen fähig sind, sondern dass auch Pflanzen sehr wohl die Möglichkeit besitzen, in der bakteriellen Kommunikation ein Wort mitzureden.

6 Literaturverzeichnis

- Aguilar C, Friscina A, Devescovi G, Kojic M, Venturi V** (2003) Identification of Quorum-Sensing-Regulated Genes of *Burkholderia cepacia*. *Journal of Bacteriology* 185 No. 21: 6456-6462
- Aldhous P** (2005) Tropical medicine: Melioidosis? Never heard of it. *Nature* 434: 692-693
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399
- Atkinson S, Sockett RE, Cámara M, Williams P** (2006) Quorum Sensing and the Lifestyle of *Yersinia*. *Curr. Issues Mol. Biol.* 8: 1-10
- Bakker P, Raaijmakers J, Bloemberg G, Höfte M, Lemanceau P, Cooke M** (2007) Foreword. *European Journal of Plant Pathology* DOI 10.1007/s10658-007-9114-z
- Barnard A, Salmond G** (2007) Quorum sensing in *Erwinia* species. *Analytical and Bio-analytical Chemistry* 387: 415-423
- Bassler BL** (2002) Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell* 109: 421-424
- Battke F, Schramel P, Ernst D** (2003) A Novel Method for In Vitro Culture of Plants: Cultivation of Barley in a Floating Hydroponic System. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 405-409
- Bauer WD, Mathesius U** (2004) Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 429-433
- Bauer WD, Robinson JB** (2002) Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 234-237
- Behr A** (2005) Flower-Power gegen Bakterien. *NZZ* am Sonntag 28. 08. 2005
- Belford EJD** (2004) Purification and characterization of Xenobiotic detoxification enzymes in *Pachyrhizus* „yam bean“ and their role in agrochemical metabolism. PhD thesis. <http://mediatum2.ub.tum.de/doc/603436/document.pdf>
- Blech J** (2001) Geheimsprache der Bakterien. *Der Spiegel* 34
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ** (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 343-350

- Blosser-Middleton RS, Gray KM** (2001) Multiple N-Acyl Homoserine Lactone Signals of *Rhizobium leguminosarum* Are Synthesized in a Distinct Temporal Pattern. *Journal of Bacteriology* 183: 6771-6777
- Boettcher KJ, Ruby EG** (1995) Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. *Journal of Bacteriology* 177: 1053-1058
- Boşgelmez-Tinaz G** (2003) Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Turkish Journal of Biology* 27: 85-93
- Bowler C, Van Montagu M, Inzé D** (1992) Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Breuer H** (2005) Schluss mit dem Bakterien-Geplapper. *SonntagsZeitung (Schweiz)* 14.09.2005
- Byers JT, Lucas C, Salmond GPC, Welch M** (2002) Nonenzymatic Turnover of an *Erwinia carotovora* Quorum-Sensing Signaling Molecule. *Journal of Bacteriology* 184/4: 1163-1171
- Cataldi TRI, Bianco G, Palazzo L, Quaranta V** (2007) Occurrence of N-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 361: 226-235
- Chang JH, Rathjen JP, Bernal AJ, Staskawicz BJ, Michelmore RW** (2000) *avrPto* Enhances Growth and Necrosis Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Tomato Lines Lacking Either *Pto* or *Prf*. *MPMI* 13: 568-571
- Charlton TS, de Nys R, Netting A, Kumar N, Hentzer M, Givskov M, Kjelleberg S** (2000) A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environmental Microbiology* 2 (5): 530-541
- Chen G-X, Asada K** (1992) Inactivation of Ascorbate Peroxidase by Thiols Requires Hydrogen Peroxide. *Plant Cell Physiology* 33: 117-123
- Chhabra SR, Harty C, Hooi DSW, Daykin M, Williams P, Telford G, Pritchard DI, Bycroft BW** (2003) Synthetic Analogues of the Bacterial Signal (Quorum Sensing) Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine Lactone as Immune Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry* 46: 97-104
- Cho H-Y, Lee HJ, Kong K-H** (2007) A Phi Class Glutathione S-transferase from *Oryza sativa* (OsGSTF5): Molecular Cloning, Expression and Biochemical Characteristics. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40, No. 4 511-516
- Choi SH, Greenberg EP** (1992) Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *Journal of Bacteriology* 174: 4064-4069
- Cohen SA, Michaud DP** (1993) Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids via High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 211: 279-287

- Conway B, Greenberg EP** (2002) Quorum-Sensing Signals and Quorum-Sensing Genes in *Burkholderia vietnamiensis*. *Journal of Bacteriology* 184/4: 1187-1191
- Dalton DA, Russell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ** (1986) Enzymatic Reactions of Ascorbate and Glutathione That Prevent Peroxide Damage in Soybean Root Nodules. *PNAS* 83: 3811-3815
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP** (1998) The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* 280: 295-298
- De Kievit TR, Iglewski BH** (2000) Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity* 68, Nr. 9: 4839-4849
- Delalande L, Faure D, Raffoux A, Uroz S, D'Angelo-Picard C, Elasri M, Carlier A, Berruyer R, Petit A, Williams P, Dessaux Y** (2005) N-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiology Ecology* 52: 13-20
- Diekmann F** (2005) Translokation von Fremdstoff-Metaboliten und ihr Einfluß auf die Rhizosphäre. PhD thesis. Center for Food and Life Science Weihenstephan, Department of Agriculture, Technical University Munich, Germany.
- Diethelm M** (2005) Veränderungen in der Expression ausgesuchter Entgiftungsenzyme in *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi und *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban nach Elicitierung. Master thesis. Center for Food and Life Science Weihenstephan, Department of Agriculture, Technical University Munich, Germany.
- Dixon DP, Cole DJ, Edwards R** (1998) Purification, regulation and cloning of a glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin-inducible type-III GSTs. *Plant Molecular Biology* 36: 75-87
- Dong Y-H, Wang L-H, Xu J-L, Zhang H-B, Zhang X-F, Zhang L-H** (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411: 813-817
- Dong Y-H, Xu J-L, Li X-Z, Zhang L-H** (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *PNAS* 97: 3526-3531
- Dong Y-H, Zhang L-H** (2005) Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *The Journal of Microbiology* 43, No. S: 101-109
- Dumenyo C, Mukherjee A, Chun W, Chatterjee A** (1998) Genetic and physiological evidence for the production of N-acyl homoserine lactones by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and other fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* species. *European Journal of Plant Pathology* 104: 569-582
- Eberhard A** (1972) Inhibition and Activation of Bacterial Luciferase Synthesis. *Journal of Bacteriology* 109: 1101-1105
- Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ** (1981) Structural Identification of Autoinducer of *Photobacterium fischeri* Luciferase. *Biochemistry* 20: 2444-2449
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5: 192-198

- Elasri M, Delorme S, Lemanceau P, Stewart G, Laue B, Glickmann E, Oger PM, Dessaux Y** (2001) Acyl-Homoserine Lactone Production Is More Common among Plant-Associated *Pseudomonas* spp. than among Soilborne *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1198-1209
- Elstner EF, Obwald WF, Schneider I** (1996) *Phytopathologie: allgemeine und biochemische Grundlagen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Englmann M, Fekete A, Kuttler C, Frommberger M, Li X, Gebefugi I, Fekete J, Schmitt-Kopplin P** (2007) The hydrolysis of unsubstituted N-acylhomoserine lactones to their homoserine metabolites: Analytical approaches using ultra performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1160: 184-193
- Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A** (2007) G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 39: 175-191
- Fekete A, Frommberger M, Rothballer M, Li X, Englmann M, Fekete J, Hartmann A, Eberl L, Schmitt-Kopplin P** (2007) Identification of bacterial N-acylhomoserine lactones (AHLs) with a combination of ultra-performance liquid chromatography (UPLC), ultra-high-resolution mass spectrometry, and in-situ biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 455-467
- Folwaczny M, Hickel R** (2003) Biofilm - Problem oder Perspektive? *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 58: 648-659
- Foyer CH** (1993) Ascorbic acid. In RG Alscher, JL Hess, eds, *Antioxidants in higher plants*. CRC Press, ISBN 0-8493-6328-4, pp 31-58
- Frendo P, Harrison J, Norman C, Jiménez MJH, Van de Sype G, Gilabert A, Puppo A** (2005) Glutathione and Homoglutathione Play a Critical Role in the Nodulation Process of *Medicago truncatula*. *MPMI* 18, No. 3 254-259
- Frommberger M** (2005) *Entwicklung von Methoden zur Analyse von N-Acyl-Homoserinlactonen durch Kapillartrenntechniken und Massenspektrometrie*. PhD thesis. Technical University Munich.
- Frommberger M, Hertkorn N, Englmann M, Jakoby S, Hartmann A, Kettrup A, Schmitt-Kopplin P** (2005) Analysis of N-acylhomoserine lactones after alkaline hydrolysis and anion-exchange solid-phase extraction by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 26: 1523-1532
- Frova C** (2003) The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia Plantarum* 119: 469-479
- Fuqua C, Greenberg EP** (2002) Listening on bacteria: Acyl-homoserine lactone signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 285-295
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP** (1994) Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulator. *Journal of Bacteriology* 176: 269-275
- Gao M, Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD** (2003) Production of Substances by *Medicago truncatula* that Affect Bacterial Quorum Sensing. *MPMI* 16/9: 827-834
- González JE, Keshavan ND** (2006) Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 859-875

- González JE, Marketon MM** (2003) Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing *Rhizobia*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 574-592
- Götz C, Fekete A, Gebefuegi I, Forczek S, Fuksová K, Li X, Englmann M, Gryndler M, Hartmann A, Matucha M, Schmitt-Kopplin P, Schröder P** (2007) Uptake, degradation and chiral discrimination of N-acyl-D/L -homoserine lactones by barley (*Hordeum vulgare*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 1447-1457.
- Govan JR, Deretic V** (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 60: 539-574
- Gram L, Christensen AB, Ravn L, Molin S, Givskov M** (1999) Production of Acylated Homoserine Lactones by Psychrotrophic Members of the Enterobacteriaceae Isolated from Foods. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3458-3463
- Halliwell B** (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* 141: 312-322
- Hayashi M, Nishimura M** (2003) Entering a new era of research on plant peroxisomes. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 577-582
- Heeb S, Haas D** (2001) Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria. *MPMI* 14 Nr. 12: 1351-1363
- Heinze M, Gerhardt B** (2002) Plant Catalases. In A Baker, IA Graham, eds, *Plant Peroxisomes. Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-0587-3, pp 103-140
- Hengen PN** (1997) Emergency sterilization using microwaves. *Trends in Biochemical Sciences* 22: 68-69
- Hense BA, Kuttler C, Müller J, Rothballer M, Hartmann A, Kreft J-U** (2007) Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nature Microbiology Reviews* 5: 230-239
- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Høiby N, Givskov M** (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal* 22: 3803-3815
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H** (2001) A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42: 462-468
- Horswill A, Stoodley P, Stewart P, Parsek M** (2007) The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 371-380
- Horwitz W, Kamps LR, Boyer KW** (1980) Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 63/6: 1344-1354
- Hossain MA, Asada K** (1984) Purification of Dehydroascorbate Reductase from Spinach and Its Characterization as a Thiol Enzyme. *Plant Cell Physiol.* 25: 85-92

- Jaenicke L** (1984) Einführung in die Praxis des Biochemikers. Praktikumsbuch. Institut für Biochemie der Universität Köln.
- Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F** (1997) Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiology* 114: 275-284
- Joseph CM, Phillips DA** (2003) Metabolites from soil bacteria affect plant water relations. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 189-192
- Kaplan JB** (2005) Methods for the treatment and prevention of bacterial biofilms. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 15: 955-965
- Kirkman TW** (1996) Statistists to Use. <http://www.physics.csbsju.edu/stats/> (19.09.2007)
- Komatsu H, Obata F** (2003) An optimized method for determination of intracellular glutathione in mouse macrophage cultures by fluorimetric high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 17: 345-350
- Kröniger W** (1994) Biochemische, entwicklungsphysiologische und ökophysiologische Untersuchungen der Superoxiddismutasen in Fichten (*Picea abies* L. Karst). IFU Schriftenreihe, Fraunhofer-Institut für Atmosphärische Umweltforschung Band 27-94
- Kutter S, Hartmann A, Schmid M** (2006) Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 262-271
- Lam LKT, Li Y, Hasegawa S** (1989) Effects of Citrus Limonoids on Glutathione S-Transferase Activity in Mice. *J. Agric. Food Chem.* 37: 878-880
- Lamoureux GL, Rusness DG** (1989) The Role of Glutathione and Glutathione S-transferases in pesticide metabolism, selectivity, and mode of action in plants and insects. In P Dolphin, Avramovic, ed, *Glutathione: Chemical, biochemical, and medical aspects*, Part B. John Wiley and Sons
- Lara-Nuñez A, Romero-Romero T, Ventura JL, Blancas V, Anaya AL, Cruz-Ortega R** (2006) Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant, Cell and Environment* 29: 2009-2016
- Leadbetter JR, Greenberg EP** (2000) Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology* 182: 6921-6926
- Lederer B** (2002) Die Regulation des antioxidativen Systems in höheren Pflanzen. PhD thesis: Universität Konstanz, Fachbereich für Biologie.
- Li X, Fekete A, Englmann M, Götz C, Rothballer M, Frommberger M, Buddrus K, Cai C, Schröder P, Hartmann A, Chen G, Schmitt-Kopplin P** (2006) Development and application of a method for the analysis of N-acylhomoserine lactones by solid-phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1134: 186-193
- Licciardello G, Bertani I, Steindler L, Bella P, Venturi V, Catara V** (2007) *Pseudomonas corrugata* contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 222-234

- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382
- Loh J, Pierson EA, Pierson LS, Stacey G, Chatterjee A** (2002) Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 5, DOI 10.1016/S1369-5266(02)00274-1
- Lopez-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A** (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO Journal* 19: 6770-6777
- Lupp C, Urbanowski M, Greenberg EP, Ruby EG** (2003) The *Vibrio fischeri* quorum-sensing systems *ain* and *lux* sequentially induce luminescence gene expression and are important for persistence in the squid host. *Molecular Microbiology* 50: 319-331
- Lyubenova L** (2007) Untersuchungen der Entgiftungskapazität verschiedener Pflanzenarten im Hinblick auf ihre Verwendung für die Phytoremediation unter Berücksichtigung von Schwermetallen. PhD thesis. Center for Food and Life Science Weihenstephan, Department of Agriculture, Technical University Munich, Germany.
- Lyubenova L, Götz C, Golan-Goldhirsh A, Schröder P** (2007) Direct effect of Cd on Glutathione S-transferase and Glutathione reductase from *Calystegia sepium*. *International Journal of Phytoremediation* 9: 1-9
- Mahajan S, Atkins WM** (2005) The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 62: 1221-1233
- Maritano S, Marchesini A, Kohzuma T, Suzuki S** (1996) Stability of ascorbate oxidase extracted from *Cucurbita pepo*. *Phytochemistry* 41: 349-351
- Marketon MM, González JE** (2002) Identification of Two Quorum-Sensing Systems in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 184: 3466-3475
- Marrs KA** (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158
- Matamoros MA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M** (1999) Glutathione and Homoglutathione Synthesis in Legume Root Nodules. *Plant Physiology* 121: 879-888
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anollés G, Rolfe BG, Bauer WD** (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *PNAS* 100: 1444-1449
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inzé D** (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* 49: 649-667
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-6055
- McDougald D, Rice SA, Kjelleberg S** (2006) Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 445-453
- Menone ML, Pflugmacher S** (2005) Effects of 3-chlorobiphenyl on photosynthetic oxygen production, glutathione content and detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Chemosphere* 60: 79-84

- Michael B, Smith JN, Swift S, Heffron F, Ahmer BMM** (2001) SdiA of *Salmonella enterica* Is a LuxR Homolog That Detects Mixed Microbial Communities. *J. Bacteriol.* 183: 5733-5742
- Miller MB, Bassler BL** (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55: 165-199
- Minorsky PV** (2002) The Hot and the Classic. Peroxisomes: Organelles of diverse function. *Plant Physiology* 130: 517-518
- Misra HP, Fridovich I** (1971) The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* 247: 3170-3175
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7 No.9: 405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498
- Mole BM, Baltrus DA, Dangl JL, Grant SR** (2007) Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends in Microbiology* In Press, Corrected Proof
- Morell S, Follmann H, De Tullio M, Haberlein I** (1997) Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Letters* 414: 567-570
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Nachin L, Barras F** (2000) External pH: An Environmental Signal That Helps to Rationalize pel Gene Duplication in *Erwinia chrysanthemi*. *MPMI* Vol. 13, No. 8: 882-886
- Nasser W, Reverchon S** (2006) New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 381-390
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW** (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *Journal of Bacteriology* 104/1: 313-322
- Nepovim A, Podlipna R, Soudek P, Schröder P, Vanek T** (2004) Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. *Chemosphere* 57: 1007-1015
- Neustifter JE** (2007) Phytoremediation organischer Schadstoffe mit Hilfe von *Phragmites australis*. PhD thesis Center for Food and Life Science Weihenstephan, Department of Agriculture, Technical University Munich, Germany.
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279
- Nultsch W** (1996) *Allgemeine Botanik*, Vol 10. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- O'Neal ME, Landis DA, Isaacs R** (2002) An Inexpensive, Accurate Method for Measuring Leaf Area and Defoliation Through Digital Image Analysis. *Journal of Economic Entomology* 95 (6): 1190-1194
- Obst U** (2007) Quorum sensing: bacterial chatting. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 369-370

- Oßwald WF** (1995) Die Wirt-Parasit-Beziehungen: Bakterien und Pilze als Parasiten. In B Hock, EF Elstner, eds, *Schadwirkungen auf Pflanzen*, Vol 3. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford, pp 315-369.
- Palma JM, Jiménez A, Sandalio LM, Corpas FJ, Lundqvist M, Gómez M, Sevilla F, del Río LA** (2006) Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants. *Journal of Experimental Botany* 57, No. 8: 1747-1758
- Park S-Y, Lee SJ, Oh T-K, Oh J-W, Koo B-T, Yum D-Y, Lee J-K** (2003) AhID, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* 149: 1541-1550
- Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C** (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65: 1879-1893
- Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH** (1999) Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. *Journal of Bacteriology* 181: 1203-1210.
- Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C** (2003) Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment* 26: 189-199
- Pflugmacher S, Schröder P, Sandermann H** (2000) Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 54: 267-273
- Pierson LS, Keppenne VD, Wood DW** (1994) Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *Journal of Bacteriology* 176: 3966-3974
- Polle A** (2001) Dissecting the Superoxide Dismutase-Ascorbate-Glutathione-Pathway in Chloroplasts by Metabolic Modeling. Computer Simulations as a Step towards Flux Analysis. *Plant Physiology* 126: 445-462
- Pomini AM, Araújo WL, Marsaioli AJ** (2006) Structural Elucidation and Biological Activity of Acyl-homoserine Lactones from the Phytopathogen *Pantoea ananatis* Serrano 1928. *Journal of Chemical Ecology* 32: 1769-1778
- Pongsilp N, Triplett EW, Sadowsky MJ** (2005) Detection of Homoserine Lactone-Like Quorum Sensing Molecules in *Bradyrhizobium* Strains. *Current Microbiology* 51: 250-254
- Poonguzhali S, Madhaiyan M, Sa T** (2007) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals is wide spread in gram-negative *Methylobacterium*. *Journal of microbiology and biotechnology* 17 Nr. 2: 226-233
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N** (2002) Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 537-548
- Quiñones B, Dulla G, Lindow SE** (2005) Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *MPMI* 18 No. 7: 682-693
- Qureshi MI, Qadir S, Zolla L** (2007) Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology* 164: 1239-1260

- Rasmussen TB, Manefield M, Andersen JB, Eberl L, Anthoni U, Christophersen C, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M** (2000) How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology* 146: 3237-3244
- Rodriguez Milla MA, Maurer A, Huete AR, Gustafson JP** (2003) Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *The Plant Journal* 36: 602-615
- Rothballer MH** (2003) In situ Lokalisierung, PGPR-Effekt und Regulation des ipdC-Gens der *Azospirillum brasilense* Stämme Sp7 und Sp245 bei verschiedenen Weizensorten, sowie endophytische Kolonisierung durch *Herbaspirillum* sp. N3. PhD thesis. http://edoc.ub.uni-muenchen.de/archive/00001795/01/Rothballer_Michael.pdf
- Rouhier N, Jacquot J-P** (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 38: 1413-1421
- Rouse D, Nordheim E, Hirano S, Upper C** (1985) A model relating the probability of foliar disease incidence to the population frequencies of bacterial plant pathogens. *Phytopathology* 75 Nr. 5: 505-509
- Santos ACO, Cavalcanti MSM, Coelho LCBB** (1996) Chemical composition and nutritional potential of yam bean seeds (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* 49: 35-41
- Scalla R, Roulet A** (2002) Cloning and characterization of a glutathione S-transferase induced by a herbicide safener in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 116: 336-344
- Scandalios JG** (1993) Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology* 101: 7-12
- Schrader M, Fahimi HD** (2004) Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology* 122: 383-393
- Schröder P** (2001) The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. In D Grill, M Tausz, LJ De Kok, eds, *Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Schröder P** (2006) Enzymes transferring biomolecules to organic foreign compounds: a role for glucosyltransferase and glutathione S-transferase in phytoremediation. In M Mackova, D Dowling, T Macek, eds, *Phytoremediation and rhizoremediation- theoretical background*. Springer Verlag, Hamburg, pp 137-142
- Schröder P, Collins C** (2002) Conjugating Enzymes Involved in Xenobiotic Metabolism of Organic Xenobiotics in Plants. *International Journal of Phytoremediation* 4: 247-265
- Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, Schmid M, Breusegem Fv, Eberl L, Hartmann A, Langebartels C** (2006) Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-Lhomoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell and Environment* 29: 909-918
- Schwinn J, Sprinz H, Leistner S, Brede O** (1998) The effects of a thiol-containing quinazolinone derivative (MECH) on the lipid oxidation in bilayer liposomes. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 232: 35-37

- Sen CK** (1997) Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 8: 660-672
- Shapiro SS, Wilk MB** (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1305-1319
- Shiner EK, Rumbaugh KP, Williams SC** (2005) Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 935-947
- Siddiqui Z** (2006) PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. In *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, pp 111-142
- Silberman S** (2003) The Bacteria Whisperer. *WIRED Magazine*. Issue 11.04
- Sørensen M** (1996) Yam bean (*Pachyrhizus* DC.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 2. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome. ISBN 92-9043-282-9
- Sparrins VL, Chuan J, Wattenberg LW** (1982) Enhancement of Glutathione S-Transferase Activity of the Esophagus by Phenols, Lactones, and Benzyl Isothiocyanate. *Cancer Research* 42: 1205-1207
- Steidle A, Sigl K, Schuegger R, Ihring A, Schmid M, Gantner S, Stoffels M, Riedel K, Givskov M, Hartmann A, Langebartels C, Eberl L** (2001) Visualization of N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Cell-Cell Communication between Bacteria Colonizing the Tomato Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 67/12: 5762-5770
- Stewart PS** (2003) New ways to stop biofilm infections. *The Lancet* 361: 97
- Swift S, Throup JP, Williams P, Salmond GPC, Stewart GSAB** (1996) Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends in Biochemical Sciences* 21: 214-219
- Taga ME, Bassler BL** (2003) Chemical communication among bacteria. *PNAS* 100: 14549-14554
- Taminiau B, Daykin M, Swift S, Boschioli M-L, Tibor A, Lestrade P, De Bolle X, O'Callaghan D, Williams P, Letesson J-J** (2002) Identification of a Quorum-Sensing Signal Molecule in the Facultative Intracellular Pathogen *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity* 70: 3004-3011
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Margis R, Margis-Pinheiro M** (2004) Analysis of the Molecular Evolutionary History of the Ascorbate Peroxidase Gene Family: Inferences from the Rice Genome. *Journal of Molecular Evolution* 59: 761-770
- Tejera Garcia NA, Iribarne C, Palma F, Lluch C** (2007) Inhibition of the catalase activity from *Phaseolus vulgaris* and *Medicago sativa* by sodium chloride. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 535-541
- Thomashow LS, Weller DM** (1988) Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology* 170: 3499-3508

- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P** (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138
- Tomasz A** (1965) Control of the Competent State in *Pneumococcus* by a Hormone-Like Cell Product: An Example for a New Type of Regulatory Mechanism in Bacteria. *Nature* 208: 155-159
- Tseng MJ, Liu C-W, Yiu J-C** (2007) Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* In Press, Accepted Manuscript
- Ulrich RL, DeShazer D, Brueggemann EE, Hines HB, Oyston PC, Jeddelloh JA** (2004 a) Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Medical Microbiology* 53: 1053-1064
- Ulrich RL, DeShazer D, Hines HB, Jeddelloh JA** (2004 b) Quorum Sensing: a Transcriptional Regulatory System Involved in the Pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infection and Immunity* 72: 6589-6596
- Ulrich RL, Hines HB, Parthasarathy N, Jeddelloh JA** (2004 c) Mutational Analysis and Biochemical Characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 Quorum-Sensing Network. *Journal of Bacteriology* 186: 4350-4360
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann K, Roveri A, Schomburg D, Flohé L** (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology* 252: 38-53
- Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH** (1998) Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves. *Plant Physiology* 117: 1103-1114
- Venturi V, Venuti C, Devescovi G, Lucchese C, Friscina A, Degrassi G, Aguilar C, Mazzucchi U** (2004) The plant pathogen *Erwinia amylovora* produces acyl-homoserine lactone signal molecules in vitro and in planta. *FEMS Microbiology Letters* 241: 179-183
- Verma S, Dubey RS** (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655
- Visick KL, Ruby EG** (2006) *Vibrio fischeri* and its host: it takes two to tango. *Current Opinion in Microbiology* 9: 632-638
- von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL** (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 41: 455-482
- Wagner VE, Frelinger JG, Barth RK, Iglewski BH** (2006) Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends in Microbiology* 14 No.2: 55-58
- Wang L-H, Weng L-X, Dong Y-H, Zhang L-H** (2004) Specificity and Enzyme Kinetics of the Quorum-quenching N-Acyl Homoserine Lactone Lactonase (AHL-lactonase). *Journal of Biological Chemistry* 279: 13645-13651
- Wang Y-J, Leadbetter JR** (2005) Rapid Acyl-Homoserine Lactone Quorum Signal Biodegradation in Diverse Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 71/3: 1291-1299
- Weber A** (1982) Enteric yersiniosis—a serious disease? Current knowledge of clinical aspects, diagnosis and therapy. *Fortschritte der Medizin* 100: 785-791

- Whitehead NA, Barnard AML, Slater H, Simpson NJL, Salmond GPC** (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 365-404
- Williams P, Camara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, Winzer K, Middleton B, Pritchard DI, Bycroft BW** (2000) Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 355: 667-680
- Winzer K, Hardie KR, Williams P** (2002) Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch! *Current Opinion in Microbiology* 5: 216-222
- Wisniewski-Dyé F, Downie JA** (2002) Quorum-sensing in *Rhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 397-407
- Wopperer J, Cardona ST, Huber B, Jacobi CA, Valvano MA, Eberl L** (2006) A Quorum-Quenching Approach To Investigate the Conservation of Quorum-Sensing-Regulated Functions within the *Burkholderia cepacia* Complex. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1579-1587
- Xiang C, Werner BL, Christensen ELM, Oliver DJ** (2001) The Biological Functions of Glutathione Revisited in *Arabidopsis* Transgenic Plants with Altered Glutathione Levels. *Plant Physiology* 126: 564-574
- Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra S, Sockett R, Goldner M, Dessaux Y, Cámara M, Smith H, Williams P** (2002) N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 70/10: 5635-5646
- Zanklan AS** (2003) Agronomic performance and genetic diversity of the root crop yam bean (*Pachyrhizus* spp.) under West African conditions. PhD thesis: Georg-August-University Göttingen. <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2003/zanklan/>
- Zhang J, Kirkham MB** (1996) Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist* 132: 361-373
- Zheng J, Mitchell AE, Jones AD, Hammock BD** (1996) Haloenol Lactone Is a New Isozyme-selective and Active Site-directed Inactivator of Glutathione S-Transferase. *Journal of Biological Chemistry* 271: 20421-20425

Zitierte Websites:

<http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de>

<http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Brueghel-tower-of-babel.jpg>

<http://de.wikipedia.org/wiki/Yambohnen>

<http://serc.carleton.edu/microbelife/topics/marinesymbiosis/squid-vibrio/index.html>

http://www.avrdc.org/photos/tomato_diseases/index.html

<http://www.lfas.bayern.de>

http://www.lfl.bayern.de/ips/haus_und_kleingarten/17312/index.php

<http://www.physics.csbsju.edu/stats/>

<http://www.python.org>

7 Anhang

Tabelle 7.1: Kalibration FTICR-MS

Arginin Cluster +	m/z	Ladung	Arginin Cluster -	m/z	Ladung
(Arg)H	175.118952	1+	(Arg)-H	173.104399	1-
(Arg)2H	349.230628	1+	(Arg)2-H	347.216075	1-
(Arg)3H	523.342304	1+	(Arg)3-H	521.327751	1-
(Arg)4H	697.453979	1+	(Arg)4-H	695.439426	1-
(Arg)5H	871.565655	1+	(Arg)5-H	869.551102	1-
(Arg)6H	1045.677331	1+	(Arg)6-H	1043.662778	1-
(Arg)7H	1219.789006	1+	(Arg)7-H	1217.774456	1-
(Arg)8H	1393.900682	1+	(Arg)8-H	1391.886129	1-
(Arg)9H	1568.012358	1+	(Arg)9-H	1565.997805	1-
(Arg)10H	1742.123034	1+	(Arg)10-H	1740.109481	1-
Diester +	m/z	Ladung	Fettsäuren -	m/z	Ladung
C10H23O4	207.159086	1+	C12H23O2	199.170354	1-
C10H22O4Na	229.141030	1+	C14H27O2	227.201654	1-
C14H19O4	251.127786	1+	C16H31O2	255.232950	1-
C14H18O4Na	273.109730	1+	C18H35O2	283.264254	1-
C16H23O4	279.159086	1+	C20H39O2	311.295554	1-
C16H22O4Na	301.141030	1+	C22H43O2	339.326854	1-
C18H35O4	315.252986	1+	C24H47O2	367.358154	1-
C18H34O4Na	337.234931	1+			
C24H39O4	391.284286	1+			
C24H38O4Na	413.266231	1+			
C28H47O4	447.346886	1+			
C28H46O4Na	469.328831	1+			

Tabelle 7.2: Reduktion der GST:CDNB-Aktivität ($\mu\text{kat}/\text{mg}$) im cytosolischen Extrakt der Gerste nach Zugabe von C8-HSL. Neben einem unveränderten CDNB-Assay wurde der gleiche Test mit der gleichen Konzentration (1 mM) an C8-HSL durchgeführt.

	1 mM CDNB	1 mM CDNB + 1 mM C8-HSL	Reduktion
Spross	5,21 \pm 0,45	3,89 \pm 0,34	-25,3 %
Wurzel	17,98 \pm 0,25	10,39 \pm 0,41	-42,2 %

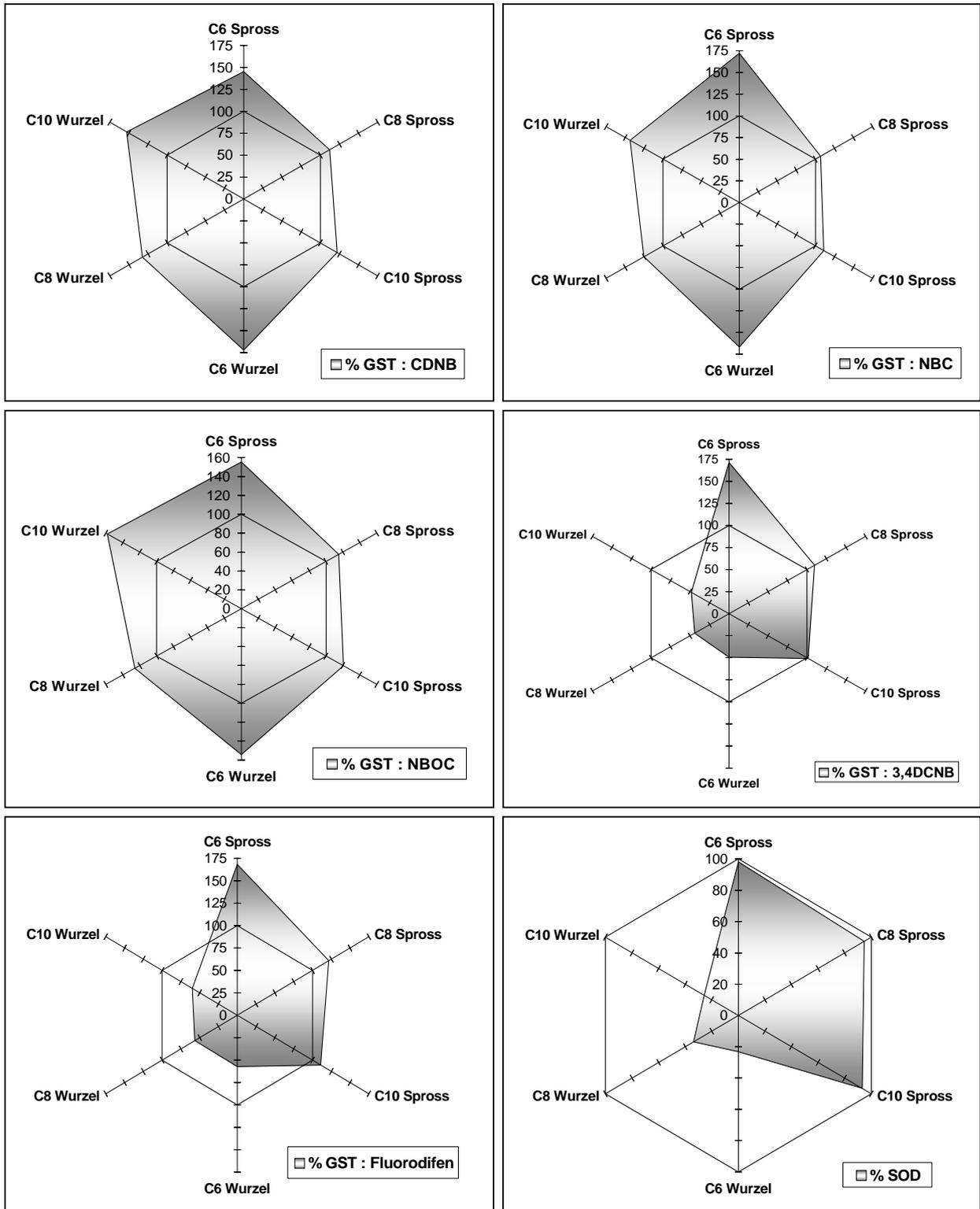


Abbildung 7.1: Einfluss von AHL auf die spezifische Aktivität ($\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein) cytosolischer Enzyme der Gerste (Teil 1)

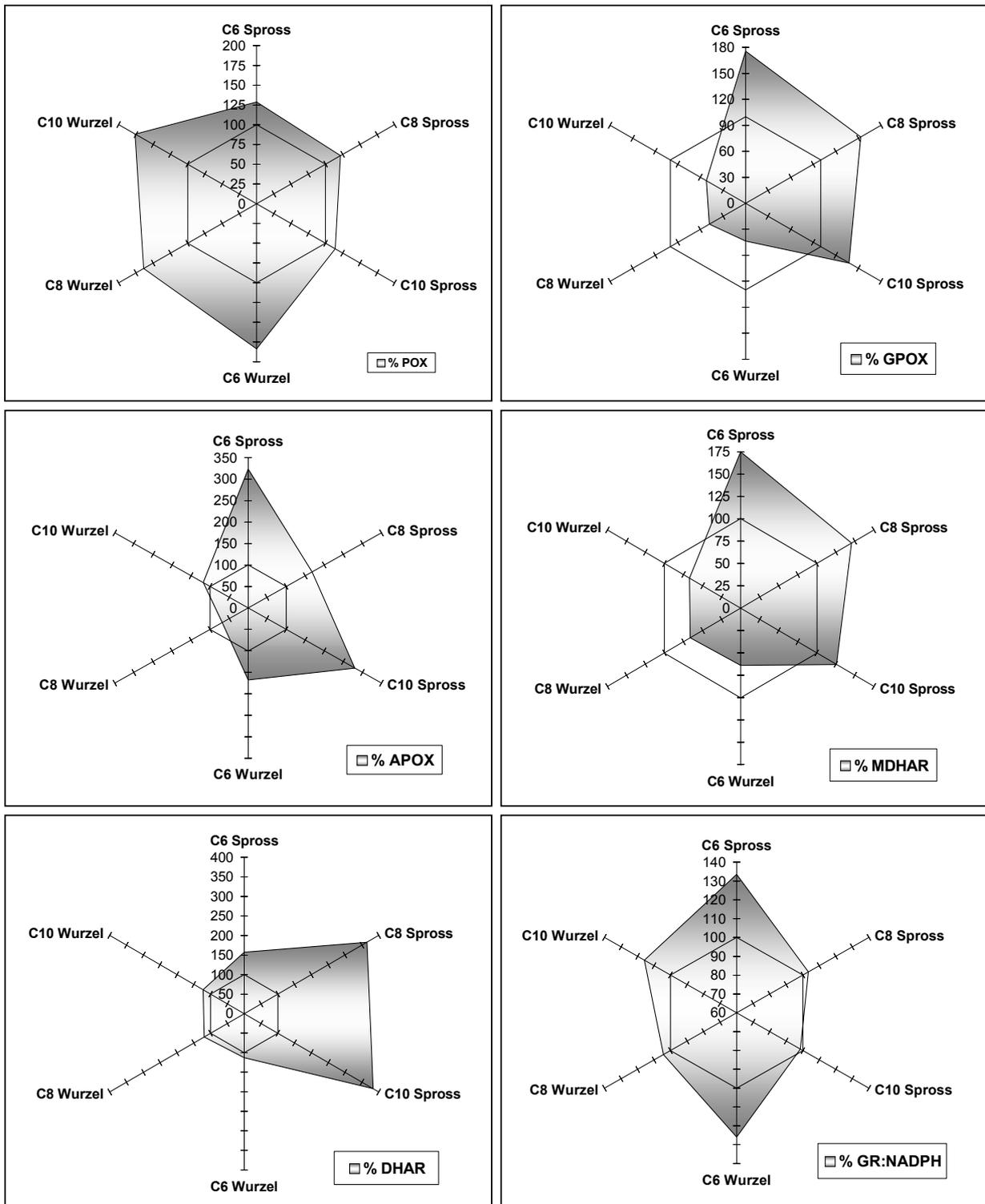


Abbildung 7.2: Einfluss von AHL auf die spezifische Aktivität ($\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein) cytosolischer Enzyme der Gerste (Teil 2)

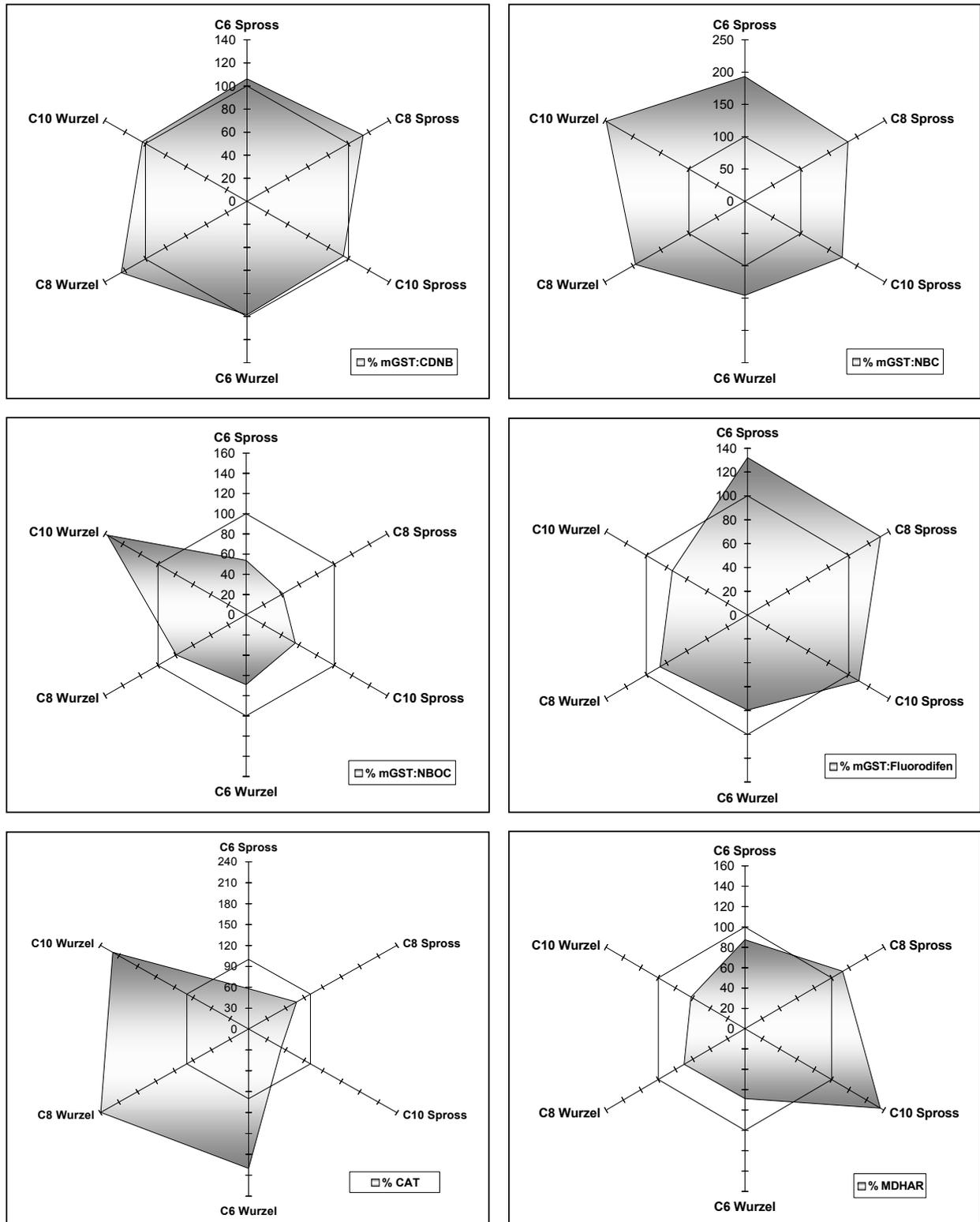


Abbildung 7.3: Einfluss von AHL auf die spezifische Aktivität ($\mu\text{kat}/\text{mg Protein}$) mikrosomaler Enzyme der Gerste (Teil 1)

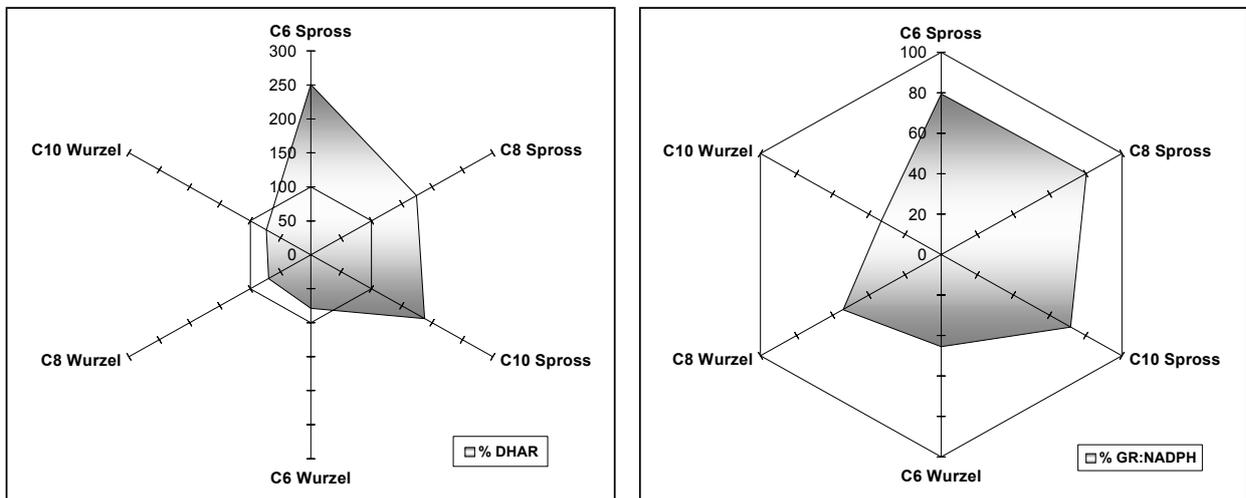


Abbildung 7.4: Einfluss von AHL auf die spezifische Aktivität ($\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein) mikrosomaler Enzyme der Gerste (Teil 2)

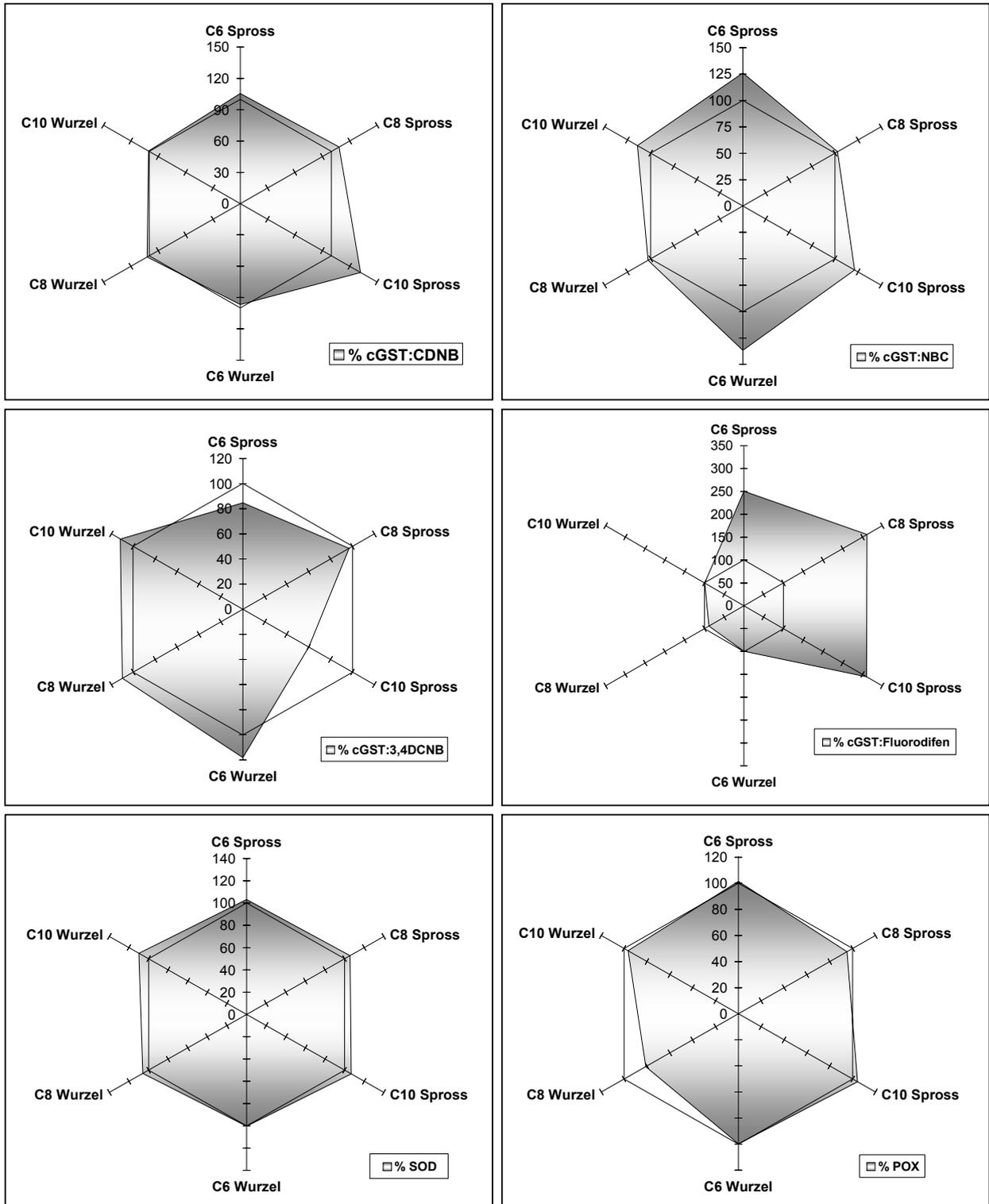


Abbildung 7.5: Einfluss von AHL auf die spezifische Aktivität ($\mu\text{kat}/\text{mg Protein}$) cytosolischer Enzyme der Yambohne (Teil 1)

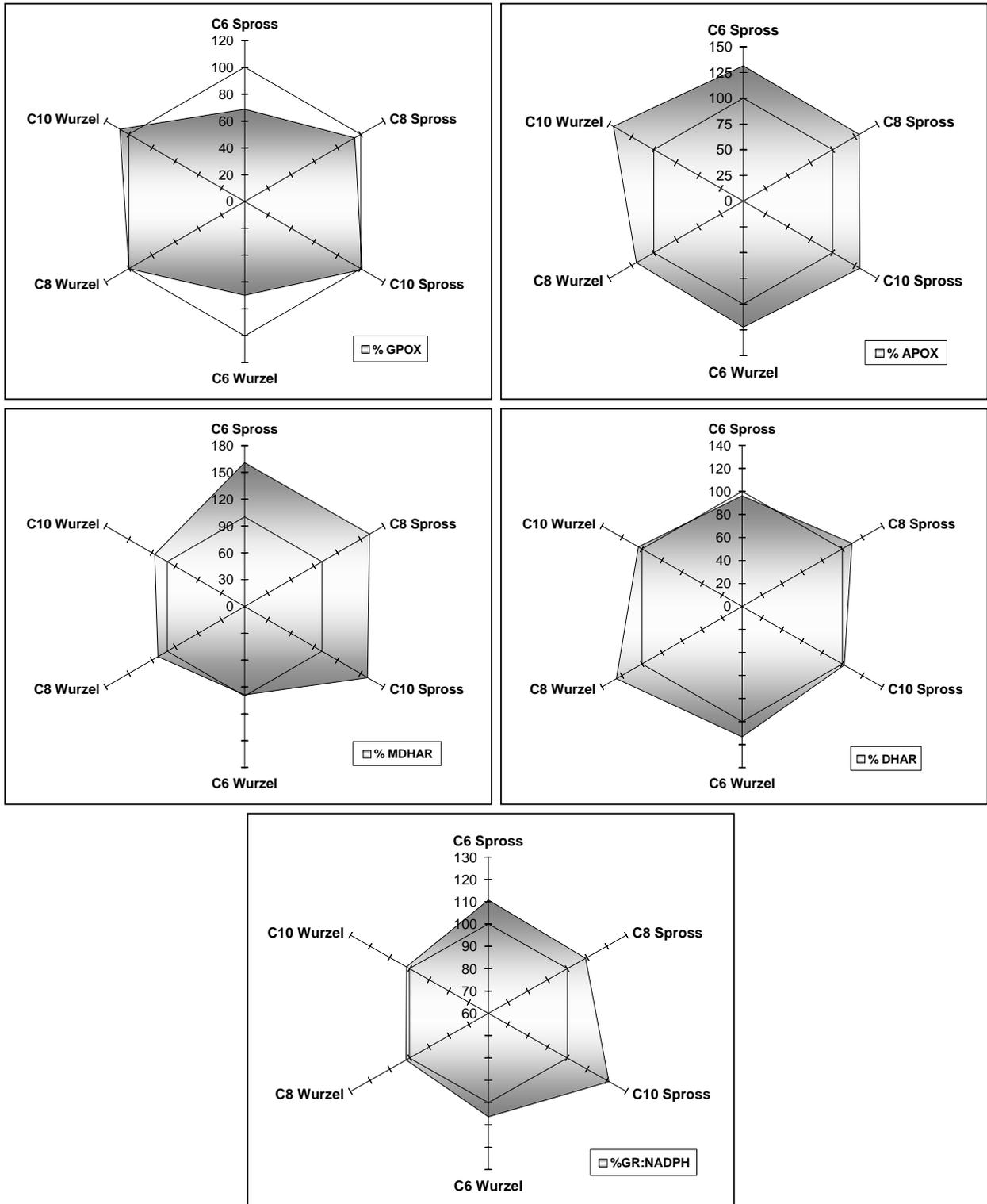


Abbildung 7.6: Einfluss von AHL auf die spezifische Aktivität ($\mu\text{kat}/\text{mg Protein}$) cytosolischer Enzyme der Yambohne (Teil 2)

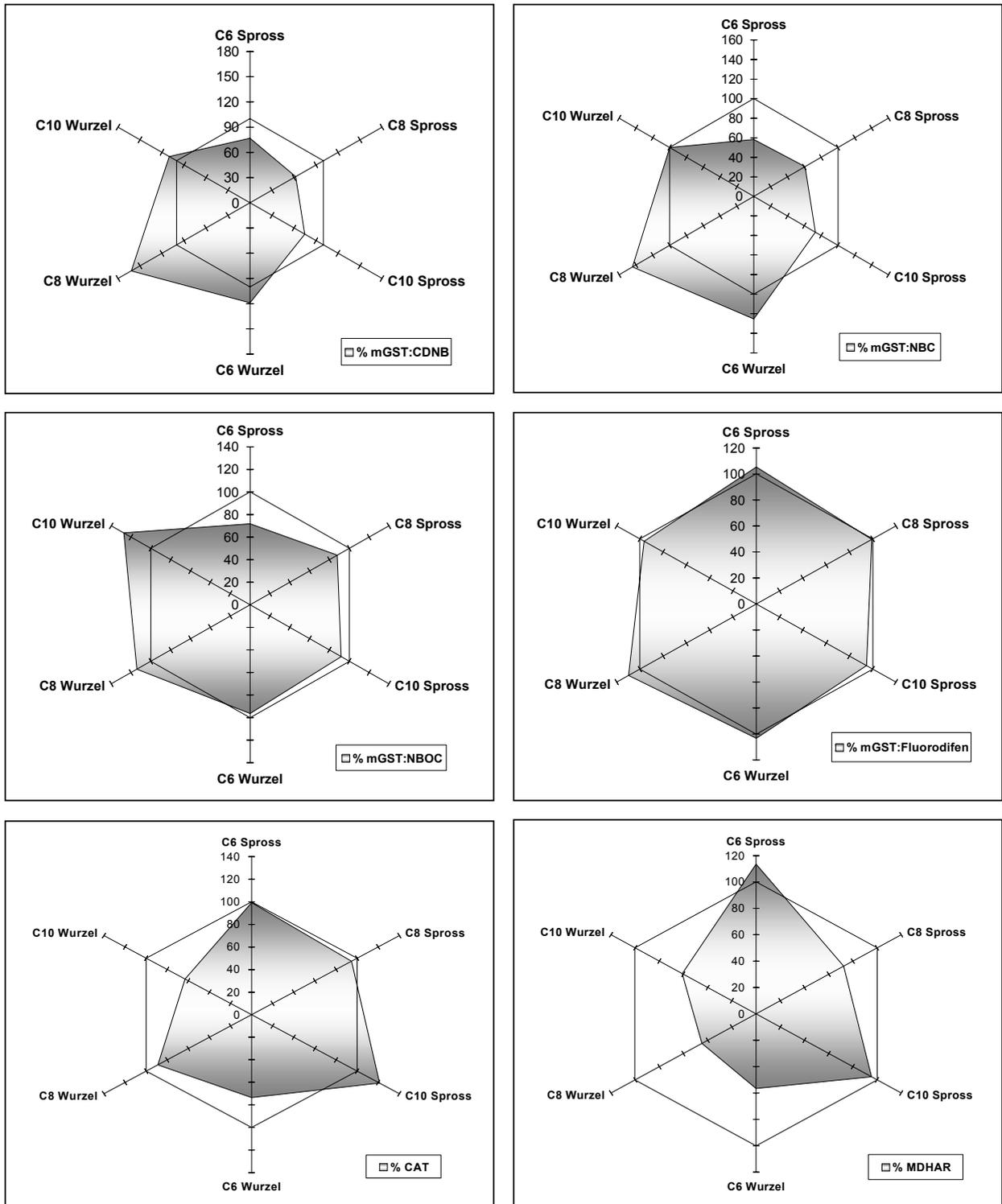


Abbildung 7.7: Einfluss von AHL auf die spezifische Aktivität ($\mu\text{kat}/\text{mg Protein}$) mikrosomaler Enzyme der Yambohne (Teil 1)

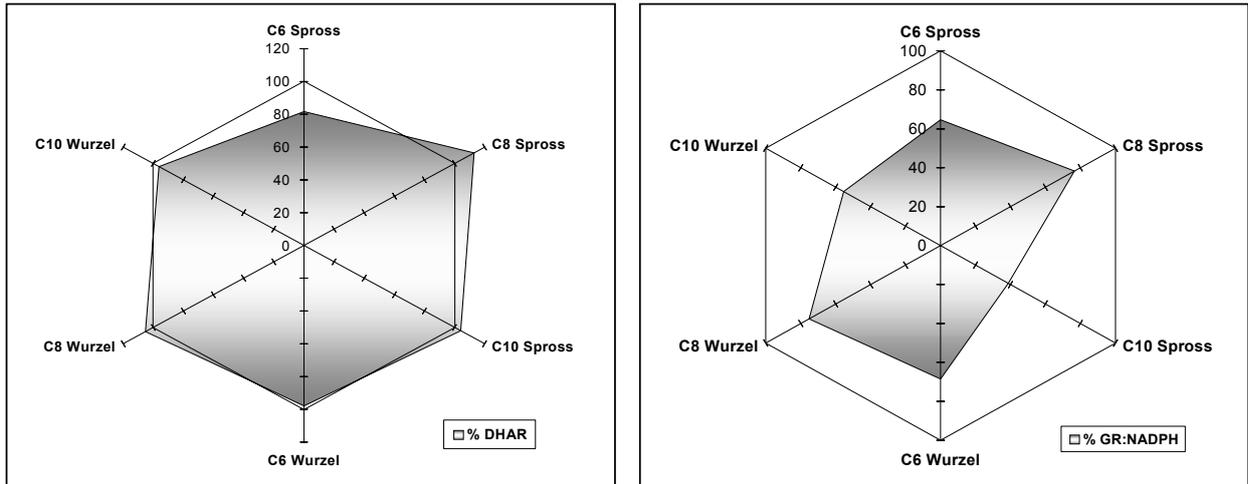


Abbildung 7.8: Einfluss von AHL auf die spezifische Aktivität ($\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein) mikrosomaler Enzyme der Yambohne (Teil 2)

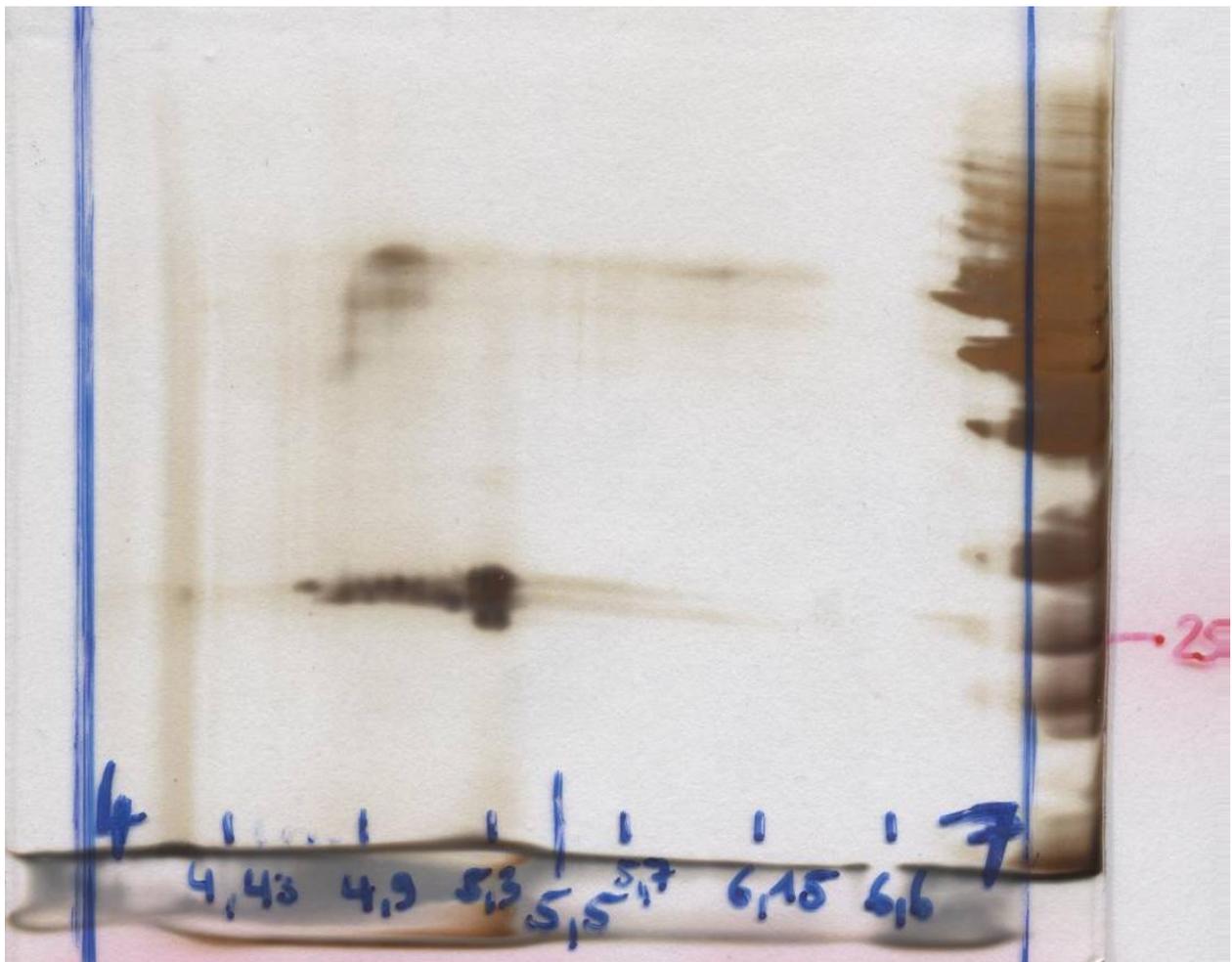


Abbildung 7.9: Bereich der GSTs (pI und kDa) der Gerstensorte Barke

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Schröder für die die Überlassung des interessanten Themas, die Unterstützung und die Möglichkeit, diese Dissertation anfertigen zu dürfen. Danke auch an Prof. Dr. Oßwald der Technischen Universität München in Weihenstephan sowie Prof. Dr. Schnyder für Vorsitz und Koreferat im Prüfungsausschuß.

Priv. Doz. Dr. Philippe Schmitt-Kopplin vom Institut für ökologische Chemie (IÖC) möchte ich meinen Dank aussprechen für die Möglichkeit, in seiner Gruppe arbeiten zu dürfen, und außerdem der gesamten Arbeitsgruppe BioGeoanalysis für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. Agnes Fekete, ohne deren unermüdliche und kompetente Unterstützung der analytische Teil dieser Arbeit nicht in dieser Form möglich gewesen wäre.

Danke an Dr. Miroslav Matucha, Frau Brit Matucha, Dr. Sándor Forczek, Jana Rohlenová und allen Kollegen am UÉB in Prag für die schöne Zeit in der goldenen Stadt und die tolle Zusammenarbeit.

Den Kollegen von EUS danke ich für ihre freundliche und unkomplizierte Unterstützung, besonders Peter Kary, Armin Richter und Dieter Arthofer bei diversen „Kammerspielen“, Dr. Andreas Albert und last but not least Dr. Jana Barbro Winkler.

Danke an Dr. Christina Kuttler, Dr. Burkhard Hense und Maria Vittoria Barbarossa vom IBB für die tolle Zusammenarbeit und den interessanten Einblick ins Modelling.

Meinen Kolleginnen Manuela Diethelm, Tina Riedel, Katharina Buddrus und Ljudmila Ljubenova für ihre Unterstützung, ihre Aufmunterung, guten Ratschläge (besonders Manu's Ratschläge zum „Kraut“) und ihr offenes Ohr in allen Belangen.

Danke an Daniel Bulba und Ulrike Hahn für ihre Freundschaft, ihren Humor und die unermüdlichen Aufmunterungen ...und lecker Essen!

Den Kollegen von BIOP, besonders Dr. Burkhard Messner, Dr. Ilona Klein und Dr. Uta von Rad sowie dem GAC für die freundliche Bereitstellung von Geräten.

Dr. Scalla und Dr. Pascal (Frankreich) für die freundliche Unterstützung bei Fragen zu Fluorodifen und Affinitätschromatographie.

Einen herzlichen Dank möchte ich außerdem aussprechen an die vielen Kollegen und Freunde, die mir Hilfestellung, Information, Material, Motivation und manches mehr gegeben haben: Ursula Bausenwein, Steffi Brandner, Jana Ernst, Jürgen Esperschütz, Roland Fuß, Brigitte Goertz, Christin Haensel, Felix Haesler, Silvia Hanyka, Beate Huber, Ali Khalvati, Fabian Mühlberger, Juliane Neustifter, Angelika Nitsche, Andreas Nuber, Stefan Peis, Karin Pritsch, Hakan Sarioglu, Christine Schäfer, Kristina Schauß, Monika Wimmer, Andrea Ziegltrum, Niklas Zimmer, sowie allen meinen netten „Mensa-Kollegen“ aus der Schloter-Gruppe.

Danke „hernach“ an Heike und Matthias für das Korrekturlesen, sowie an alle meine Verwandten und Freunde, die mich privat unterstützt haben.

Und ganz besonders: noch einmal bei Matthias, meinen Geschwistern Birgit und Matthias und bei meinen Eltern!

Lebenslauf

Name: Christine Götz

Geboren: 18. 07. 1978 in Neumarkt in der Oberpfalz

WISSENSCHAFTLICHE LAUFBAHN

06.2004–10.2007: Promotion am Helmholtz-Zentrum München in der Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen

01.2004–06.2004: Diplomarbeit über „Endophyten in Gräsern. Entwicklung grün fluoreszierender Endophyten der Linien *Epichloë festucae* Fl1 und *Neotyphodium lolii* Lp19 durch Transformation mit dem Green Fluorescent Protein-Gen (GFP)“ in Zusammenarbeit mit der Firma AgResearch Grasslands in Palmerston North, Neuseeland

03.2003–10.2003: Bachelorarbeit zum Thema „Beitrag der Glutathion-S-Transferasen (GST) zur Xenobiotika-Entgiftung: Ein Vergleich zwischen Zaunwinde (*Calystegia sepium*) und Ackerwinde (*Convolvulus arvensis*)“ am Institut für Bodenökologie des Helmholtz-Zentrums München

10.1999–06.2004: Studium der Agrarwissenschaften an der Technischen Universität München-Weihenstephan mit Schwerpunkt Pflanzenwissenschaften

SCHUL- UND BERUFSAUSBILDUNG

09.1997–07.1999: Abgeschlossene Berufsausbildung zur Bauzeichnerin bei Firma Klebl in Neumarkt in der Oberpfalz

09.1988–07.1997: Ostendorfer Gymnasium Neumarkt mit Abschluss Abitur

AUSLANDSAUFENTHALTE

10.2006–11.2006: Forschungsaufenthalt am Institut für Experimentelle Botanik in Prag zur Einführung in radiochemische Methoden und zur Charakterisierung der Translokation Tritium-markierter AHLs

10.2003–04.2004: Auslandssemester in Neuseeland bei der Advanced Fungal Technology Group der Firma AgResearch Grasslands in Palmerston North