

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Ökologischen Landbau und Pflanzenbausysteme

Der Einfluss von *N*-Acyl-Homoserinlactonen in der Rhizosphäre
von *Hordeum vulgare* L. – Aufnahme, Transport und pflanzliche
Stressantworten

Tina Sieper

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 31.01.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 18.04.2012 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtprozent
[³ H]	Tritium
μ	micro
A	Ampere
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
ACP	Acyl-Trägerprotein
AHL	<i>N</i> -Acyl-Homoserinlacton
APOX	Ascorbatperoxidase
APS	Ammoniumpersulfat
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
c	centi oder Konzentration
ca.	circa
CAT	Katalase
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
cfu	‘colony forming units’
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Ci	Curie
cv.	Kulturvarietät
d	Tag
DAF-2	4,5-Diaminofluorescein
DAF-2DA	4,5-Diaminofluorescein Diacetat
DAF-2T	Triazolofluorescein
dai	‘days after inoculation’
DCNB	3,4-Dichlornitrobenzol
dH ₂ O	entsalztes, filtriertes Wasser
DHAR	Dehydroascorbatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(-aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ETI	'effector-triggered immunity'
EtOH _{abs}	absoluter Ethanol
FPLC	'Fast Protein Liquid Chromatography'
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9,81 m*s ⁻²)
GAR-HRP	...	'goat-anti-rat'-Meerrettich-Peroxidase
GPOX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion <i>reduziert</i>
GSSG	Glutathion <i>oxidiert</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
Guajakol	2-Methoxy-phenol
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HR	'hypersensitive response'
HSL	DL-Homoserinlacton
HSL	Homoserinlacton
JA	Jasmonsäure
kDa	kilo Dalton
KPP	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
L.	Linné, Carl von (1707-1778)
M	Molar
m	milli oder Meter
mAb	monoklonaler Antikörper
MAMPs	'microbe-associated molecular patterns'
MDHAR	Monodehydroascorbatreductase
Mes	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mJA	Methyljasmonat
mSA	Methylsalizylat
NBC	p-Nitrobenzylchlorid
NBoC	p-Nitrobenzoylchlorid
nm	nanometer

NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Superoxid
OD	optische Dichte
OH-C4-HSL	<i>N</i> -(3-Hydroxybutanoyl)-Homoserinlacton
p	pico
p.a.	pro analysi
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	‘pathogen-associated molecular patterns’
PAR	photosynthetisch wirksame Strahlung
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PGPR	‘plant growth promoting rhizobacteria’
pNpa	p-Nitrophenylacetat
POX	Peroxidase
PTI	‘PAMP-triggered immunity’
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QS	Quorum Sensing
RFU	‘relative fluorescent units’
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SA	Salizylsäure
SAM	S-Adenosylmethionin
SAR	‘systemic aquired resistance’
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TMB	3,3',5,5'- Tetramethyl-benzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit (µmol Substrat pro Minute)
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Quorum Sensing	1
1.1.1 Historisches	1
1.1.2 Quorum Sensing in Bakterien	5
1.1.3 Quorum Quenching	12
1.2 Interkingdom Signaling	13
1.3 Kommunikation in Pflanzen	18
1.4 Versuchspflanze Gerste	22
1.5 Zielstellung der Arbeit	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Verwendete Medien	24
2.1.2 Verwendete Mikroorganismen	25
2.1.3 Verwendete AHLs	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Oberflächensterilisierung von Gerstesamen	27
2.2.2 Aufbau des Anzuchtssystem und Inokulation der Pflanzen	28
2.2.3 Flüssigkeitsszintillation	31
2.2.4 Autoradiographie	31
2.2.5 AHL-Wurzeltransport (Pitman-Kammer)	33
2.2.6 Extraktion von Apoplastensaft	34
2.2.7 AHL-Detektion mit Sensorstämmen	36
2.2.8 AHL-Detektion mittels ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	36
2.2.9 Gewinnung des Protein-Rohextrakts	38
2.2.10 Enzymaktivitätsmessungen	40

2.2.11	Affinitätschromatographie	44
2.2.12	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	48
2.2.13	Visualisierung von NO in der Wurzel	51
2.2.14	Verwendete Software	53
3	Ergebnisse	54
3.1	AHL Aufnahme und Transport	54
3.1.1	Messungen mit tritiierten AHLs	54
3.1.2	AHL-Detektion mit Sensorstämmen	62
3.1.3	AHL-Detektion mit monoklonalen Antikörpern	67
3.2	Enzymaktivitäten	70
3.2.1	Kurz- und Langzeitkinetik antioxidativer Enzyme	70
3.2.2	Kurz- und Langzeitkinetik von GSTs	82
3.2.3	Applikation synthetischer AHLs und Inokulation mit Bakterien im Vergleich	96
3.2.4	AHL-Applikation direkt am Enzym	99
3.2.5	Applikation am Halm	109
3.3	NO-Produktion in der Wurzel	118
4	Diskussion	121
4.1	Aufnahme und Transport von AHLs in Pflanzen	122
4.1.1	Tritium-markierte AHLs	122
4.1.2	AHL-Sensorstämmen	123
4.1.3	ELISA	125
4.2	Veränderungen der Aktivität ausgewählter Enzyme	126
4.2.1	Antioxidative Enzyme	126
4.2.2	Morphologische Veränderungen	131
4.2.3	GSTs	132
4.3	Vergleich der Verwendung von synthetischen AHLs mit einer Bakterienkultur	135
4.4	Mögliche Enzyme, die den Abbau von AHLs in Gerste katalysieren	136
4.4.1	P450-Monooxygenasen	137
4.4.2	POX	138
4.5	Auf der Suche nach einem sekundären Botenstoff	138
4.5.1	NO als möglicher sekundärer Botenstoff	140
4.6	Weiterführende Überlegungen	142
4.6.1	Hologenomtheorie	142
4.6.2	QS-Signale als Antibiotika	143
4.6.3	QS-Signale zur Biokontrolle und Pflanzenstärkung	143

4.7 Schlussfolgerungen	144
5 Zusammenfassung	146
Literaturverzeichnis	147
6 Anhang	A

Abbildungsverzeichnis

1.1	Satellitenaufnahme eines „Milchmeeres“	3
1.2	Allgemeine Struktur von AHLs	5
1.3	Quorum Sensing in <i>V. fischeri</i>	6
1.4	Klassen von LuxR-Homologen	8
1.5	Quorum sensing bei Gram-positiven Bakterien	9
1.6	QS-System in <i>V. harveyi</i>	10
1.7	Eingriffe in das QS-System	12
1.8	Struktur halogenierter Furanone	13
1.9	„Interkingdom Signaling“ bei Pflanzen	17
1.10	Entgiftung von ROS	20
1.11	<i>Hordeum vulgare</i> cv. Barke im Gewächshaus	22
2.1	Gerstenkeimlinge nach Oberflächensterilisierung	27
2.2	Behandlung von Pflanzen im Reagenzglassystem	29
2.3	Behandlung von Gerstenhalmen	30
2.4	Szintillation und Autoradiographie	32
2.5	Aufbau Pitman-Kammer	34
2.6	Aufbau ELISA	37
2.7	Aufbau BD-Oxygen Biosensor	43
2.8	Proteinkonzentration und CDNB-Aktivität der Fraktionen der salzlosen Affinitätschromatographie	46
2.9	Gradient bei der Affinitätschromatographie	47
2.10	Proteinkonzentration und CDNB-Aktivität der Fraktionen der FPLC- gekoppelten Affinitätschromatographie	47
2.11	Wirkung von DAF-2DA	52
3.1	Detektion von tritiierten AHLs im Halm und in den Blättern	55
3.2	Detektion von tritiierten AHLs im gesamten Spross und in der Wurzel	57
3.3	Autoradiographie von AHLs auf der Wurzeloberfläche	58
3.4	AHL-Transport durch die Wurzel in der Pitman-Kammer	59
3.5	Hemmung der AHL-Aufnahme und des Transports durch die Wurzel	60
3.6	Autoradiographie von Wurzelquerschnitten	62

3.7	Nachweis von C8-HSL in Apoplastensaft	64
3.8	C10-HSL Standardkurven mit verschiedenen Sensorstämmen	65
3.9	Nachweis von AHLs aus <i>S. liquefaciens</i> MG1 in Gerste	66
3.10	Einfluss der Matrix und der Hydrolyse auf die Standardkurve beim ELISA-Test	68
3.11	Nachweis von C10-HSL in Apoplastensaft	69
3.12	Superoxiddismutaseaktivität nach Inkubation mit C6-HSL	72
3.13	Superoxiddismutaseaktivität nach Inkubation mit C8-HSL	73
3.14	Katalaseaktivität nach Inkubation mit C6-HSL	74
3.15	Katalaseaktivität nach Inkubation mit C8-HSL	75
3.16	Ascorbatperoxidaseaktivität nach Inkubation mit C6-HSL	76
3.17	Ascorbatperoxidaseaktivität nach Inkubation mit C8-HSL	77
3.18	Glutathionreduktaseaktivität nach Inkubation mit C6-HSL	78
3.19	Glutathionreduktaseaktivität nach Inkubation mit C8-HSL	79
3.20	Peroxidaseaktivität nach Inkubation mit C6-HSL	80
3.21	Peroxidaseaktivität nach Inkubation mit C8-HSL	82
3.22	Kurzzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Wurzeln nach C6-HSL Appli- kation	84
3.23	Kurzzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Blättern nach C6-HSL Appli- kation	85
3.24	Kurzzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Wurzeln nach C8-HSL Appli- kation	87
3.25	Kurzzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Blättern nach C8-HSL Appli- kation	88
3.26	Langzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Wurzeln nach C6-HSL Appli- kation	90
3.27	Langzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Blättern nach C6-HSL Appli- kation	91
3.28	Langzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Wurzeln nach C8-HSL Appli- kation	93
3.29	Langzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Blättern nach C8-HSL Appli- kation	94
3.30	Frischgewicht nach Langzeitinkubation mit C6-HSL in Prozent der Kontrollen	95
3.31	Frischgewicht nach Langzeitinkubation mit C8-HSL in Prozent der Kontrollen	96
3.32	Cfu von <i>S. liquefaciens</i> MG1 bzw. MG44 an den Wurzeln von Gerste . . .	97
3.33	Vergleich der Affinitätschromatographie mittels PAGE	101
3.34	GST-Aktivität nach AHL-Applikation im Rohextrakt	102

3.35	CDNB-Aktivität nach AHL-Applikation in die Fraktionen der Affinitätschromatographie	103
3.36	NBC-Aktivität nach AHL-Applikation in die Fraktionen der Affinitätschromatographie	104
3.37	pNpa-Aktivität nach AHL-Applikation in die Fraktionen der Affinitätschromatographie	105
3.38	DCNB-Aktivität nach AHL-Applikation in die Fraktionen der Affinitätschromatographie	106
3.39	Aktivität von CYP2C9 nach C8-HSL-Applikation	108
3.40	POX-Aktivität im Apoplastensaft	109
3.41	NBoC-Aktivität im Spross im Vergleich	110
3.42	Fluorodifen-Aktivität im Spross im Vergleich	111
3.43	pNpa-Aktivität im Spross im Vergleich	112
3.44	SOD-Aktivität im Spross im Vergleich	113
3.45	CAT-Aktivität im Spross im Vergleich	114
3.46	APOX-Aktivität im Spross im Vergleich	115
3.47	GR-Aktivität im Spross im Vergleich	116
3.48	POX-Aktivität im Spross im Vergleich	117
3.49	Fluoreszenz von DAF-2DA behandelten Wurzeln	119
3.50	NO-Produktion der Wurzel nach C8-HSL-Applikation	120
4.1	AHL-Metabolite in Gerste	137
6.1	<i>S. liquefaciens</i> MG44 Standardkurve	A
6.2	Frischgewicht nach Langzeitinkubation mit C6-HSL	B
6.3	Frischgewicht nach Langzeitinkubation mit C8-HSL	B
6.4	CDNB-Aktivität im Spross im Vergleich	C
6.5	DCNB-Aktivität im Spross im Vergleich	D
6.6	NBC-Aktivität im Spross im Vergleich	E

Tabellenverzeichnis

1.1	LuxR-Klassen	7
2.1	Zusammensetzung MS-Medium	24
2.2	Verwendete Mikroorganismen	26
2.3	GST-Messungen mit Modellsubstraten	42
2.4	Pipettierschema salzlose Affinitätschromatographie	45
3.1	Grundaktivität ausgewählter antioxidativer Enzyme in Kontrollpflanzen . .	71
3.2	GST-Grundaktivität in Kontrollpflanzen	83
3.3	Vergleich der GST-Aktivität in Gerste nach C6-HSL- und MG1-Inokulation	98
3.4	Vergleich der Aktivität ausgewählter ROS-Enzyme von Gerste nach C6-HSL- und MG1-Inokulation	99

1 Einleitung

1.1 Quorum Sensing

1.1.1 Historisches

N-Acyl-Homoserinlactone (AHLs) sind kleine, diffusionsfähige Verbindungen, die von bestimmten Bakterien produziert und zur Kommunikation mit anderen Bakterien genutzt werden. Dieser Prozess der bakteriellen Kommunikation mit Hilfe sogenannter „Autoinducer“ ist heute unter dem Namen „Quorum Sensing“ (QS) bekannt.

Biolumineszente Bakterien aus dem Meer spielen eine bedeutende Rolle bei der Entdeckung des QS, denn Phänomene, die auf QS beruhen, wurden schon sehr früh beobachtet. Es gibt mehrere Theorien, weshalb sich Biolumineszenz in Bakterien entwickelt hat: Rees *et al.* (1998) schlagen vor, dass sie zuerst lediglich ein Nebenprodukt oxidativer Reaktionen war, da Luciferine starke antioxidative Kapazitäten besitzen (Devillers *et al.*, 1999). Auf diese Art und Weise könnten Luciferine, bevor sie ihre differenzierte Funktion einnahmen, im Laufe der Evolution erhalten worden sein. Einer anderen Theorie zufolge macht das Leuchten die Bakterien als Nahrung für Fische attraktiver. Da marine Leuchtbakterien von Darmbakterien abstammen, stellt der Gastrointestinaltrakt der Fische eine bevorzugte Umgebung für sie dar (Ruby and Morin, 1979). Außer im Gastrointestinaltrakt und freiem Wasser kann man lumineszente Bakterien auch in speziellen Leuchtorganen bestimmter Fische oder Tintenfische finden. Die Bakterien leben dort in Symbiose mit den Tieren und dienen diesen unter anderem zur Tarnung bei der Jagd oder als Schutz vor Fressfeinden (Haddock *et al.*, 2010; Young and Roper, 1976). Man kann davon ausgehen, dass diese Form des spezialisierten Zusammenlebens evolutionär erst später entstanden ist, da die Bakterien auch außerhalb der Leuchtorgane überleben können, sich die Leuchtorgane bei einigen Arten aber nur bei Anwesenheit der Bakterien entwickeln (zusammengefasst in Haddock *et al.*, 2010; Visick and Ruby, 2006). Durch diese enge Assoziation mit einigen Meerestieren kam es wahrscheinlich zu dem in der Vergangenheit immer wieder auftretenden Phänomen der leuchtenden toten Fische, welches zu früheren Zeiten als unerklärlich und magisch galt. Pflüger (1875) erkannte jedoch, dass die Leuchtkraft nicht von den toten Tieren selbst, sondern von einem ihnen aufliegenden Schleim verursacht wird. Nach mehreren Experimenten - darunter auch fraktionierter Filtration - gelangte

er schließlich zu der Erkenntnis, dass der Schleim aus lebenden Schizomyceten¹ besteht, die das Leuchten verursachen. Ein weiteres unerklärliches Phänomen damaliger Zeiten waren laut den Berichten von Seefahrern seit dem 17. Jahrhundert (Herring and Watson, 1993) die sogenannten leuchtenden „Milchmeere“ - ein Naturereignis, welches auch in Jules Vernes Roman „20.000 Meilen unter dem Meer“ beschrieben wird:

Am 27. Januar, bei der Einfahrt in den Golf von Bengalen, stießen wir mehrmals auf Leichname, die auf der Meeresoberfläche schwammen.

Gegen sieben Uhr abends fuhr die »Nautilus«, halb unter Wasser, mitten durch ein Milchmeer, so weit man sehen konnte, schien der Ozean aus Milch zu bestehen. War es nur die Wirkung des Mondlichts? Nein, denn der Mond, erst seit zwei Tagen im Zunehmen begriffen, war noch nicht aufgegangen.

Und Kapitän Nemo erklärt zudem die Ursache der Erscheinung:

»Diese weiße Farbe«, antwortete ich, »rührt von Myriaden Infusionstierchen her, einer Art Leuchtwürmchen, die farblos sind und wie Gallert aussehen, haardünn und nicht länger als ein fünftel Millimeter. Manche dieser Tierchen hängen meilenweit zusammen.«

»Meilenweit?« rief Conseil aus.

»Ja, und gib dir keine Mühe, die Zahl dieser Tierchen auszurechnen! Du würdest es nicht fertigbringen, denn irre ich mich nicht, so sind manche Seefahrer mehr als vierzig Meilen weit über solche Milchmeere gefahren.« (Verne, 1990)

Dass diese Berichte kein „Seemannsgarn“ waren, zeigten Miller *et al.* (2005). Nach einem Bericht des Kapitäns des britischen Handelsschiffes *S.S. Lima* befand sich dieses in der Nacht vom 25.01.1995 in der Nähe der somalischen Küste in milchig weißem Wasser. Mit Hilfe von Aufzeichnungen des Wettersatellitenprogramms der U.S. amerikanischen Streitkräfte, gelang es Miller und seinen Kollegen, dieses Phänomen sichtbar zu machen (siehe Abbildung 1.1). Die Erscheinung dauerte insgesamt 3 Tage an, erstreckte sich am 25.01.95 auf eine Fläche von 15.400 km² und dehnte sich auf mehr als 17.700 km² am nächsten Tag aus - eine Fläche, die größer als das Bundesland Thüringen ist (16.172,50 km²). Es ist davon auszugehen, dass einzig Bakterienzellen für die „Milchmeere“ verantwortlich sein können, da

¹historischer Begriff für Bakterien

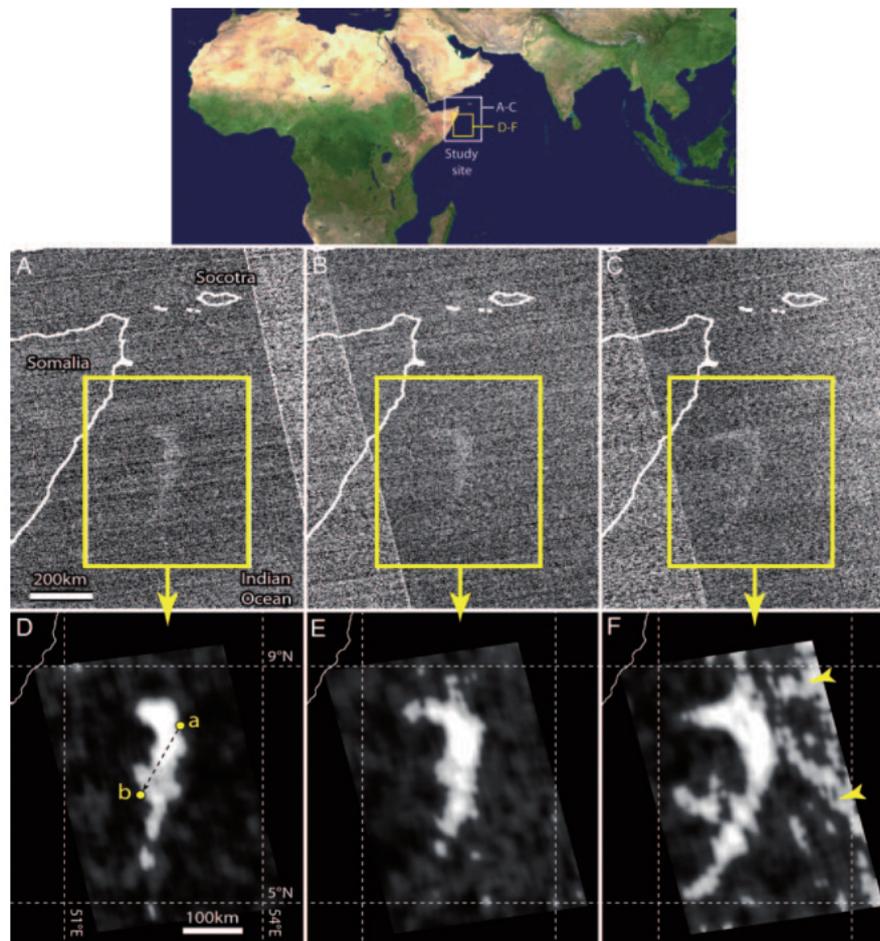


Abbildung 1.1 – Satellitenaufnahme eines Milchmeeres vor der somalischen Küste. Oben: Genaue Position der ungefilterten (A-C) und gefilterten (D-F) Satellitenaufnahmen vom 25.01.95 (A und D), 26.01.95 (B und E) und 27.01.95 (C und F). Auf dem Teilbild D ist des weiteren der Kurs der *S.S. Lima* eingezeichnet. Bildnachweis: Miller *et al.* (2005) Fig1.

nur diese, im Gegensatz zu anderen zur Biolumineszenz befähigten Organismen, in der Lage sind, konstantes Licht über einen längeren Zeitraum hinweg zu erzeugen (Haddock *et al.*, 2010). Trotz zahlreicher Sichtungen von „Milchmeeren“ (Herring and Watson, 1993) gelang es bisher erst ein einziges Mal eine Probe zu entnehmen. Das Leuchten wurde in diesem „Milchmeer“ von *Vibrio harveyi* erzeugt, welche mit Kolonien der Mikroalge *Phaeocystis spec.* assoziiert waren (Lapota *et al.*, 1988). Obwohl Kapitän Nemo davon abriet, die Anzahl der „Tierchen“ zu berechnen, versuchten es Miller *et al.* (2005) dennoch und kamen am Ende auf eine Zahl von $4 \cdot 10^{22}$ Bakterienzellen, wobei gleichzeitig darauf hingewiesen wird, dass diese Zahl aufgrund mehrerer Unsicherheiten nur eine grobe Schätzung darstellt. Seit der Arbeit von Pflüger (1875) begannen Wissenschaftler mit lumineszenten Bakterien zu arbeiten und diese zu isolieren, darunter auch einer der Begründer der Mikrobiologie: Martinus W. Beijerinck, welcher die Physiologie dieser Bakterien untersuchte (Figge *et al.*,

2011). Bis etwa 1900 wurden 27 Arten beschrieben, die nach heutigen Erkenntnissen und Überarbeitung der Namen zu 20 Arten zusammengefasst werden, die alle zur Klasse der Gamma-*Proteobacteria* gehören (Figge *et al.*, 2011; Herring, 2002). Knapp 100 Jahre nach den Entdeckungen Pflügers erkannten Nealson *et al.* (1970), dass es einen Zusammenhang zwischen der Zellzahl der Bakterien und dem Auftreten der Lumineszenz gibt. So wird die Luciferase in *Vibrio fischeri* und *V. harveyi* erst ab der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert, die Bakterien leuchten aber ab diesem Zeitpunkt proportional stärker zur weiter steigenden Zellzahl (Nealson and Hastings, 1979; Nealson *et al.*, 1970). Experimente zeigten, dass die Biolumineszenz durch wiederholte Verdünnung der Kulturen verhindert werden kann, dass aber die Zugabe von Kulturüberständen aus der exponentiellen Wachstumsphase in eine verdünnten Kultur die Biolumineszenz in der verdünnten Kultur induziert, noch bevor diese die exponentielle Wachstumsphase erreicht hat. Dieser Effekt war teilweise artspezifisch; so konnte man beispielsweise *V. fischeri* durch Zugabe von Extrakten aus *V. harveyi* Kulturen nicht zum Leuchten bringen und auch die Substanzen von bestimmten *Photobacterium* und *Beneckeia* Arten zeigten keinerlei Kreuzreaktionen (Nealson and Hastings, 1979). Gleichzeitig erkannte man aber schon damals, dass nicht nur lumineszente Bakterien sogenannte „Autoinducer“ produzieren können, denn Extrakte einiger nicht-leuchtender *Beneckeia* Arten waren in der Lage, die Lumineszenz in *V. fischeri* zu induzieren. So prägten Nealson *et al.* (1970) damals den Begriff des „Autoinducers“, eventuell einer der Gründe, weshalb die Arbeiten von Nealson und Kollegen bis heute mehr Beachtung finden als die von Tomasz (1965), welcher den gleichen Regulationsmechanismus 5 Jahre vorher in *Streptococcus pneumoniae* anhand der Transformation beschrieb. Ein anderer Grund könnte sein, dass der von Nealson *et al.* (1970) beschriebene „Autoinducer“ von *V. fischeri* der erste war, der aufgereinigt und strukturell als *N*-(3-Oxohexanoyl)-L-Homoserinlacton (oxo-C6-HSL) bestimmt werden konnte (Eberhard *et al.*, 1981). 24 Jahre nach den Arbeiten von Nealson *et al.* (1970) prägten schließlich Fuqua *et al.* (1994) den Begriff QS, wobei das Wort *Quorum* dem Lateinischen entstammt („von denen“) und in politischen Systemen die Mindestanzahl an Mitgliedern von Versammlungen beschreibt, die notwendig sind, um handlungsfähig zu sein. Der Ausdruck QS beschreibt also im wörtlichen Sinne die Fähigkeit von Bakterien, die Anzahl ihrer selbst in ihrer Umgebung wahrzunehmen und die Expression von bestimmten Genen beim Erreichen einer Mindestmenge an Zellen zu aktivieren.

Auch deshalb war die Vorstellung, dass „Milchmeere“ aus Bakterien bestehen fast ungreiflich, da es zur Induktion der Biolumineszenz einer relativ großen Anzahl an Bakterien bedarf. Die zugegebenermaßen sehr ungenaue Schätzung von $4 \cdot 10^{22}$ Bakterienzellen in dem von Miller *et al.* (2005) beschriebenen „Milchmeer“ wird umso erstaunlicher, wenn man sich andere Zahlen im Vergleich ansieht: So wird geschätzt, dass sich in den obersten

20 m aller Ozeane der Erde zusammen genommen $3,6 \cdot 10^{28}$ Bakterienzellen befinden (Whitman *et al.*, 1998). Es stellt sich also die Frage, weshalb eine derartige Menge an Bakterien über eine so große Fläche verteilt auftritt. Am wahrscheinlichsten ist, dass das Leuchten der Bakterien einer Algenblüte folgt. Unklar dabei ist, ob die Bakterien in Symbiose mit den Algen leben und sich gleichzeitig mit diesen vermehren, oder ob sie saprophytisch auf den Algen leben und die Biolumineszenz erst nach der Algenblüte eintritt (Nealson and Hastings, 2006). Die Hypothese, dass „Milchmeere“ in Zusammenhang mit der Algenblüte stehen, wird zumindest von den Funden von Lapota *et al.* (1988) unterstützt, die *V. harveyi* nur in Assoziation mit *Phaeocystis spec.* fanden. Die von Kapitän Nemo beschriebenen „Infusionstierchen“ wären somit kein Phantasiegebilde von Jules Verne, sondern Leuchtbakterien, die an Kolonien von Mikroalgen haften.

1.1.2 Quorum Sensing in Bakterien

The only explanation I can think of is that a multitude of the bacteria are stronger than a few, and thus by union are able to overcome obstacles too great for the few. (Smith, 1911)

Quorum Sensing in Gram-negativen Bakterien

Seit den frühen 1990er Jahren gab es einen sprunghaften Anstieg an Veröffentlichungen zum Thema QS. Neben der Biolumineszenz fand man weitere bakterielle Prozesse, die QS-kontrolliert sind, so zum Beispiel die Produktion von Antibiotika, die Konjugation, Motilität und das Schwarmverhalten, die Entstehung von Biofilmen, die Expression von Virulenzgenen oder von Faktoren, die für die Etablierung von Symbiosen wichtig sind (zusammengefasst in Chhabra *et al.*, 2005; Taga and Bassler, 2003). AHLs werden einzig von Gram-negativen Bakterien produziert. Die Grundstruktur von AHLs ist ein Lactonring, an dem eine Acyl-Seitenkette gebunden ist. Diese unterscheidet sich je nach Spezies in ihrer Länge und der Substitution am C3-Atom (siehe Abbildung 1.2) und verleiht dem jeweiligen AHL so seine Spezifität. Die Länge der Seitenkette variiert zwischen 4-18 C-Atomen und

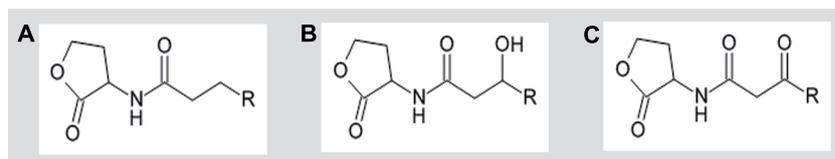


Abbildung 1.2 – Allgemeine Struktur von AHLs mit Lactonring und Acyl-Seitenkette. Die Spezifität wird durch die Seitenkette gegeben, die in ihrer Länge variieren kann. Zusätzlich kann das C3-Atom der Seitenkette A) unsubstituiert sein, B) hydroxyliert vorliegen oder C) eine Ketogruppe tragen.

wird meist um zwei C-Atome verlängert oder verkürzt (zusammengefasst in Stevens *et al.*, 2011). Da die Biolumineszenz in *V. fischeri* eines der meistzitierten Beispiele für QS ist, sollen die molekularen Mechanismen anhand dieses Beispiels näher erläutert werden (siehe Abbildung 1.3): Der „Autoinducer“ oxo-C6-HSL wird cytoplasmatisch durch die AHL-Synthase produziert. Das LuxI-Enzym überträgt dabei eine Acyl-Gruppe von einem Trägerprotein (Acyl-ACP) auf S-Adenosylmethionin (SAM), woraufhin dieses cyclisiert und den Lactonring bildet. Das oxo-C6-HSL kann über die Zellmembranen nach außen oder zurück ins Zellinnere frei diffundieren. Nach Erreichen eines Schwellenwertes an freiem AHL erfolgt die Bindung an den AHL-Rezeptor (LuxR). Der AHL-Rezeptor-Komplex ist nun in der Lage an die Lux-Box zu binden und damit die Expression der QS-kontrollierten Gene zu starten. Neben der Luciferase werden auch die *luxI*- und *luxR*-Gene exprimiert, es findet also gleichzeitig eine positive Rückkopplung statt (unter anderem zusammengefasst in Bassler, 2002; Galloway *et al.*, 2011; Miller and Bassler, 2001; Taga and Bassler, 2003; Waters and Bassler, 2005; Whitehead *et al.*, 2001; Williams, 2007; Williams *et al.*, 2007).

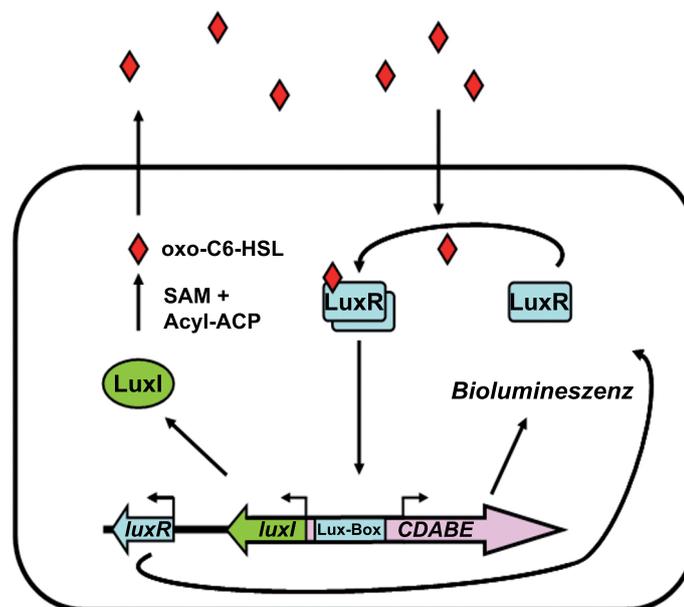


Abbildung 1.3 – Molekularer Mechanismus des QS in *V. fischeri*, abgewandelt nach Galloway *et al.* (2011); Waters and Bassler (2005). Oxo-C6-HSL wird durch LuxI synthetisiert und kann frei über die Membranen diffundieren. Nach Erreichen des Schwellenwertes bindet es an den Rezeptor LuxR. Die Bindung des AHL-Rezeptor-Komplexes an die DNA der Zielgene startet deren Expression.

Die Interaktion zwischen den verschiedenen LuxR-Homologen und ihren jeweiligen AHLs ist im Allgemeinen hochspezifisch. Es geschieht nur selten, dass ein AHL einer Spezies zur Aktivierung AHL-abhängiger Zielgene einer anderen führt (Taga and Bassler, 2003). Dies hat zwei Gründe: 1. Die LuxI Enzyme erkennen jeweils nur ACP-Trägerproteine, die Acyle

einer bestimmten Kettenlänge tragen und übertragen diese dann auf SAM. 2. Die Bindung der LuxR-Regulatoren erfolgt wiederum spezifisch an ihr jeweiliges AHL. Aus diesem Grund gelten AHLs als „Intraspezies“-Signale (Huse and Whiteley, 2011; Taga and Bassler, 2003). Dabei beschränkt sich die Spezifität der Interaktion lediglich auf die Bindung mit dem AHL, denn allen LuxR-Proteinen ist gemeinsam, dass sie an strukturell ähnliche regulatorische Elemente auf der DNA, den sogenannten „Lux-Boxen“ binden (Taga and Bassler, 2003). Bis heute gibt es mehr als 70 bekannte LuxIR basierte QS-Systeme in Gram-negativen Bakterien (Taga and Bassler, 2003). Die verschiedenen LuxR-Homologen lassen sich nach Art der Interaktion mit den AHLs und ihrer Bindung an die DNA in unterschiedliche Klassen einteilen (Stevens *et al.*, 2011; Whitehead *et al.*, 2001). In Tabelle 1.1 sind für jede Klasse beispielhaft ein LuxR-Homolog samt des dazugehörigen Organismus und der Referenz aufgeführt.

Tabelle 1.1 – Auflistung der verschiedenen LuxR-Klassen inklusive Beispielorganismus mit LuxR-Homolog und entsprechender Referenz

Klasse	LuxR	Spezies	AHL	Referenz
I	TraR	<i>A. tumefaciens</i>	oxo-C8-HSL	Zhu and Winans (1999)
II	LuxR	<i>V. fischeri</i>	oxo-C6-HSL	Eberhard <i>et al.</i> (1981)
III	MrtR	<i>M. tianshanense</i>	oxo-C6,C8,C12-HSL	Zheng <i>et al.</i> (2006)
IV	EsaR	<i>P. stewartii</i>	oxo-C6-HSL	Beck von Bodman and Farrand (1995)
V	SdiA	<i>E. coli</i>	–	Kanamaru <i>et al.</i> (2000)

Die LuxR-Homologen der Klasse I bis III sind allesamt Aktivatoren, die nach der Interaktion mit den AHLs an die DNA ihrer Zielgene binden (siehe Abbildung 1.4). Die Aktivierung und Stabilisierung der Klasse I-Homologen erfolgt dabei co-translational. Jedes TraR-Monomer beinhaltet ein tief in der inneren Struktur des Enzyms liegendes AHL-Molekül und es scheint, dass die korrekte Faltung des Proteins nur mit dem gebundenen AHL möglich ist (Bassler, 2002; Williams, 2007). Bei den Klasse II-Regulatoren wie z.B. LuxR erhöht die Bindung des AHLs während der Translation die Lebensdauer des Proteins, die Bindung ist aber reversibel. Im Gegensatz zu den ersten beiden Klassen ist die Anwesenheit von AHLs bei der Proteinfaltung bei Klasse III-Regulatoren wie MrtR nicht notwendig, aber erst durch die AHL-Bindung an das fertige Protein kann dieses Dimere bilden und wird so aktiviert. Im Unterschied dazu sind Klasse IV-Regulatoren wie EsaR nur bei der Abwesenheit von AHLs als Dimer aktiv und werden durch die Bindung von AHL-Molekülen an das Dimer inaktiviert. Eine Sonderrolle nehmen die Klasse V-Homologen wie z.B. SdiA von *E.coli* ein. Obwohl *E.coli* selbst nicht in der Lage ist, AHLs zu produzieren, also kein entsprechendes LuxI-Homolog besitzt, kann *E.coli* mit dem LuxR-Homolog die produzierten AHLs von Nachbarzellen wahrnehmen. Die Klasse V-Regulatoren dimerisieren

nicht nach AHL-Bindung und können verschiedene AHLs erkennen (Stevens *et al.*, 2011).

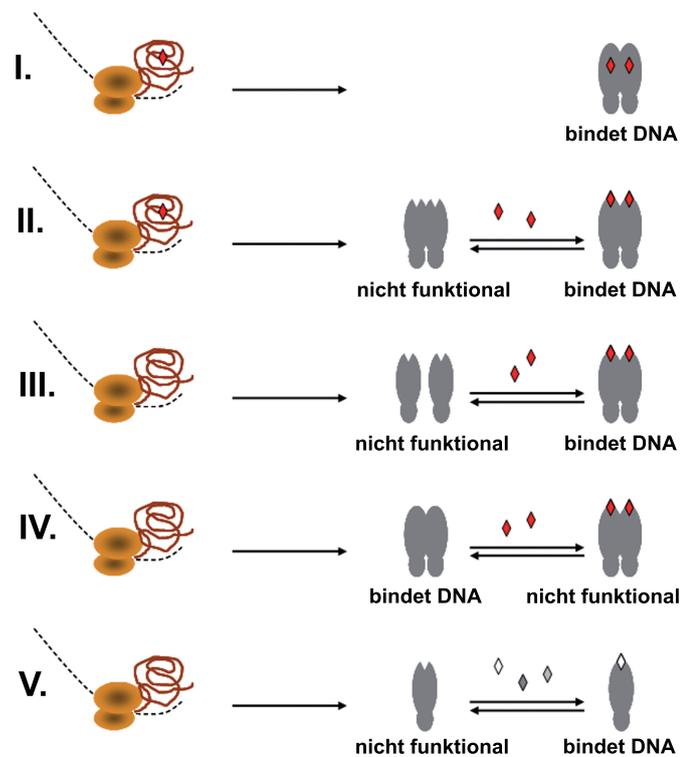


Abbildung 1.4 – Darstellung der Klassen der LuxR-Proteinfamilie unterteilt nach ihrer Bindung an AHLs und ihren multimeren Fähigkeiten nach Stevens *et al.* (2011). Ganz links ist die Translation der LuxR-Homologen am Ribosom dargestellt. Klasse I- und II-Homologe benötigen hierbei die Anwesenheit ihrer AHLs. Die Bindung der AHLs an die LuxR-Homologe (rechts) ist außer bei Klasse I-Homologen reversibel.

Quorum Sensing in Gram-positiven Bakterien

Gram-positive Bakterien nutzen lineare oder zyklische Oligopeptide anstelle von AHLs als „Autoinducer“. Diese entstehen im Zytosol aus Vorläufer-Peptiden und können individuell modifiziert werden. Die Oligopeptide werden aktiv aus der Zelle mittels speziellen ATP-abhängigen ABC-Transportern befördert. Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien werden die Oligopeptide in Gram-positiven durch Rezeptoren an der Zellmembran ähnlich dem Zwei-Komponenten-System erkannt. Ein generelles Beispiel ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Die aus der Zelle transportierten Oligopeptide akkumulieren bei entsprechender Zelldichte und binden die Zwei-Komponenten-Sensorkinase. Dies startet eine Serie von Phosphorylierungen, die schließlich in der Phosphorylierung des DNA-Bindeproteins gipfelt, welches dann die Expression der QS-kontrollierten Zielgene startet (Bassler, 2002;

Huse and Whiteley, 2011; Miller and Bassler, 2001; Taga and Bassler, 2003). Durch die Spezies-spezifischen Modifikationen der Peptide gelten auch diese als „Intraspezies“-Signale.

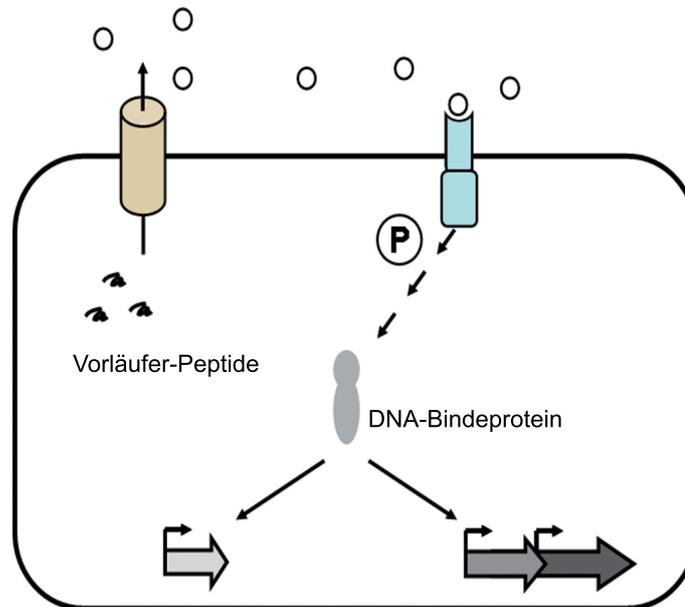


Abbildung 1.5 – Vereinfacht dargestellter Mechanismus des QS in Gram-positiven Bakterien, abgewandelt nach Galloway *et al.* (2011); Waters and Bassler (2005). Die Oligopeptide werden aktiv über die Zellmembran nach außen gepumpt. Die AHL-Bindung erfolgt über ein Zwei-Komponenten-System, was eine Phosphorylierungskaskade im Cytoplasma(®) auslöst.

Weitere QS-Systeme

Viele Bakterien besitzen mehrere QS Systeme. Die Hierarchien der einzelnen Systeme können dabei a) in Reihe oder b) parallel geschaltet sein. Durch in Reihe geschaltete Systeme erreicht man eine genaue zeitliche Abfolge der Expression verschiedener Zielgene. So hat z.B. *Pseudomonas aeruginosa* zwei verschiedene in Reihe geschaltete QS-Systeme: LasIR und RhlIR. Die beiden AHL-Synthasen produzieren zwei verschiedene AHLs. Nach Überschreiten des Schwellenwertes an freiem AHL bindet LasR sein spezifisches AHL. Dadurch werden die LasR regulierten Zielgene exprimiert, darunter auch der Rezeptor für das andere QS-System: RhlR. Erst jetzt können die RhlI-synthetisierten AHLs an ihren Rezeptor binden und die RhlR-regulierten Gene werden exprimiert. Dieses in Reihe geschaltete System erlaubt die Expression unterschiedlicher Virulenzfaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionsprozesses.

Ein Beispiel für ein parallel geschaltetes System ist das QS System von *V. harveyi* (siehe Abbildung 1.6). Auch hier produzieren zwei LuxI-Homologe ihre spezifischen „Autoinducer“. Im Fall von LuxLM ist das N-(3-Hydroxybutanoyl)-Homoserinlacton (OH-C4-HSL); LuxS

produziert den sogenannten „Autoinducer“-2 (AI-2), der erstmals von Surette *et al.* (1999) entdeckt wurde. AI-2-„Autoinducer“ sind eine Gruppe von ineinander umwandelbaren Furanonen (im Fall von *V. harveyi* ein Furanosyl-Borat-Diester (Ahmer, 2004)) und werden in mehreren enzymatischen Schritten aus SAM synthetisiert (Bassler, 2002). Sie kommen sowohl in Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien vor und gelten deshalb als „Interspezies“-Signalmolekül (Ahmer, 2004; Bassler, 2002; Taga and Bassler, 2003). Evolutionär ist dieses QS-System vermutlich vor den beiden anderen entstanden (Taga and Bassler, 2003), mittlerweile wird aber auch diskutiert, dass unterschiedliche Bakterienarten auf verschiedene Formen von AI-2 reagieren (Huse and Whiteley, 2011). Nach Überschreiten des Schwellenwertes binden beide „Autoinducer“ an ihren jeweiligen Rezeptor: OH-C4-HSL bindet an LuxN und AI-2 an LuxPQ. Interessanterweise findet die Signaltransduktion nicht wie bei anderen Gram-negativen Bakterien im Zytosol, sondern im Periplasma statt und ähnelt dem Zwei-Komponenten-System der Gram-positiven Bakterien. Nach der Bindung an LuxN bzw. LuxPQ finden parallele Phosphorylierungskaskaden statt, die über LuxU bis zum Regulator LuxO laufen, der die Expression der Zielgene (u.a. Biolumineszenz) kontrolliert (Bassler, 2002; Taga and Bassler, 2003).

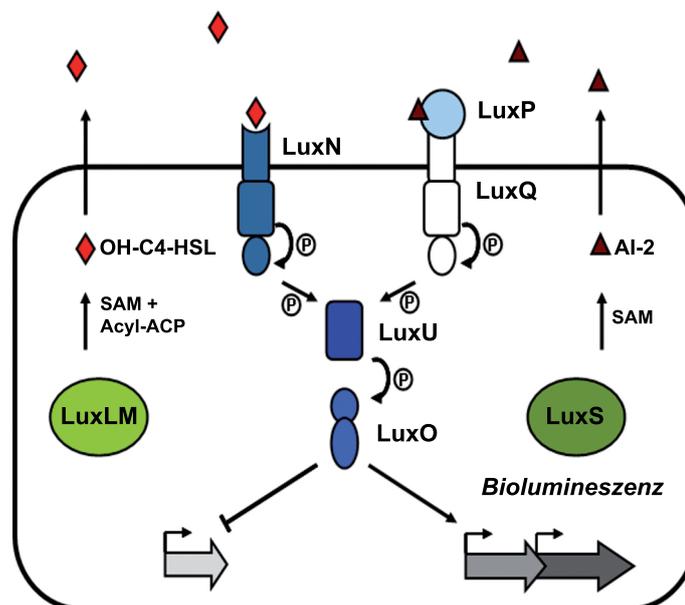


Abbildung 1.6 – Parallel geschaltetes QS-System von *V. harveyi*, abgewandelt nach Bassler (2002); Taga and Bassler (2003). *V. harveyi* stellt parallel zwei „Autoinducer“ her, ein AHL und AI-2. Die Bindung an den Rezeptor erfolgt im Periplasma ähnlich dem Zwei-Komponenten System der Gram-negativen Bakterien und löst parallele Phosphorylierungskaskaden (Ⓟ) aus.

Mittlerweile wurden auch Chinolone/Chinoline als „Autoinducer“ entdeckt. So produziert *P. aeruginosa* mehr als 50 verschiedene dieser Chinolone/Chinoline, von denen

einige auch antimikrobielle Wirkung haben. Des Weiteren wurden Chinolone/Chinoline mit Signalfunktion auch in verschiedenen *Burkholderia*-Arten und in *Pseudomonas putida* nachgewiesen (zusammengefasst in Huse and Whiteley, 2011). Weshalb braucht *V. harveyi* aber zwei verschiedene QS-Systeme (mittlerweile ist sogar ein drittes parallel geschaltetes QS-System bekannt (Henke and Bassler, 2004)) zur Regulation der selben Zielgene? Zum einen kann *V. harveyi* unterscheiden, ob nur einer der beiden „Autoinducer“ oder beide gleichzeitig anwesend sind (die volle Leuchtkraft wird nur bei Anwesenheit beider entwickelt), zum anderen ist aber auch noch nicht völlig geklärt, welche Zielgene von beiden und welche nur von einem „Autoinducer“ reguliert werden. Die parallele Genregulation könnte *V. harveyi* helfen, sein Verhalten anzupassen je nachdem, ob es die Mehrheit oder lediglich eine Minderheit in einer gemischten Population stellt (Taga and Bassler, 2003).

Mit der Zeit und einer Vielzahl entdeckter QS-Systeme und Regulationsmechanismen wurde klar, dass QS über ein reines Messen der Populationsdichte hinaus geht. So postulierten Redfield (2002) das Modell des „Diffusion Sensing“. Dieses besagt, dass Bakterien mittels der Autoinducer messen, wie schnell diese in ihrer Umgebung diffundieren. Wenn die Diffusionsraten hoch sind, werden die „Autoinducer“ schnell verdünnt, auch wenn die Populationsdichte ausreichend hoch ist. Sind die Diffusionsraten hingegen niedrig, können die „Autoinducer“ auch bei geringer Zellzahl akkumulieren und die Expression der Zielgene wird gestartet. Die Bakterien messen also mit den für sie nicht ganz so kostenintensiven „Autoinducern“, ob die Expression und anschließende Exkretion von Effektoren gewinnbringend wäre, weil diese am Wirkungsort in ausreichender Konzentration vorliegen können. Während das Modell des QS davon ausgeht, dass sich die Signalmoleküle im Laufe der Evolution entwickelt haben, weil es für die Bakterien von Vorteil ist, in Gruppen koordiniert agieren zu können, fehlt jede Art von Sozialverhalten im Konzept des „Diffusion Sensing“. Das Modell des „Efficiency Sensing“ vereint die beiden Theorien und geht dabei noch einen Schritt weiter (Hense *et al.*, 2007). Demnach messen die Bakterien nicht nur die Zahl ihrer selbst und die anderer Spezies, sondern zusätzlich deren räumliche Verteilung und die Effizienz exkretierter Moleküle. Laut dem „Efficiency Sensing“ Modell sind „Autoinducer“ im Laufe der Evolution nicht nur entstanden, weil das Messen der Effizienz von Effektoren einen Fitnessvorteil für die einzelne Zelle darstellt, sondern auch, weil das Erfassen der Population (eigene und fremde Zellen und deren räumliche Verteilung) einen Fitnessvorteil für die ganze Gruppe bedeutet.

Da die größte Anzahl an Veröffentlichungen AHLs als QS-„Autoinducer“ betreffen, wird sich diese Arbeit hauptsächlich auf diese konzentrieren.

1.1.3 Quorum Quenching

Für Bakterien ist es nicht nur von Vorteil miteinander zu kommunizieren und das eigene Verhalten koordinieren zu können, sondern auch in der Lage zu sein, die Kommunikation anderer Bakterienarten abzuhören oder gar ganz zu unterbinden, stellt aus evolutionärer Sicht einen Vorteil dar. Ein Beispiel hierfür sind *E. coli* Bakterien, welche, obwohl sie selbst keine AHLs herstellen, in der Lage sind, die von anderen Bakterien produzierten AHLs mit ihrem LuxR Homolog SdiA wahrzunehmen und entsprechend zu reagieren (Kanamaru *et al.*, 2000). Das Eingreifen und Stören des QS nennt man „Quorum Quenching“. Ein einzelner QS-Regelkreis bietet mehrere Stellen, an denen in die Kommunikation eingegriffen werden kann (siehe Abbildung 1.7).

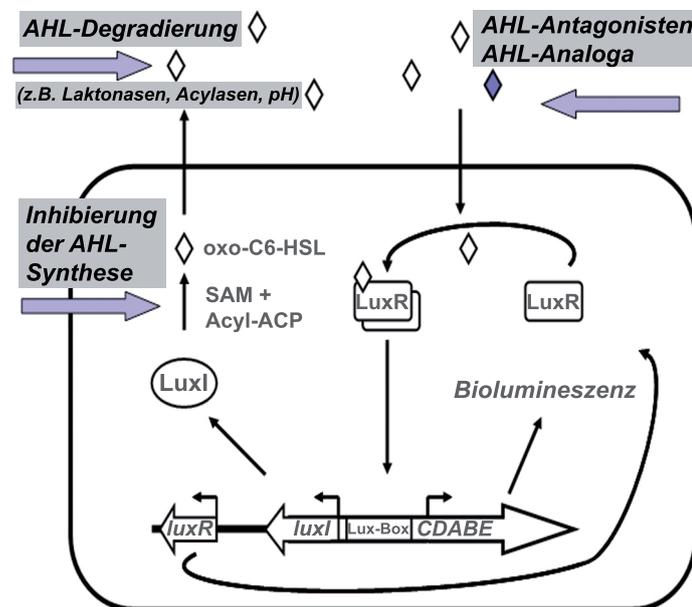


Abbildung 1.7 – Vereinfacht dargestelltes Modell des QS-Systems von *V. fischeri* und mögliche Stellen zur Beeinflussung des Systems abgewandelt nach Galloway *et al.* (2011); Stevens *et al.* (2011); Waters and Bassler (2005).

Eine Möglichkeit wäre die Synthese des „Autoinducers“ selbst zu inhibieren. Viel häufiger wird aber in das QS-System eingegriffen, indem die „Autoinducer“ entweder zerstört werden oder indem Antagonisten die Bindung an den Rezeptor stören. Man kann aber auch durch die Produktion von AHL-Analoga in das QS eingreifen. Diese induzieren die gleichen biologischen Effekte wie der natürliche Ligand (Stevens *et al.*, 2011). Die Degradierung von AHLs kann durch nicht-enzymatische Lactonolyse aufgrund basischer pH-Werte erfolgen (Englmann *et al.*, 2007), AHLs können aber auch durch bestimmte Enzyme abgebaut werden. Bisher wurden zwei AHL-abbauende Enzyme gefunden: Die AHL-Lactonase öffnet den Lactonring und bewirkt eine Hydrolyse, während die AHL-Acylase das AHL

in Lactonring und Fettsäurerest aufspaltet (Dong *et al.*, 2001; Dong and Zhang, 2005; Xu *et al.*, 2003). AHL-abbauende Enzyme finden sich in mehreren bakteriellen Phyla (Dong and Zhang, 2005) und können auch dazu genutzt werden, in das eigene QS-System einzugreifen um dieses zu regulieren (Fekete *et al.*, 2010).

Doch nicht nur Bakterien greifen in das QS-System ein. Eines der bekanntesten Beispiele für AHL-Antagonisten sind die halogenierten Furanone der Rotalge *Delisea pulchra*, die z.B. das Schwarmverhalten von *S. liquefaciens* unterbinden (Givskov *et al.*, 1996). Die halogenierten Furanone sind AHLs strukturell sehr ähnlich (siehe Abbildung 1.8).

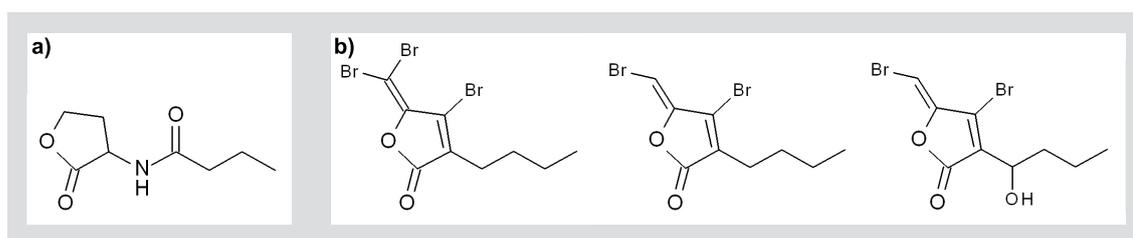


Abbildung 1.8 – Struktur von a) C4-HSL von *S. liquefaciens* und b) einige Furanone, die aus *Delisea pulchra* extrahiert werden konnten im Vergleich.

Sie unterbrechen das Kommunikationssystem der Bakterien dabei weder durch die Inhibierung der Synthese, noch durch Störung der AHL-Aufnahme (Rasmussen *et al.*, 2000), sondern binden an die AHL-Rezeptoren und fördern so deren proteolytischen Abbau (Manefield *et al.*, 1999, 2002). In Abschnitt 1.2 wird näher auf die Beziehung zwischen eukaryotischen Wirtsorganismen und bakteriellen QS-Signalen eingegangen. Interessanterweise hemmen viele Bakterien das QS-System von anderen Arten durch die Produktion von AHLs. Oft wirken langkettige AHLs antagonistisch auf Funktionen kurzkettiger AHLs. So hemmt zum Beispiel die Zugabe von C10-HSL die Pigmentbildung in *Chromobacterium violaceum*, welche normalerweise durch C6-HSL induziert wird (McClellan *et al.*, 1997). Eine Reihe weiterer AHL-Antagonisten und -Analoge, die entweder künstlich hergestellt wurden oder natürlichen Ursprungs sind (darunter auch Salizylsäure) wurden zusammengefasst in Stevens *et al.*, 2011.

1.2 Interkingdom Signaling

Prokaryotische Lebensformen haben sich lange vor dem Erscheinen der ersten eukaryotischen Zelle entwickelt. Eukaryoten mussten sich deshalb schon immer mit Bakterien auseinandersetzen und befinden sich in ständigem Kontakt mit QS-Signalen. Da Bakterien einen klaren Vorteil davon haben, in das eigene QS-System und in das anderer Arten einzugreifen, wäre es nur natürlich, wenn auch Eukaryoten Mechanismen entwickelt hätten,

das bakterielle QS-System zu manipulieren. Die Kommunikation zwischen Bakterien und eukaryotischen Wirtsorganismen nennt man „Interkingdom Signaling“. Tatsächlich gibt es dafür einige Beispiele. Wie bereits in Abschnitt 1.1.3 erwähnt, wurden AHL-abbauende Lactonasen in *Delisea pulchra* nachgewiesen. Dort verhindern die Enzyme, dass sich bakterielle Biofilme auf der Oberfläche der Rotalge bilden und so die Photosynthese stören (Manefield *et al.*, 1999; Rasmussen *et al.*, 2000). Auch menschliche Epithelzellen inaktivieren AHLs durch spezifische Lactonasen (zusammengefasst in Hughes and Sperandio, 2008). Das Verhältnis von Bakterienzellen zu eigenen Zellen beträgt bei Säugetieren in etwa 9:1 (Teplitski *et al.*, 2011). Ein gesunder erwachsener Mensch besitzt etwa $3 \cdot 10^8$ Bakterienzellen auf seiner Haut und $3,9 \cdot 10^{23}$ Bakterienzellen in seinem Darm (Whitman *et al.*, 1998). Die meisten dieser Bakterien sind in Symbionten oder Kommensalen. Trotzdem wurde die Kommunikation zwischen Bakterien und Säugern hauptsächlich in Bezug auf Pathogene untersucht. Im Fokus stand dabei der opportunistische Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* und das von ihm produzierte AHL oxo-C12-HSL, da herausgefunden wurde, dass die Expression der Virulenzgene und die Biofilmbildung in *P. aeruginosa* QS reguliert sind und das QS-System in dieser Spezies sehr gut charakterisiert ist (Rumbaugh *et al.*, 2000). So löst oxo-C12-HSL unter anderem Apoptose in verschiedenen Zelltypen, darunter Makrophagen (Tateda *et al.*, 2003), Fibroblasten (Shiner *et al.*, 2006) und Lymphozyten (Jacobi *et al.*, 2009) aus. Um die Reaktionen in den Zellen auszulösen, wird eine relativ hohe Konzentration an AHLs benötigt, trotzdem scheinen die Reaktionen spezifisch zu sein, denn die Applikation anderer AHLs in vergleichbarer Konzentration lösen keinerlei Reaktionen aus (Jacobi *et al.*, 2009; Shiner *et al.*, 2006; Tateda *et al.*, 2003). Shiner *et al.* (2006) konnten zudem nachweisen, dass nach Applikation von oxo-C12-HSL das intrazelluläre Level an Kalzium zunahm und der Kalziumanstieg mit der Apoptose im direkten Zusammenhang steht. Zwei Jahre später postulierten Jahoor *et al.* (2008) den ersten eukaryotischen AHL-Rezeptor in Säugern. Eine Zusammenfassung weiterer Reaktionen von Säugern auf AHLs gibt Teplitski *et al.* (2011).

Auch Pflanzen stehen in ständigem Kontakt mit Bakterien. Es wird geschätzt, dass sich pro cm^2 Blattoberfläche durchschnittlich $10^4 - 10^6$ Bakterienzellen befinden (Whitman *et al.*, 1998). Eine noch größer Bedeutung hat allerdings die Rhizosphäre, also der Boden, der die Wurzeloberfläche direkt umgibt. Dort leben eine Vielzahl von Bakterien, die sich beispielsweise von Wurzelexudaten ernähren. Viele Pflanzen-assoziierte Bakterien nutzen AHLs, um miteinander zu kommunizieren. Man fand heraus, dass *Pseudomonas*-Arten, die hauptsächlich in der Rhizosphäre zu finden sind, häufiger AHLs produzieren, als Arten, die im restlichen Boden vorkommen (DeAngelis *et al.*, 2007; Elasri *et al.*, 2001). Steidle *et al.* (2001) entdeckten, dass ca. 12 % aller Bakterienarten in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen AHLs produzieren und D'Angelo-Picard *et al.* (2004) fanden sogar 15 %

AHL-produzierende Arten in der Rhizosphäre von Tabakpflanzen. Es wird angenommen, dass das erhöhte Vorkommen AHL-produzierender Bakterien in der Rhizosphäre von den Bakterien auch zur Kommunikation mit den Pflanzen genutzt wird (Bais *et al.*, 2006). Phytopathogene Arten nutzen das QS ähnlich wie bei Säugetieren zur zeitlich abgestimmten Expression von Virulenzgenen. *Pectobacterium carotovorum* (früher *Erwinia carotovora* (Hauben *et al.*, 1998)), der Verursacher der Schwarzbeinigkeit und der Weichfäule z.B. bei Kartoffeln, steuert mittels AHLs die Expression zellwandabbauender Enzyme. Die Steuerung erfolgt, indem durch AHL-Bindung ein regulatorisches Protein, welches hemmend auf die Expression der Zielgene wirkt, wie bei LuxR-Homologen der Klasse IV (siehe Abbildung 1.4) selbst gehemmt wird (Barnard and Salmond, 2007; Mole *et al.*, 2007). Gemäß dem „Efficiency Sensing“-Modell erfolgt die Expression der Zellwand-abbauenden Enzyme erst beim Vorhandensein einer genügend großen Anzahl von Bakterien und bei gleichzeitig niedrigen Diffusionsraten, sodass die Wirksamkeit der Enzyme gewährleistet ist. Neben pathogenen Bakterien benutzen auch viele andere Rhizobakterien, die kommensalistisch oder mutualistisch mit Pflanzen leben, AHLs als „Autoinducer“. Sogenannte „plant growth promoting rhizobacteria“ (PGPR) können an der Wurzeloberfläche oder sogar endophytisch leben und werden auch in der Landwirtschaft als Bio-Dünger oder zur Bio-Kontrolle gegen Pathogene eingesetzt. PGPR kommen natürlicherweise im Boden und in der Rhizosphäre vor. Unter ihnen sind z.B. verschiedene *Pseudomonas*- und *Bacillus*-Arten. Allen ist gemeinsam, dass sie das Pflanzenwachstum steigern und/oder die Pflanzengesundheit stärken. Dies kann beispielsweise über die Produktion von Phytohormonen geschehen, aber auch durch die Induktion der „systemic acquired resistance“ (SAR) (zusammengefasst in Ortíz-Castro *et al.*, 2009) Viele dieser Bakterien produzieren AHLs, jedoch ist noch nicht ganz geklärt, welche Rolle die AHLs im PGPR-Effekt spielen. Auch „klassische Pflanzensymbionten“ sind auf AHLs bei der Etablierung der Symbiose angewiesen. So ist z.B. bei *Mesorhizobium tianshanense* mit defektem QS-System keine Knöllchenbildung mehr möglich (Zheng *et al.*, 2006).

Eine der ersten Arbeiten, die zeigten, dass Pflanzen auf AHLs reagieren können, beschäftigte sich mit der Alge *Ulva intestinalis*. Deren Zoosporen besiedeln bakterielle Biofilme, allerdings nur, wenn diese bestimmte AHLs produzieren (Joint *et al.*, 2002). Dabei verringert sich die Geschwindigkeit der schwimmenden Zoospore, je näher sie der AHL-Quelle kommt, ohne dass dabei gleichzeitig die Orientierung der Zoospore (zur AHL-Quelle hin bzw. von ihr weg) beeinflusst wird (Wheeler *et al.*, 2006). Nur ein Jahr später entdeckten Mathesius *et al.* (2003), dass *Medicago truncatula* sowohl auf die AHLs von pathogenen *P. aeruginosa* als auch auf die von symbiotisch lebenden *Sinorhizobium meliloti* mit der veränderten Expression von über 150 Proteinen reagieren. Viele dieser regulierten Proteine spielen eine Rolle in der pflanzlichen Abwehr, bei allgemeinen Stressantworten, im Primär-

metabolismus oder bei Phytohormonantworten (Ortíz-Castro *et al.*, 2009; Teplitski *et al.*, 2011). Diese Resultate wurden später bei *Arabidopsis thaliana* bestätigt, wobei zusätzlich noch die Regulation von Auxin- und Cytokinin-abhängigen Genen festgestellt wurde (von Rad *et al.*, 2008). Es wurden aber auch nach Zugabe von AHLs in *A. thaliana* Auxin-unabhängige Veränderungen der Wurzelarchitektur beobachtet (Ortíz-Castro *et al.*, 2008). In Tomatenpflanzen konnte nachgewiesen werden, dass die Pflanzen nach Inokulation mit dem AHL-produzierenden *S. liquefaciens* MG1 Wildtypstammes anschließend gegen den Befall des pathogenen Pilzes *Alternaria alternata* besser geschützt waren. Gleichzeitig erhöhte sich in den so behandelten Pflanzen der Gehalt an SA. Die Inokulation mit dem Stamm MG44, der keine AHLs produzieren kann, konnte die Symptome nach Pilzbefall nicht verringern, die SA-Gehalte blieben ebenfalls unverändert (Schuhegger *et al.*, 2006). Ebenso wurde festgestellt, dass die Applikation von AHLs zur Induktion SA- und Ethylen-abhängiger Abwehrgene in Tomatenpflanzen führt. Die Autoren folgerten, dass AHLs durch Induktion der systemischen Resistenz in Pflanzen eine Rolle bei der Biokontrolle in der Rhizosphäre spielen können. Die Applikation von Homoserinlacton - einem Abbauprodukt von AHLs - an Wurzeln von Bohnenpflanzen erhöhte die Transpiration bei diesen um bis zu 30 %. Da dies die Aufnahme von schwer erreichbaren Nährstoffen erhöhen kann, ist eine erhöhte Transpiration unter Umständen für die Pflanze von Vorteil (Joseph and Phillips, 2003). Eine Vielzahl von Pflanzen greift direkt in das QS-System ein. Beispielsweise ist *Lotus corniculatus* L. in der Lage, AHLs im Medium enzymatisch abzubauen (Delalande *et al.*, 2005) und *Pisum sativum* Keimlinge haben verschiedene Substanzen in ihren Exudaten, die einerseits hemmend, aber auch stimulierend auf bakterielles QS wirken können. So wird z.B. die Violacein-Produktion in *Chromobacterium violaceum* nach Zugabe von *Pisum*-Exudaten gehemmt, das Schwarmverhalten in *S. liquefaciens* MG44 aber erst induziert (Teplitski *et al.*, 2000). Vor einiger Zeit wurde eine völlig neue Art von Homoserinlactonen entdeckt (Schaefer *et al.*, 2008). Das Bakterium *Rhodopseudomonas palustris* besitzt ein LuxI-Homolog, welches aus im Medium vorhandenen p-Coumarat p-Coumaroyl-HSL synthetisieren kann. Die Expression von *rpaI* startet erst beim Vorhandensein von Coumarat, welches der Hauptbestandteil von Lignin ist. *R. palustris* hat auch einen entsprechenden Rezeptor, RpaR, welcher Homologie zu den Fettsäure-Acyl-HSL-Rezeptoren aufweist. Die Arbeiten von Schaefer *et al.* (2008) zeigen zwei Dinge: 1. HSLs müssen nicht mit Fettsäuren, sondern können auch an organische Säuren gekoppelt sein. Dies eröffnet ein neues Spektrum an möglichen QS-Signalen. 2. Das Funktionieren des QS-Signals ist an zwei Bedingungen geknüpft. Zum einen an eine ausreichend hohe Populationsdichte der Bakterien, zum anderen aber auch an das Vorhandensein eines weiteren externen Signals, welches als Ausgangssubstanz zur Synthese des „Autoinducers“ dient. Coumarat wird nach Verletzungen oder Stress verstärkt von

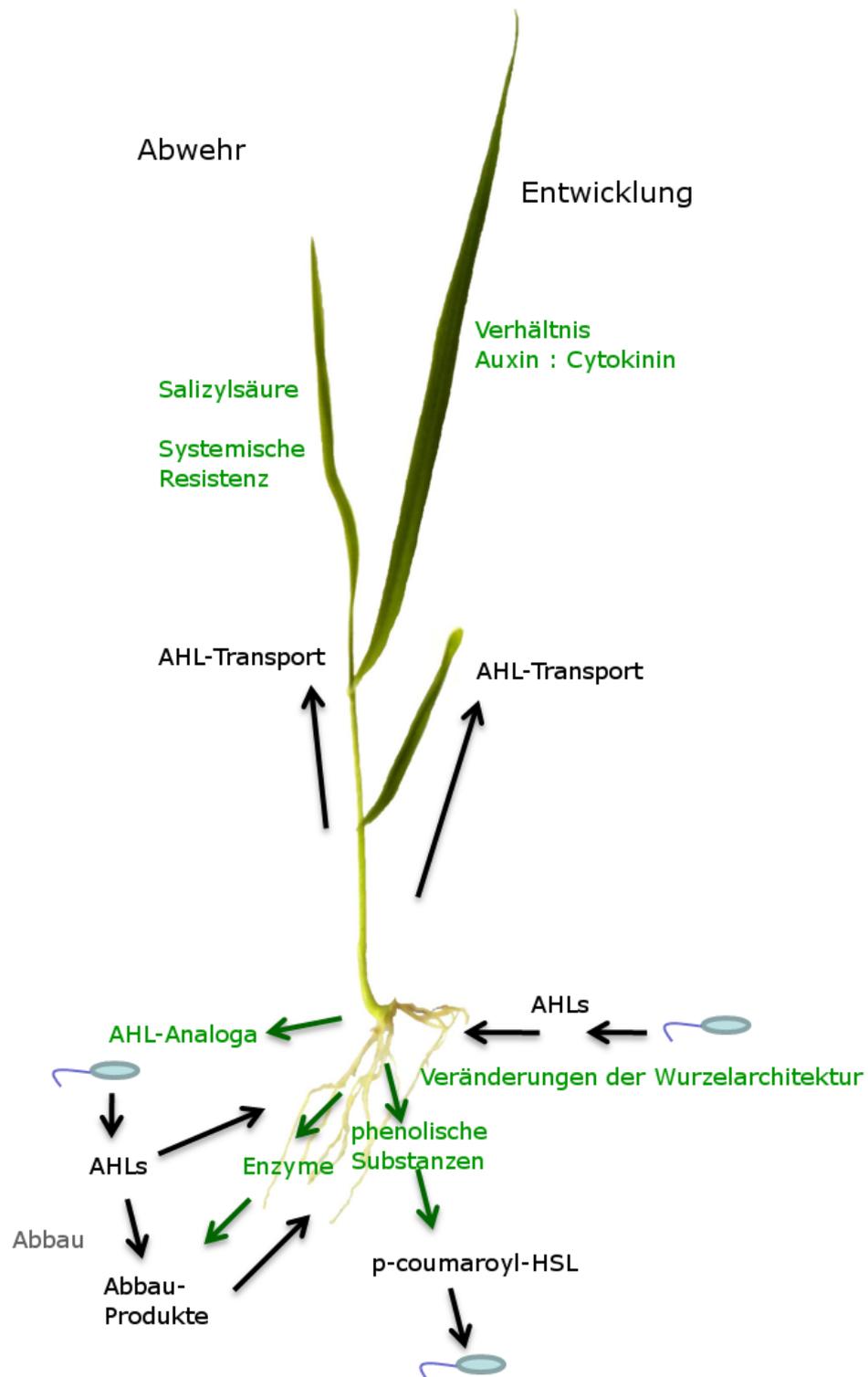


Abbildung 1.9 – Zusammenfassende Darstellung des „Interkingdom Signaling“ bei Pflanzen mit AHLs als bakteriellen „Autoinducer“ verändert nach Teplitski *et al.* (2011).

Pflanzen produziert. Die Autoren spekulieren, dass Bakterien mit diesen „Autoinducern“ eine besonders enge Beziehung mit den Pflanzen haben und dass dieses „Interkingdom Signaling“ auf der Basis von p-Coumaroyl-HSL funktioniert (Schaefer *et al.*, 2008). Pflanzen können AHLs durch ihre Wurzeln bis in die Blätter aufnehmen (Götz *et al.*, 2007; von Rad *et al.*, 2008). Dabei ist die AHL-Kettenlänge, aber auch die Pflanzenspezies selbst ausschlaggebend, ob ein AHL bis in die Blätter transportiert werden kann oder nicht. Des Weiteren unterscheiden Pflanzen auch die Chiralität der AHLs und nehmen hauptsächlich L-Isoformen auf (Götz *et al.*, 2007). Dies könnte auf einen AHL-Rezeptor in Pflanzen hindeuten. Bis heute ist dieser allerdings noch nicht gefunden worden.

1.3 Kommunikation in Pflanzen

Auch Pflanzen kommunizieren mittels einer Vielzahl chemische Signale mit ihrer Umwelt. Da Pflanzen sessil sind, haben sie im Laufe der Evolution ein breites Arsenal an chemischen „Waffen“ entwickelt, um sich gegen Feinde zu wehren. Die *Brassicaceae* produzieren beispielsweise eine Reihe verschiedener Glukosinolate, *Solanaceae* eine Vielzahl von Alkaloiden, das bekannteste ist hierbei das Nikotin in Tabak. All diese Sekundärmetabolite dienen den Pflanzen als Schutz gegen nicht spezialisierte Herbivore (Steppuhn *et al.*, 2004). Neben dieser direkten Abwehr können Pflanzen nach Herbivorbefall aber auch um Hilfe rufen, indem sie volatile Substanzen abgeben und dadurch beispielsweise parasitische Wespen anlocken (Dicke, 2009). Volatile Substanzen spielen auch eine Rolle beim Anlocken möglicher Bestäuber und bei der Kommunikation mit Nachbarpflanzen (zusammengefasst in van Dam, 2009; Karban, 2008). Die gesamte Kommunikation ist sehr komplex. Pflanzen sind in der Lage zwischen einer Vielzahl von Signalen zu unterscheiden und entsprechend zu reagieren. So werden beispielsweise unterschiedlich Mischungen an volatilen Substanzen in die Luft entlassen, auch wenn die an der Pflanze fressenden Raupenarten relativ eng miteinander verwandt sind (Karbon, 2008). Die Abwehr gegen Fressfeinde, aber auch gegen Mikroorganismen wird durch Phytohormone gesteuert. Von besonderer Bedeutung sind dabei Salizylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen. Biotrophe Pathogene werden durch SA-gesteuerte Abwehrmechanismen bekämpft, nekrotrophe Pathogene und pflanzenfressende Insekten durch JA-Ethylen gesteuerte Abwehrmechanismen (Verhage *et al.*, 2010). Die verschiedenen Phytohormone können dabei antagonistisch oder synergistisch aufeinander wirken und das Ergebnis der eingeleiteten Abwehr ist immer abhängig vom zeitlichen Ablauf und der Mischung der beteiligten Phytohormone (Karbon, 2008; Verhage *et al.*, 2010). Verschiedene Mikroorganismen werden spezifisch erkannt. Die Erkennung von Mikroben erfolgt über allgemeine Elicitoren, die sogenannten „pathogen-“ oder „microbe-associated molecular patterns“ (PAMPs oder

MAMPs) wie z.B. Flagellin. Diese werden von den Pflanzen über spezielle Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt. Die Antwort der Pflanzen auf PAMPs ist die sogenannte „PAMP-triggered immunity“ (PTI). Im evolutionären Wettrüsten haben einige Pathogene sogenannte Effektoren entwickelt, um die PTI zu umgehen. Viele der Effektoren wirken direkt auf die Signalkaskaden der PTI ein. Die Antwort einiger Pflanzen auf die Effektoren sind spezielle Rezeptoren, die diese erkennen. Dies führt dann zur „effector-triggered immunity“ (ETI) (zusammengefasst in Boller and He, 2009). PAMPs lösen verschiedene Reaktionen in Pflanzen aus: 1. kurzzeitige Reaktionen (Sekunden bis Minuten) wie z.B. den oxidativen „burst“ oder Kalziumströme, 2. mittelfristige Reaktionen (Minuten bis Stunden) wie z.B. die Produktion von Ethylen und 3. langfristige Reaktionen (Stunden bis Tage) wie z.B. die Erhöhung der SA (Zipfel and Robatzek, 2010). Es wird deutlich, dass pflanzliche Kommunikations- und Abwehrmechanismen die gleichen Komponenten benutzen. Denn auch die Etablierung von Symbiosen mit Rhizobien oder Mycorrhizapilzen ist mit einer Oszillation von Kalzium verbunden, wobei bei der Erkennung die Periode und Amplitude der Oszillation eine Rolle spielt (Kudla *et al.*, 2010). Kalzium reguliert aber auch die SA-abhängige Pathogenabwehr (Du *et al.*, 2009). Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenabwehr. ROS werden unter „normalen“ Umständen während der Photosynthese und Atmung produziert. Dabei werden ca. $240 \mu\text{M O}_2^- \text{ s}^{-1}$ und $0,5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ gebildet. Unter Stressbedingungen erhöhen sich diese Werte auf $240 - 720 \mu\text{M O}_2^- \text{ s}^{-1}$ und $5 - 15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ (Polle, 2001). Die Auslöser können sowohl abiotisch oder biotisch sein. ROS gelten deshalb als Stressindikator, aber auch als mögliche sekundäre Botenstoffe für weitere Signalkaskaden (Mittler, 2002). ROS werden bei Stress u. a. von NADPH-Oxidasen gebildet. Mittler (2002) weist darauf hin, dass es zwei verschiedene Systeme geben muss, welche ROS abbauen und im Gleichgewicht halten: eines, das sehr empfindlich ist und die Feinabstimmung übernimmt, wenn ROS als sekundäre Botenstoffe wirken und eines, welches größere Mengen ROS schnell entgiften kann, wenn die Pflanzen gestresst sind. Zu den wichtigsten Entgiftungsenzymen zählen die Superoxiddismutase (SOD), die Ascorbatperoxidase (APOX) und die Katalase (CAT). Das Zusammenspiel aller drei Enzyme ist wichtig, um das Gleichgewicht von O_2^- und H_2O_2 in den Zellen zu erhalten. APOX und CAT haben unterschiedliche Affinitäten zu ihrem Substrat H_2O_2 (APOX = μM Bereich; CAT = mM Bereich), was darauf hindeuten könnte, dass APOX eher für die Feinabstimmung und CAT für die Entgiftung von H_2O_2 zuständig ist. In Abbildung 1.10 ist die Entgiftung von O_2^- und H_2O_2 grob skizziert. Neben den schon genannten Enzymen sind noch weitere Entgiftungsenzyme und Antioxidantien wie Ascorbat und Glutathion an der ROS-Entgiftung beteiligt. Auch die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) wirkt neben H_2O_2 als sekundärer Botenstoff bei der Interaktion

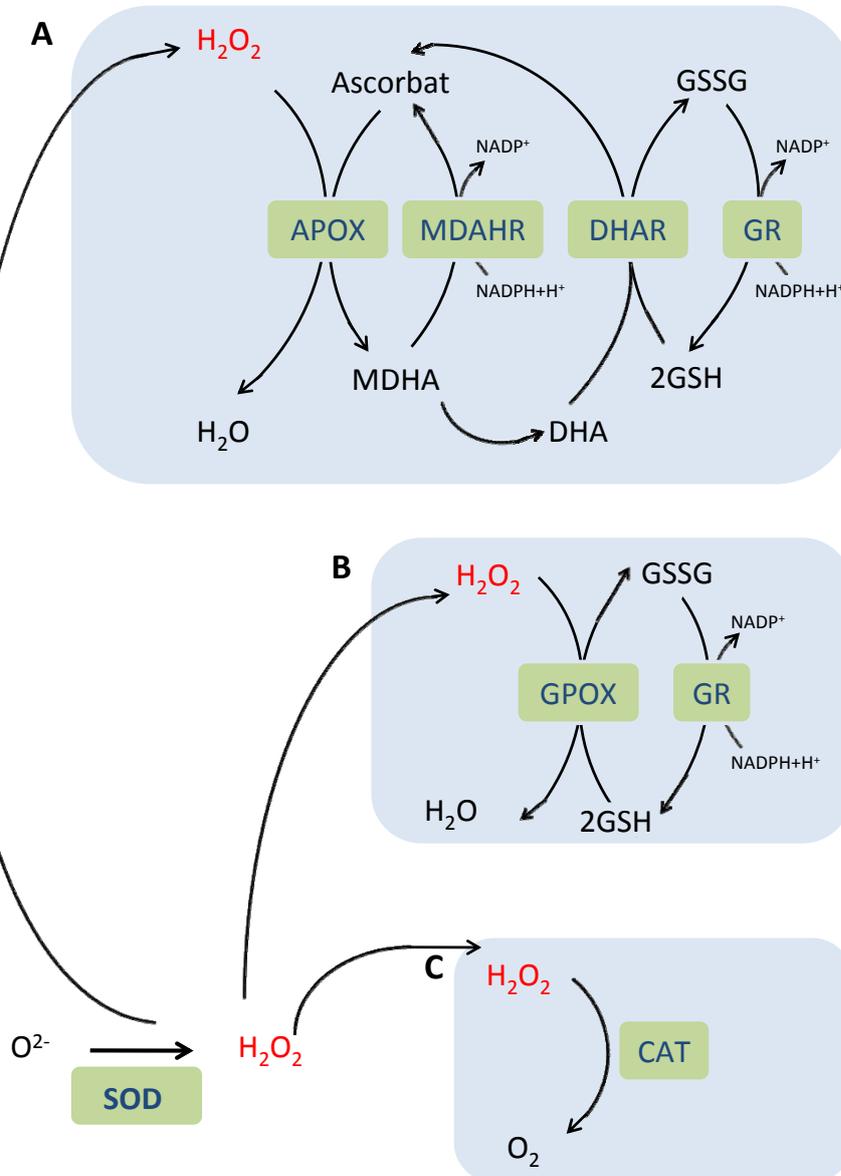


Abbildung 1.10 – Vereinfachte Darstellung des Entgiftungsweges von ROS nach Mittler (2002) A) Halliwell-Asada-Zyklus B) GPOX-Zyklus und C) Reaktion der Katalase. Der Halliwell-Asada-Zyklus findet in Chloroplasten, im Cytosol, in Mitochondrien, im Apoplasten und in Peroxisomen statt. Der GPOX-Zyklus und die Entgiftung mit Katalase geschieht in den Peroxisomen.

mit Mikroorganismen und unterdrückt wahrscheinlich zusammen mit SA die APOX und CAT-Aktivität während der Stressantwort (Mittler, 2002).

Glutathion-S-Transferasen (GSTs) sind eine alte und vielschichtige Proteinfamilie, die in fast allen lebenden Organismen vorkommt. Die bisherige Forschung konzentrierte sich hauptsächlich auf die Entgiftung verschiedener Xenobiotika durch GSTs (zusammengefasst in Edwards *et al.*, 2000). GSTs können jedoch nicht nur als GSH-Transferasen, sondern auch als GSH-abhängige Peroxidasen, Isomerasen, Oxidoreduktasen und auch als nicht-enzymatisches Trägerprotein wirken (zusammengefasst in Sappl *et al.*, 2009). Über die natürlichen Substrate von GSTs und über deren Rolle in endogenen Prozessen ist im Vergleich nur recht wenig bekannt (Edwards *et al.*, 2000). Da es Anzeichen dafür gibt, dass einige GSTs Auxin- und Cytokininbindeproteine sein können, wurde vorgeschlagen, dass GSTs auch Hormonaktivitäten in Pflanzen modulieren können (Smith *et al.*, 2003). Die Expression von GSTs kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stressauslöser wie z.B. Kälte, Dehydrierung, Verwundung, Pathogenbefall, Ethylen, H₂O₂ und SA, induziert werden. Dabei gibt es einige GSTs, die auf mehrere Arten von Stress reagieren, während andere sehr spezifisch sind (zusammengefasst in Sappl *et al.*, 2009). In jedem Fall aber reagieren GSTs schnell auf Stressoren und können daher als Indikatoren für Störungen genutzt werden.

1.4 Versuchspflanze Gerste

Hordeum vulgare ssp. *vulgare* ist eine der ältesten Kulturpflanzen und gehört zu der Familie der *Poaceae*. Gerste wurde vor etwa 10 000 Jahren im sogenannten „Fruchtbaren Halbmond“ aus der Wildform *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* domestiziert. Neuere Arbeiten gehen allerdings davon aus, dass es mehr als ein Domestikationsereignis gab (Orabi *et al.*, 2007). Derzeit liegt Gerste auf Platz vier der wichtigsten Getreidesorten, nach Mais, Reis und Weizen. Da Gerste relativ schnell reif wird und sehr anpassungsfähig ist, eignet sie sich hervorragend für die weltweite landwirtschaftliche Nutzung (zusammengefasst in Schulte *et al.*, 2009). Wintergerste wird oft als Tierfutter verwendet, während Sommergerste meist als Braugerste eingesetzt wird. Da Gerste unter Laborbedingungen einfach zu handhaben ist und durch das „International Barley Genome Sequencing Consortium“ (IBSC; <http://barleygenome.org>) bereits Informationen über das Genom zur Verfügung stehen, eignet sie sich gut als Modellpflanze für Monokotyledone. Die in dieser Arbeit verwendete Sorte Barke (siehe Abbildung 1.11) ist eine zweizeilige Sommerbraugerste mit guter Mehлтаuresistenz, die aber mittlerweile in der Landwirtschaft von neueren Sorten verdrängt wurde. Um die Ergebnisse dieser Arbeit mit früheren besser vergleichbar zu machen, wurde dennoch auf diese Sorte zurück gegriffen.



Abbildung 1.11 – *Hordeum vulgare* cv. Barke ca. sechs Tage nach Aussaat in Einheitserde im Gewächshaus. Foto: Maximilian Krönauer, HMGU

1.5 Zielstellung der Arbeit

Pflanzen sind in der Lage einer Vielzahl bakterieller Signale wahrzunehmen und spezifisch zu reagieren. Auch AHLs werden von Pflanzen erkannt. Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden Gerstenpflanzen mit verschiedenen AHLs in einer biologisch relevanten Konzentration inokuliert. Folgende Fragestellungen wurden dabei behandelt:

- Es ist bekannt, dass AHLs in Pflanzen aufgenommen und systemisch transportiert werden können (Götz *et al.*, 2007; von Rad *et al.*, 2008). Da bisherige Transportstudien von AHLs zu relativ späten Zeitpunkten gemacht wurden, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie der frühzeitige Transport in die Pflanze erfolgt. Durch gezielte Inhibierung in der Wurzel, sollte außerdem geklärt werden, ob die AHL-Aufnahme und der Transport ein aktiver Prozess der Pflanze ist.
- Durch die Analyse typischer Stressindikatoren wie GSTs sollte quantifiziert werden, wann erste Reaktionen in der Wurzel und den Blättern nach AHL-Behandlung stattfinden. Außerdem sollte untersucht werden, ob es bestimmte Enzymaktivitäten gibt, die speziell auf AHLs reagieren (*in vitro* und *in planta*). Des Weiteren wurde untersucht inwiefern sich die Reaktionen der Pflanze mit der Dauer der AHL-Behandlung verändern.
- In der Arbeit sollte geklärt werden, ob die Veränderungen, die in den Blättern der Pflanze stattfinden direkt auf die AHLs zurück zu führen sind, oder ob eventuell weitere sekundäre Signale eine Rolle spielen.
- Des Weiteren wurde untersucht, ob die Veränderungen, die nach Applikation mit synthetischen AHLs in der Pflanze induziert wurden, gleich denen sind, die nach Inokulation AHL-produzierender Bakterien auftreten. Außerdem wurde das Kolonisierungsverhalten von AHL-produzierenden und nicht AHL-produzierenden *S. liquefaciens* Stämmen in der Rhizosphäre von Gerstenpflanzen begutachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Nährlösungen wurden mit entsalztem, gefiltertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q PLUS, Millipore GmbH, Schwalbach bzw. SG Ultra Clear direct UV-Plus, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel) hergestellt (im Folgenden dH₂O). Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a. Qualität von den jeweiligen Firmen bezogen. Der pH Wert der eingesetzten Medien und Puffer wurde mittels eines pH Meters (pH 211, Hanna Instruments, Kehl am Rein bzw. inolab pH Level 2, WTW GmbH & Co. KG, Weilheim) mit Temperaturreferenzelektrode überprüft und eingestellt. Zum Sterilisieren der Geräte und Lösungen wurde, wenn nicht anders vermerkt, ein Wasserdampfhochdruckautoklav (Systec D65 / V65 / 50, Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg) bei 121°C und einem Überdruck von 1,013 x 10⁵ Pa für 20 min benutzt.

2.1.1 Verwendete Medien

MS (Murashige&Skoog)-Medium 4,3 g/l [pH 7,2]
(Duchefa Biochemie BV, Haarlem, Niederlande)

Tabelle 2.1 – Auflistung der genauen Zusammensetzung des MS-Mediums aufgeteilt in Makro- und Mikroelemente

Makroelemente	[mM]	Mikroelemente	[μM]
CaCl ₂	2,99	CoCl ₂ · 6*H ₂ O	0,11
KH ₂ PO ₄	1,25	CuSO ₄ · 5*H ₂ O	0,1
KNO ₃	18,79	FeNaEDTA	100
MgSO ₄	1,5	H ₃ BO ₃	100,27
NH ₄ NO ₃	20,61	KI	5
		MnSO ₄ · H ₂ O	100
		Na ₂ MoO ₄ · 2*H ₂ O	1,03
		ZnSO ₄ · 7*H ₂ O	29,91

NB (Nährbouillon Nr. 4)-Medium 8 g/l [pH 7]
(Fluka, Steinheim)

Pepton 5 g/l
Fleischextrakt 3 g/l

LB (Luria-Bertani)-Medium 25 g/l [pH 7]
(LabM, Lancashire, UK)

Trypton 10 g/l
Hefeextrakt 5 g/l
NaCl 10 g/l

Zum Verfestigen der Medien wurde 15 g/l Agar-Agar vor dem Autoklaviervorgang zugegeben. Bei der Arbeit mit bakteriellen AHL-Sensorstämmen wurden zusätzlich Antibiotika im Medium verwendet. Aufgrund ihrer Hitzlabilität wurden die entsprechenden Stammlösungen 1000 fach konzentriert mit dH₂O angesetzt, steril filtriert (Sterilfilter 0,22 µm Porengröße, Millipore GmbH, Schwalbach) und dem Flüssigmedium erst nach vollständigem Erkalten, den Festmedien nach Abkühlen auf ca. 45°C in der entsprechenden Endkonzentration hinzu gegeben. Medien mit Antibiotika wurden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt und bis maximal 3 Wochen nach Antibiotikazugabe verwendet.

Einheitserde ED73 Topferde [pH 7,8]
(Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH & Co. KG, Sinntal-Jossa)

N: 250 mg/l
P₂O₅: 300 mg/l
K₂O: 400 mg/l
KCl: 3 g/l

2.1.2 Verwendete Mikroorganismen

Alle verwendeten Mikroorganismen wuchsen auf LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 30°C in einem Innova 4200 Inkubator (New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA). Flüssigkulturen wurden zusätzlich bei 170 rpm geschüttelt. Bei beiden *Serratia liquefaciens* Stämmen wurden 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Tetracyclin (alle von Sigma-Aldrich, Steinkirchen) dem Medium zugegeben, bei *Pseudomonas putida* F117 dagegen 50 µg/ml Kanamycin und 20 µg/ml Gentamycin.

Tabelle 2.2 – Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme mit zusätzlichen Anmerkungen.

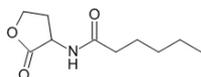
Spezies/Isolat	Anmerkung	Referenz
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	chromosomale <i>gfp</i> Markierung	Eberl <i>et al.</i> (1996)
<i>Serratia liquefaciens</i> MG44	AHL-negative Mutante von MG1 mit <i>gfp</i> Sensorkonstrukt	Eberl <i>et al.</i> (1996)
<i>Pseudomonas putida</i> F117	AHL-negative Mutante von IsoF mit <i>gfp</i> Sensorkonstrukt	Steidle <i>et al.</i> (2001)

2.1.3 Verwendete AHLs

Die AHLs wurden nach Erhalt mit EtOH_{abs} in einer Konzentration von 0,1 M gelöst und zu je 35 µl in Eppendorf Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) aliquotiert. Der Alkohol wurde anschließend bei Raumtemperatur in einem Vakuumkonzentrator (Univapo 100 ECH, Montreal Biotech Inc., Dorval, PQ, Kanada) ca. 15 min vollständig evaporiert. Die Reaktionsgefäße wurden dicht mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) verschlossen und bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur gelagert. Für Behandlungen mit AHLs wurde je ein Aliquot mit 35 µl EtOH_{abs} frisch gelöst und entsprechend der Endkonzentration von 10 µM dem Medium zugegeben. Es wurden nur AHL Stammlösungen verwendet, die sich nicht länger als fünf Tage im gelösten Zustand befanden.

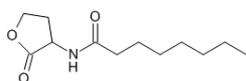
N-Hexanoyl-DL-Homoserinlacton (C6-HSL)

(>97.0% HPLC) [09926 Fluka, Steinheim]



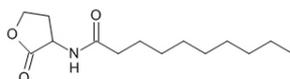
N-Octanoyl-DL-Homoserinlacton (C8-HSL)

(>97.0% HPLC) [10940 Sigma-Aldrich, Steinheim]



N-Decanoyl-DL-Homoserinlacton (C10-HSL)

(>97.0% HPLC) [17248 Sigma-Aldrich, Steinheim]



2.2 Methoden

2.2.1 Oberflächensterilisierung von Gerstesamen

Die Oberflächensterilisierung wurde nach dem Protokoll von Rothballe (2003) unter einer Sterilbank (BDK, Luft- und Raumfahrttechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen) durchgeführt. Zuvor dunkel und trocken gelagerte Samen von *Hordeum vulgare* L. cv. Barke wurden dazu in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen (BD-Biosciences, Heidelberg) überführt und 2 min lang in einer 1 % igen Tween 80 Lösung (Fluka, Steinkirchen) inkubiert. Diese wurde dann durch 70 % igen Ethanol ersetzt und die Samen wiederum 5 min inkubiert. Nach 3 maligem Waschen mit sterilem dH₂O wurde zu den Samen eine 8-12 % ige (aktives Chlor) Natriumhypochloridlösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gegeben und nach 20 min erneut gewaschen. Um die Oberfläche der Gerstenkörner besser zugänglich zu machen, wurden die Samen 4 h lang in sterilem dH₂O vorgequollen. Danach fand nochmals eine 10 minütige Behandlung mit Natriumhypochlorid statt. Nach 5-6 maligem Waschen wurden je 10 Samen auf NB-Agarplatten verteilt und bei Raumtemperatur im Dunkeln vorgekeimt. Nach 3 Tagen hatten die Keimlinge eine für die Umsetzung ins Versuchssystem optimale Wurzellänge erreicht (siehe Abbildung 2.1).



Abbildung 2.1 – Gerstenkeimlinge auf einer NB-Agarplatte 3 Tage nach Oberflächensterilisierung

Diese Art der Oberflächensterilisierung war insbesondere gegen Pilze nicht sehr erfolgreich. Samen aus dem Jahr 2006 waren nach der Sterilisierung noch zu 70-80 % mit Pilzen kontaminiert. Ein anderes Sterilisierungsprotokoll unter der Verwendung von Antibiotika (Bürün and Çoban Poyrazouglu, 2002) führte zwar zu keimfreien Samen, konnte aber nicht

verwendet werden, da Antibiotika (besonders Cycloheximid) die GST-Aktivität beeinflussen (Schröder and Stampfl, 1999). Die Saatzucht Josef Breun stellte daraufhin Samen aus dem Jahr 2003, welches besonders heiß und trocken war, zur Verfügung. Bei diesen Samen lag die Kontamination durch Pilze und Bakterien nach der oben beschriebenen Oberflächensterilisierung unter einem Prozent. Die Keimungsrate nach Oberflächensterilisierung betrug im Jahr 2008 ca. 80% und verschlechterte sich bis 2011 auf ca. 40%. Um zu testen, ob oberflächensterilisierte Keimlinge, die keinerlei Anzeichen von Kontamination auf der Agarplatte aufwiesen, tatsächlich axenisch waren, wurden diese in NB-Flüssigmedium getaucht und über Nacht schüttelnd bei 30°C inkubiert. Dabei zeigte sich auch später keine Trübung des Mediums. Die Keimlinge wurden deshalb gemäß Rothballer (2003) als axenisch und somit endophytenfrei betrachtet und unter diesen Bedingungen in allen Experimenten verwendet.

2.2.2 Aufbau des Anzuchtssystems und Inokulation der Pflanzen

Die Pflanzen wurden in einem axenischen System nach Götz (2008) bestehend aus je 2 Duran-Reagenzgläsern (Schott, Mainz) mit einem Öffnungsdurchmesser von 30 mm angezogen. Die unteren Reagenzgläser, welche eine zusätzliche seitliche Öffnung besitzen, wurden mit 50 g Glasperlen (\varnothing 1,7-2 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) befüllt und die Seitenöffnung mit einer umstülpbaren Silikonkappe (\varnothing 10 mm, Neolab, Heidelberg) versehen. Alle Gläser wurden mit Alukappen verschlossen und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Zu den mit Glasperlen befüllten Reagenzgläsern wurde später 10 ml steril filtriertes MS-Medium gegeben. Keimlinge, die auf den NB-Agarplatten keine sichtbaren Kontaminationen aufwiesen, wurden unter sterilen Bedingungen ca. 1 cm unter die Glasperlenschicht gebracht. Die Reagenzgläser wurden dann aufeinander gesteckt und mit Parafilm verschlossen (siehe Abbildung 2.2). Die Pflanzen wurden für insgesamt 17 Tage in einer Heraeus-Vötsch Klimakammer (Vötsch Industrietechnik GmbH-Umweltsimulation, Balingen-Frommern) mit einem Tag-Nacht Rhythmus von 14 / 10 h bei 16°C am Tag und 12°C in der Nacht untergebracht. Dabei wurde auf eine zufällige Verteilung aller Pflanzen in den Reagenzglasständen geachtet. Die Luftfeuchtigkeit in der Kammer ist aufgrund des geschlossenen Anzuchtssystems zu vernachlässigen. Die photosynthetisch wirksame Strahlung (PAR) gemessen an der Unterkante der Anzuchtgefäße (ca. 1 m Abstand zur Deckenlampe) betrug 34,78 W/m², UV-A und UV-B Strahlung 66,6 W/m² bzw. 3,49 W/m², wobei lediglich ca. 66 % der PAR und 33 % bzw. 71 % der UV-A bzw. UV-B Strahlung das Duranglas durchdringen können (Götz, 2008). Das Anzuchtssystem mit Glasperlen wurde gewählt, da diese im Unterschied zur Hydrokultur den Pflanzen die Möglichkeit der Verankerung im „Boden“ geben, die Experimente aber gleichzeitig unter streng definierten Bedingungen durchgeführt werden konnten. So sind beispielsweise die abiotischen Abbauprozesse der einzelnen

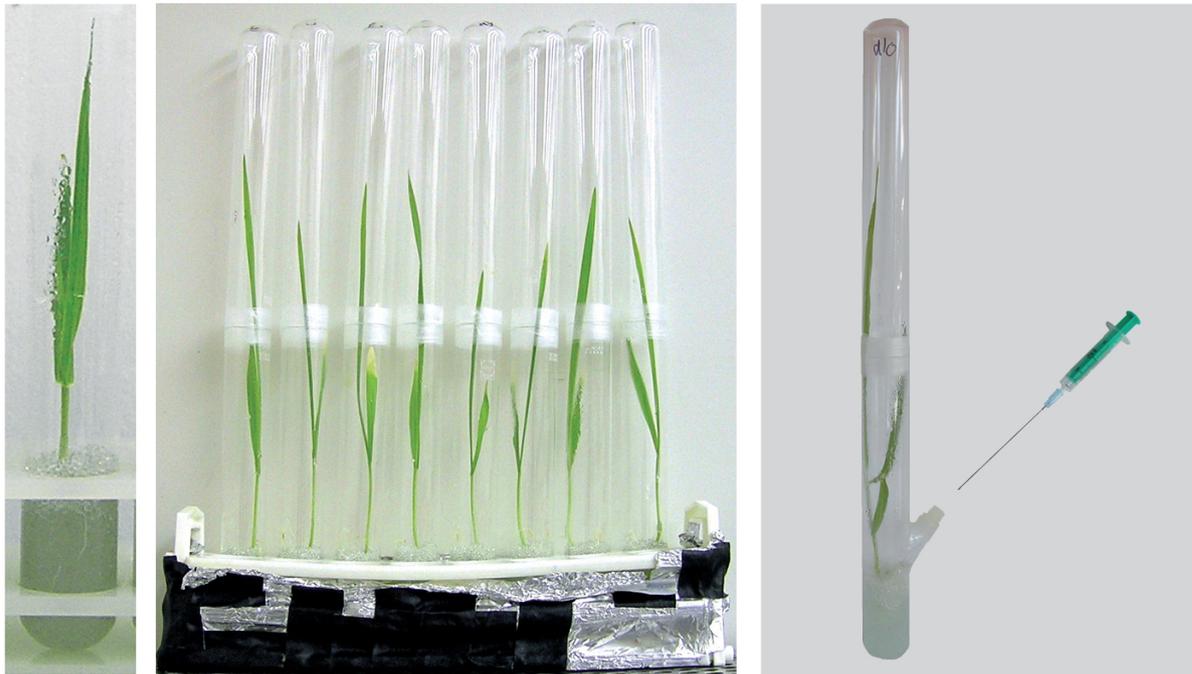


Abbildung 2.2 – Anzucht der Gerstenpflanzen im Reagenzglassystem. Links erkennt man das Wachstum der Wurzeln im Glasperlensubstrat, in der Bildmitte die Anordnung im Reagenzglasständer und rechts die schematische Darstellung der Inokulation mit AHLs mittels einer sterilen Kanüle durch das Silikonseptum.

AHLs innerhalb dieses Systems bereits bestens bekannt Götz (2008). Die Pflanzen wurden während der Experimente unterschiedlich lang mit AHLs behandelt, jedoch alle gleichzeitig am Tag 17 nach dem Umsetzen geerntet, um zu gewährleisten, dass alle Pflanzen bei der Ernte im gleichen Entwicklungszustand waren. Deshalb wurden die Pflanzen, die nicht von Anfang an mit AHLs in Kontakt waren, zunächst wie Kontrollpflanzen behandelt. Für eine Behandlung vom Tag des Einsetzens in das Reagenzglas-System bis zum Tag 17 wurden die jeweiligen AHLs in einer Endkonzentration von $10\ \mu\text{M}$ direkt im MS-Medium gelöst. Die Ethanolkonzentration im Medium wurde sowohl bei den mit AHL behandelten, sowie bei den Kontrollpflanzen auf 0,1 % eingestellt, um durch das Lösungsmittel hervorgerufene Effekte auszuschließen. Die Sterilfiltration des MS-Mediums erfolgte erst nach Zugabe der entsprechenden Menge Ethanol bzw. AHL durch Vakuumfiltration mit sterilen Membranfiltern mit einer Porengröße von $0,22\ \mu\text{m}$ (Express PLUS, Millipore, Schwalbach). Ein Teil des MS-Mediums wurde ohne Zugabe von Ethanol steril aufbewahrt. Für die Behandlung mit AHLs zu einem späteren Zeitpunkt wurde mit dem zurückgehaltenen Teil des MS-Mediums eine $100\ \mu\text{M}$ AHL-Lösung hergestellt. Durch das Silikonseptum wurde unter sterilen Bedingungen mit einer 8 cm langen Kanüle 1 ml des MS-Mediums im Reagenzglas vorsichtig entnommen und durch 1 ml der $100\ \mu\text{M}$ AHL-Lösung ersetzt.

Dabei wurde darauf geachtet, dass die Wurzeln der Gerstenpflanze nicht verletzt wurden und dass sich die AHL-Lösung möglichst gleichmäßig im Reagenzglas verteilte, sodass sich eine Endkonzentration von 10 μM und 0,1 % Ethanol ergab.

Neben der Behandlung mit AHLs an der Wurzel wurden auch Pflanzen direkt am abgeschnittenen Halm mit AHLs inkubiert. Dafür wurden Gerstenpflanzen 14 Tage im Gewächshaus auf Einheitserde angezogen und direkt über der Erde abgeschnitten. Jeweils 5 Pflanzen wurden zusammen in ein Duran-Reagenzglas ($\text{\O} 30 \text{ mm}$) gestellt. In jedem Reagenzglas befanden sich 5 ml MS-Medium mit 10 μM C6- bzw. C8-HSL (siehe Abbildung 2.3). Zusätzlich dazu wurden auch Versuche mit anderen möglichen Signalsubstanzen gemacht. Dafür wurden die Pflanzen anstelle von AHLs mit jeweils 10 μM Salizylsäure (SA), Methylsalizylat (mSA), Jasmonsäure (JA), Methyljasmonat (mJA), 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) und H_2O_2 inkubiert. Da pH-Wertveränderungen im Xylemstrom eine Möglichkeit der Signalweiterleitung von der Wurzel in die Blätter sind (Jackson *et al.*, 2003), wurden zusätzlich auch Pflanzen mit verändertem pH-Wert im Medium behandelt. Das MS-Medium der Kontrollpflanzen, welches auch bei der Zugabe der verschiedenen Substanzen verwendet wurde, hatte einen pH Wert von 6. Für die Behandlung mit veränderten pH-Werten wurde dieses a) angesäuert auf pH 3 und b) auf pH 9,8 eingestellt. Die Ethanolkonzentration betrug bei allen Behandlungen inklusive den Kontrollen 0,1 %. Alle Pflanzen wurden nach 4 h bei Raumtemperatur geerntet und die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.



Abbildung 2.3 – Inkubation von Gerstenhalmen mit AHLs und anderen Signalsubstanzen. Auf Einheitserde angezogene Pflanzen wurden dicht über dem Boden abgeschnitten (Bildmitte) und je 5 Pflanzen mit 5 ml MS-Medium in Reagenzgläsern zusammen (im Detail links) in einem Reagenzglasständer (rechts) inkubiert. Fotos: Maximilian Krönauer, HMGU

2.2.3 Flüssigkeitsszintillation

Tritium markiertes [^3H] C8-HSL und [^3H] C10-HSL wurde von Frau Dr. Fuksova (Institut für Nuklearmedizin, Medizinische Fakultät, Karlsuniversität Prag) synthetisiert und die radiochemische Reinheit bestimmt (bei beiden Substanzen >98%). Die Gesamtradioaktivität lag bei 8,9 mCi für [^3H] C8-HSL und bei 7,3 mCi für [^3H] C10-HSL; die molekulare Radioaktivität bei 30 Ci/mmol bzw. 26 Ci/mmol. Bei der Applikation wurde nicht-radioaktives C8- bzw. C10-HSL mit tritiiertem HSL gemischt, sodass sich eine Endkonzentration bei Applikation an der Pflanze von 10 μM und 100 μCi ergab (Götz *et al.*, 2007). Die Gerstenpflanzen wuchsen nach Oberflächensterilisierung 14 Tage im sterilen Reagenzglassystem. Die tritiierten AHLs wurden wie oben beschrieben mittels einer sterilen Kanüle appliziert und die Pflanzen wurden 1 h, 2,5 h, 4 h und 16 h nach AHL-Zugabe geerntet. Dabei wurde jede Pflanze in 4 Teile geschnitten: Neben der Wurzel wurde der grüne Teil der Pflanze nochmals in 3 Abschnitte geteilt. Der unterste Teil, im folgenden Halm genannt, bestand fast ausschließlich aus dem Halm, die beiden anderen Teile aus den Blättern. Halm und Blatt 1 waren exakt 5 cm lang, Blatt 2 variierte in seiner Länge (siehe Abbildung 2.4). Alle Teile wurde frisch gewogen und bis zur Extraktion bei -20°C eingefroren. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff gemörsert und zusammen mit 2 ml 25 % igem Acetonitril für 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Danach wurde 10 min lang bei 2000 x g zentrifugiert und 1 ml des Überstandes in ein neues Gefäß überführt. Der Rest des Überstandes wurde verworfen, ohne dabei das Pellet zu zerstören. Dann wurde abermals 2 ml 25 % iges Acetonitril zum Pellet hinzu gegeben. Nach 15 min im Ultraschallbad wurde erneut zentrifugiert und 1 ml des Überstandes mit dem zuvor entnommenen vereinigt. Von diesem Extrakt wurden 0,5 ml mit 5 ml Szintillationscocktail (Rotiszint eco plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) vereint und die Radioaktivität für 5 min in einem Szintillationszähler (LS 6500, Beckman, USA) bestimmt, wobei jede Probe in 2 technischen Replikaten gemessen wurde.

2.2.4 Autoradiographie

Je eine 14 Tage alte Pflanze wurde vorsichtig am Halm in einer Halterung befestigt ohne die Pflanze dabei zu verletzen. Die Wurzeln wurden auf einer Glaspetrischale ausgebreitet, sodass allein die Wurzelspitze das Glas berührte und zu jeder Wurzelspitze wurden 20 μl einer 10 μM und 10 μCi [^3H] C8- bzw. [^3H] C10-HSL Lösung pipettiert (siehe Abbildung 2.4). Die Wurzeln wurden nach 15, 30 und 60 min geerntet, dabei erst mit 25 % igem Acetonitril gespült, um lose anhaftendes AHL zu entfernen, mit einem Tuch vorsichtig abgetrocknet und anschließend sofort auf einen Tritium sensitiven Film gelegt. Dieser wurde bei -20°C inkubiert und nach 27 h mit einem Fujifilm BAS-5000 Scanner bei einer eingestellten Sensitivität von 1000 und einer Pixelgröße von 50 eingelesen. Um den AHL-Transport innerhalb der Wurzel zu lokalisieren, wurden Wurzelquerschnitte auf dem Tritium sensitiven

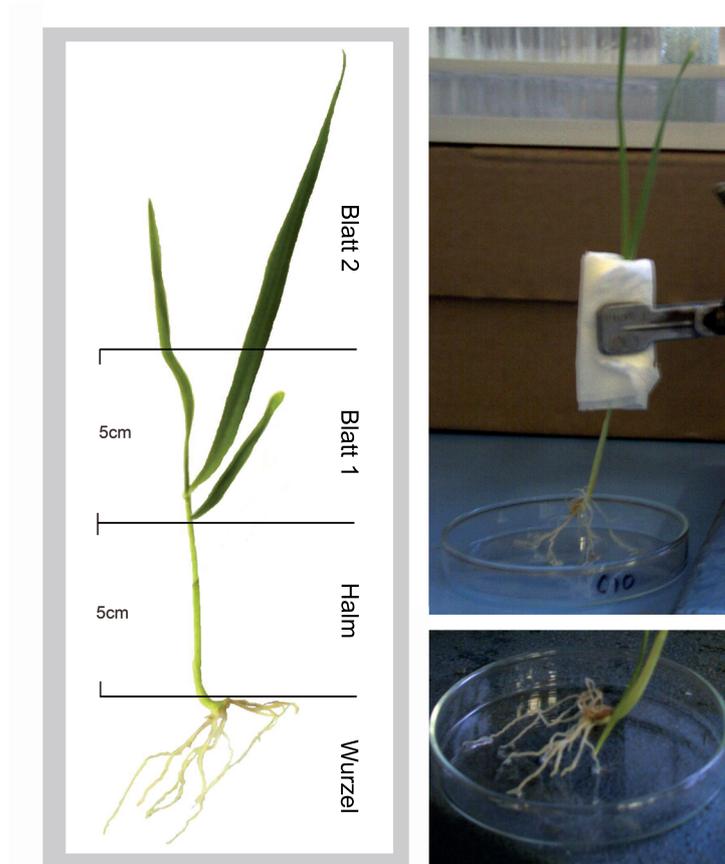


Abbildung 2.4 – Links: Schematische Darstellung der Teilung der Gerstenpflanze für die Flüssigkeitsszintillation. Jede Pflanze wurde nach der Ernte in 4 Teile geteilt: Wurzel, Halm und Blatt 1-2. Rechts: Versuchsaufbau zur Autoradiographie von Gerstenwurzeln. Die Wurzeln wurden auf einer Glaspetrischale ausgebreitet, sodass lediglich die Wurzelspitzen die Glasoberfläche berührten.

Film inkubiert. Anstelle von Gerste wurde hierfür ein Maiskeimling (*Zea mays* L.) mit einer ca. 4 cm langen Hauptwurzel mit [^3H] C8- bzw. [^3H] C10-HSL behandelt, weil die Wurzeln von Gerstenpflanzen zu filigran waren, um qualitativ hochwertige Querschnitte herzustellen. Zu der Wurzelspitze wurden je 40 μl [^3H] C8- bzw. [^3H] C10-HSL mit einer Konzentration von 10 μM und 20 μCi gegeben und nach 1 h direkt auf Trockeneis eingefroren. Es wurden Querschnitte von 3 verschiedenen Wurzelabschnitten gemacht: direkt hinter der Wurzelspitze, vom mittleren Teil der Wurzel und von der Wurzelbasis. Dazu wurden die Wurzelstücke in Cryo-Gel (Instrumedics, Inc, Richmond, IL, USA) auf einer Metallscheibe eingebettet und im Cryotom (Mikrom HM 560, Mikrom, Walldorf) in einem Winkel von 5° in 30 μm dicke Scheiben geschnitten. Die Arbeitstemperatur im Cryotom war dabei auf -19°C eingestellt, die der Probe auf -21°C . Dies stellte sicher, dass sich die Proben während der gesamten Zeit im gefrorenen Zustand befanden. Die Schnitte wurden auf vorgekühlte

Deckgläschen aufgebracht und bis zur Applikation auf den Film auf Trockeneis gelagert. Die Deckgläschen wurden mit der Wurzelseite nach unten auf den Film gelegt, welcher 65h bei -20°C inkubiert und anschließend mit dem Fujifilm BAS-5000 Scanner ausgelesen wurde (eingestellte Sensitivität: 30000, Pixelgröße: 25).

2.2.5 AHL-Wurzeltransport (Pitman-Kammer)

Um den Transport durch die Wurzel gezielt verfolgen zu können, wurden die Wurzeln von 5-7 Tage alten, oberflächensterilisierten Gerstenwurzeln, die auf NB-Agarplatten wuchsen, in eine Pitman-Kammer (Pitman, 1971) eingespannt. Diese besteht aus Acrylglas und kann mit Hilfe von variabel einsetzbaren Balken in unterschiedlich große Kompartimente unterteilt werden. Einige dieser Balken sind ihrerseits nochmals horizontal geteilt und besitzen 7 gleichmäßig verteilte, halbmondförmige Gruben, in welche die Wurzeln eingelegt werden können. Die Pitman-Kammer wurde für dieses Experiment in 3 Kompartimente geteilt: Im ersten Kompartiment befanden sich die Wurzelspitzen, im dritten die abgeschnittenen Wurzelbasen, das zweite diente als „Puffer“ gegen evt. Diffusion vom ersten ins dritte Kompartiment. Die eingespannten Gerstenwurzeln waren alle ca. 3,5 cm lang. $[^3\text{H}]$ C8- bzw. $[^3\text{H}]$ C10-HSL wurde in einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ und $100\ \mu\text{Ci}$ zum ersten Kompartiment gegeben, die Proben wurden nach 2 h, 4 h, 8 h und 24 h aus dem dritten entnommen, wo ein Magnetrührer für eine gleichmäßige Verteilung der AHLs sorgte. Zum Abdichten der einzelnen Kompartimente wurde Vaseline benutzt, die mittels einer Kanüle entlang aller Balken und zwischen die Wurzeln appliziert wurde. Überstehende Vaseline wurde sorgfältig entfernt. Die Kammer war während des gesamten Versuchs dicht mit Parafilm abgedeckt, um Verdunstung zu vermeiden (siehe Abbildung 2.5). Der Transport von $[^3\text{H}]$ C8-HSL durch die Wurzel wurde durch die Zugabe von KCl gehemmt. Dafür wurde nach 4 h KCl in einer Endkonzentration von $110\ \text{mM}$ zum zweiten Kompartiment gegeben. Die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ C8-HSL wurde durch die Zugabe von Orthovanadat gehemmt. Natrium-Orthovanadat wurde nach 4 h dem ersten Kompartiment in einer Endkonzentration von $1\ \text{mM}$ hinzu gefügt. Vorher wurde eine $0,2\ \text{M}$ Stammlösung von Natrium-Orthovanadat hergestellt. Nach dem einstellen des pH-Wertes auf pH 10 verfärbte sich die Lösung gelb und wurde aufgeköcht, bis sie wieder farblos wurde. Danach wurde der pH-Wert erneut auf pH 10 eingestellt und die Prozedur so lange wiederholt, bis die Lösung nach der pH-Wert Einstellung farblos blieb. Die Stammlösung wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

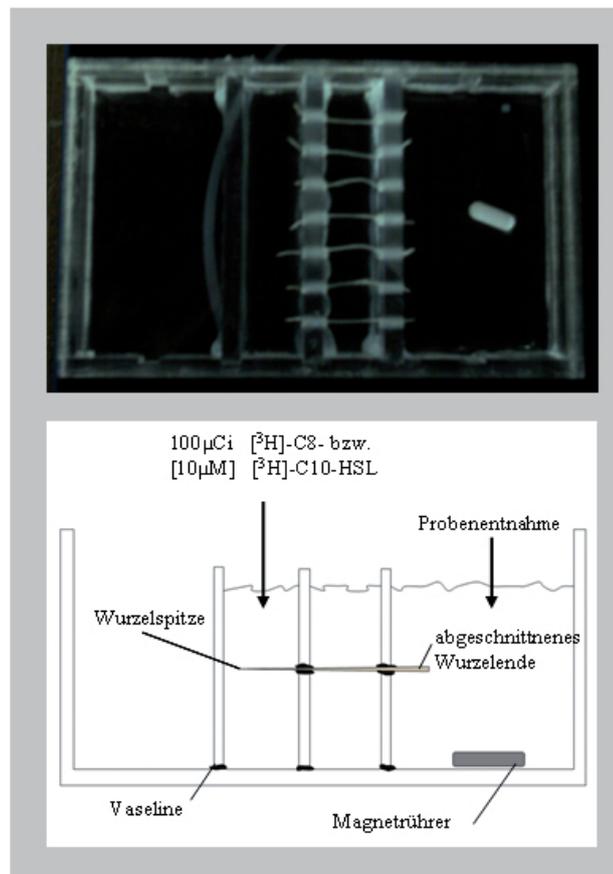


Abbildung 2.5 – Aufbau der Pitman-Kammer für den AHL-Transportversuch durch die Wurzel. Oben: Foto der fertig zusammen gebauten Pitman-Kammer direkt vor dem Versuch. Unten: Schematische Darstellung des Aufbaus.

2.2.6 Extraktion von Apoplastensaft

Um nachzuweisen, dass tatsächlich nicht metabolisierte AHLs durch den Zentralzylinder der Pflanze transportiert werden, wurden Versuche mit AHL-Sensorstämmen und monoklonalen Antikörpern gemacht und dafür Apoplastensaft aus dem Halm von Gerstenpflanzen modifiziert nach Djordjevic *et al.* (2007) extrahiert. Gerstensamen wurden wie unter 2.2.1 beschrieben oberflächensterilisiert und auf NB-Agarplatten verteilt. Visuell nicht kontaminierte Keimlinge wurden drei Tage später in ein steriles Bechersystem überführt. Dieses bestand aus je zwei 500 ml großen Duran-Bechergläsern, wobei das untere eine 3 cm dicke Schicht Glasperlen enthielt. Nach dem Autoklavieren wurden 30 ml steril filtriertes MS-Medium zugegeben und 10 Keimlinge unter sterilen Bedingungen ca. 1 cm tief in die Glasperlen gesetzt. Nachdem der obere Becher aufgesetzt war, wurde das System mit Parafilm verschlossen. Nach 8 Tagen wurde das System geöffnet und zum MS-Medium wurde mittels einer Kanüle C8- bzw. C10-HSL in einer Endkonzentration von

10 μM gegeben; die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge Ethanol (0,01%). Die Gefäße mit den Pflanzen blieben geöffnet für 4 h stehen, um den AHL-Transport durch den Transpirationssog zu erhöhen. Danach wurden die Halm geerntet, in ca. 1 cm lange Stücke geteilt, in eiskalten Puffer (20 mM CaCl_2 , 20 mM Ascorbat (beides Sigma-Aldrich, Steinheim)) gelegt und 1 h in einem Exsikkator auf Eis vakuuminfiltriert. Nach langsamen Entlassen des Vakuums wurden die Halme vorsichtig zwischen Tüchern getrocknet und in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses hatte im Boden ein durch eine glühende Nadel appliziertes Loch und wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt. Nach 30 min Zentrifugieren bei 1500 x g und 4°C (Eppendorf Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) wurde der sich nun im 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelte Apoplastensaft in ein 1,5 ml Glasgefäß mit Gewinde (Neolab, Heidelberg) pipettiert und bis zur weiteren Verwendung dicht verschlossen bei -20°C aufbewahrt. Aus 10 Pflanzen konnte auf diese Weise ca. 200 - 250 μl Apoplastensaft gewonnen werden. Für die Etablierung eines ELISA-Tests für C10-HSL mit Apoplastensaft wurden jedoch größere Mengen benötigt. Deshalb wurden zusätzlich Gerstenpflanzen im Gewächshaus auf Einheitserde angezogen, nach 10 - 14 Tagen geerntet und der Apoplastensaft wie eben beschrieben extrahiert. Neben der Inkubation mit synthetischen AHLs wurden die Gerstenpflanzen auch mit dem AHL-produzierenden Bakterienstamm *Serratia liquefaciens* MG1 inokuliert. Eine Übernachtskultur wurde 1:8 mit Medium verdünnt. Nach 5 h Wachstum wurde die Kultur 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert, 2 mal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend auf eine Verdünnung von 10^8 Zellen/ml eingestellt ($\text{OD}_{[436\text{nm}]} = 0,2 = 10^8$ Zellen/ml). Je 5 ml dieser Verdünnung wurden in eine sterile Petrischale mit 10 Gerstenkeimlingen (3 Tage alt, oberflächensterilisiert) getan. Nach 1 h Inkubation wurden je 10 Keimlinge in ein steriles Becherglas mit Glasperlen und MS-Medium überführt. Der Apoplastensaft wurde 4, 7, und 11 Tage nach dem Umsetzen in das System geerntet. Dafür wurden die Bechergläser unter der Sterilbank geöffnet und verblieben dort für 2 h. Die Extraktion des Apoplastensaftes erfolgte wie oben beschrieben. Zusätzlich wurden auch die Wurzeln mit anhaftenden Glasperlen geerntet. Um zu überprüfen ob die Bakterien AHLs in der Rhizosphäre produzierten, wurden die Wurzeln mit EtOH_{abs} gespült und dieser in Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt und komplett evaporiert. Die Reaktionsgefäße wurden dann mit kleinen Mengen dH_2O gespült und der Extrakt wieder vereinigt. Die Wurzeln selbst wurden mit Flüssigstickstoff gemörsert und eventuell anhaftende AHLs mit 25 % Acetonitril wie unter 2.2.3 beschrieben extrahiert. Auch hier wurde der Extrakt erst eingedampft und wieder mit dH_2O resuspendiert, weil verbleibende Lösungsmittel die AHL-Detektion mit dem AHL-Sensorstamm *Serratia liquefaciens* MG44 gestört hätten.

2.2.7 AHL-Detektion mit Sensorstämmen

C8-HSL wurde im Apoplastensaft mittels des AHL-Sensorstammes *Serratia liquefaciens* MG44 nachgewiesen. Dieser ist eine Mutante des MG1 Wildtypstamms und selbst nicht in der Lage AHL zu produzieren, besitzt aber ein AHL-sensitives *gfp*-Konstrukt auf einem Plasmid (pBAH9). Es wurden Übernachtskulturen in Falcon-Röhrchen direkt von einer Glycerinkultur gemacht. Diese wurde am nächsten Morgen mit Medium 1:4 verdünnt und wuchs für weitere 2,5 h. Bei jedem Versuch wurde zusätzlich eine Standardkurve mit C8-HSL in einer Endkonzentration von 5 μ M - 0,01 μ M angesetzt. Die Apoplastensaftproben wurden mittels eines Zentrifugenfiltersystems (Mini) mit einer Porengröße von 0,2 μ m (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bei 7400 x g (Eppendorf Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) für 10 min steril filtriert. Der Versuchsaufbau bestand aus sterilen Duran-Reagenzgläsern (\varnothing 1,6 cm, 16 cm hoch, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) die mit Alukappen verschlossen waren. In jedem Reagenzglas befanden sich 1150 μ l Medium, 250 μ l C8-HSL Standard bzw. Apoplastensaftprobe und 100 μ l der 1:4 verdünnten MG44 Kultur. Als Kontrolle wurde in einem Ansatz LB-Medium anstelle des Standards hinzugefügt und die Ansätze wurden für weitere 6 h bei 30°C inkubiert. Danach wurde jeder Ansatz in 4 technischen Replikaten von je 200 μ l auf eine schwarze FluoroNunc Platte gegeben und im Fluorimeter Spectra MAX Gemini EM (Molecular Devices GmbH, Ismaning) bei einer Anregungsenergie von 490 nm und einer Emission von 520 nm gemessen. Es stellte sich heraus, dass sich das Fluoreszenzsignal in Proben, in denen sich AHLs befanden, deutlich erhöhte, wenn die Platte nach 24 stündiger Lagerung bei Raumtemperatur noch einmal gemessen wurde. Deshalb wurden alle Messungen nach 24h wiederholt.

2.2.8 AHL-Detektion mittels ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Die Immunodetektion von AHLs mit monoklonalen Antikörpern (mAb) wurde im sogenannten „Coating-Antigen-Format“ nach Chen *et al.* (2010a) durchgeführt (siehe Abbildung 2.6). Dazu wurden Mikrotiterplatten mit 96-Kavitäten (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) über Nacht mit 100 μ l des „Coating“-Antigens HSL3-OVA^{1/4} in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml in Natriumkarbonatpuffer bei 4°C beschichtet. Die Nunc MaxiSorp-Platte wurde nach jedem Inkubationsschritt in einem automatisierten Mikrotiterplattenwaschgerät (Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall) gespült. Nach der Übernachtsinkubation wurden noch evt. freie Stellen auf der Oberfläche der Platte mit 1 % Milchpulver (Casein-Natrium 88 % Milcheiweiß, Karl Roth GmbH, Karlsruhe) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Vorher wurde eine C10-HSL-Standardkurve mit Konzentrationen von 50.000 μ g/l - 1 μ g/l in Apoplastensaft angesetzt und die zu untersuchenden Proben vorbereitet. Der Apoplastensaft und die Proben mussten für einen funktionierenden Test 1:5 mit PBS-Puffer verdünnt werden. Da der eingesetzte mAb eine

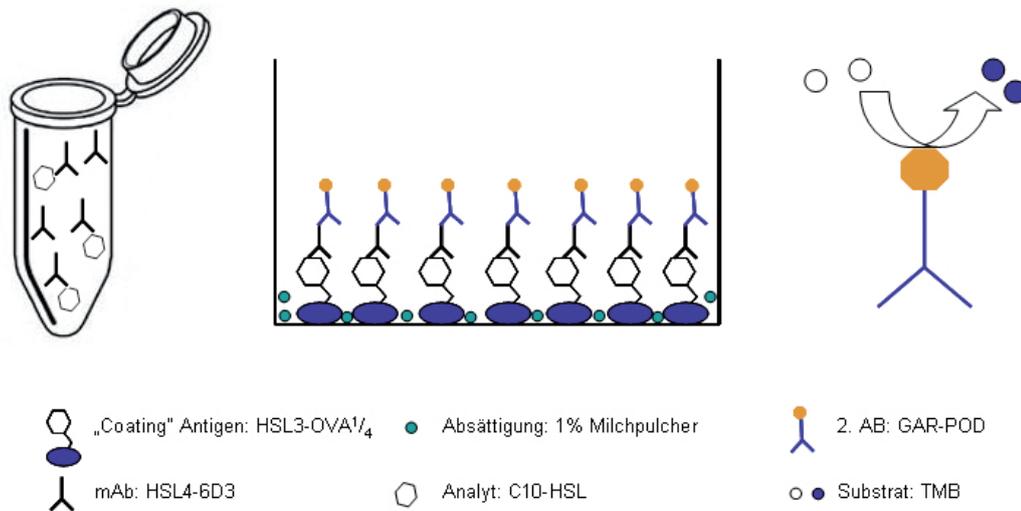


Abbildung 2.6 – Schematische Darstellung der ELISA im „Coating-Antigen-Format“. Links: Verdrängungsreaktion von mAb und C10-HSL. Mitte: Beispielhafte Darstellung einer Kavität auf der Nunc MaxiSorp-Platte nachdem alle Komponenten des Tests gebunden haben. Rechts: Farbreaktion des TMB katalysiert durch die am sekundären Antikörper gebundene Peroxidase.

höhere Sensitivität gegen das korrespondierende Homoserin aufwies, (Chen *et al.*, 2010a) wurden alle Standards und Proben in „protein-low-bind-tubes“ (Eppendorf, Hamburg) mit 10 % (v/v) 1 M NaOH hydrolysiert und nach 15 min Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit 8 % (v/v) 1 M HCl zurück auf pH 7 eingestellt. Dann wurden alle Standards und Proben 10 min bei 8500 xg zentrifugiert um das Kalzium, welches beim Verdünnen des Apoplastensaftes mit PBS-Puffer ausgefallen war, zu präzipitieren. Der Überstand wurde 1:1 (v/v) mit dem mAb HSL4-6D3 (Kulturüberstand 1:2000 verdünnt mit PBS-Puffer) auf einer Greiner-Mikrotiterplatte mit 96 U-förmigen Kavitäten (Greiner Bio-One, Solingen-Wald) auf einem Heidolph Inkubator 1000 (Metrohm, Herisau, Schweiz) bei 170 rpm und Raumtemperatur für 2 h inkubiert. 100 µl des Antikörper-Analyt-Gemischs wurden auf die gewaschene MaxiSorp-Platte transferiert und diese 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der zweite Antikörper („goat-anti-rat“ gekoppelt an eine Meerrettich-Peroxidase, GAR-HRP, Dianova, Hamburg) wurde 1:8000 mit PBS-Puffer verdünnt, 100 µl davon auf die gewaschene MaxiSorp-Platte gegeben und diese erneut 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100 µl des Substrat-Gemischs [0,4 mM 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin (TMB, Sigma-Aldrich, Steinheim), 1,3 mM H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Steinheim) in Natriumacetatpuffer] auf die gewaschene Platte gegeben und 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2 M H₂SO₄ abgestoppt, ohne die

Platte dabei erneut zu waschen und sofort im Spectra Max M5e Photospektrometer (Molecular Devices GmbH, Ismaning) bei 450 nm (Referenz 650 nm) gemessen. Die Auswertung der Daten und Erstellung der Standardkurven erfolgte mit Softmax Pro 4.6.

Verwendete Puffer:

Natriumkarbonatpuffer enthält: 15 mM Na_2CO_3
50 mM pH 9,6 35 mM NaHCO_3

PBS-Puffer enthält: 5 mM NaH_2PO_4
40 mM pH 7,6 35 mM Na_2HPO_4
100 mM NaCl

Waschpuffer enthält: 40 mM PBS-Puffer 1:10 verdünnt
0,05 % Tween 20 (Merck, Darmstadt)

Natriumacetatpuffer enthält: 100 mM $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (wasserfrei)
100 mM pH 5,5 pH-Werteinstellung mit 10 %iger Zitronensäure

Die TMB-Stammlösung wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO, AppliChem, Darmstadt) gelöst und bei Raumtemperatur in Dunkelheit maximal 3 Tage aufbewahrt. Alle für die Puffer verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Fluka (Steinheim) bezogen. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH eingestellt (Ausnahme: Natriumacetatpuffer).

2.2.9 Gewinnung des Protein-Rohextrakts

Nach der Ernte der *Hordeum vulgare* Pflanzen aus dem Reagenzglassystem wurde das Frischgewicht der Wurzeln und der Blätter von jeder einzelnen Pflanze bestimmt und dann die Wurzeln und Blätter von je 3 Pflanzen zu einer Probe und bei -80°C eingefroren. Dies war notwendig, da weniger Pflanzenmaterial – insbesondere bei den Wurzeln – nicht ausreichte, um Proteine in ausreichender Konzentration für die anschließenden photometrischen Tests zu erhalten. Die Proteine wurden abgewandelt nach Menone and Pflugmacher (2005) extrahiert. Die einzelnen Proben wurden zuerst unter flüssigem Stickstoff gemörsert und pro Gramm Pflanzenmaterial wurden 5 ml Extraktionspuffer [0,1 M Natriumphosphatpuffer

pH 6,5, 20 % Glycerin (Karl Roth GmbH, Karlsruhe), 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Karl Roth GmbH, Karlsruhe), 1 % Polyvinylpyrrolidon K90 (PVP, Fluka, Steinheim), 14 mM Dithioerythrit (DTE, Karl Roth GmbH, Karlsruhe)] hinzu gegeben. Der Extraktionspuffer wurde mindestens 24 h vor Gebrauch und ohne DTE angesetzt, da das PVP erst im Puffer vorquellen musste und der Puffer, sobald sich darin auch DTE befand, maximal 3 Tage haltbar war. Das DTE wurde deshalb in der entsprechenden Konzentration frisch am Tag der Proteinextraktion hinzu gegeben. Die Proben wurden dann 10 min auf Eis gerührt, danach durch eine Miracloth Membran (Porengröße 22-25 µm, Calbiochem, Merck, Darmstadt) filtriert und anschließend für 10 min bei 10.000 x g und 4°C in einer Beckman Coulter Zentrifuge vom Typ JA 25 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugengefäß umgefüllt und nochmals eine Stunde lang bei 39.500 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthält den mikrosomalen Anteil der pflanzlichen Proteine und wurde mit 0,5 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 20 % Glycerin und 1,4 mM DTE resuspendiert. Im Überstand befinden sich die cytosolischen Proteine, welche durch eine zweistufige Ammoniumsulfatfällung weiter aufgereinigt wurden. Die Formel zur Berechnung der erforderlichen Ammoniumsulfatmenge stammt von Jaenicke (1984):

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

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

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

Im ersten Fällungsschritt wurde Ammoniumsulfat (Karl Roth GmbH, Karlsruhe) bis zu einer Konzentration von 35 % schrittweise zu den Proben gegeben und nach vollständiger Auflösung 20 min auf Eis gerührt. Danach wurde erneut für eine Stunde bei 39.500 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand im zweiten Fällungsschritt auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 80 % gebracht, abermals 20 min auf Eis gerührt und für eine Stunde bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2,5 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gelöst. Zum Entsalzen wurde der Proteinrohextrakt auf PD 10 Säulen (GE Healthcare, Freiburg) gegeben und mit 3,5 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,0 eluiert. Die Säulen wurden vor der Verwendung laut Hersteller mit 5 x 5 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,0 äquilibriert und nach dem Gebrauch mit 2 x 5 ml 0,1 M HCl und 2 x 5 ml dH₂O gereinigt. Der so gewonnene Proteinrohextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Für Proteinextraktionen mit anschließenden weiteren Aufreinigungsschritten wie z.B. Affinitätschromatographie wurden im Gewächshaus auf Einheitserde angezogene Pflanzen als Ausgangsmaterial verwendet.

2.2.10 Enzymaktivitätsmessungen

Enzymaktivitäten wurden, wenn nicht anders angegeben, in steril verpackten Nunc Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (Brand, Wertheim) bzw. wenn notwendig (bei Wellenlängen < 300 nm) in speziellen UV-Platten (Greiner, Frickenhausen) im SpektraMax Plus 384-Spektrophotometer (Molecular Devices, Ismaning) bestimmt und mit der Software Softmax Pro 4.6 ausgewertet. Die Messungen erfolgten im allgemeinen bei Raumtemperatur für 5 min in 15 sekundigen Intervallen. Bei allen Messungen wurde mit mindestens 3 technischen Replikaten gearbeitet. Zur Bestimmung der nicht-enzymatischen Reaktion wurde eine entsprechende Menge Puffer bzw. dH₂O anstelle des Enzymextraktes gemessen und der Blindwert von den anderen Reaktionen abgezogen. Die Aktivität der Enzyme wurde in μkat (= $\mu\text{mol/s}$) ausgedrückt und später auf die Proteinkonzentration bezogen (Lamoureux and Rusness, 1989; Scalla and Roulet, 2002). Die Proteinkonzentration wurde mittels des Bradford-Tests (Bradford, 1976) bestimmt. Durch Anlagerung von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs „Coomassie brilliant blue“ von 465 nm auf 595 nm. Es wurden jeweils 10 μl bzw. bei Proben mit geringer Proteinkonzentration 20 μl des Enzymextraktes mit 200 μl 1:10 verdünnter Bradfordlösung (Fluka, Steinheim) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden aus Rinderserumalbumin konnte daraufhin die Proteinkonzentration der einzelnen Proben in mg/ml ermittelt werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle gemessenen Werte im linearen Bereich der Eichgerade lagen.

Enzymaktivitäten des antioxidativen Stoffwechsels

Alle Messungen wurden wie in Lyubenova (2007) beschrieben durchgeführt, jedoch wurde der Enzymanteil pro Reaktion bei fast allen Enzymen erhöht, da die Proteinkonzentration der Rohextrakte aufgrund der Anzucht im Reagenzglassystem meist relativ gering war. Zusätzlich wird bei jedem Enzymtest auf die Originalarbeit verwiesen, auf der die Messung basiert.

Superoxiddismutase (SOD) Die Messung der SOD-Aktivität erfolgte modifiziert nach der Methode von Polle *et al.* (1989). Dabei wird die Bildung von Adenochrom gemessen. Im Testansatz befanden sich pro Reaktion neben 20 % Enzymextrakt noch 10 % Epinephrinlösung und 140 U/ml Katalase in 62 mM Natriumcarbonatpuffer mit 125 μM EDTA. Die Epinephrinlösung wurde so eingestellt, dass die Adenochrombildung in Kontrollen (also mit dH₂O anstelle des Enzymextraktes) eine Veränderung der OD bei 480 nm von 0,021 pro Minute ergab. Dafür wurden 25 mg Epinephrin (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 30 ml 0,1 M HCl gelöst (Lyubenova, 2007). SOD hemmt durch das Wegfangen freier

Superoxidradikale die Bildung von Adenochrom; die SOD-Aktivität entspricht also der Hemmung der Adenochrombildung (angegeben in $\mu\text{mol Adenochrom s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) bei einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 4,02 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Lara-Nuñez *et al.*, 2006).

Katalase (CAT) Der Test auf Katalaseaktivität erfolgte nach Verma and Dubey (2003). Hierbei wird die Umsetzung von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff (also die Abnahme von H_2O_2) bei 240 nm gemessen. Im Testansatz befanden sich pro Reaktion 27 % Enzymextrakt und 53,3 mM H_2O_2 in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7. Bei den Blattproben war die Aktivität jedoch so hoch, dass der Enzymextrakt auf 1 % pro Reaktion verdünnt wurde. Der Extinktionskoeffizient betrug $0,036 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Peroxidase (POX) Die POX-Messung mittels Guajacol (2-Methoxy-phenol, Fluka, Steinheim) wurde nach der Methode von Schröder *et al.* (1997) durchgeführt. Dabei wurde bei 420 nm die Bildung von Tetraguajacol gemessen. Pro Reaktion befanden sich neben 27 % Enzym noch 68 μM Guajacol und 180 μM H_2O_2 im 50 mM Tris/HCl Puffer pH 6. Der molare Extinktionskoeffizient betrug $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Neben dieser Methode wurde die Peroxidase in Apoplastensaft mit TMB bei 650 nm gemessen, da die Messung mit Guajacol nicht sensitiv genug war. Die Herstellung der TMB-Stammlösung und des Natriumacetatpuffers erfolgte wie beim ELISA-Test bereits beschrieben. Zum Puffer-Substrat-Gemisch (0,4 mM TMB, 1,3 mM H_2O_2 in Natriumacetatpuffer) wurden 5 % Apoplastensaft und AHLs in der entsprechenden Verdünnung gegeben. Dabei fiel die Reaktion so heftig aus, dass der Apoplastensaft vorher 1:100 verdünnt werden musste, so dass die Konzentration von Apoplastensaft pro Reaktion nur noch 0,005 % betrug ($\epsilon_{650 \text{ nm}} = 35,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Ascorbatperoxidase (APOX) Die Methode der APOX-Aktivitätsmessung wurde modifiziert nach Vanacker *et al.* (1998) durchgeführt. Dabei wurde die Abnahme der Extinktion durch Oxidation des Ascorbats bei 290 nm in 55,56 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 verfolgt. Der Testansatz enthielt neben 27 % Enzymextrakt, 15 μM Natriumascorbat (Fluka, Steinheim) und 0,95 mM H_2O_2 pro Reaktion. Der Extinktionskoeffizient betrug $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Glutathionreduktase (GR) Die Messung der Glutathionreduktaseaktivität wurde nach der Methode von Vanacker *et al.* (1998) durchgeführt. Gemessen wurde der NADPH-Verbrauch bei der Reduktion der oxidierten Form des Glutathion (GSSG) zu GSH bei 340 nm ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Pro Reaktion befanden sich 0,1 mM GSSG, 0,2 mM NADPH und 27 % Enzymextrakt in 0,1 M Tris/HCl Puffer pH 7,5 mit 0,1 mM EDTA.

Glutathion-S-Transferase (GST)

GSTs weisen nur geringe Substratspezifität auf, wobei diese auch von den GST-Isoformen abhängig ist. Um verschiedene Isoformen und damit auch unterschiedliche Reaktionstypen zu erfassen, wurden die Aktivitätsmessungen mit mehreren Modellsubstraten durchgeführt. Alle Substrate wurden wie oben beschrieben mit einem Enzymanteil von 20 % pro Reaktion gemessen. Lediglich die Aktivität beim Modellsubstrat Fluorodifen wurde über einen Zeitraum von 20 min nach der Methode von Scalla and Roulet (2002) ermittelt. Weitere Details der Messungen sind der Tabelle 2.3 zu entnehmen. Alle GSH-Stammlösungen wurden mit dH₂O, Substratstammlösungen mit EtOH_{abs} hergestellt.

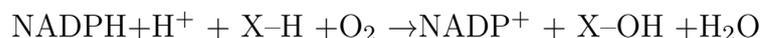
Tabelle 2.3 – Auflistung der verwendeten Puffer, der molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{[\text{nm}]}$) und der Konzentrationen [c] an GSH und Substrat pro Reaktion bei der Messung der GST-Aktivität mit verschiedenen Modellsubstraten.

1-Chlor-2,4-dinitrobenzol [CDNB] (Merck, Darmstadt), 3,4-Dichlornitrobenzol [DCNB] (Riedel deHäen, Steinheim), p-Nitrobenzylchlorid [NBC] (Fluka, Steinheim), p-Nitrobenzoylchlorid [NBoC] (Fluka, Steinheim), Fluorodifen (Riedel deHäen, Steinheim), p-Nitrophenylacetat [pNpa] (Sigma-Aldrich, Steinheim), GSH (Fluka, Steinheim)

Substrat	Puffer	Extinktionskoeffizient	[c]Substrat	[c]GSH
CDNB	0,1 M Tris/HCl pH 6,4	$\epsilon_{[340\text{nm}]} = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	1 mM	1ß,mM
DCNB	0,1 M Tris/HCl pH 7,5	$\epsilon_{[345\text{nm}]} = 8,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	1 mM	1 mM
NBC	0,1ß,M Tris/HCl pH 6,4	$\epsilon_{[310\text{nm}]} = 1,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	0,5 mM	1 mM
NBoC	0,1 M Tris/HCl pH 6,4	$\epsilon_{[310\text{nm}]} = 1,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	0,5 mM	1 mM
Fluorodifen	0,1 M Tris/HCl pH 7,5	$\epsilon_{[400\text{nm}]} = 17,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	0,3 mM	1,2 mM
pNpa	0,1 M KPP pH 7,0	$\epsilon_{[400\text{nm}]} = 8,79 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	0,2 mM	0,5 mM

Bestimmung der P450-Monooxygenaseaktivität

P450 Enzyme sind in der Lage, Xenobiotika durch Oxidation unter Verbrauch von atmosphärischem Sauerstoff zu metabolisieren. Die Reaktionsgleichung sieht dabei wie folgt aus:



Die Aktivität der P450-Enzyme wurden nach der Methode von Olry *et al.* (2007) mittels BD-Oxygen Biosensor Platten mit 96 Kavitäten (BD Biosciences, Heidelberg) ermittelt. Auf dem Boden jeder Kavität befindet sich eine Silikonmatrix in die ein Sauerstoff-sensitiver Fluorophor (Tris-(4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin)Ruthenium (II)-chlorid) eingebettet ist. Sowohl die Matrix als auch der Fluorophor sind impermeabel für Flüssigkeiten, aber durchlässig für Sauerstoff. Der Fluorophor wird durch die Anwesenheit des Sauerstoffs gehemmt, die Aktivitätsmessung beruht also auf der Messung des Verbrauchs von Sauerstoff

durch das P450-Enzym mit einer Fluoreszenz bei 620 nm bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm (siehe Abbildung 2.7).

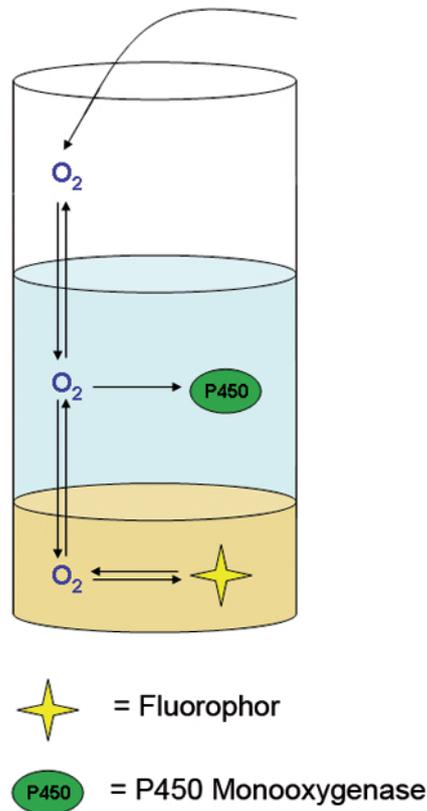
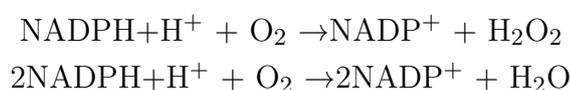


Abbildung 2.7 – Schematischer Aufbau einer Kavität einer BD-Oxygen Biosensor Platte. Am Boden befindet sich die für Flüssigkeiten undurchlässige, aber sauerstoffpermeable Silikonmatrix mit dem eingebetteten Fluorophor. Der Luftsauerstoff kann frei in die Pufferlösung und in die Silikonmatrix diffundieren. Der Sauerstoffabbau findet durch enzymatische Prozesse in der Pufferlösung statt. Je geringer die Sauerstoffkonzentration in der Matrix, desto höher ist die Leuchtkraft des Fluorophors.

Vom humanen P450-Enzym CYP2C9 (BD-Biosciences, Heidelberg) wurden 10 pmol pro Reaktion mit 200 μM C8-HSL als zu untersuchendes Substrat eingesetzt. Des weiteren befanden sich 1 % Glycerin, 5 μM NADPH, 0,15 mM Glucose-6-Phosphat und 0,08 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 in jeder Reaktion. Neben der oben dargestellten Reaktion der P450-Enzyme können noch weitere Sauerstoff-verbrauchende Prozesse stattfinden, welche vom P450 unabhängig sind.



Deshalb wurden zusätzlich mehrere Kontrollmessungen durchgeführt: a) mit NADPH-Quelle, ohne Substrat, b) ohne NADPH-Quelle, mit Substrat und c) ohne NADPH-Quelle, ohne Substrat, und diese von der eigentlichen Reaktion abgezogen. Die Konzentration des Sauerstoffs in der Lösung ist direkt proportional zur Fluoreszenz des eingesetzten Tris-(4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin)Ruthenium (II)-chlorids und folgt der Stern-Volmer-Gleichung (Olry *et al.*, 2007).

Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte nach der folgenden Gleichung:

$$O_2 = \frac{(DR * \frac{I}{I_A}) - 1}{K_S}$$

Dabei gilt:

K_S	=	$\frac{DR-1}{O_2A}$	=	Stern-Volmer-Konstante
DR	=	$\frac{I_0}{I_A}$	=	„dynamic range“
O_2A	=	0.209 atm	=	atmosphärischer Sauerstoffgehalt
I	=		=	Fluoreszenz der Probe
I_A	=		=	Fluoreszenz bei Abwesenheit von Sauerstoff

Um die Fluoreszenz bei Abwesenheit von Sauerstoff zu messen, wurde auf jeder Platte die Fluoreszenz einer 100 mM Natriumsulfit Lösung in PBS-Puffer gemessen. Nach ca. 1h war dabei der Sauerstoff komplett verbraucht und die maximale Fluoreszenz erreicht. Um die Aktivität des Enzyms zu berechnen, wurde der Sauerstoffverbrauch über die Zeit im linearen Bereich der Messung aufgetragen (atm/s). Die Umrechnung vom verbrauchten Volumen [O_2] zur verbrauchten Stoffmenge erfolgte über die thermische Zustandsgleichung idealer Gase ($p * V = n * R_m * T$). Die Enzymaktivität wurde auf die Proteinkonzentration bezogen und in nkat/mg angegeben.

2.2.11 Affinitätschromatographie

Zusätzlich zu Messungen im Proteinrohextrakt wurden die GSTs weiteren Aufreinigungsschritten unterworfen und Messungen der Aktivität unter AHL-Behandlung mit aufgereinigten Extrakten durchgeführt. Da GSTs an GSH binden, ist eine Möglichkeit der weiteren Aufreinigung dieser Enzyme die Affinitätschromatographie.

Salzlose Affinitätschromatographie

Die salzlose Affinitätschromatographie wurde nach den Arbeiten von Pascal *et al.* (1998) durchgeführt. Dazu wurde 1 ml des Protein-Rohextraktes auf vorher vorbereitete und mit

5 x 5ml Puffer Pascal B gespülten GSH-Agarosesäulen gegeben. Für eine Säule wurden ca. 150 mg GSH-Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit dH₂O gemischt und für 30 min vorgequollen (laut Herstellerangaben quellen 90-95 % der Agarose in den ersten 30 min, der Rest nach spätestens 24 h). Danach wurde die GSH-Agarose vorsichtig in Säulen gepackt und diese frühestens nach 24 h benutzt. Durch die hohe Affinität von GSTs zu ihrem Substrat GSH hafteten diese im Gegensatz zu den anderen im Rohextrakt befindlichen Proteinen am Säulenmaterial. Erst durch Zugabe des Puffers Pascal C, der gelöstes GSH in ausreichender Konzentration enthielt, wurden die gebundenen GST wieder eluiert. Nach dem Beladen der Säule mit 1 ml Proteinrohextrakt wurde sofort mit der Elution begonnen; dabei wurde 1 ml des entsprechenden Pascal Puffers nach dem unten stehenden Schema (siehe Tab. 2.4) auf die Säule aufgetragen, die Fraktionen aufgefangen und schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Später wurden die Proteinkonzentration und die

Tabelle 2.4 – Darstellung des Pipettierschemas zur Elution der an die GSH-Agarose gebundenen Proteine bei der salzlosen Affinitätschromatographie. Je 1 ml des entsprechenden Puffers wurde auf die Säule gegeben und die Fraktion aufgefangen.

Fraktion	verwendeter Puffer
1-4	Pascal B
5-8	Pascal A
9-18	Pascal C
19-20	Pascal B
21-22	Pascal A
23-24	Pascal B
25-26	Pascal A

CDNB-Aktivität jeder Fraktion bestimmt. Die Säule wurde durch Spülen mit 20 ml 0,1 M Boratpuffer pH 8-9 und 0,5 M NaCl, dann 20 ml dH₂O, dann 20 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 4 und 0,5 M NaCl und abschließend wieder mit 20 ml dH₂O regeneriert und bei 4°C in einer Lösung aus 1 M NaCl und 20 % Ethanol gelagert.

Verwendete Puffer

Pascal A: 0,2M Tris/HCl pH 7,8; 1mM EDTA; 5mM DTT

Pascal B: 0,5M Tris/HCl pH 7,8; 1mM EDTA; 1mM DTT

Pascal C: 0,2M Tris/HCl pH 7,8; 1mM EDTA; 20mM GSH

Die Proteinkonzentration und CDNB-Aktivität der einzelnen Fraktionen sind in Abbildung 2.8 dargestellt.

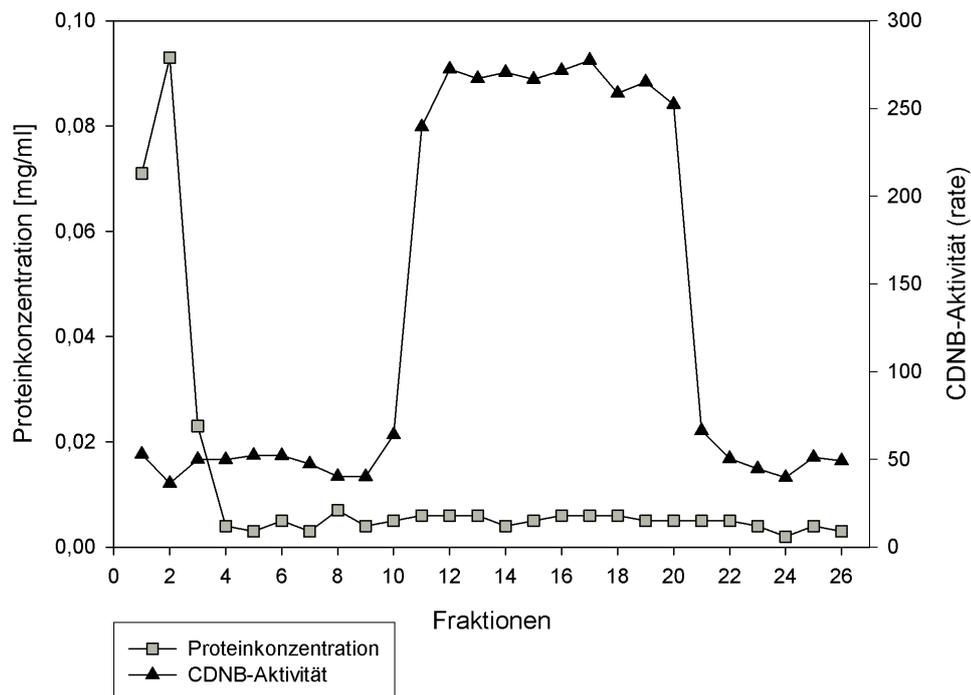


Abbildung 2.8 – Proteinkonzentration und CDNB-Aktivität der Fraktionen der salzlosen Affinitätschromatographie

Affinitätschromatographie an einer FPLC

Die GSH-Agarose Säule wurde an eine Bio-Rad ECONO FPLC-Anlage (mit 2110 Fraktionsammler, Bio-Rad, München) angeschlossen. In der Säule befanden sich 2 ml bereits vorgequollene GSH-Agarose. Im Unterschied zur salzlosen Affinitätschromatographie wurde hier mit einem kontinuierlichen Puffergradienten mit nur 2 unterschiedlichen Puffern gearbeitet. Puffer A (0,2 mM Tris/HCl pH 7,8 0,1 M EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT, Karl Roth GmbH, Karlsruhe)) diente als Basispuffer, mit Puffer B (0,2 mM Tris/HCl pH 7,8 0,1 M EDTA, 20 mM GSH, 0,5 M NaCl) wurden die gebunden Proteine von der Säule eluiert. Die Säule wurde vor jedem Lauf mit 20 ml Puffer A gespült. Der Probenschlauch wurde mit 1,5 ml Enzymrohextrakt beladen und dann der Gradient (siehe Abbildung 2.9) gestartet. Sobald der Rohextrakt das Säulenmaterial komplett erreicht hatte, wurde das Programm für 1 min unterbrochen, damit die Enzyme ausreichend Zeit hatten, an das Säulenmaterial zu binden. Die Flussrate betrug 1 ml/min und der Fraktionsammler fing je einem Milliliter pro Fraktion auf. Nach jedem Lauf wurde die Säule, wie bereits bei der salzlosen Affinitätschromatographie beschrieben, gespült. Später wurden die einzelnen Fraktionen auf ihre Proteinkonzentration und CDNB-Aktivität hin untersucht.

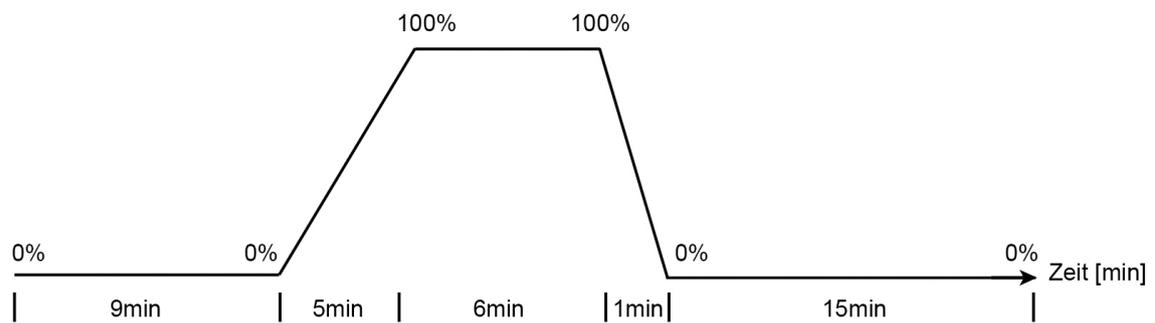


Abbildung 2.9 – Schematische Darstellung des eingestellten Gradienten bei der Affinitätschromatographie mit einer FPLC-Anlage. In Prozent angegeben ist hier der Anteil an Puffer B über die Zeit in Minuten.

Die Proteinkonzentration und CDNB-Aktivität der einzelnen Fraktionen sind in Abbildung 2.10 dargestellt.

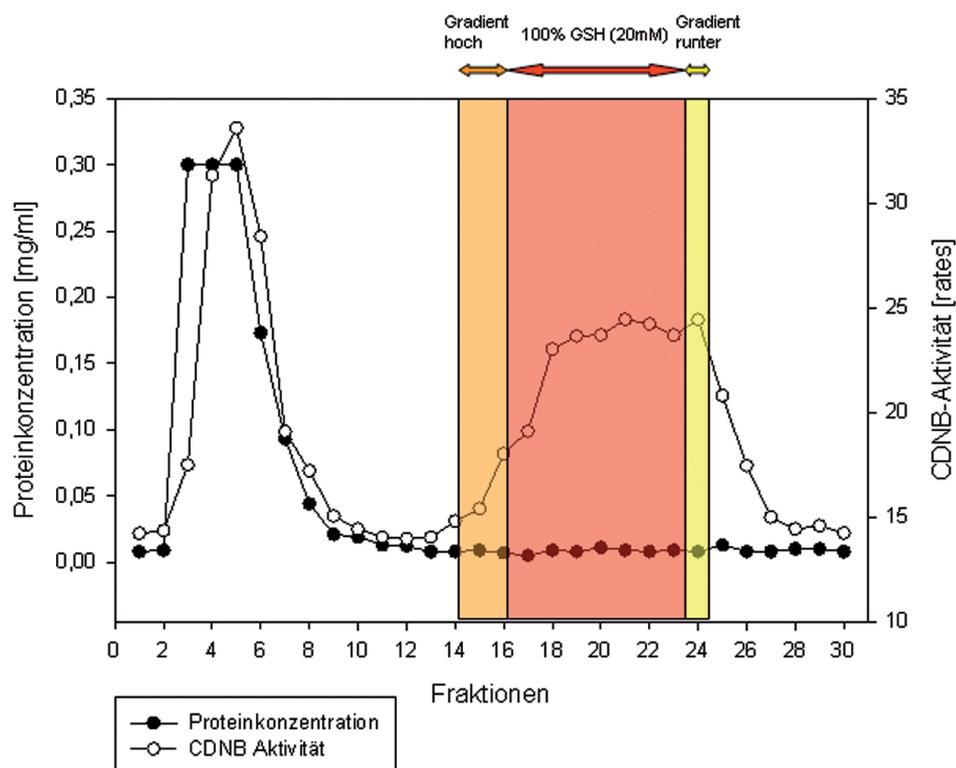


Abbildung 2.10 – Proteinkonzentration und DNB-Aktivität der Fraktionen der FPLC-gekoppelten Affinitätschromatographie

2.2.12 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Aus 40 g Blattmaterial von im Gewächshaus auf Einheitserde angezogenen Pflanzen wurde in 8 Einzelproben ein Proteinrohextrakt wie unter 2.2.9 beschrieben hergestellt. Die Einzelproben wurden vereinigt und in Amicon-Ultra-Filtern (Millipore GmbH, Schwalbach) mit einer Filterausschlussgröße von 10 kDa für 40 min bei 7500 x g in der Beckmannzentrifuge bei 4°C konzentriert und in zwei Eppendorfreaktionsgefäße á 1,5 ml aufgeteilt. Der eine Teil wurde mittels salzloser Affinitätschromatographie, der andere mit Hilfe der FPLC gekoppelten Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt. Nach Ermittlung der CDNB-Aktivität in den einzelnen Fraktionen wurden diese zu größeren Fraktionen zusammengefasst und erneut aufkonzentriert. Die jeweiligen Spüllösungen wurden ebenfalls aufgefangen und aufkonzentriert. Die Proben wurden daraufhin mit der PAGE näher untersucht. Für die Herstellung aller Gele wurde eine 40 % Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung 37,5:1 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) verwendet. Die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (Temed) erfolgte erst nach 15 minütiger Entgasung im Exsikkator. Danach wurde das Gel direkt zwischen zwei entsprechend vorbereitete Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Glasplatten wurden so zusammengebaut, dass die Gele (Trenn- und Sammelgel zusammen) eine maximale Größe von 150 x 160 x 1 mm hatten. Nach 1,5 h wurden sämtliche Reste von Isopropanol entfernt und das Sammelgel darauf gegossen. Sofort nach dem Gießen des Sammelgels wurde ein Kamm zwischen die Glasplatten eingesetzt und das so präparierte Gel über Nacht bei 4°C weiter auspolymerisiert. Zwischen dem Boden der durch den eingesetzten Kamm gebildeten Taschen und dem Anfang des Trenngels war ca. 1 cm Sammelgel vorhanden. Die Proben wurden im Verhältnis 2:1 bei einem Endvolumen von 40 µl mit Probenpuffer gemischt. Vor dem Auftragen auf das Gel, denaturierten die Proteine für 10 min bei 95°C im Sandbad. Das Gel lief erst für 30 min bei 150 V (150 A, 150 W) und dann für weitere 2,5 h bei 300 V (300 A, 300 W) in einer Hoefer SE 600 Ruby Gelkammer (Amersham Biosciences, jetzt Teil von GE Healthcare, München) im entsprechenden Elektrodenpuffer. Als Marker wurde der PageRuler („Unstained Protein Ladder“, Fermentas, jetzt Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet.

Verwendete Puffer:

Trenngel: 12 % Acrylamid
 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma-Aldrich, Steinheim)
 0,5 % (v/v) Glycerin in 375 mM Tris/HCl pH 8,8
 1 % (v/v) 22,82 mM APS-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim)
 0,05 % (v/v) Temed (Karl Roth GmbH, Karlsruhe)

Sammelgel:	3 % Acrylamid 0,1 % (w/v) SDS 125 mM Tris/HCl pH 6,8 1 % (v/v) 22,82 mM APS-Lösung 0,05 % (v/v) Temed
Probenpuffer:	0,1 M Tris/HCl pH 6,8 20 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 1 M DTT 0,002 % (w/v) Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Elektrodenpuffer: pH~8,3	1 M Tris 2 M Glycin (Karl Roth GmbH, Karlsruhe) 20 % (w/v) SDS

2D-PAGE

Bei der 2-dimensionalen PAGE wurden die Proteine erst nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt. Für die erste Dimension wurde das IPGphor-System (GE Healthcare, München) unter Verwendung aller zugehörigen Komponenten eingesetzt. Die zweite Dimension erfolgte wiederum in der Hoefer SE 600 Ruby Gelkammer. Es wurden 12 %ige Gele hergestellt und direkt nach der Zugabe von APS und Temed zwischen zwei bereits vorbereitete Glasplatten gegossen, sodass ca. 1,5 cm Platz bis zum Ende der Glasplatten blieb. Die Gele wurden sofort mit Isopropanol überschichtet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die Proteinproben wurden in Rehydratisierungspuffer aufgenommen, wobei die Probe einen Anteil von 50 % bei einem Gesamtvolumen von 250 µl nicht überstieg. Die so vorbereiteten Proben wurden auf IPG-Gelstreifen (mit dem gleichen pH-Bereich wie beim zuvor eingesetzten IPG-Puffer) in Keramikschißchen mit Platinelektroden (Ettan IPGphor „strip holders“) gegeben und mit 1 mL IPG „Cover Fluid“ überschichtet. Nachdem das Keramikschißchen geschlossen war, wurde es auf dem EttanIPGphor II ausgerichtet und die elektrische Fokussierung gestartet. Die Rehydratisierung erfolgte dabei für mindestens 10 h bei eingestellten 10 V und maximal 3 mA pro Schißchen, die anschließende Fokussierung in drei Stufen: 1 h bei 500 V, 1 h bei 1000 V und

4 h bei 8000 V. Am nächsten Morgen wurden die Gelstreifen zuerst für 15 min in Puffer B1 und anschließend für abermals 15 min in Puffer B2 leicht schüttelnd inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Gelstreifen vorsichtig auf dem gegossenen Gel positioniert und mit 0,5 % (w/v) Agarose (Merck, Darmstadt) überschichtet. Zusammen mit dem Gelstreifen wurde vor dem Überschichten ein Stück Filterpapier (Whatman, Teil von GE Healthcare, München) mit 2 µl PageRuler auf dem Gel platziert. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen dem Gelstreifen und dem Gel befanden. Die so präparierten Gele wurden in die Gelkammer mit vorgekühltem Laufpuffer gestellt und die Elektrophorese bei 300 V (300 A, 300 W) für 2,5 - 3 h durchgeführt.

Verwendete Puffer:

Acrylamidgel:	12 % Acrylamid 0,1 % (w/v) SDS 375 mM Tris/HCl pH 8,8 1 % (v/v) 22,82 mM APS-Lösung 0,05 % (v/v) Temed
Rehydratisierungspuffer:	8 M Urea (Karl Roth GmbH, Karlsruhe) 2 % (w/v) Chaps ¹ 1,25 mM Na ₄ -EDTA (Karl Roth GmbH, Karlsruhe) 1,25 mM EGTA ² 0,005 % (w/v) Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim) 0,05 % IPG-Puffer ³
Puffer B1:	24% (v/v) Glycerin 35 M Urea (Karl Roth GmbH, Karlsruhe) 2 % (w/v) SDS 0,05 M Tris/HCl pH 6,8 1,234 M DTE

¹3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan sulfonat (Karl Roth GmbH, Karlsruhe)

²Ethylenglycol-bis-(-aminoethylether)-N,N'-tetraacetat (Sigma-Aldrich, Steinheim)

³pH 4-7 bzw. pH 3-10 (GE Healthcare, München)

Puffer B2:	24% (v/v) Glycerin 35 M Urea (Karl Roth GmbH, Karlsruhe) 2 % (w/v) SDS 0,05 M Tris/HCl pH 6,8 1,85 M Jodacetamid (Sigma-Aldrich, Steinheim) 0,004 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer:	0,1% (w/v) SDS 25 mM Tris 192 mM Glycin

Silberfärbung

Die Gele wurden nach dem Beenden des Laufes in der Elektrophoresekammer sofort in die Fixierlösung 1 überführt (30 % Ethanol (v/v), 10 % Eisessig (v/v, Merck, Darmstadt)) und verblieben dort für mindestens 1 h teilweise aber auch über Nacht. Danach wurden sie 3 mal für je 20 min in Fixierlösung 2 (30% Ethanol (v/v)) und dann in Sensibilisatorlösung, die 0,08 M Natriumthiosulfat (Riedel deHäen, Steinheim) enthielt, weiterbehandelt. Die Gele wurden im Anschluss 2 mal für je 20 sec in dH₂O geschwenkt und dann für 20 min abgedunkelt in die eigentliche Färbelösung (11,8 mM Silbernitrat (Sigma-Aldrich, Steinheim), 0,02 % Formaldehyd (Karl Roth GmbH, Karlsruhe)) getaucht. Die Gele wurden daraufhin erneut 2 mal für je 20 sec in dH₂O geschwenkt und anschließend ca. 5-10 min in das Entwicklerbad überführt (566 mM Natriumcarbonat (Karl Roth GmbH, Karlsruhe), 0,02 % Formaldehyd und 0,02 mM Natriumthiosulfat). Gestoppt wurde der Entwicklungsprozess durch ein 10 minütiges Bad in einer Lösung aus 5 % Eisessig. Die Gele wurden kurzzeitig in dH₂O aufbewahrt oder zwischen Zellophanfolien getrocknet.

2.2.13 Visualisierung von NO in der Wurzel

Wurzeln von 3-4 Tage alten Gerstenkeimlingen wurden auf einen Objektträger in Puffer (0,01 M MES; 0,05 M KCl; pH 6,15) mit 10 µM 4,5-Diaminofluorescein Diacetat (DAF-2DA, Axxora, Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach) gelegt. DAF-2DA kann in die Zellen diffundieren und wird dort durch zelleigene Esterasen erst zu 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2) metabolisiert und beim Vorhandensein von NO und O₂ unter neutralen pH Wert weiter zu Triazolofluorescein (DAF-2T) umgebaut. Dieses fluoresziert bei Wellenlänge von 515 nm (siehe Abbildung 2.11). Die Fluoreszenz der Wurzeln wurde an einem Epifluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss (Axioplan, Carl Zeiss AG, Oberkochen) mit dem dazu gehörigen

Objektiv (5 x EC Plan Neofluor) beobachtet. Das Anregungslicht (495 nm) wurde von einem speziellen Beleuchter (HxP 120, Carl Zeiss AG, Oberkochen) erzeugt. Nach ca. 30-40 min Inkubation der Wurzel mit der DAF-2DA Lösung stabilisierte sich die Fluoreszenz. Die Lösung wurde daraufhin mittels einer Glaskapillare ohne das Deckgläschen dabei zu entfernen vorsichtig abgesaugt und durch eine identische Lösung mit zusätzlich 10 μ M C8-HSL ersetzt. Dabei wurde darauf geachtet, die Wurzel und den gesamten Objektträger nicht zu bewegen. Kontrollbehandlungen enthielten anstelle der AHL-Lösung die entsprechende Menge Ethanol. Als Positivkontrolle wurde eine Lösung mit 10 μ M Salizylsäure bei gleichem Ethanolgehalt verwendet. Nach der Behandlung wurde alle 5 Minuten eine Aufnahme gemacht. Die Belichtungszeit wurde für jede Wurzel kurz vor der Behandlung individuell eingestellt, danach aber nicht mehr verändert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm AxioVision Rel. 4.6 bzw. 4.8 durch Ermittlung der Graustufen an einem exakt festgelegten Bildabschnitt in der Wurzelwachstumszone (bis zur beginnenden Wurzelhaarzone) in einem festen Kreisdurchmesser.

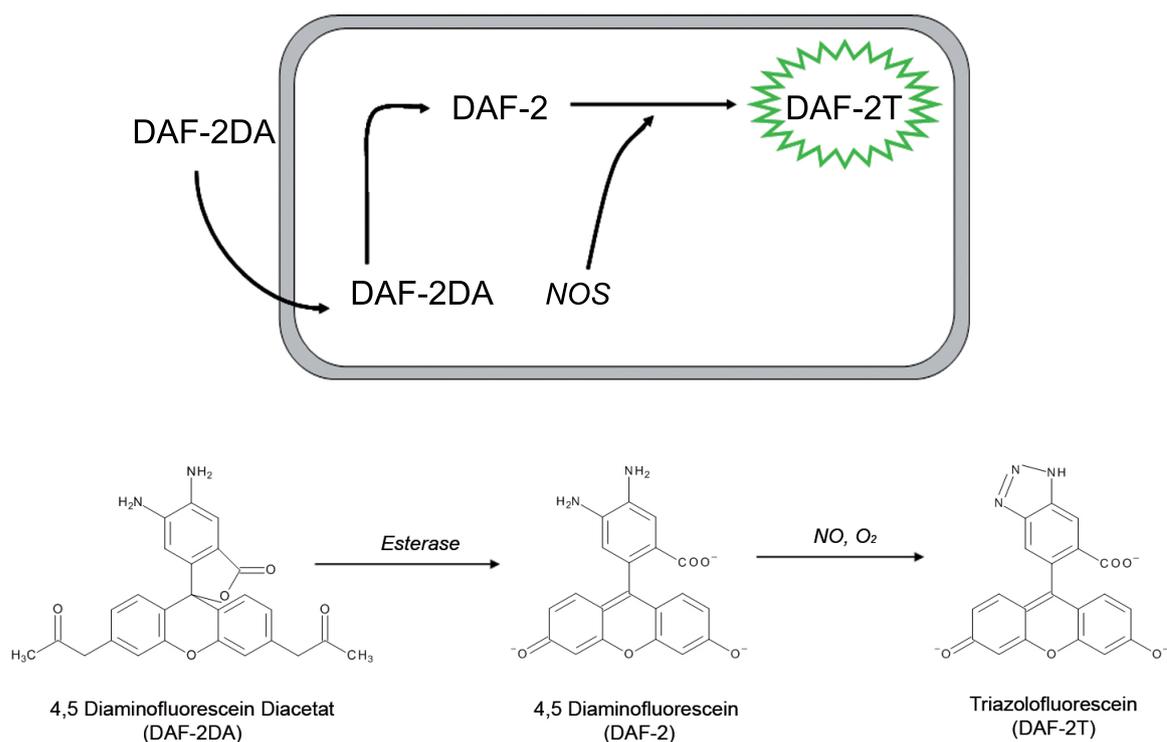


Abbildung 2.11 – Schematische Darstellung der Detektion von NO in Zellen. DAF-2DA diffundiert in das Zellinnere und wird dort mittels einer Esterase zu DAF-2 und bei Vorhandensein von NO zu dem fluoreszierenden DAF-2T metabolisiert.

2.2.14 Verwendete Software

Alle gemessenen Enzymaktivitäten, sowie die Fluoreszenzspektroskopie bei der Analyse mit den bakteriellen Sensorstämmen und die ELISA Tests wurden mit der Software Softmax Pro 4.6 ausgewertet. Die Bilder der Fluoreszenzmikroskopie wurden mit der Software AxioVision Rel. 4.6 bzw. 4.8 analysiert. Die Erstellung der Graphen sowie die statistische Analyse erfolgten mit den Programmen SigmaPlot 11.0 und Microsoft Office Excel 2003. Bilder und schematische Darstellungen wurden mit Microsoft Office Power Point 2003 und Adobe Photoshop CS3 erstellt. Die Struktur chemischer Verbindungen wurden mit Symyx Draw 4.0 angefertigt.

3 Ergebnisse

Der folgende Ergebnisteil gliedert sich in drei Teile.

Im ersten Teil wird die Aufnahme und der systemische Transport von C8- und C10-HSL in die Pflanze dargestellt. Die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden sollen im Anschluss diskutiert werden (4.1).

Im zweiten Teil werden Aktivitätsveränderungen bestimmter Enzyme (GSTs und ausgewählte Enzyme des antioxidativen Stressstoffwechsels) als Antwort auf die applizierten AHLs erfasst. Dabei werden die Reaktionen der Pflanze unterteilt in kurzzeitige, schnelle Antworten (in einem Zeitrahmen zwischen 2 h - 24 h) und in länger andauernde Veränderungen der Enzymaktivitäten (zwischen 3 - 17 Tagen). Auf morphologische Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit größtenteils verzichtet, da Götz (2008) in Gerste keine Veränderungen der Morphologie nach 17-tägiger AHL-Applikation feststellen konnte. Es wurden bei der Langzeitkinetik lediglich die Frischgewichte der Pflanzen bestimmt. Des Weiteren wurden die Aktivitätsveränderungen ausgewählter Enzyme nach AHL-Applikation mit der Reinsubstanz C6-HSL mit den Veränderungen nach Inokulation mit AHL-produzierenden *S. liquefaciens* MG1 Bakterien verglichen. Außerdem wurde untersucht, welche Enzyme direkt mit AHLs interagieren und so an der AHL-Degradierung in der Pflanze beteiligt sein könnten.

Im dritten Teil wurden mögliche Signalsubstanzen gesucht, die die systemischen Enzymaktivitätsveränderungen nach AHL-Applikation auslösen könnten.

3.1 AHL Aufnahme und Transport

3.1.1 Messungen mit tritiierten AHLs

Die frühe Aufnahme und der Transport von AHLs in Gerste wurde mit Hilfe von tritiierten AHLs bestimmt, da diese Methode eine der sensitivsten ist, die derzeit zur Verfügung stehen. Die Pflanzen wuchsen hierfür im sterilen Reagenzglassystem mit Glasperlen und wurden mit tritiiertem C8- bzw. C10-HSL behandelt. Die Pflanzen wurden 1h, 2,5h, 4h und 16h nach AHL-Zugabe geerntet und dabei gewogen. Anschließend wurden die AHLs wie unter 2.2.3 beschrieben extrahiert und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

Transport durch Halm und Blatt

Um den systemischen Transport der AHLs in die Gerstenblätter näher charakterisieren zu können, wurden diese vor der Extraktion in drei Abschnitte geteilt (siehe Abbildung 3.1). Der Halm und Blatt 1 waren jeweils exakt 5 cm lang, während Blatt 2 in der Länge je nach Pflanze leicht variierte.

Bereits nach einer Stunde konnten tritiierte AHLs in geringen Konzentrationen in den Blättern nachgewiesen werden, sodass sich der Schluss ergibt, dass beide AHLs durch die Wurzel bis in den Halm und die Blätter transportiert werden. Die AHL-Aufnahme erfolgte dabei in allen drei Blattteilen nahezu linear.

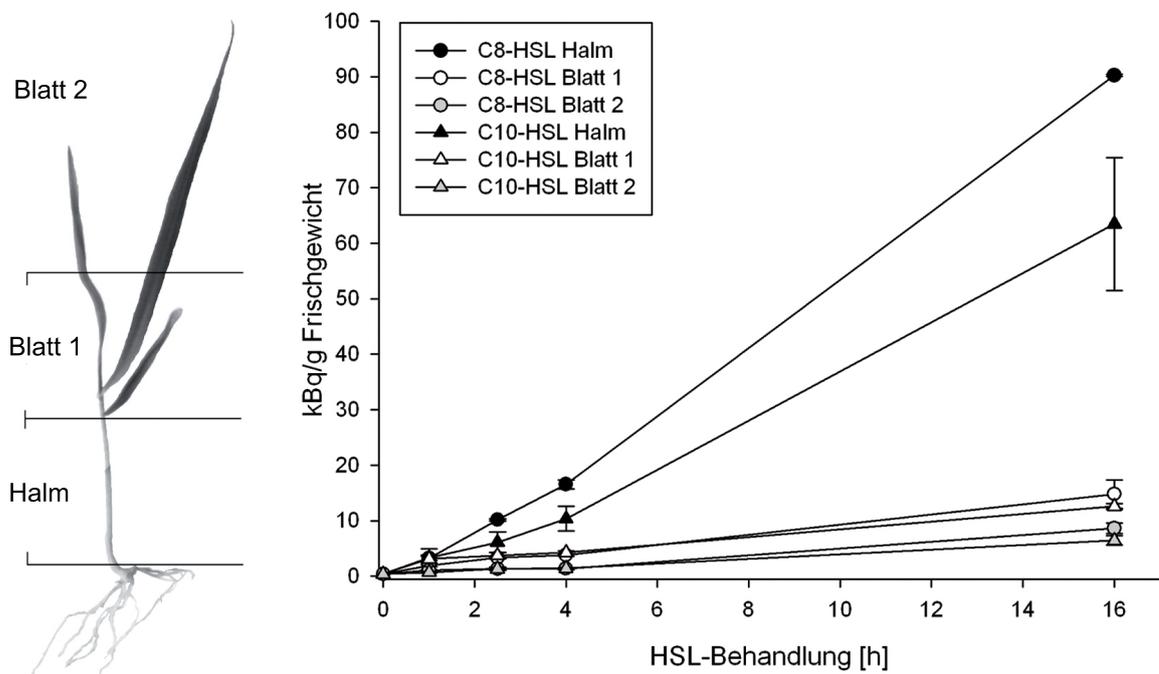


Abbildung 3.1 – Detektion von tritiierten AHLs im Halm und in den Blättern von Gerstenpflanzen. Links ist schematisch dargestellt, wie der Spross bei der Ernte unterteilt wurde. Rechts sieht man die lineare Aufnahme von C8- bzw. C10-HSL in Halm und Blätter.

Die höchste Radioaktivität, unabhängig vom eingesetzten AHL, wurde im Halm gemessen. Die geringste Radioaktivität war erwartungsgemäß in Blatt 2 zu finden, obwohl der Unterschied der gemessenen Menge an Radioaktivität zwischen Blatt 1 und Blatt 2 überraschenderweise nur gering war. Zusammen betrug die gemessene Radioaktivität von Blatt 1 und 2 nach 16 h nur 26 % bei C8-HSL bzw 30 % bei C10-HSL der ermittelten Radioaktivität des Halmes zu diesem Zeitpunkt. Dabei ist anzumerken, dass der Unterschied zwischen dem Halm und Blatt 1-2 zusammen zu diesem Zeitpunkt am größten war. In allen grünen Pflanzenteilen und zu allen gemessenen Zeitpunkten wurde mehr C8-HSL

als C10-HSL aufgenommen und transportiert. Nach 2,5 h wurde im gesamten grünen Teil der Pflanze 20 % mehr tritiiertes C8-HSL detektiert als tritiiertes C10-HSL. Nach 4 h und 16 h waren es dann bereits 26 % und 27 % mehr C8-HSL. Nach 16 h sind 0,36 % des eingesetzten C8-HSL bzw. 0,34 % des eingesetzten C10-HSL in den grünen Teil der Pflanze transportiert worden.

Bei den Wurzeln nahm die gemessene Radioaktivität im Gegensatz zum gesamten Spross nicht linear über die Zeit zu (siehe Abbildung 3.2). Nach 4 h erreichte die gemessene Radioaktivität bei beiden AHLs bereits eine Sättigung und war gleichzeitig um ein Vielfaches höher als im Spross. Zudem war die Radioaktivität nach der Behandlung mit C10-HSL - ebenfalls anders als im gesamten Spross - höher als die nach C8-HSL Applikation. Götz *et al.* (2007) kamen zu einem ganz ähnlichen Ergebnis, die Sättigung trat hier jedoch erst nach ca. 50 h ein. Um lose anhaftende AHLs zu entfernen, wurden die Wurzeln bei diesem Experiment wie bei Götz *et al.* (2007) mit dH₂O gewaschen, bevor die AHLs extrahiert und gemessen wurden. Da der Unterschied zwischen gewaschenen und ungewaschenen Wurzeln bei Götz *et al.* (2007) eher gering ausfiel, ist anzunehmen, dass der Anteil der lose an der Wurzeloberfläche anhaftenden AHLs eher gering ist.

Transport durch die Wurzel

Um heraus zu finden, ob und wenn ja, wie stark AHLs an die Wurzeloberfläche binden können, wurden Gerstenpflanzen in eine Halterung eingespannt, die Wurzeln auf einer Glasplatte ausgebreitet und nur direkt an der Spitze mit tritiierten AHLs behandelt. Die Wurzeln wurden dann nach 15 min, 30 min und 60 min geerntet und mit 25 % Acetonitril gespült, bevor sie auf einen Tritium-sensitiven Film gelegt wurden. Acetonitril wurde zum Spülen der Wurzeln gewählt, da es sich im Laufe der Experimente als das am besten geeignete Lösungsmittel für die AHLs erwies. Bereits nach 15 min waren sowohl C8-, als auch C10-HSL fest an die Wurzeloberfläche gebunden (Abbildung 3.3). Die Radioaktivität, die auf dem Film zu erkennen ist, stammt dabei nur von an der Oberfläche gebundenen AHLs. Da Tritium ein schwacher β -Strahler ist, dessen Strahlen Gewebe maximal 2 μ m weit durchdringen können, bleiben AHLs, die in das Wurzelinnere aufgenommen und transportiert wurden, auf dem Film verborgen. Aufgrund der Schwierigkeiten, einen geeigneten Marker für die tritiierten AHLs auf dem Film zu finden, kann die Menge gebundener AHLs nur geschätzt werden. Nach 60 min waren mindestens 1 % des eingesetzten C8-HSL und 2 % des eingesetzten C10-HSL an die Wurzeloberfläche gebunden. Zu jedem Zeitpunkt war in etwa doppelt so viel C10-HSL im Vergleich zu C8-HSL gebunden. Da die Menge an gebundenem AHLs so hoch und die Bindung gleichzeitig so stark ist, kann die AHL-

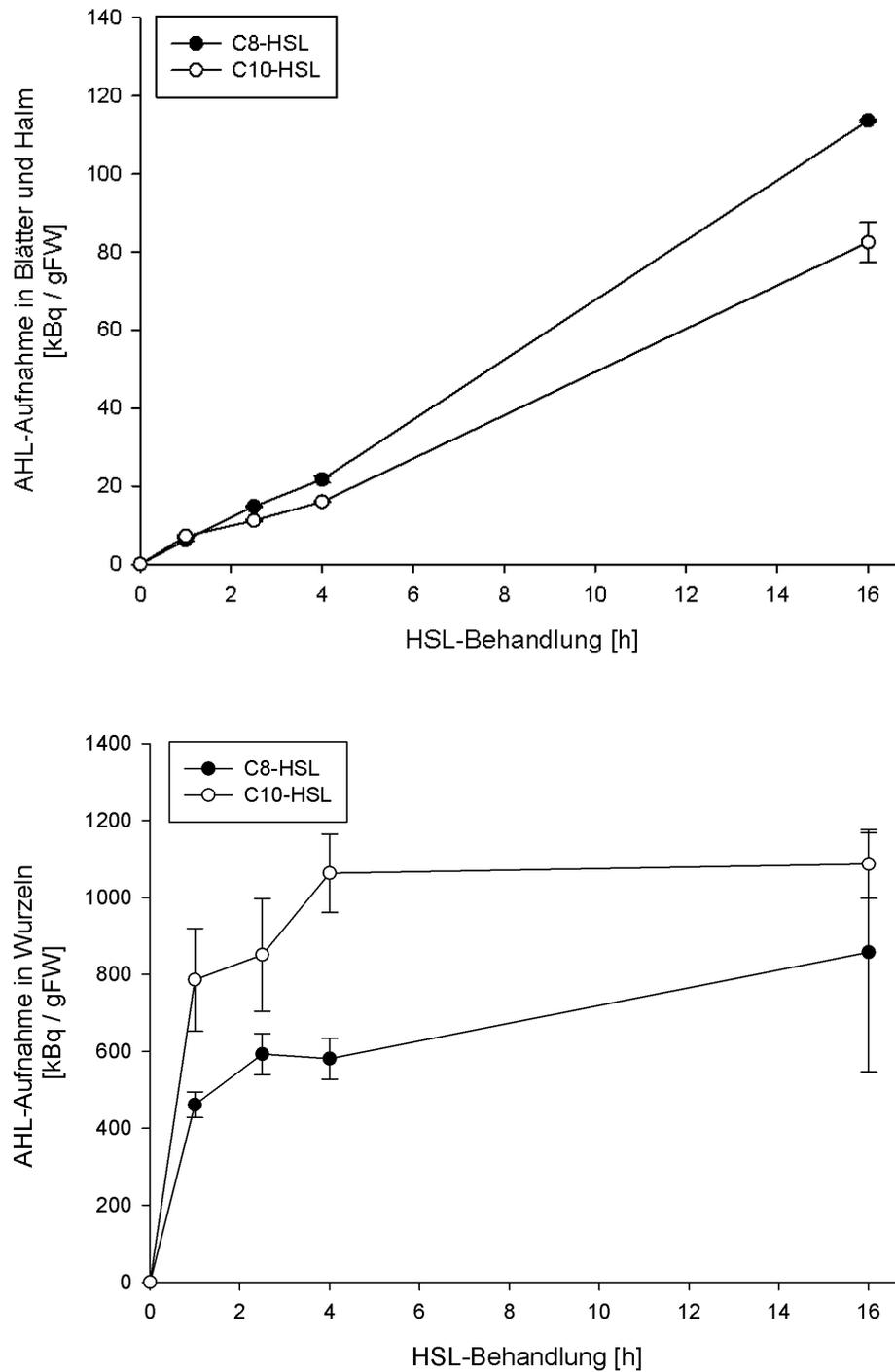


Abbildung 3.2 – Detektion von tritiierten AHLs mittels Flüssigkeitsszintillation im gesamten Spross (oben) und in der Wurzel (unten) über einen Zeitraum von 16 h im Vergleich. Die AHLs wurden mit 25 % Acetonitril aus dem pflanzlichen Gewebe extrahiert.

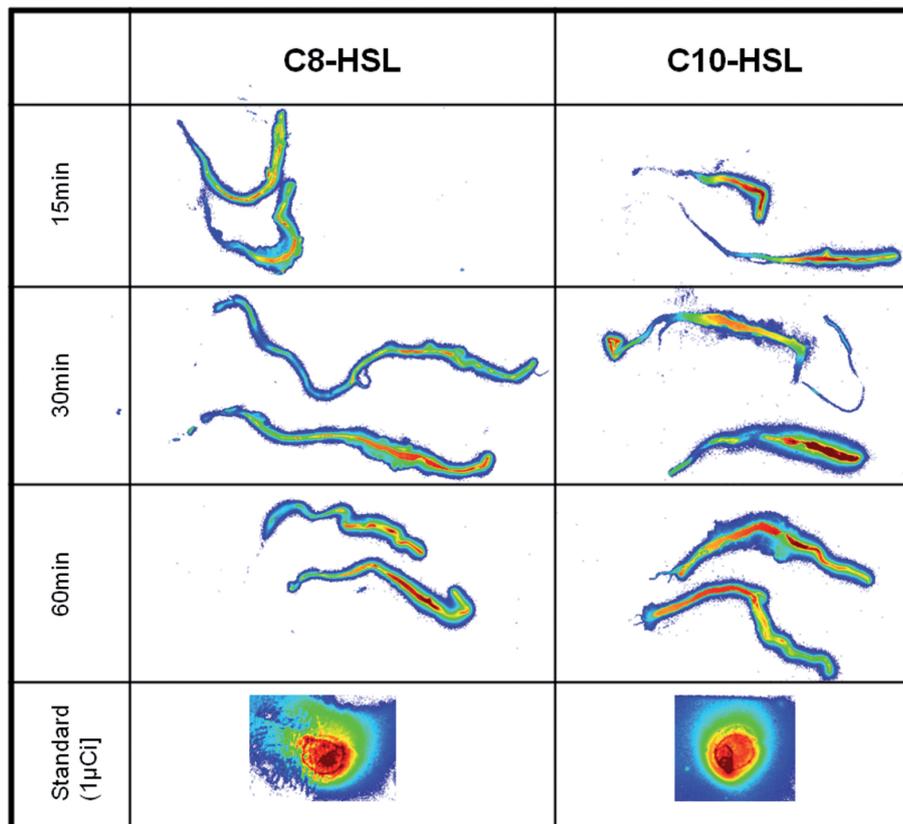


Abbildung 3.3 – Autoradiographie von tritiiertem C8- und C10-HSL auf der Wurzeloberfläche von *H. vulgare*. Die 10 μM und 10 μCi der jeweiligen AHLs wurden an der Wurzelspitze appliziert. Die einzelnen Wurzeln wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, mit Acetonitril gespült und auf den Tritium-sensitiven Film gelegt. Die Stärke des radioaktiven Signals wird im Bild durch die Farbe dargestellt: blau bzw. weiß = geringe Radioaktivität <grün <gelb <rot <dunkelrot = hohe Radioaktivität.

Aufnahme in die Wurzel und der Wurzeltransport mit der herkömmlichen Methode nicht bestimmt werden, da oberflächengebundenes AHL den eigentlichen Transport maskiert.

Der Wurzeltransport wurde aus diesem Grund mit Hilfe einer Pitman-Kammer untersucht (Pitman, 1971). Da die Kammer in unterschiedliche Kompartimente geteilt werden kann, ist es möglich, die Wurzeln so einzuspannen, dass nur ein kleiner Teil der Wurzeloberfläche - nämlich die Wurzelspitze - in Kontakt mit der AHL-Lösung kommt (siehe Abbildung 2.5). Durch regelmäßige Entnahme von Flüssigkeit aus dem Kompartiment, in dem sich das abgeschnittene Ende der Wurzel befindet, kann festgestellt werden, ob und in welchem Umfang die zu untersuchende Substanz durch die Wurzeln transportiert wird. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, dass die abgeschnittene Wurzelbasis nicht zu weit in das dritte Kompartiment reicht, um zu verhindern, dass die transportierten AHLs an die Oberfläche der Wurzel binden. Durch diesen experimentellen Aufbau war es möglich zu zeigen, dass

der AHL-Transport durch die Wurzel ebenfalls linear verläuft (siehe Abbildung 3.4). In diesem System wurden 0,2 % der eingesetzten C8-HSL Menge und 0,1 % des eingesetzten C10-HSL innerhalb von 24 h durch die Wurzel in das dritte Kompartiment transportiert. Dies entspricht in etwa einem Zehntel der an der Wurzeloberfläche gebundenen AHLs.

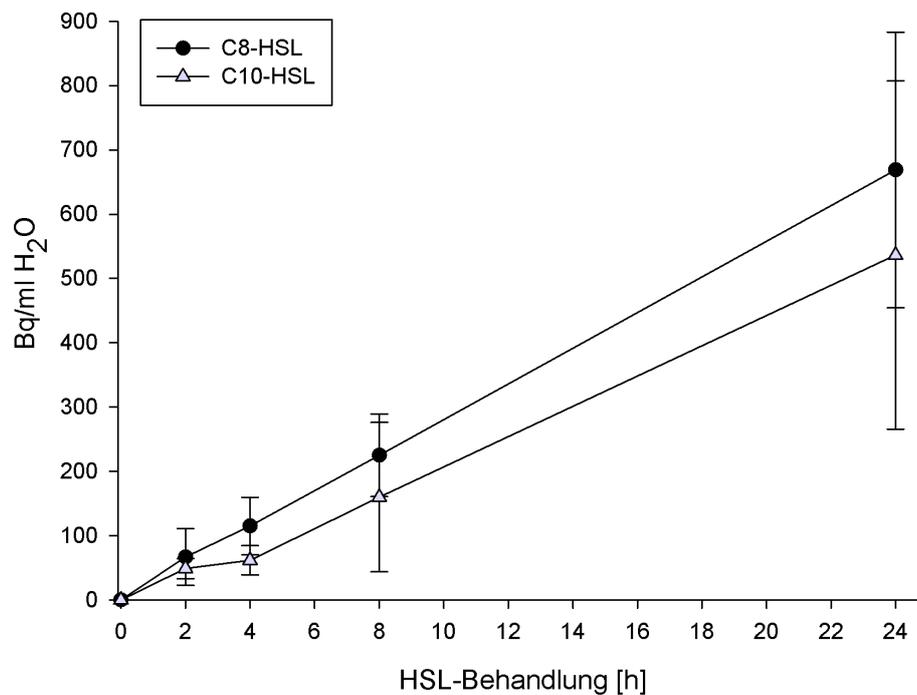


Abbildung 3.4 – Linearer Transport von C8- und C10-HSL durch die Wurzel in der Pitman-Kammer. 10 μ M und 100 μ Ci C8- bzw. C10-HSL wurden in das Kompartiment mit den Wurzelspitzen appliziert. Die Probenahme erfolgte aus dem Kompartiment mit den abgeschnittenen Wurzelbasen.

Ob der Transport symplastisch oder apoplastisch erfolgt, kann durch Zugabe von KCl getestet werden. Eine 110 mM KCl-Lösung hemmt den Transport durch Plasmodesmata, da sich diese nach der KCl-Zugabe schließen (Diekmann, 2005). Der Zusatz der KCl-Lösung erfolgte 4 h nach Start des Versuches, um den Wurzeln ausreichend Zeit lassen, sich zu akklimatisieren und damit der Transport der AHLs durch die Wurzeln bereits etabliert war. Der Transport durch die Wurzeln wurde durch die KCl-Zugabe relativ zeitnah gestoppt (siehe Abbildung 3.5 oben). Zwischen den Zeitpunkten von 4 h bis 8 h war keine nennenswerte Zunahme an Radioaktivität im dritten Kompartiment feststellbar. Gegen Ende des Versuches war zwar ein leichter Anstieg zu beobachten, die Radioaktivität erreichte jedoch nicht das Niveau eines ungehemmten Transportes.

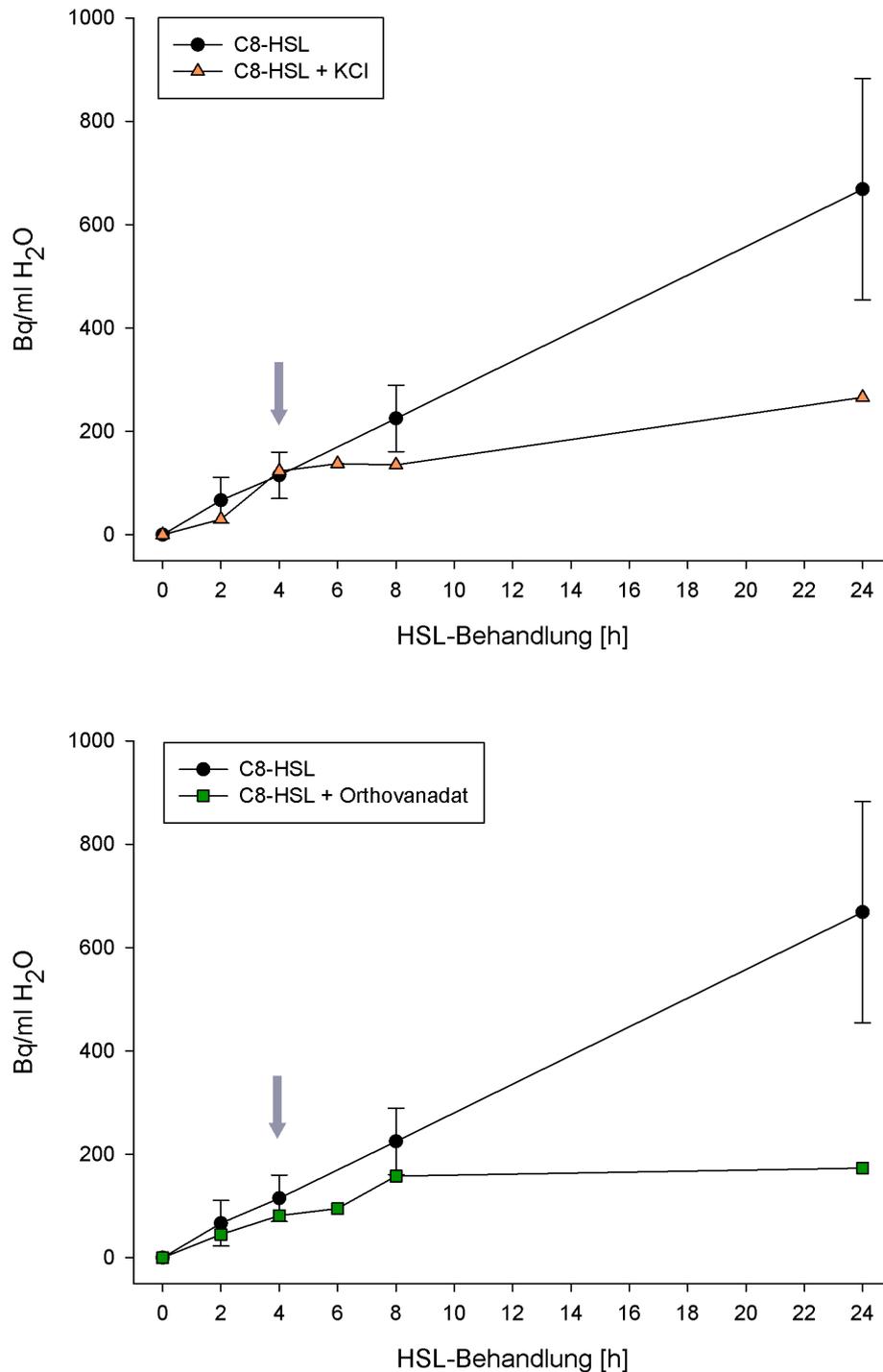


Abbildung 3.5 – Hemmung des AHL-Transports durch Zugabe von KCl (oben) und der AHL-Aufnahme durch Zugabe von Orthovanadat (unten) in die Wurzel von *H. vulgare*. 10 μ M und 100 μ Ci C8-HSL wurde in das erste Kompartiment der Pitman-Kammer zu den Wurzelspitzen gegeben. Die Probenahme erfolgte aus dem Kompartiment mit den abgeschnittenen Wurzelbasen. Orthovanadat wurde in das erste Kompartiment mit den Wurzelspitzen appliziert, KCl in das zweite Kompartiment. Der Pfeil zeigt den genauen Zeitpunkt der Zugabe der jeweiligen Substanz an.

Eine mögliche aktive Aufnahme von AHLs kann durch die Zugabe von Orthovanadat gehemmt werden. Die Struktur von Orthovanadat ähnelt der des ATP und kann auf diese Weise ATP-abhängige ABC-Transporter binden und dadurch blockieren. Orthovanadat wurde ebenfalls erst 4 h nach Versuchsbeginn zu dem Kompartiment mit den Wurzelspitzen gegeben. Nach der Zugabe von Orthovanadat konnte man weitere 4 h lang eine Zunahme an tritiierten C8-HSL im dritten Kompartiment messen. Danach fand jedoch keine weitere Zunahme an Radioaktivität bis zum Versuchsende statt. Vermutlich wurden bereits in das Wurzelinnere aufgenommene AHLs erst weiter bis zur Wurzelbasis transportiert. Die Blockierung der AHL-Aufnahme erscheint also leicht verzögert. Die Hemmung der AHL-Aufnahme war bis zum Ende des Versuchs stabil.

Die Hemmung des Transports durch KCl lässt bereits erahnen, dass der Transport der AHLs durch die Wurzel hauptsächlich symplastisch über den Zentralzylinder funktioniert. Um dies zu verifizieren, wurden Wurzelquerschnitte von mit tritiierten AHLs behandelten Pflanzen hergestellt und die Querschnitte auf dem Tritium-sensitiven Film inkubiert. Da die Wurzeln von jungen Gerstenpflanzen zu filigran sind, um qualitativ hochwertige Kryo-Schnitte herzustellen, wurden für diesen Versuch Maiskeimlinge verwendet. Nach 1-stündiger Inkubation mit tritiierten C8- bzw. C10-HSL wurden die Querschnitte kurz hinter der Wurzelspitze, vom mittleren Teil der Wurzel und der Wurzelbasis mit einem Kryotom angefertigt und nach kurzfristiger Lagerung auf Trockeneis sofort auf einen Tritium-sensitiven Film gelegt. Sowohl C8- als auch C10-HSL konnten in den Querschnitten der Wurzelspitze und der Wurzelmitte detektiert werden (siehe Abbildung 3.6). Erwartungsgemäß war das Signal an der Wurzelspitze am stärksten und wurde zur Mitte der Wurzel hin schwächer. Lediglich in den Querschnitten der Wurzelbasis konnte keines der beiden AHLs gemessen werden. Auffällig ist, dass die stärkste Radioaktivität bei allen Querschnitten im Zentralzylinder der Wurzel zu finden war. In den Querschnitten der Wurzelspitze - im Gegensatz zu den Querschnitten aus dem mittleren Bereich der Wurzel - waren auch Signale außerhalb des Zentralzylinders sichtbar. Die Signale im Zentralzylinder waren aber auch hier wesentlich stärker. Man kann folglich davon ausgehen, dass beide AHLs in den Wurzeln hauptsächlich durch die Leitgefäße des Zentralzylinders transportiert werden.

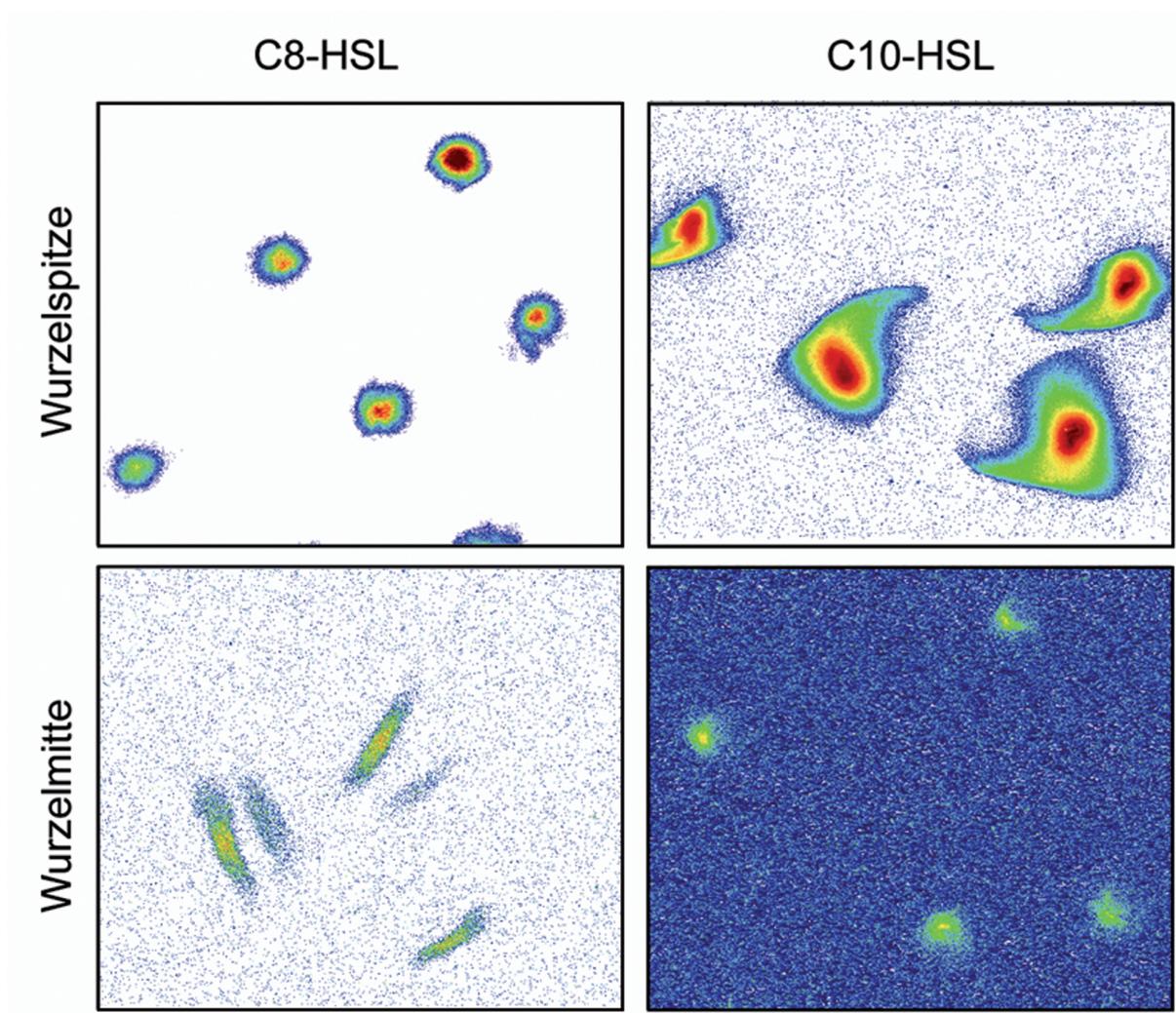


Abbildung 3.6 – Autoradiographie von Wurzelquerschnitten von mit tritiierten C8- bzw. C10-HSL (10 μ M und 20 μ Ci) behandelten Maiskeimlingen. Die Querschnitte wurden kurz hinter der Wurzelspitze bzw. von der Wurzelmittle angefertigt. Die Stärke des radioaktiven Signals wird im Bild durch die Farbe dargestellt: blau bzw. weiß = geringe Radioaktivität <grün <gelb <rot <dunkelrot = hohe Radioaktivität.

3.1.2 AHL-Detektion mit Sensorstämmen

Durch die oben geschilderten Experimente mit tritiierten AHLs wurde deutlich, dass die AHLs in den Wurzeln hauptsächlich symplastisch im Zentralzylinder transportiert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich der Hauptteil der in die oberen Pflanzenteile transportierten AHLs im Halm befindet. Man kann also schließen, dass die AHLs auch im grünen Teil der Pflanze hauptsächlich über die Leitgefäße des Xylems transportiert werden. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Halm von Gerstenpflanze nach 4-stündiger Inkubation mit 10 μ M C8- bzw. C10-HSL geerntet und der Apoplastensaft, wie unter 2.2.6 beschrieben, extrahiert. Gleichzeitig sollte mit diesem Versuch geklärt

werden, ob tatsächlich nicht-metabolisiertes AHL in den Halmen transportiert wird. Da bei den tritiierten AHLs die Tritiummarkierung gleichmäßig über das gesamte Molekül verteilt war, ist es nicht möglich zu erkennen, ob das Molekül in der Pflanze in irgend einer Art verändert wurde. Um die Möglichkeit der Bildung von Metaboliten auszuschließen, wurde ein sensitiver Biotest verwendet. Bakterielle Sensorstämme reagieren spezifisch auf ihre jeweiligen AHLs - nicht aber auf AHL-Metabolite. Zur Detektion von C8-HSL wurde der bakterielle Sensorstamm *S. liquefaciens* MG44 gewählt. Dieser geht aus dem Wildtypstamm *S. liquefaciens* MG1 hervor und ist selbst nicht in der Lage, AHLs zu produzieren, wurde aber mit dem Sensorkonstrukt pBAH9 ausgestattet. Damit können AHLs mit einer Kettenlänge zwischen C4- C14 durch die Fluoreszenz des an das Konstrukt gekoppelten grün fluoreszierenden Proteins bei 520 nm nach Anregung mit einer Wellenlänge von 490 nm detektiert werden. Um die Stabilität des Tests zu überprüfen, wurde bei jedem Versuch eine Standardkurve aus C8-HSL erstellt und ebenfalls gemessen. Der Test war robuster, wenn das Inokulum für die Übernachtskultur direkt aus der Glycerinkultur entnommen wurde. Des Weiteren erhöhte sich das Fluoreszenzsignal, wenn die Kultur nach dem Messen für 24 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubierte und danach erneut gemessen wurde, ohne die Platte nochmals zu schütteln. Die Fluoreszenz erhöhte sich dabei nur in den Proben, in denen sich AHLs befunden haben, nicht aber in den Kontrollen oder Blindwerten. Nach weiteren 24 h erhöhte sich das Fluoreszenzsignal nochmals. Da dabei aber auch Kontrollen und Blindwerte von der Signalverstärkung betroffen waren, wurden in weiteren Versuchen alle Platten maximal 24 h nach der ersten Messung erneut gemessen (siehe Abbildung 6.1 im Anhang). Mit Hilfe dieses Versuchsverlaufs konnten C8-HSL Standardkonzentrationen bis 0,1 μM detektiert werden. Nach der Analyse der Proben und der jeweiligen Kontrollen konnte C8-HSL mit dem Sensorstamm im Apoplastensaft von Gerste nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.7). Da die Standardkurve jedoch nicht linear ist, kann sie nicht zur Quantifizierung des in die Pflanze transportierten AHLs genutzt werden. Dennoch waren die Proben bei allen Wiederholungen deutlich von den Kontrollen und Blindwerten zu unterscheiden. Die Konzentration im Apoplastensaft muss außerdem weniger als 1 μM betragen haben. Nach der Isolierung des Apoplastensaftes wurden die Halme weiter, wie unter 2.2.3 beschrieben, mit 25 % Acetonitril extrahiert, um C8-HSL, das nicht im Zentralzylinder transportiert wurde sondern an die Zelloberflächen gebunden hatte, zu detektieren. Auch im Halmmaterial konnte C8-HSL - in geringerem Maße als im Apoplastensaft selbst - detektiert werden (siehe Abbildung 3.7). Die Apoplastensaft- und Halmkontrollen zeigten gegenüber dem Blindwert keine erhöhte Fluoreszenz.

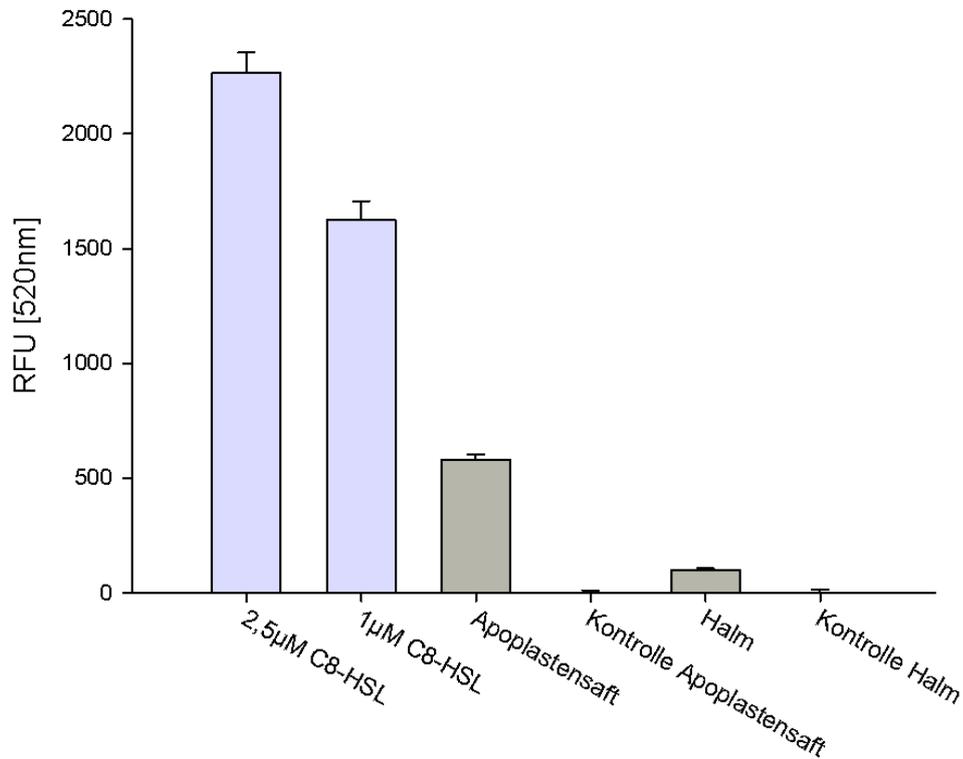


Abbildung 3.7 – Nachweis von C8-HSL in Apoplastensaft und im Halmmaterial von *H. vulgare* mit Hilfe des Sensorstamm *S. liquefaciens* MG44. Gerstenpflanzen wurden dazu 4 h lang mit 10 µM C8-HSL inkubiert, danach wurden die Halme geerntet und die AHLs extrahiert.

Die Anwesenheit von C10-HSL im Apoplastensaft konnte nicht mit bakteriellen Sensorstämmen bestätigt werden. Mit *S. liquefaciens* MG44 können AHLs mit einer Kettenlänge zwischen C4-C14 detektiert werden, die Sensitivität gegenüber C10-HSL war aber, verglichen mit der Sensitivität gegenüber C8-HSL, insbesondere bei niedrigen Konzentrationen stark herabgesetzt (siehe Abbildung 3.8). Daraufhin wurde ein weiterer AHL-Sensorstamm verwendet. *Pseudomonas putida* F117 ist ebenfalls ausgestattet mit einem gfp-Sensorbaustein (pKR-C12), welches besonders sensitiv gegenüber mittel- bis langkettigen AHLs von C10-C14 ist. Dieser Sensorstamm konnte ebenfalls nicht verwendet werden, da er zwar eine hohe Sensitivität gegenüber oxo-C10-HSL hatte, C10-HSL aber fast nicht detektieren konnte (siehe Abbildung 3.8). C10-HSL wurde daraufhin in einem weiteren Versuch mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern in den Gerstenpflanzen detektiert (siehe Abschnitt 3.1.3).

Neben der Detektion von synthetischen AHLs in den Pflanzen wurde auch versucht, AHLs aus an der Wurzel lebenden Bakterienkulturen im Apoplastensaft nachzuweisen. Der

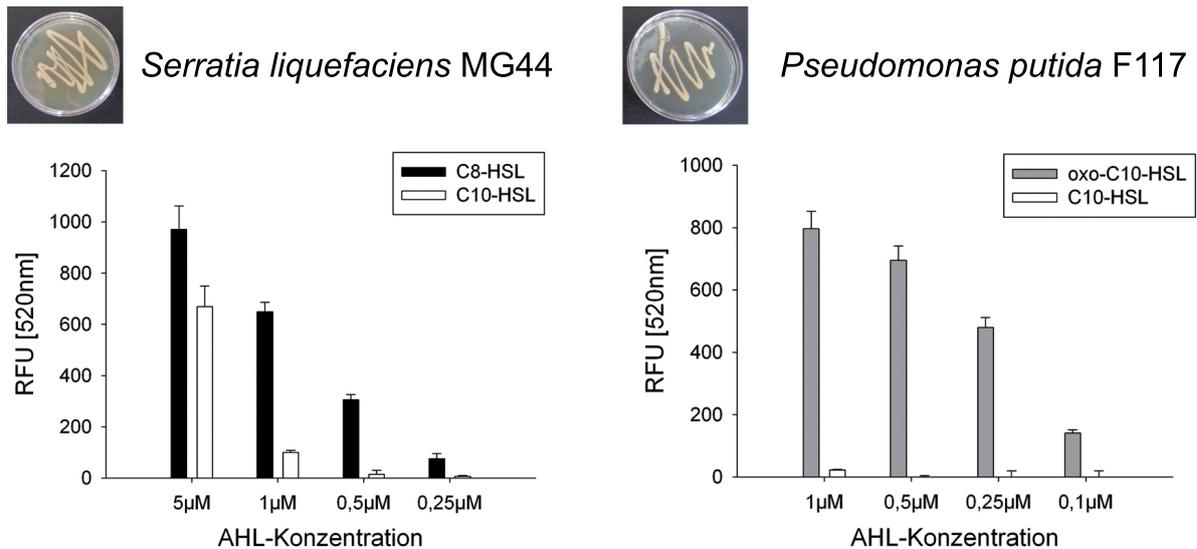


Abbildung 3.8 – Standardkurven der detektion von C10-HSL mit den Sensorstämmen *S. liquefaciens* MG44 und *P. putida* F117.

Wildtypstamm *S. liquefaciens* MG1 ist in der Lage, AHLs (vor allem C4- und C6-HSL) zu produzieren. Schuegger *et al.* (2006) haben gezeigt, dass *S. liquefaciens* die Rhizosphäre von Tomatenpflanzen gut kolonisieren kann. Als Teilprojekt dieser Arbeit wurde eine Diplomarbeit (Bernhard Nägele, LMU-München) durchgeführt und betreut, die sich mit der Interaktion zwischen AHL-produzierenden *S. liquefaciens* mit Gerstenpflanzen beschäftigte. Dabei wurde festgestellt, dass *S. liquefaciens* die Rhizosphäre von Gerste ebenfalls sehr gut kolonisiert (siehe Abschnitt 3.2.3). Um in die Pflanze aufgenommene AHLs zu detektieren, die von an der Wurzel lebenden Bakterien stammen, wurden drei Tage alte, oberflächensterilisierte Gerstenkeimlinge mit $1 \cdot 10^9$ *S. liquefaciens* MG1 Zellen pro ml Puffer inokuliert und in das Reagenzglassystem überführt. Die Pflanzen wurden nach 4, 7 und 11 Tagen geerntet und der Apoplastensaft aus diesen extrahiert. Zusätzlich wurde auch die Wurzel geerntet und die AHLs aus diesen und aus den Wurzeln anhaftenden Glasperlen, wie unter 2.2.6 beschrieben, mit Ethanol isoliert. Die Kontrollpflanzen wurden alle am Tag 11 nach der Inokulation geerntet. Alle Extrakte wurden mit dem Sensorstamm *S. liquefaciens* MG1 analysiert. In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse samt dazugehöriger Standardkurve aus C8-HSL zu sehen. Der Sensorstamm reagierte auf sterilfiltrierte Kulturüberstände des MG1-Stammes ebenfalls mit erhöhter Fluoreszenz. Im Ethanolextrakt - also an den Glasperlen, die die Wurzeln unmittelbar umgaben - war eine erhöhte Fluoreszenz an Tag 4 und an Tag 7 zu beobachten. Der Wurzelextrakt zeigte nur an Tag 4 erhöhte Fluoreszenz. Im Apoplastensaft konnte keine erhöhte Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Die Fluoreszenzwerte von Tag 4 waren niedriger als die Kontrollwerte. Dies liegt daran, dass die Pflanzen am Tag 4 nach der Inokulation noch

recht klein waren, und der Apoplastensaft nicht in ausreichender Menge extrahiert werden konnte.

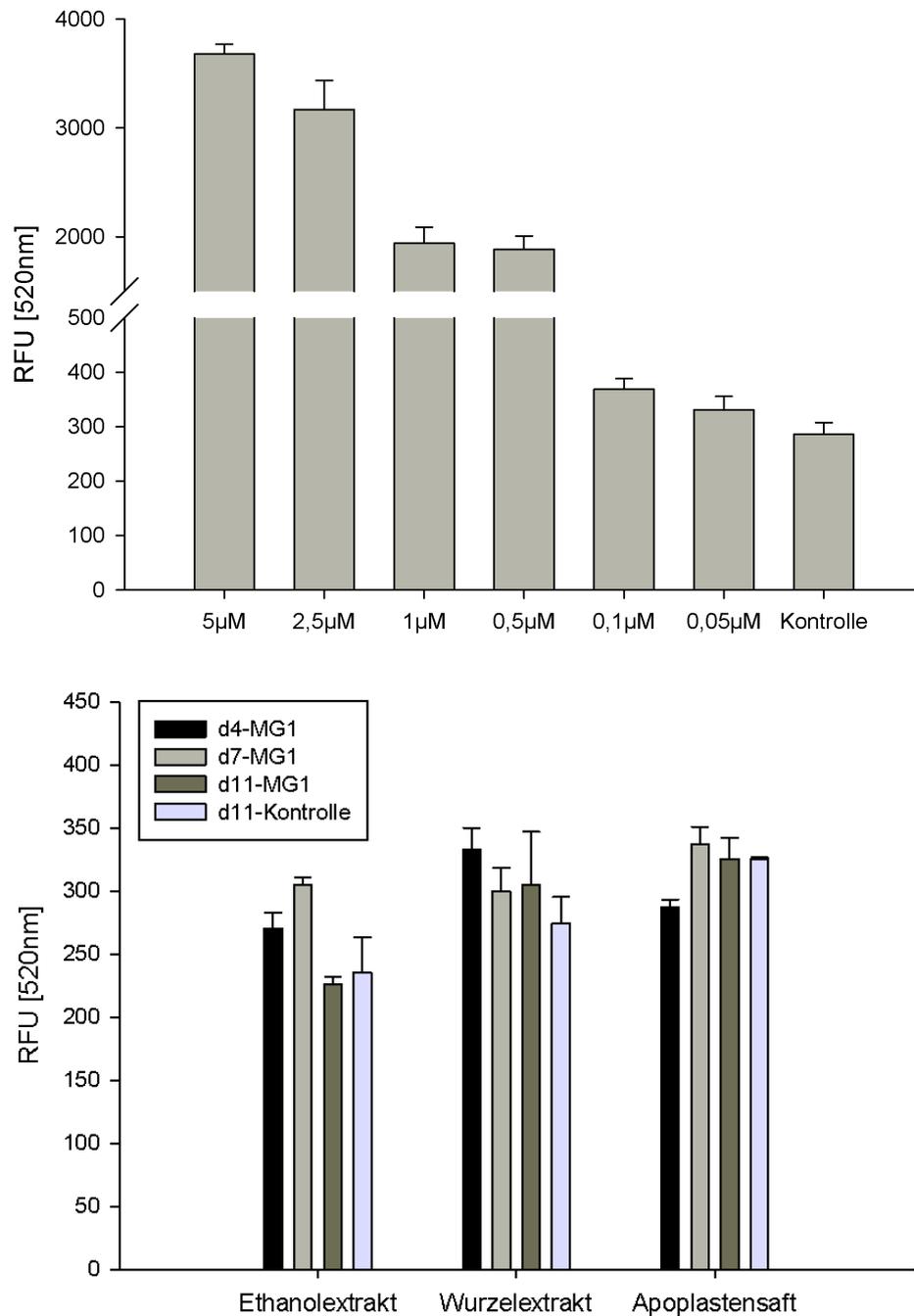


Abbildung 3.9 – Nachweis von AHLs aus *S. liquefaciens* MG1 in Gerste mit Hilfe des Sensorstammes *S. liquefaciens* MG44. Es wurden Proben vom Apoplastensaft, der Gerstenwurzel selbst und dem der Wurzel direkt umgebenden Glasperlen (=Ethanol-extrakt) genommen. Zu beachten ist, dass die Y-Achse der oberen Abbildung stark gestaucht ist.

Von allen anderen Proben wurden 250 µl Apoplastensaft zu der MG44-Kultur hinzu gegeben. Bei den Proben von Tag 4 wurde die Apoplastensaftprobe mit LB-Medium verdünnt, so dass diese das gleiche Volumen wie die restlichen Proben enthielten. Der Apoplastensaft selbst enthält Nährstoffe wie Zucker und Peptide, was dazu führt, dass die MG44-Kultur stärker wächst, wenn Apoplastensaft hinzugegeben wird. Eine höhere Zellzahl erhöht wiederum die Autofluoreszenz der Kultur, weshalb das Verdünnen des Apoplastensafte am Tag 4 zu einer niedrigeren Fluoreszenz dieser Probe führte. Dennoch konnten zumindest an Tag 4 und Tag 7 von *S. liquefaciens* MG1 produzierte AHLs in der Rhizosphäre der Gerste detektiert werden. Das Versuchssystem muss allerdings weiterhin optimiert werden, um festzustellen, wann und unter welchen Bedingungen *S. liquefaciens* MG1 AHLs an der Wurzel produziert. So könnte man herausfinden, wann der optimale Zeitpunkt für eine Apoplastensaftextraktion ist und somit zu welchem Zeitpunkt eine AHL-Detektion im Apoplastensaft am vielversprechendsten wäre.

3.1.3 AHL-Detektion mit monoklonalen Antikörpern

C10-HSL wurde, wie bereits unter 3.1.2 erwähnt, mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (mAb) detektiert. Im Unterschied zu konventionellen analytischen Methoden benötigt man beim ELISA Test nur relativ geringe Probenvolumina (Chen *et al.*, 2010b). Die bisher vorhandenen mAb sind alle unterschiedlich sensitiv gegenüber den verschiedenen AHLs und „Coating“-Antigenen. Der Test gegen C10-HSL basiert auf dem sogenannten „Coating-Antigen-Format“ und wurde mit dem „Coating“-Antigen HSL3-OVA^{1/4} und dem mAb HSL4-6D3 in den entsprechenden Verdünnungen und Inkubationszeiten durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.8). Die optimalen Verdünnungen der einzelnen Reagenzien wurden mittels 2D-Titration ermittelt. Im „Coating-Antigen-Format“ wird die Konzentration an AHLs indirekt über eine Verdrängungsreaktion gemessen. In einem separaten Schritt werden die AHLs mit den mAb zusammen inkubiert. Je höher die Konzentration an AHLs, desto mehr mAb werden gebunden und sind somit nicht mehr frei verfügbar für die Bindung des „Coating“-Antigens auf der ELISA-Platte im nächsten Inkubationsschritt. Deshalb ist die gemessene OD bei 450 nm bei niedrigen AHL-Konzentrationen am höchsten und bei hohen AHL-Konzentrationen am niedrigsten. Die Standardkurve folgt einer sogenannten 4-Parameter-Kurve; der Testmittelpunkt (C) beschreibt den Wendepunkt der Kurve. Zu analysierende Proben müssen im linearen Bereich der Kurve liegen, um quantitativ bestimmt werden zu können.

Beim Etablieren eines neuen ELISA-Tests ist der sogenannten Matrix-Effekt zu beachten (siehe Abbildung 3.10 oben). Oft verschiebt sich der Testmittelpunkt, aber auch die maximale bzw. minimale OD der Standardkurve in Abhängigkeit von der Matrix, in der die Analyten gelöst wurden. Da die zu untersuchenden Proben aus Apoplastensaft von

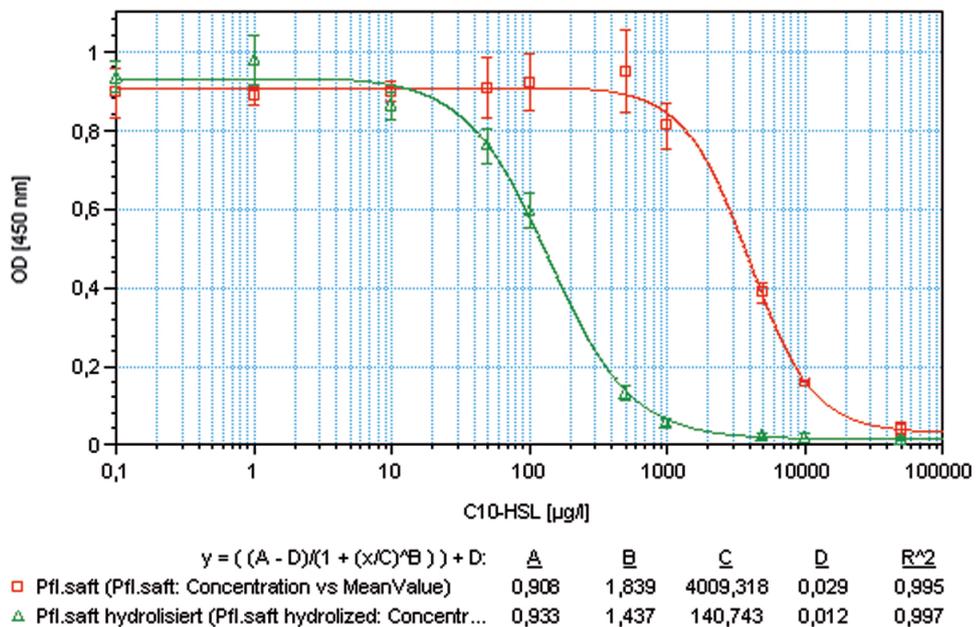
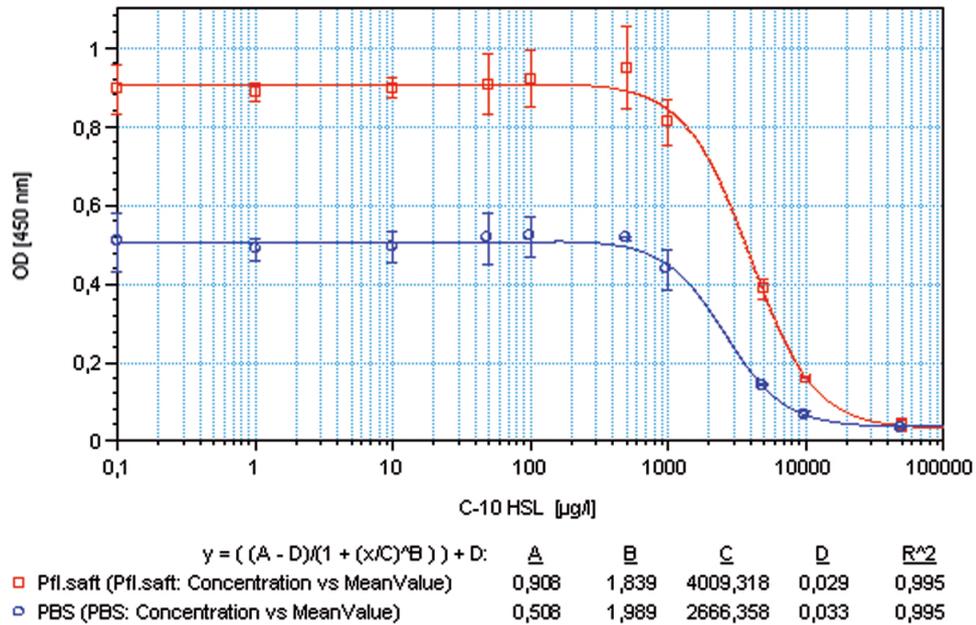


Abbildung 3.10 – Einfluss der Matrix (oben) und der Hydrolisierung der AHLs (unten) auf die Standardkurve beim ELISA-Test. Oben: C10-HSL Standards angesetzt in PBS-Puffer (blau) und angesetzt in 1 : 5 verdünnten Apoplastensaft (rot). Unten: nicht-hydrolysierte C10-HSL Standards (rot) und hydrolysierte C10-HSL Standards (grün) angesetzt in 1 : 5 verdünnten Apoplastensaft.

Gerste bestanden, wurde auch die C10-HSL Standardkurve in Apoplastensaft erstellt. Als optimal erwies sich dabei eine Verdünnung des Apoplastensaftes mit PBS-Puffer im Verhältnis von 1 : 5. Im Gegensatz zu der Standardkurve in PBS-Puffer verschlechterte sich der Testmittelpunkt etwa um den Faktor 1,5; die maximale OD erhöhte sich aber von 0,5 in PBS-Puffer auf 0,9 in Apoplastensaft, ohne dass die Blindwerte beeinflusst wurden. Eine weitere Eigenschaft der derzeit zur Verfügung stehenden mAb ist ihre erhöhte Sensitivität gegenüber den korrespondierenden Homoserinen (Chen *et al.*, 2010b). Nach Hydrolyse der im verdünnten Apoplastensaft gelösten C10-HSL Standards verbesserte sich der Testmittelpunkt um den Faktor 28 (siehe Abbildung 3.10 unten). Durch weitere Optimierung konnte der Testmittelpunkt schließlich auf einen Wert von 58 µg/l verschoben werden (siehe Abbildung 3.11 rechts), ohne dass sich die maximalen ODs oder die Blindwerte veränderten. Da zu erwarten war, dass die Konzentration an C10-HSL im Apoplastensaft nur sehr gering

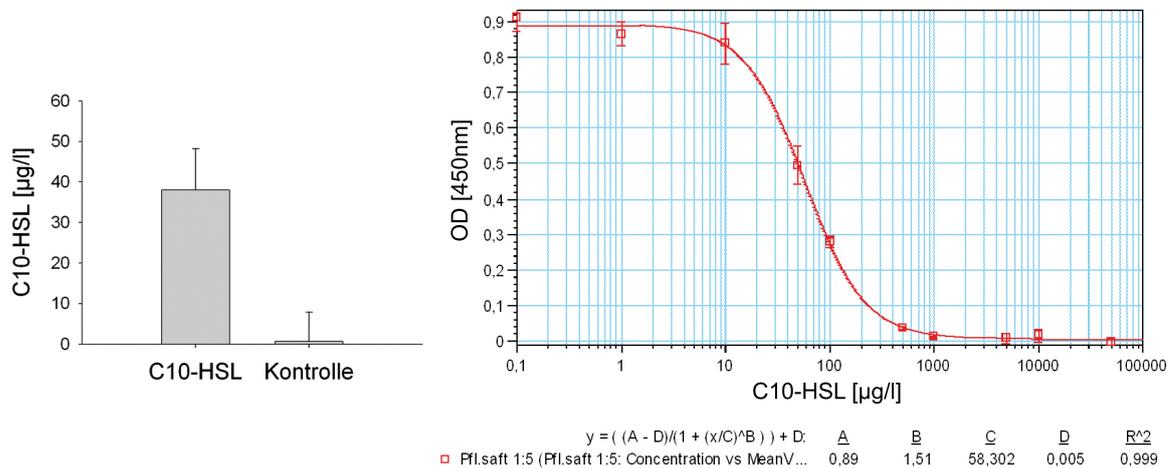


Abbildung 3.11 – Nachweis von C10-HSL in Apoplastensaft mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Gerstepflanzen wurden 4 h lang mit 10 µM C10-HSL inkubiert, die Halme anschließend geerntet und der Apoplastensaft extrahiert. Links sind die Messungen der Apoplastensaftproben zu sehen, rechts die dazugehörige Standardkurve mit hydrolysierten C10-HSL Standards.

ausfällt, wurden die Proben und die Standards vor der Messung hydrolysiert. Um sicher zu gehen, dass sich die Proben im linearen Bereich der Standardkurve befinden, wurden sie zusätzlich dotiert (50 µg/l, 100 µg/l und 200 µg/l). Die Dotierung wurde anschließend vom Messwert subtrahiert. Mit dieser Methode konnte C10-HSL im Apoplastensaft von Gerste detektiert werden (siehe Abbildung 3.11). Die C10-HSL Konzentration betrug nach Abzug der Dotierung 38 µg/l in den Proben der inokulierten Pflanzen. Nach Einberechnung der Verdünnung ergibt das eine Konzentration von 190 µg/l bzw. 0,7 µM C10-HS im Apoplastensaft. Da Gersten keine Lactonasen besitzen (Götz *et al.*, 2007) und der Apoplastensaft

einen leicht sauren pH-Wert hat, ist zu erwarten, dass das aufgenommene C10-HSL in seiner nicht-hydrolysierten Form in der Pflanze vorlag.

3.2 Enzymaktivitäten

Viele Enzyme in Pflanzen reagieren auf abiotische und biotische Einflüsse mit veränderter Expression bzw. veränderter Enzymaktivität, wobei letztere auch auf posttranskriptionalen Veränderungen basieren können. Da die Interaktion von Pflanzen mit Mikroorganismen oft mit der Produktion von ROS in Zusammenhang steht, ist eine veränderte Expression bzw. Enzymaktivität antioxidativer Enzyme zu erwarten.

Um zu determinieren, wann erste Veränderungen nach AHL-Applikation in den ober- und unterirdischen Pflanzenteilen eintreten, wurden die Gerstenpflanzen in einer Kurzzeitkinetik mit C6-bzw. C8-HSL inkubiert und nach 2 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h geerntet. In einer zweiten Langzeitkinetik sollte verifiziert werden, ob sich die Enzymaktivitäten über den Zeitraum von 17 Tagen noch weiter verändern. Die Pflanzen wurden hierfür 1, 3, 5, 10 und 17 Tage nach AHL-Behandlung geerntet. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

3.2.1 Kurz- und Langzeitkinetik antioxidativer Enzyme

Reaktive Sauerstoffspezies werden außer im Chloroplasten während der Photosynthese auch von im Plasmalemma befindlichen NADPH-Oxidasen als Reaktion auf verschiedene Stressauslöser produziert, darunter auch Mikroorganismen (Sagi and Fluhr, 2006). Die entstandenen Superoxidionen müssen wegen ihrer hohen Reaktivität gegenüber Lipiden und Proteinen möglichst schnell entgiftet werden. Ihre Entgiftung erfolgt über die Enzyme des antioxidativen Stoffwechsels (siehe Abbildung 1.10). Aus diesem Grund wurden ausgewählte Enzyme des antioxidativen Stoffwechsels in einer Kurz- und Langzeitkinetik nach C6- bzw. C8-HSL Applikation untersucht. Da in der Langzeitkinetik auch Daten für den Tag 1 und in der Kurzzeitkinetik für 24 h erhoben wurden, war es möglich, die Graphen der einzelnen Experimente miteinander zu verrechnen. Da sämtliche Aktivitäten in % der Kontrollen angegeben wurden, um die Veränderungen der verschiedenen Enzymaktivitäten in den unterschiedlichen Geweben vergleichbar zu machen, sind die Aktivitäten der Kontrollpflanzen bezogen auf die Proteinkonzentration in Tabelle 3.1 angegeben.

Auch hier sind die Aktivitäten in den Wurzeln - angegeben in $\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein - meist höher als in den Blättern (Ausnahme: CAT). Dabei ist zu beachten, dass die Proteinkonzentration der Wurzelextrakte vielfach geringer war als die der Blattextrakte. Nach der wie unter 2.2.9 durchgeführten Proteinextraktion hatten die Wurzelrohextrakte laut

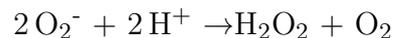
Bradfordmessung eine durchschnittliche Proteinkonzentration von $0,05 \pm 0,005$ mg/ml. Die durchschnittliche Proteinkonzentration der Blattrohextrakte betrug $0,89 \pm 0,08$ mg/ml. Die Proteinkonzentration der Extrakte war dabei unabhängig von der Behandlung der Pflanzen.

Tabelle 3.1 – Mittelwerte der Grundaktivitäten ausgewählter antioxidativer Enzyme angegeben in $\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein \pm SE in Wurzel- und Blattgewebe von Kontrollpflanzen ($n =$ mindestens 13).

	SOD	CAT	APOX	GR	POX
Wurzel	$0,46 \pm 0,07$	619 ± 110	$13,7 \pm 1,0$	$3,0 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,5$
Blätter	$0,11 \pm 0,02$	1033 ± 139	$0,48 \pm 0,12$	$0,90 \pm 0,12$	$0,12 \pm 0,02$

Superoxiddismutase

SODs (SOD, EC 1.15.1.1) kommen in fast allen aeroben Organismen vor und katalysieren die Dismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff.



Diese Reaktion kann zwar ebenfalls spontan ohne SOD ablaufen, allerdings wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch das Enzym 3-4-fach beschleunigt. SODs kann man in allen Zellorganellen, aber auch im Cytoplasma und im Apoplasten finden (Alscher *et al.*, 2002; Mittler, 2002; Palma *et al.*, 2006).

So wurde auch in dieser vorliegenden Arbeit erwartet, dass die SOD-Aktivität gleich nach der Applikation des AHL-Signals induziert werden würde. Die Beobachtungen bestätigen diese Hypothese jedoch zuerst nicht bzw. nur zum Teil.

Bereits zwei Stunden nach C6-HSL Applikation war die SOD-Aktivität in den Blättern um -21 % und in den Wurzeln um -27 % reduziert. Innerhalb der ersten 24 h sank die SOD-Aktivität in den Wurzeln weiter bis auf -44 %. Sie stieg aber mit andauernder Inkubationszeit auf bis zu 145 % der Kontrollaktivität an Tag 10 an. Am Tag 17 der Inkubation war die Aktivität wieder um -20 % im Vergleich zu den Kontrollpflanzen reduziert.

Die SOD-Aktivität in den Blättern wurde durch die Inkubation mit C6-HSL sogar noch dramatischer beeinflusst. Die Aktivität in behandelten Pflanzen erreichte ihr Maximum am Tag 5 mit 390 % der Aktivität der Kontrollen. Auch am Tag 17 war sie noch immer um den Faktor 2,5 höher (siehe Abbildung 3.12) als die der Kontrollpflanzen.

Auch nach der Applikation von C8-HSL war die SOD-Aktivität in den Wurzeln und in den Blättern bereits nach 2 h um -20 % und -19 % reduziert. Interessanterweise entwickelten sich die Aktivitäten in den Wurzeln und in den Blättern innerhalb der ersten 24 h

genau gegensätzlich. In den Wurzeln stieg die Aktivität bis auf 163 % im Vergleich zu den Kontrollpflanzen an, in den Blättern fiel die Aktivität um -61 % ab. Mit zunehmender Inkubationsdauer glichen sich die Aktivitätskurven von Wurzeln und Blättern mehr oder weniger an und befanden sich fast immer oberhalb der Aktivität der Kontrollen. Am Tag 17 der Inkubation hatten die Blätter wieder das Niveau der Kontrollpflanzen erreicht. In den Wurzeln lag die Aktivität +25 % über der Aktivität der Kontrollen (siehe Abbildung 3.13).

Insgesamt ist die Reaktion der SOD nach Applikation von C8-HSL erheblich geringer als nach C6-HSL Behandlung. In den Wurzeln entspricht sie aber der anfänglichen Hypothese.

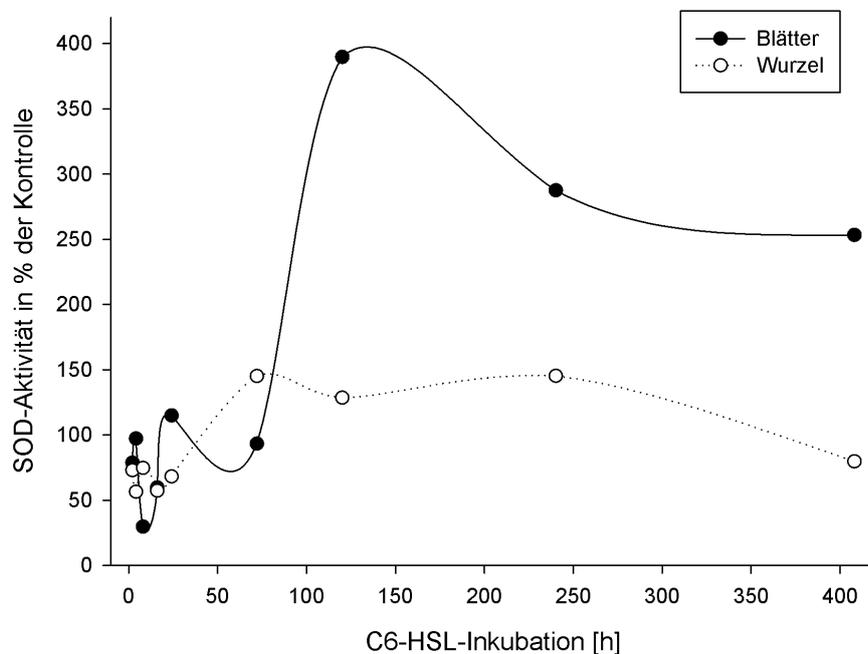


Abbildung 3.12 – Superoxiddismutaseaktivität in Wurzeln (weiß) und Blättern (schwarz) von *H. vulgare* nach Inkubation mit 10 μ M C6-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

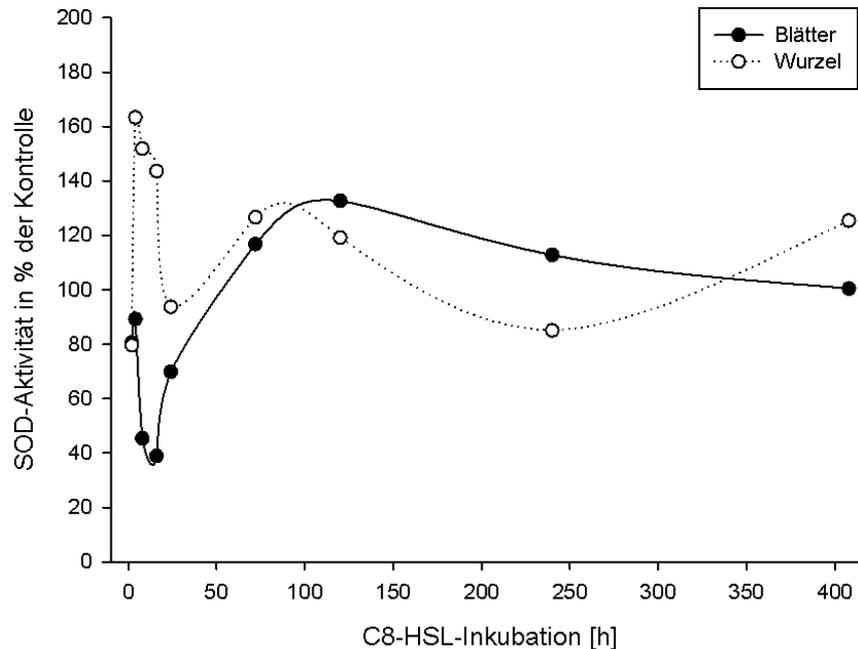
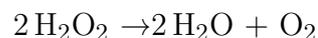


Abbildung 3.13 – Superoxiddismutaseaktivität in Wurzeln (weiß) und Blättern (schwarz) von *H. vulgare* nach Inkubation mit 10 µM C8-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

Katalase

Katalasen (CAT, EC 1.11.1.6) kommen in allen aeroben, eukaryotischen Organismen vor. Sie entfernen das ebenfalls reaktive Molekül Wasserstoffperoxid und wandeln es in Sauerstoff und Wasser um (Tseng *et al.*, 2007).



In Pflanzen kommen die CAT in Peroxisomen und Mikrosomen vor und zeichnen sich durch eine hohe Umsatzrate bei gleichzeitig relativ schwacher Substrataffinität aus (Foyer, 1993; Mittler, 2002; Qureshi *et al.*, 2007).

Bereits 2 h nach C6-HSL Applikation war die CAT-Aktivität in den Blättern um den Faktor 2,2 erhöht, während die Aktivität in den Wurzeln im Vergleich zu den Kontrollen mehr als halbiert war. Die Aktivität in den Blättern fiel danach stark ab und betrug am Tag 3 nach Applikation nur noch 70 % der Aktivität der Kontrollen. Die CAT-Aktivität in den Wurzeln stieg dagegen mit zunehmender Inkubationsdauer an und erreichte ihr Maximum an Tag 5 der Inkubation (143 % der Kontrollen). Am Tag 17 betrug die Aktivität

in den Wurzeln 78 % der Aktivität der Kontrollpflanzen, die Aktivität der Blätter war in etwa so hoch wie die der Kontrollen (siehe Abbildung 3.14).

Auch nach C8-HSL Applikation war die CAT-Aktivität der Wurzeln 2 h nach der Behandlung viel niedriger als die Aktivität in den Blättern. Während die Aktivität in den Blättern gleich der Aktivität der Kontrollen war, entsprach die Aktivität der Wurzeln nur 23 % der Kontrollaktivität und blieb bis zum Tag 3 der Inkubation auf diesem niedrigen Niveau. Am Tag 5 der Inkubation stieg die Aktivität in den Wurzeln dramatisch an auf 184 % der Kontrollpflanzen und sank danach wieder auf das Niveau der Kontrollen ab. In den Blättern sank die CAT-Aktivität und erreichte nach 8 h ihren niedrigsten Punkt (63 % der Kontrollaktivität). Am Tag 17 betrug die Aktivität in den Blättern noch immer lediglich 70 % der Aktivität der Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.15).

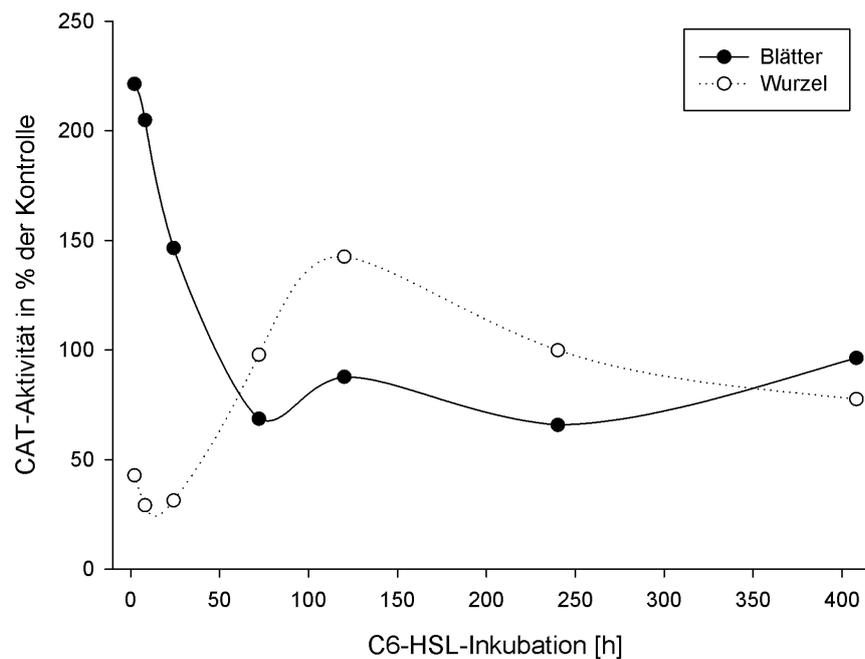


Abbildung 3.14 – Katalaseaktivität in Wurzeln (weiß) und Blättern (schwarz) von *H. vulgare* nach Inkubation mit 10 μ M C6-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

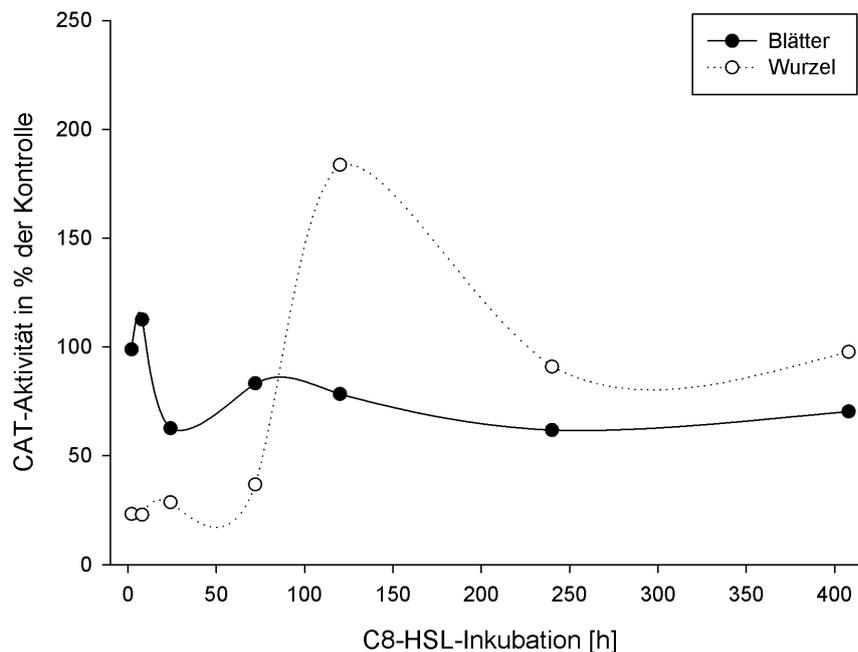


Abbildung 3.15 – Katalaseaktivität in Wurzeln (weiß) und Blättern (schwarz) von *H. vulgare* nach Inkubation mit 10 µM C8-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

Ascorbatperoxidase

Die APOX (EC 1.11.1.11) spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von ROS in den Chloroplasten. Die Enzyme entgiften Peroxide wie beispielsweise H_2O_2 und nutzen dabei Ascorbat als Elektronendonator. Es entstehen Monodehydroascorbat und Wasser.



Da die CAT in den Chloroplasten fehlt, wird durch die Photosynthese entstehendes H_2O_2 in den Chloroplasten durch die APOX entgiftet. Das Enzym findet sich aber auch im Zytosol und in den Peroxisomen (Noctor and Foyer, 1998; Teixeira *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die APOX aufgrund ihrer hohen Affinität zu H_2O_2 zur Feinabstimmung der H_2O_2 -Konzentration in den Pflanzen zuständig ist und so eine wichtige Rolle beim ROS-“Signaling“ spielt (Mittler, 2002).

Nach 2 stündiger Inkubation mit C6-HSL ist die APOX in den Wurzeln nur noch halb so aktiv wie in den Kontrollpflanzen, hat aber nach 8 h in etwa wieder das Niveau der Kontrollpflanzen erreicht. Der Kurvenverlauf erreicht ein zweites Aktivitätsminimum 3

Tage nach der Applikation (-30 % der Kontrollaktivität). Zwischen Tag 5 und Tag 10 steigt die APOX-Aktivität in den Wurzeln C6-HSL behandelter Pflanzen auf 140 % der Aktivität der Kontrollpflanzen an. An Tag 17 nach der Inokulation mit C6-HSL liegt die Aktivität noch immer 28 % über der Aktivität der Kontrollen (siehe Abbildung 3.16).

In den Blättern ist die APOX-Aktivität 2 h nach der Inokulation mit C6-HSL im Vergleich zu den Kontrollpflanzen unverändert, verringert sich aber innerhalb der ersten 24 h nach Inkubation um -15 % im Vergleich zu der Aktivität der Kontrollpflanzen. Danach steigt auch in den Blättern die APOX-Aktivität wieder an und erreicht am Tag 5 der Inkubation 140 % der Kontrollpflanzenaktivität. Am Ende des Inkubationszeitraumes entspricht die Aktivität in den Blättern der mit C6-HSL behandelten Pflanzen wieder der Aktivität der Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.16).

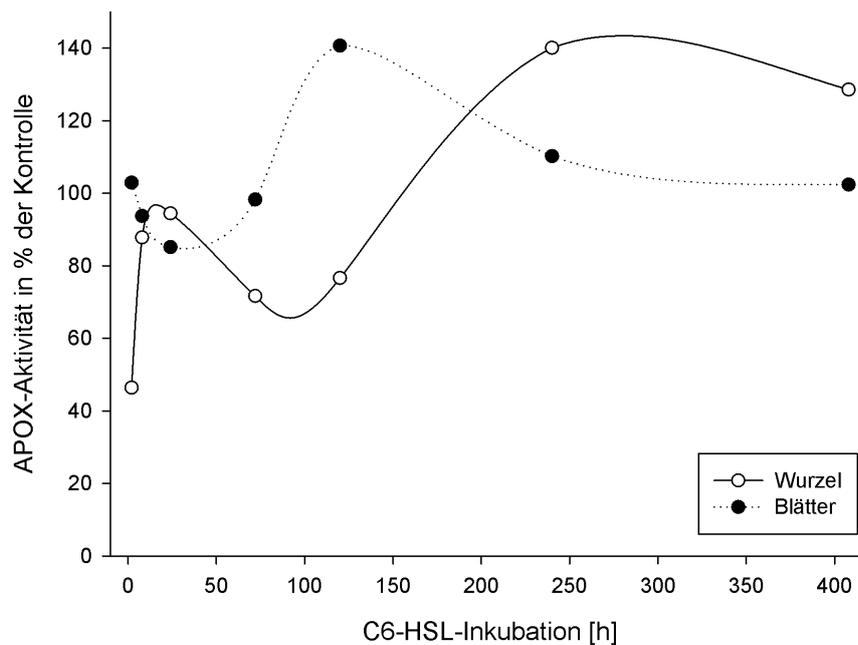


Abbildung 3.16 – Ascorbatperoxidaseaktivität in Wurzeln (weiß) und Blättern (schwarz) von *H. vulgare* nach Inkubation mit 10 μ M C6-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

Die APOX-Aktivität in den Wurzeln C8-HSL behandelter Pflanzen unterscheidet sich nach 2 h nicht von den Kontrollpflanzen, sinkt dann aber innerhalb der nächsten 6 h auf 44 % der Aktivität der Kontrollpflanzen herab. Nach 24 h hat sich die Aktivität in den Wurzeln der behandelten Pflanzen wieder erholt und erreicht die Aktivität der Kontrollpflanzen.

Die Aktivitätskurve steigt bis zum Tag 5 nach der Applikation auf 120 % der Aktivität der Kontrollpflanzen an. Nach 17 Tagen beträgt die Aktivität in den Wurzeln der mit C8-HSL behandelten Pflanzen 80 % der Aktivität der Kontrollpflanzen.

Die Aktivität der Blätter befindet sich innerhalb der ersten 24 h nach der Inkubation mehr oder weniger auf dem Niveau der Aktivität der Kontrollpflanzen. Am Tag 3 nach der Applikation von C8-HSL sinkt die APOX-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen um -55 % herab und hat am Tag 5 nur noch 40 % der Aktivität der Kontrollpflanzen. Am Tag 17 ist die APOX-Aktivität in den Blättern behandelter Pflanzen noch immer um -31 % geringer als in Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.17).

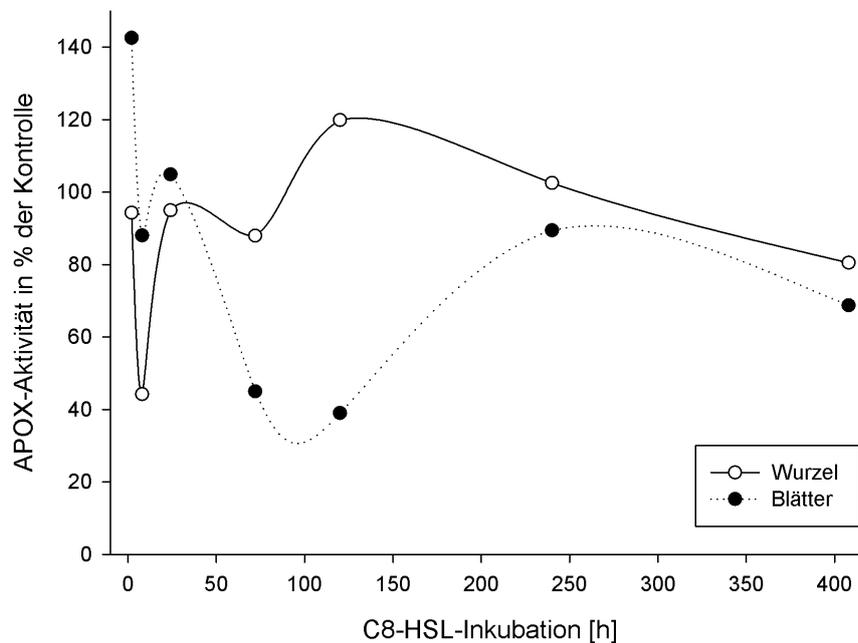
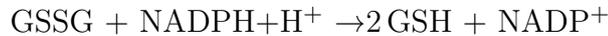


Abbildung 3.17 – Ascorbatperoxidaseaktivität in Wurzeln (weiß) und Blättern (schwarz) von *H. vulgare* nach Inkubation mit 10 μ M C8-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

Glutathionreduktase

Die GR (EC 1.6.4.2) ist ein Enzym, das am Ende des Halliwell-Asada-Zyklus arbeitet und gebildetes GSSG unter Oxidation von NADPH wieder reduziert (Apel and Hirt, 2004).



Die GR stellt also freies GSH unter anderem für den Ascorbat-Glutathionzyklus zur Verfügung.

Der Kurvenverlauf der GR-Aktivität in den Wurzeln und Blättern von Gerstenpflanzen war nach der Behandlung mit C6-HSL im Vergleich zu den Kontrollpflanzen in etwa parallel zueinander, aber entlang der Y-Achse verschoben.

Die Aktivität der Wurzeln war bereits 2 h nach der Applikation um -39 % gegenüber der Kontrolle verringert, erreichte die niedrigste Aktivität im Vergleich zur Kontrolle 8 h nach Applikation (49 % Aktivität der Kontrollpflanzen), stieg daraufhin wieder an und hatte im Zeitraum von Tag 1 bis Tag 17 eine Aktivität zwischen 72 % - 75 % der Aktivität der Kontrollen.

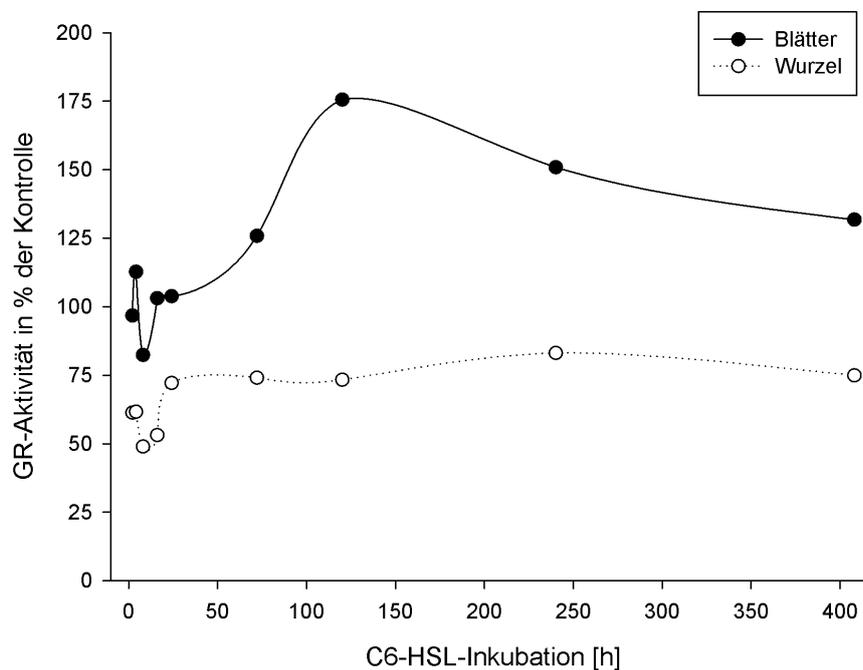


Abbildung 3.18 – Glutathionreduktaseaktivität in Wurzeln (weiß) und Blättern (schwarz) von *H. vulgare* nach Inkubation mit 10 µM C6-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

Die GR-Aktivität der Blätter lag 2 h nach der Behandlung mit C6-HSL im Bereich der Aktivität der Kontrollpflanzen, sank zum Zeitpunkt von 8 h um -18 %, stieg danach aber wieder an und erreichte die maximale Aktivität im Vergleich zur Kontrolle am Tag 5 nach der Inkubation (176 %). Bis zum Tag 17 verringerte sich die Aktivität wieder, lag aber im Vergleich zu den Aktivitäten in den Wurzeln noch deutlich über der Aktivität der Kontrollpflanzen (132 %) (siehe Abbildung 3.18).

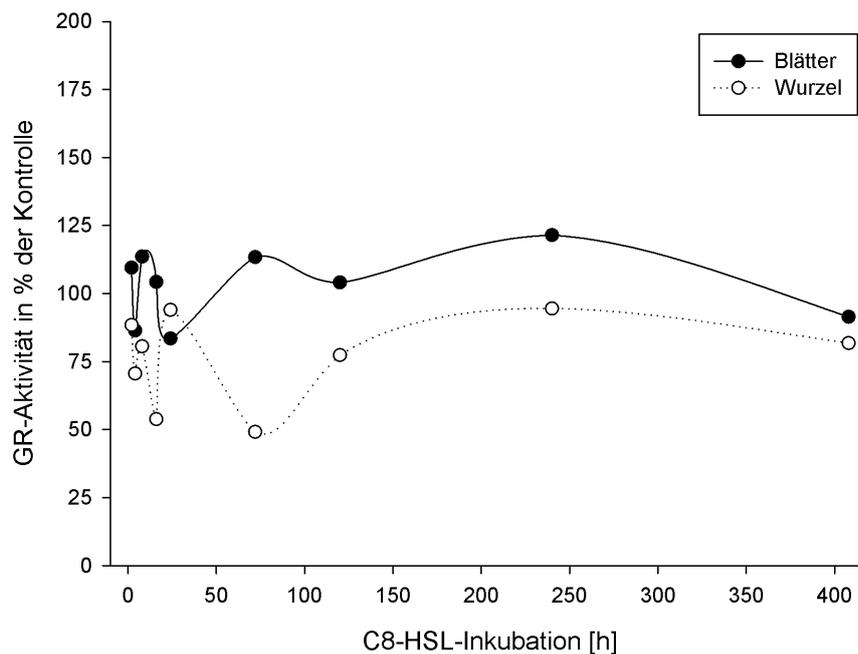


Abbildung 3.19 – Glutathionreduktaseaktivität in Wurzeln (weiß) und Blättern (schwarz) von *H. vulgare* nach Inkubation mit 10 μ M C8-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

Bei der Behandlung mit C8-HSL verliefen die Kurven der GR-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle in den Blättern und Wurzeln ebenfalls nahezu parallel zueinander. Auch hier war die GR-Aktivität in den Wurzeln bereits 2 h nach der Behandlung reduziert (-18 % im Vergleich zur Kontrolle). Danach fiel der Kurvenverlauf weiterhin ab und erreichte sein erstes Minimum nach 16 h bei 54 % der Aktivität der Kontrollpflanzen. Nach 24 h war nahezu das Aktivitätsniveau der Kontrollen erreicht. Am Tag 3 der Behandlung verringerte sich die Aktivität in den Wurzeln der C8-HSL behandelten Pflanzen um -50 % der Aktivität der Kontrollpflanzen. Danach stieg die GR-Aktivität in der Wurzel im Vergleich zur Kontrolle wieder an und betrug am Tag 17 82 % der Kontrollpflanzenaktivität.

Die GR-Aktivität in den Blättern lag nach 2 h Behandlung - ähnlich wie bei der Behandlung mit C6-HSL - in etwa auf dem Niveau der Aktivität der Kontrollpflanzen. Im Gegensatz zu der Behandlung mit C6-HSL verblieb der Kurvenverlauf der GR-Aktivität der C8-HSL behandelten Pflanzen danach im Bereich Aktivität der Kontrollpflanzen. Die niedrigste Aktivität wurde nach 24 h gemessen (83 % im Vergleich zur Kontrolle); das Maximum an Tag 10 (121 % im Vergleich zur Kontrolle) (siehe Abbildung 3.19).

Peroxidasen

POX (EC 1.11.1.7) sind nicht nur in der Lage Peroxide - darunter auch H_2O_2 - zu entgiften, sondern sind ebenfalls am Zellstreckungswachstum und am Aufbau der pflanzlichen Zellwand beteiligt (Passardi *et al.*, 2004). Die Entgiftung von H_2O_2 wird durch die Klasse III Peroxidasen (z.B. Meerrettich-Peroxidase) katalysiert (Veitch, 2004). Die in diesem Experiment untersuchten POX werden aufgrund ihres Co-Substrats auch als Guajacol-POX bezeichnet (Noctor and Foyer, 1998).

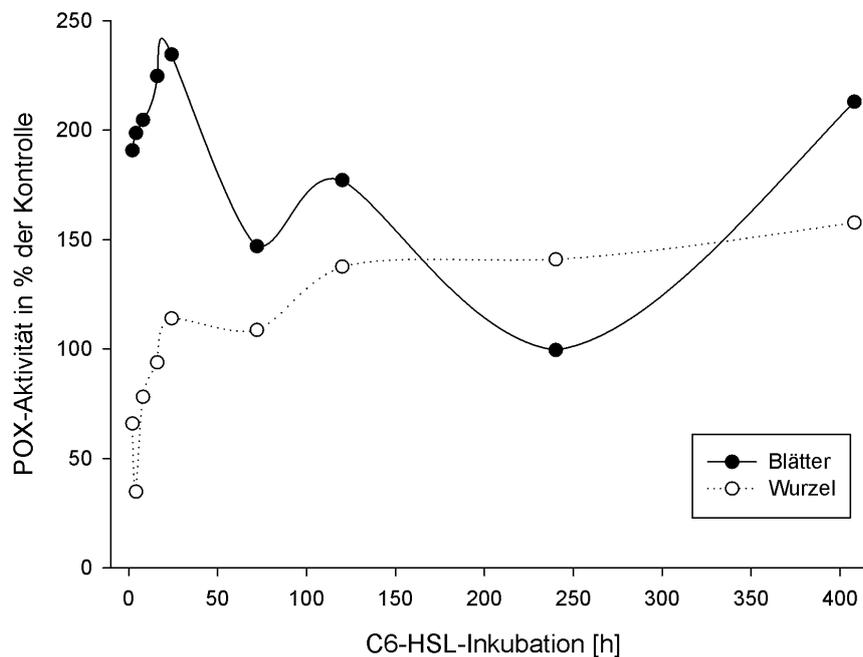


Abbildung 3.20 – Peroxidaseaktivität in Wurzeln (weiß) und Blättern (schwarz) von *H. vulgare* nach Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ C6-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

Die POX-Aktivität war in den Wurzeln nach 2 h Behandlung mit C6-HSL bereits um -33 % reduziert. Innerhalb der ersten 24 h stieg die Aktivität rasch auf 94 % der Aktivität der Kontrollpflanzen an. Mit dem Fortschreiten des Inkubationszeitraumes stieg die Aktivität in den Wurzeln dann langsam weiter bis auf 158 % am Tag 17.

Die POX-Aktivität in den Blättern war im Gegensatz dazu bereits 2 h nach der C6-HSL-Applikation fast doppelt so hoch wie in den Kontrollpflanzen und stieg weiter bis zum Zeitpunkt von 24 h auf 235 % an. Danach verringerte sich der Kurvenverlauf im Vergleich zur Kontrolle ein wenig. Am Tag 17 war die POX-Aktivität der Blätter aber wieder mehr als doppelt so hoch wie die Aktivität in den Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.20).

Im Gegensatz zur C6-HSL Applikation war die POX-Aktivität in den Wurzeln 2 h nach der Behandlung mit C8-HSL nur leicht reduziert und stieg nach 8 h rasch auf 166 % im Vergleich zur Kontrolle an. Ein zweites Aktivitätsmaximum war nach 24 h erreicht (155 %). Danach sank die Aktivität und lag am Tag 17 +11 % über der Aktivität der Kontrollpflanzen.

Die Aktivität in den Blättern war 2 h nach C8-HSL Applikation - im Unterschied zu der Behandlung mit C6-HSL - um -78 % im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Bis zum Zeitpunkt von 16 h erfolgte ein rascher Anstieg der Aktivität auf 188 %. Ein weiteres Aktivitäts-Minimum gab es bei 24 h. Die C8-HSL behandelte Pflanzen zeigten zu diesem Zeitpunkt eine POX-Aktivität in den Blättern von lediglich 80 % der Aktivität der Kontrollen, danach stieg die Aktivität über den restlichen Behandlungszeitraum kontinuierlich an. Am Tag 17 hatten die Blätter eine Aktivität von 188 % der Aktivität der Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.21).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die antioxidativen Enzyme nach Applikation der AHLs in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Insbesondere wurden frühe Effekte beobachtet, die sich deutlich von der Reaktion nach 2-4 Tagen und der Langzeitinkubation unterscheiden. Reaktionen in der Wurzel und im grünen Teil der Pflanze waren unterschiedlich bis gegensinnig. C8-HSL erfüllte eher die Hypothesen als C6-HSL.

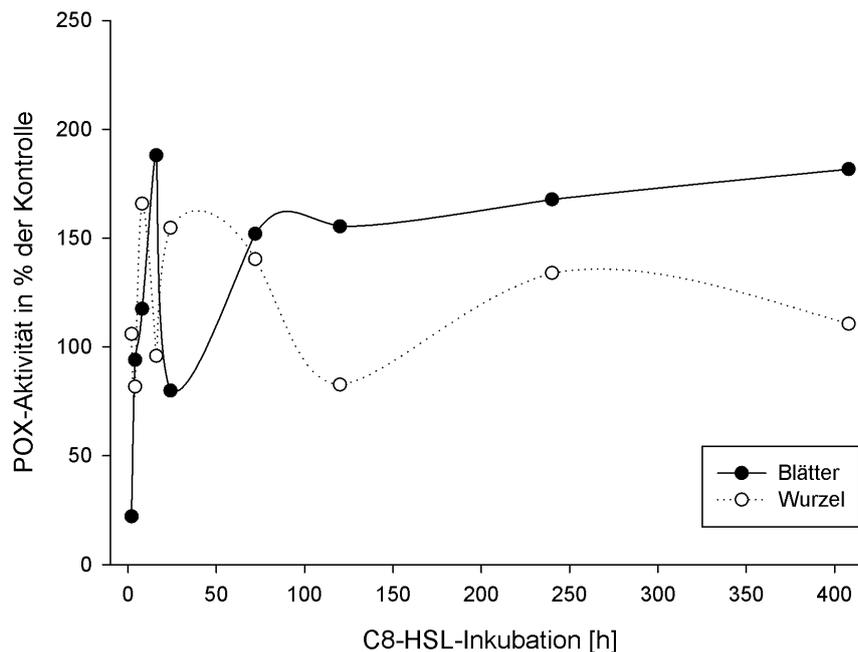


Abbildung 3.21 – Peroxidaseaktivität in Wurzeln (weiß) und Blättern (schwarz) von *H. vulgare* nach Inkubation mit 10 μ M C8-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen. Die Daten der jeweiligen Kinetiken wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

3.2.2 Kurz- und Langzeitkinetik von GSTs

Auch GSTs (EC 2.5.1.18) reagieren schnell auf eine Vielzahl äußerer Reize (u.a. auch Mikroorganismen) und wurden deshalb in dieser Arbeit als Indikatorenzyme für AHLs ausgewählt.

Die Aktivität der GSTs kann mit Hilfe unterschiedlicher Modellsubstrate bestimmt werden. Die verschiedenen Isoenzyme können die Substrate dabei unterschiedlich gut nutzen (Pflugmacher *et al.*, 2000). So gelten die Modellsubstrate CDNB und Fluorodifen als Substrate, die von den meisten GSTs genutzt werden können. DCNB und NBC werden hingegen nur von wenigen Isoenzymen konjugiert.

Die GST-Aktivität der einzelnen Modellsubstrate wurden stets in % der Aktivität der Kontrollpflanzen angegeben, damit die Veränderungen der Aktivitäten der verschiedenen GST-Substrate in unterschiedlichen Pflanzengeweben besser zu vergleichen sind. Die Grundaktivitäten der einzelnen Modellsubstrate in den Kontrollpflanzen sind in Tabelle 3.2 μ kat/mg Protein angegeben. Oft waren die Enzymaktivitäten pro mg Protein in den Wurzeln um ein Vielfaches höher als die der Blattextrakte. Dabei ist zu beachten, dass die

Proteinkonzentrationen der Wurzelextrakte sehr viel geringer waren als die der Blätter (siehe 3.2.1).

Tabelle 3.2 – Mittelwerte der GST-Grundaktivitäten im cytosolischen Proteinrohextrakt angegeben in $\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein \pm SE in Wurzel- und Blattgewebe von Kontrollpflanzen. (n = mindestens 28)

	CDNB	DCNB	NBC	NBoC	Fluorodifen	pNpa
Wurzel	$2,3 \pm 0,2$	$0,46 \pm 0,005$	$5,3 \pm 0,9$	$2,2 \pm 0,4$	$0,92 \pm 0,07$	$1,28 \pm 0,09$
Blätter	$1,0 \pm 0,1$	$0,03 \pm 0,003$	$0,28 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,004$

Kurzzeitkinetik von GSTs

GSTs reagierten in den Wurzeln sehr schnell auf die Applikation mit C6-HSL. Schon nach 2 h waren dramatische Veränderungen zu beobachten. Die Messungen mit unterschiedlichen Substraten lassen sich dabei in zwei Klassen unterteilen. Die CDNB-, DCNB- und NBC-Aktivitäten waren nach 2-stündiger Behandlung mit C6-HSL um -20 % bis -30 % niedriger als die der Kontrollpflanzen. Über den Zeitraum von 24 h sanken sie weiter ab, bis sie nur noch 65 % (CDNB), 47 % (NBC) bzw. 17 % (DCNB) der Aktivität der Kontrollpflanzen hatten (siehe Abbildung 3.22 oben). Die Aktivitäten von Fluorodifen bzw. pNpa waren bereits nach 2 h mehr als halbiert, veränderten sich dann aber über die ersten 24 h nicht weiter (siehe Abbildung 3.22 unten).

In den Blättern lassen sich die GST-Aktivitäten nach C6-HSL-Behandlung sogar in drei Klassen unterteilen. Die DCNB- und Fluorodifenaktivitäten befanden sich 2 h nach der Behandlung leicht unterhalb der Aktivitäten der Kontrollpflanzen, blieben aber über den gesamten Zeitraum von 24 h mehr oder weniger unverändert (siehe Abbildung 3.23 Mitte). Im Gegensatz dazu stiegen sowohl die CDNB- als auch die pNpa-Aktivitäten ab ca. 8 h nach der C6-HSL Behandlung in den Blättern an (siehe Abbildung 3.23 oben). Die NBC- und NBoC-Aktivitäten verhielten sich auffällig anders zu den anderen gemessenen GST-Aktivitäten in den Blättern. Obwohl NBoC nach 2 h nur 55 % der Aktivität der Kontrollpflanzen zeigte, NBC aber +28 % über der Aktivität der Kontrollpflanzen lag, war der Kurvenverlauf der beiden Substrate sehr ähnlich. Beide Substrataktivitäten stiegen ab diesem Zeitpunkt stark an und erreichten ihr Maximum 16 h nach C6-HSL-Applikation. Die NBoC-Aktivität betrug zu diesem Zeitpunkt das doppelte der Kontrollpflanzenaktivität, die NBC-Aktivität war sogar 2,3-fach höher als die Kontrollen. Nach 24 h fiel die Kurve zwar wieder, beide Aktivitäten blieben aber über dem Niveau der Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.23 unten).

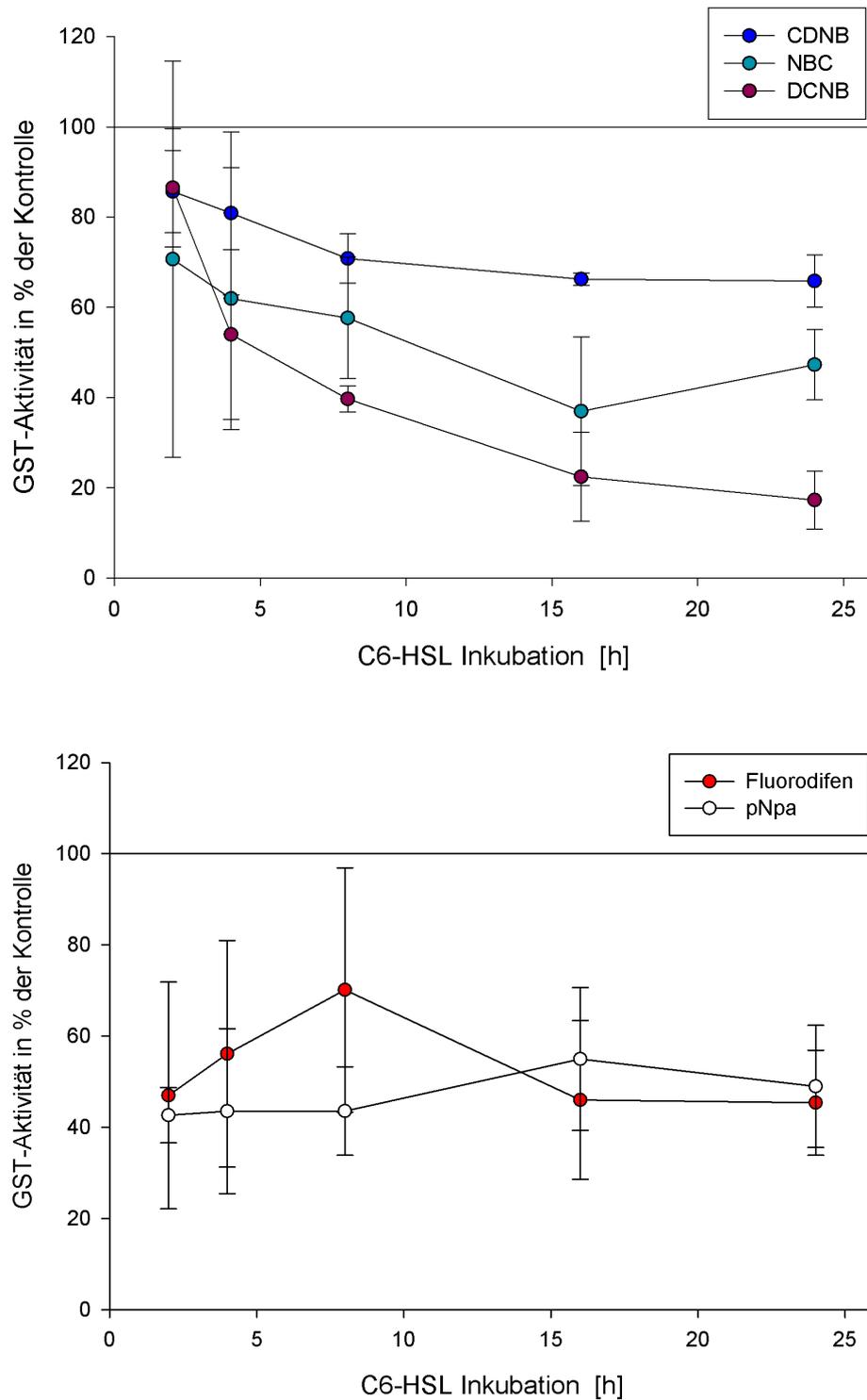


Abbildung 3.22 – Kurzzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Wurzeln von Gerste nach Inkubation mit 10 μM C6-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen (= durchgehende Linie bei 100%). Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

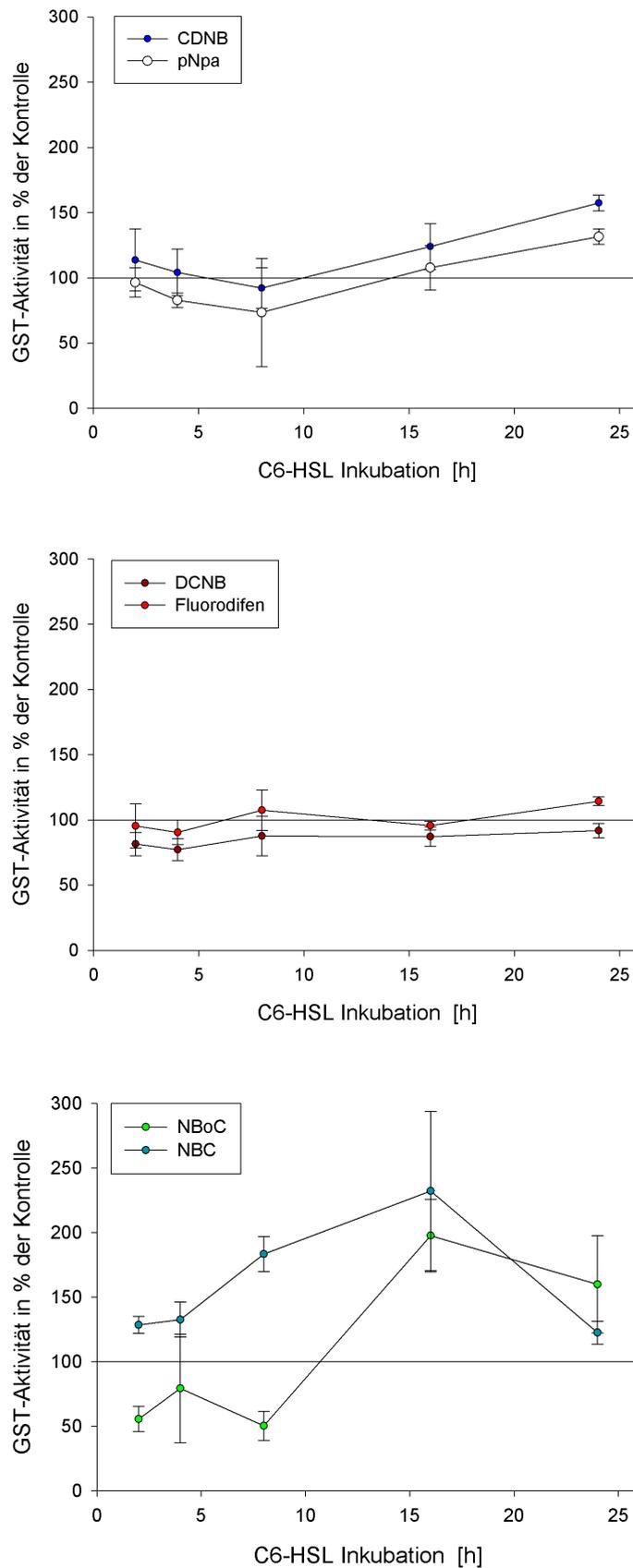


Abbildung 3.23 – Kurzzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Blättern von Gerste nach Inkubation mit 10 µM C6-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen (= durchgehende Linie bei 100%).

Die GST-Aktivität in den Wurzeln nach C8-HSL Applikation lässt sich nach den Messungen mit den verschiedenen Modellsubstraten in zwei Klassen unterteilen. Die DCNB-, NBC-, NBoC- und Fluorodifenaktivitäten fielen im Verlauf zwischen 2-6 h im Vergleich zur Kontrolle leicht ab und verblieben bis zum Zeitpunkt von 24 h auf dem jeweiligen Aktivitätsniveau (DCNB: 85 %, NBC: 59 %, Fluorodifen: 82 %, NBoC: 128 %). Interessanterweise ist die NBoC-Aktivität die einzige, die 2 h nach C8-HSL Applikation über der Aktivität der Kontrollpflanzen lag (+40 %) und während des gesamten Inkubationszeitraums von 24 h oberhalb der Aktivität der Kontrollpflanzen blieb (siehe Abbildung 3.24 oben). Die Aktivitäten der Substrate CDNB und pNpa lagen 2 h nach C8-HSL Applikation -30 % bzw. -33 % unterhalb der Aktivität der Kontrollpflanzen, stiegen dann aber über den Zeitraum von 24 h bis auf 150 % bzw. 115 % des Niveaus der Kontrollpflanzenaktivität an (siehe Abbildung 3.24 unten).

In den Blättern waren die Veränderungen der GST-Aktivität nach C8-HSL-Applikation im Vergleich weniger dramatisch. Auch hier lassen sich je nach verwendetem Substrat die GST-Aktivitäten in zwei Klassen unterteilen. Die CDNB-, NBC- und NBoC-Aktivitäten waren 2 h nach Applikation noch auf dem Niveau der Kontrollpflanzen, stiegen dann kurzzeitig leicht an auf 110 %, 115 % und 120 % und fielen schließlich im weiteren Verlauf der 24 h wieder ab. Nach 24 h waren die CDNB- und NBC-Aktivitäten der Blätter in den C8-HSL behandelten Pflanzen genau so hoch wie in den Kontrollpflanzen. Nur die NBoC-Aktivität war nach C8-HSL-Applikation geringer als die Aktivität der Kontrollen. Die geringste Aktivität war dabei nach 16 h erreicht (62 % der Aktivität der Kontrollpflanzen), nach 24 h betrug sie noch immer nur 75 % (siehe Abbildung 3.25 oben). Auch die DCNB-, Fluorodifen- und pNpa-Aktivitäten waren 2 h nach der Behandlung unverändert im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Obwohl bei den Substraten pNpa und Fluorodifen die Tendenz zum leichten Abfall zu Beginn der Aktivitätskurve erkennbar war, verblieben beide Aktivitäten im Verlauf der 24 h mehr oder weniger auf dem Niveau der Aktivitäten der Kontrollpflanzen. Einzig die DCNB-Aktivität verringerte sich nach 6 h auf 44 % der Aktivität der Kontrollen. Nach 24-stündiger Inkubation betrug die DCNB-Aktivität ca. $\frac{2}{3}$ der Kontrollpflanzenaktivität (siehe Abbildung 3.25 unten).

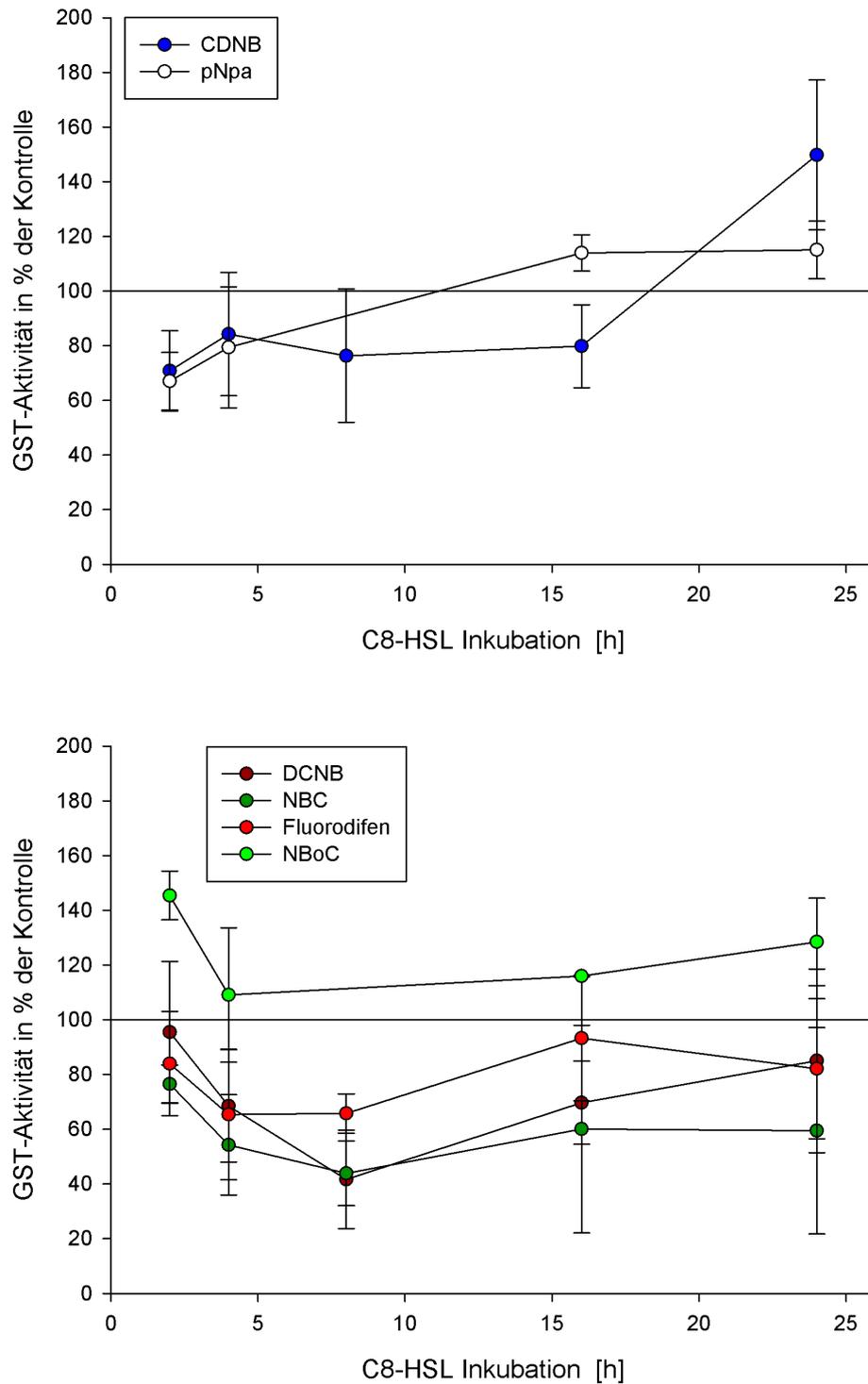


Abbildung 3.24 – Kurzzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Wurzeln von Gerste nach Inkubation mit 10 μM C8-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen (= durchgehende Linie bei 100%). Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

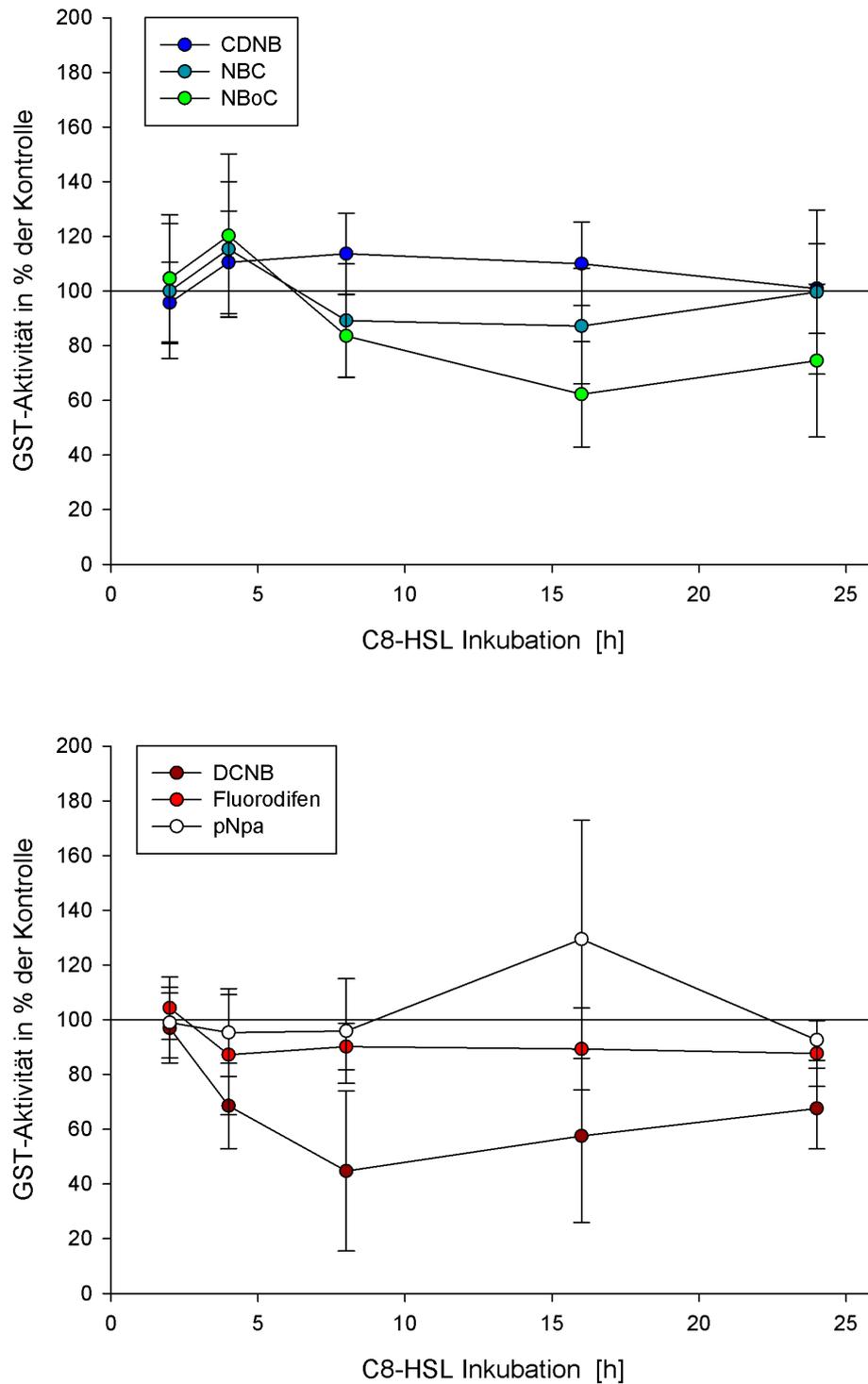


Abbildung 3.25 – Kurzzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Blättern von Gerste nach Inkubation mit 10 μM C8-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen (= durchgehende Linie bei 100%). Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

Langzeitkinetik von GSTs

Auch bei der Langzeitinkubation mit AHLs ist es möglich, die GST-Aktivitäten anhand der verwendeten Substrate in unterschiedliche Gruppen einzuteilen. Die CDNB-, NBC- und pNpa-Aktivitäten in den Wurzeln blieben über die gesamte Dauer der C6-HSL-Behandlung, also vom Tag 3 bis Tag 17 mehr oder weniger unverändert. Dabei lag die CDNB-Aktivität nach 17 Tagen nur leicht unterhalb des Niveaus der Aktivität der Kontrollpflanzen, nämlich bei 81 %. Die Konjugation von NBC und pNpa war 17 Tage nach der Behandlung mit C6-HSL nur noch ca. $\frac{1}{3}$ so hoch wie in den Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.26 oben). Die DCNB-Aktivität lag nach 3 Tagen Behandlung bei 60 % der Aktivität der Kontrollpflanzen und stieg mit zunehmender Behandlungsdauer auf 135 % am Tag 17 an. Die Konjugationsrate von Fluorodifen entsprach nach 3 Tagen Behandlungsdauer der Aktivität der Kontrollpflanzen und stieg ebenfalls mit andauernder Behandlung leicht an (siehe Abbildung 3.26 unten).

In den Blättern veränderten sich die CDNB-, Fluorodifen- und pNpa-Aktivitäten während des gesamten Inkubationszeitraumes mit C6-HSL fast nicht und blieben in etwa auf dem Aktivitätsniveau der Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.27 oben). Im Kontrast dazu stehen die Aktivitäten mit den Substraten NBC, NBoC und DCNB. Am Tag 3 der Inkubation waren alle im Vergleich zur Kontrolle drastisch erhöht (DCNB: 183 %, NBC: 172 %, NBoC: 234 %). Nur die NBC-Konjugation nahm mit der Dauer der Behandlung noch an Aktivität zu; nach 17 Tagen war die NBC-Aktivität in etwa doppelt so hoch wie die Aktivität in den Kontrollpflanzen. Die Aktivitäten von DCNB und NBoC nahmen beide mit der Dauer der Behandlung ab. Die NBoC-Aktivität lag nach 17 Tagen aber noch immer knapp +60 % über dem Aktivitätsniveau der Kontrollpflanzen. Dramatischer war die Abnahme der DCNB-Aktivität. Nach 17 Tagen war diese um -40 % geringer als in den Kontrollen (siehe Abbildung 3.27 unten).

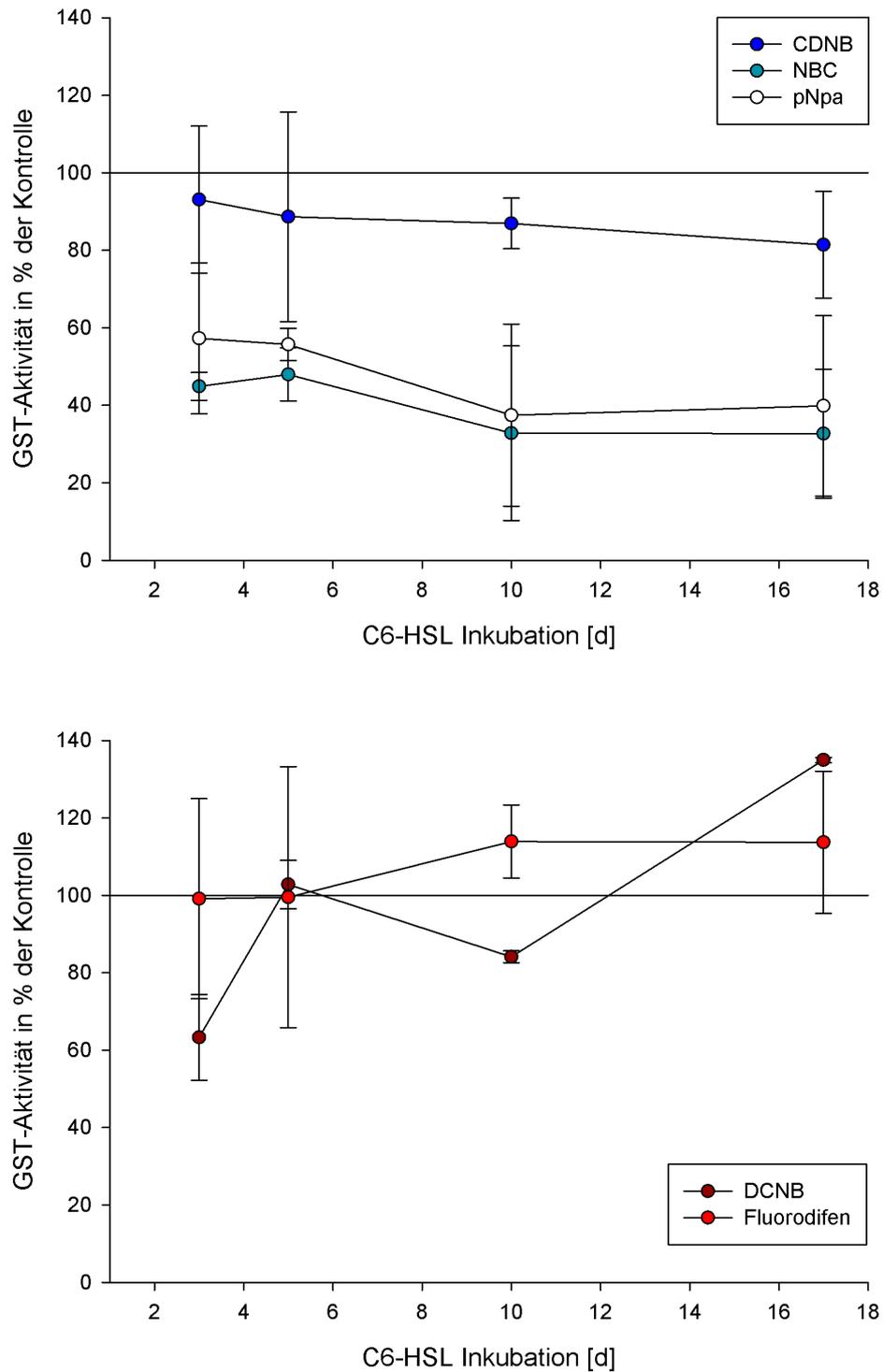


Abbildung 3.26 – Langzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Wurzeln von Gerste nach Inkubation mit 10 μM C6-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen (= durchgehende Linie bei 100%). Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

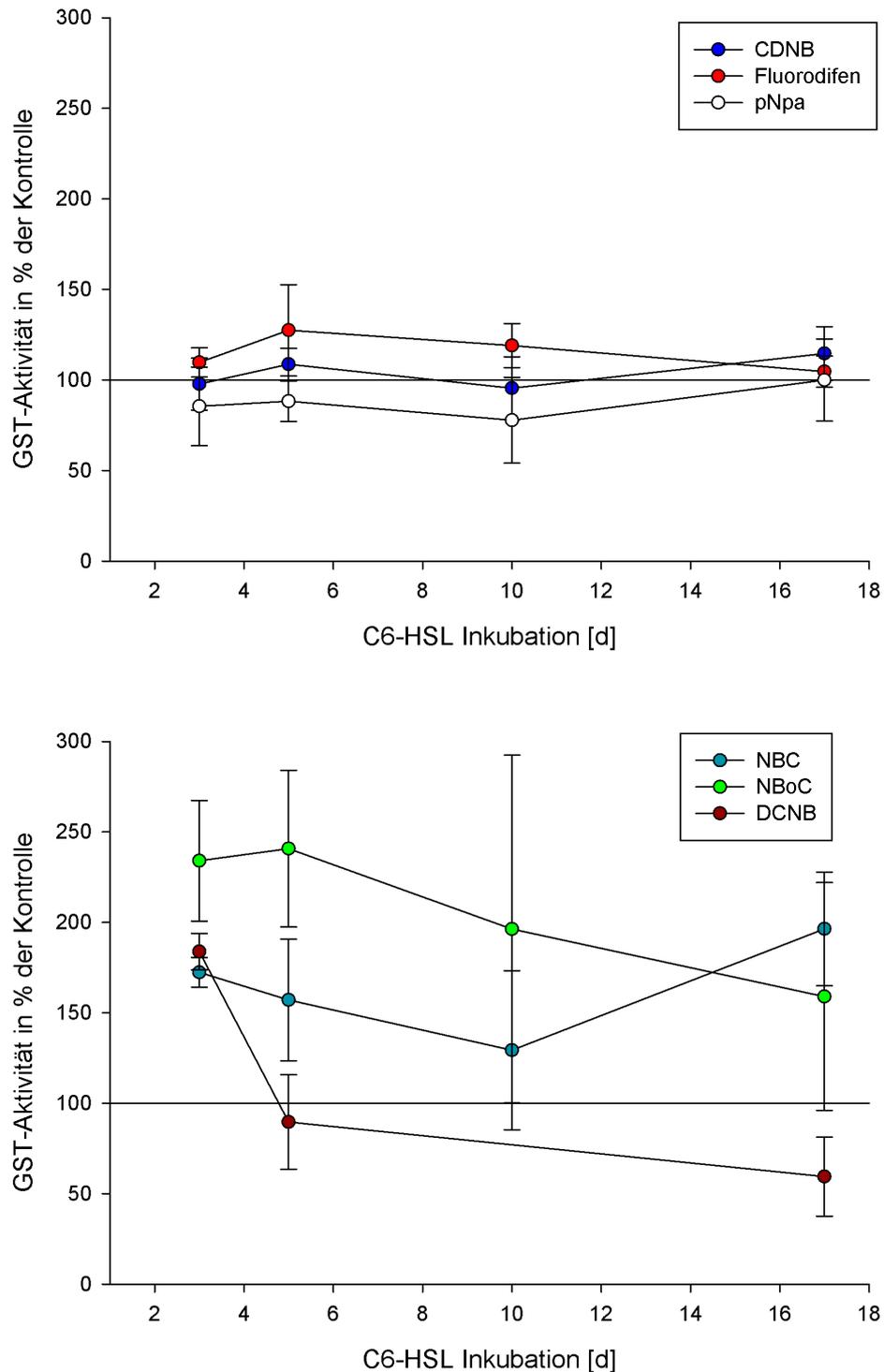


Abbildung 3.27 – Langzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Blättern von Gerste nach Inkubation mit 10 µM C6-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen (= durchgehende Linie bei 100%). Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

Die GST-Aktivitäten mit den Substraten pNpa und Fluorodifen veränderten sich in den Wurzeln über den gesamten Zeitraum der C8-HSL-Behandlung nicht und entsprachen in etwa der Aktivität der Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.28 oben). Auch die DCNB-Aktivität in den Wurzeln befand sich nach 3 tägiger Behandlung noch auf dem Niveau der Kontrollpflanzen, wurde aber mit anhaltender Behandlungsdauer immer geringer und war am Tag 17 schließlich um -44 % geringer als in den Kontrollpflanzen. Die CDNB- und NBC-Aktivität waren am Tag 17 der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls um -41 % und -50 % reduziert. Im Gegensatz zur DCNB-Aktivität waren diese aber schon am Tag 3 der Behandlung um -41 % und -50 % verringert und veränderten sich mit anhaltender Behandlungsdauer nicht weiter (siehe Abbildung 3.28 unten).

In den Blättern verhielten sich die CDNB-, NBoC-, Fluorodifen- und pNpa-Aktivitäten anders als die DCNB- und NBC-Aktivitäten. Erstere waren am Tag 3 in etwa auf dem Niveau der Kontrollpflanzen und stiegen über den Inkubationszeitraum von 17 Tagen leicht an. Am Tag 17 lag die CDNB-Aktivität bei 124 %, die NBoC-Aktivität bei 113 %, die Fluorodifenaktivität bei 114 % und die pNpa-Aktivität bei 136 % der Aktivität der Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.29 oben). Die mit dem Substrat CDNB gemessene Aktivität lag bereits am Tag 3 nach der Behandlung mit C8-HSL -23 % unterhalb der Aktivität der Kontrollpflanzen. Die NBC-Aktivität war sogar um -40 % gegenüber den Kontrollen reduziert. Beide Aktivitäten verringerten sich über den Inkubationszeitraum noch weiter und waren am Tag 17 der Behandlung um -56 % (DCNB) bzw. -59 % (NBC) gegenüber den Kontrollpflanzen reduziert (siehe Abbildung 3.29 unten).

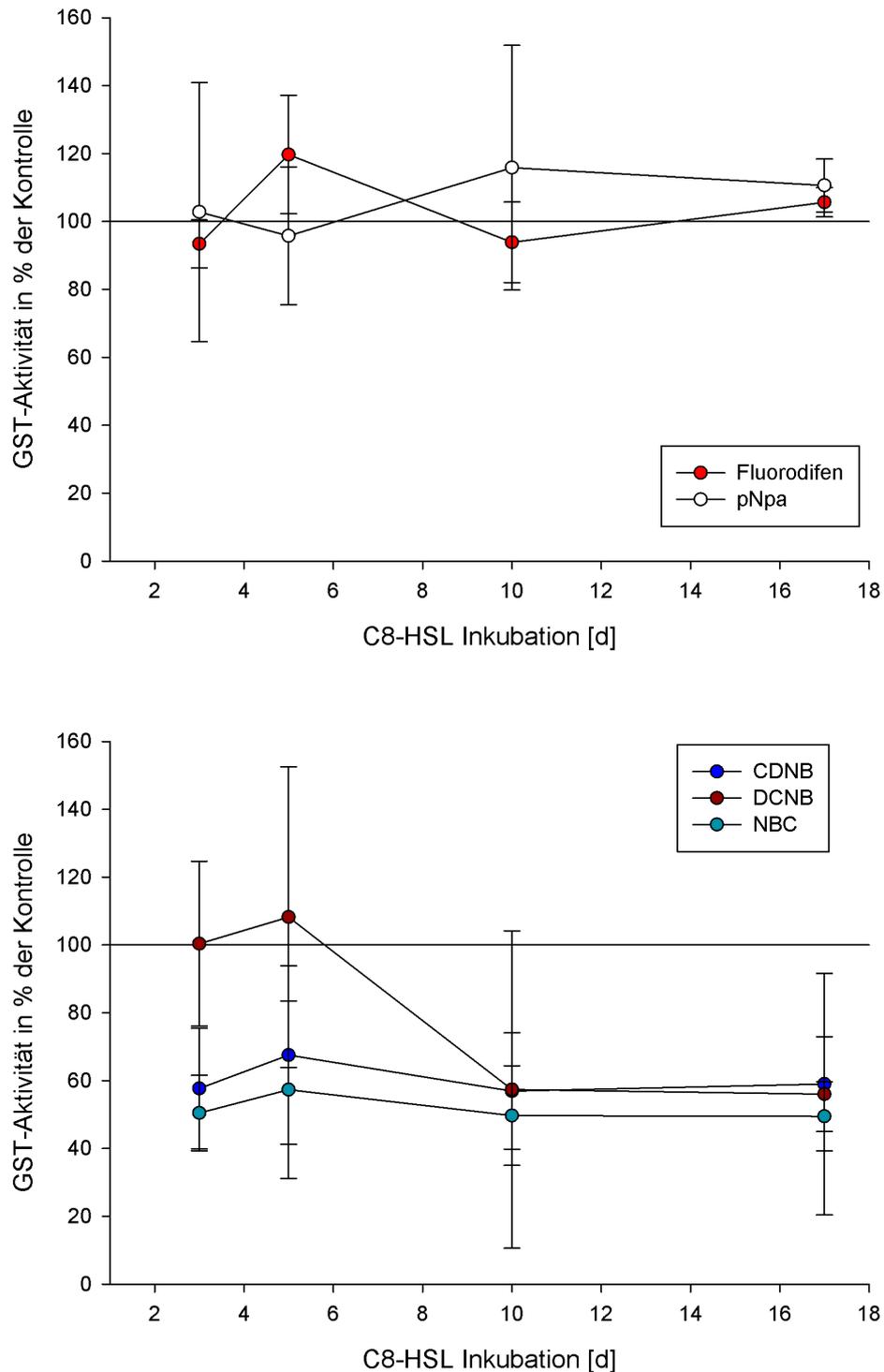


Abbildung 3.28 – Langzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Wurzeln von Gerste nach Inkubation mit 10 μM C8-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen (= durchgehende Linie bei 100%). Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

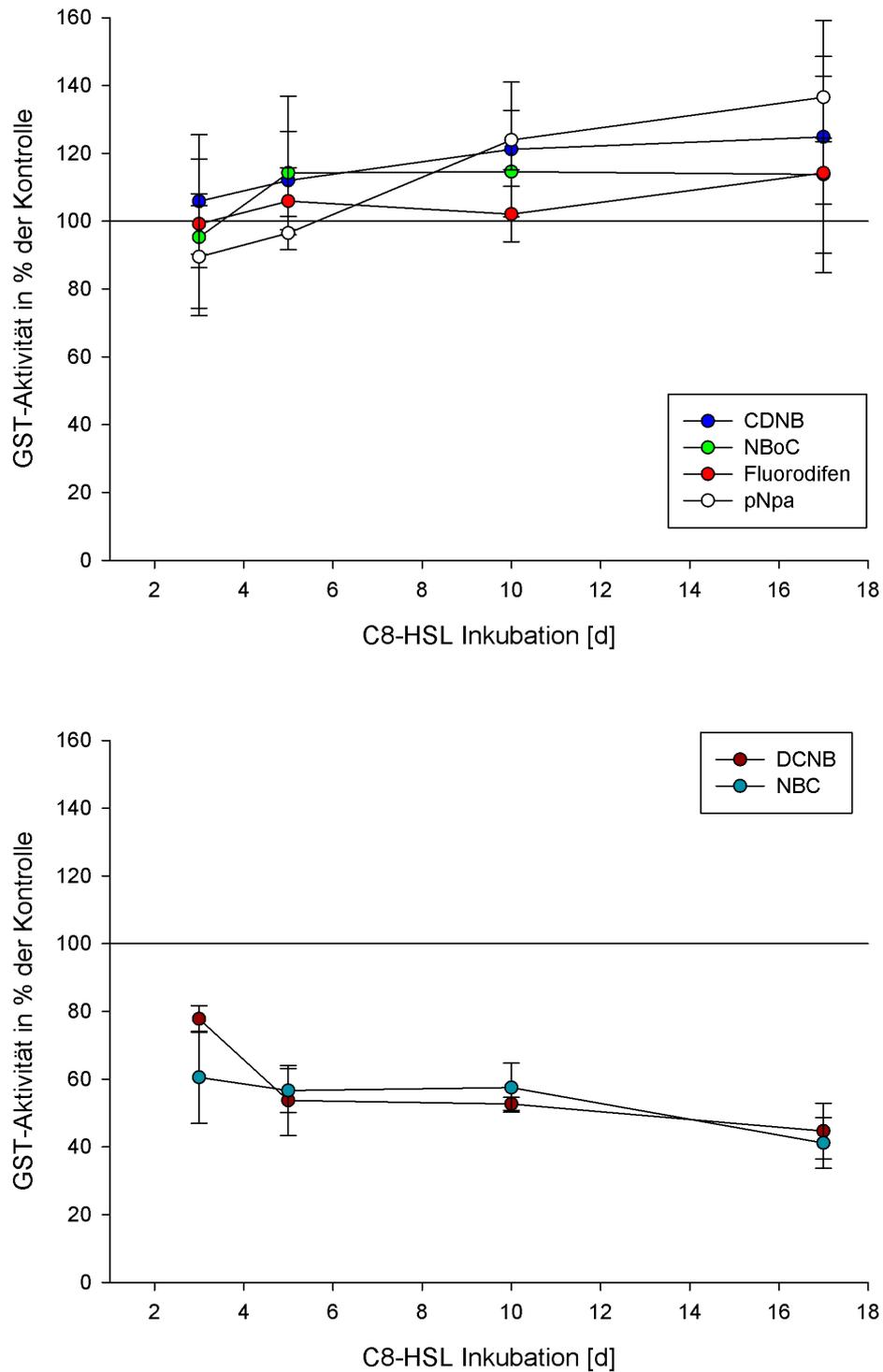


Abbildung 3.29 – Langzeitkinetik von GST-Aktivitäten in den Blättern von Gerste nach Inkubation mit 10 μ M C8-HSL. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte in % der Kontrollpflanzen (= durchgehende Linie bei 100%). Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden dabei mindestens 6-9 Pflanzen verwendet.

Bestimmung des Frischgewichtes Bei der Ernte der Langzeitkinetik wurden gleichzeitig die Frischgewichte der Wurzeln und Blätter bestimmt. Um die verschiedenen Experimente besser miteinander verrechnen zu können, wurde das Frischgewicht der behandelten Pflanzen in % der Kontrollpflanzen ausgedrückt. Die Mittelwerte folgten einer Normalverteilung. Man erkennt, dass 10 Tage nach der Applikation mit C6-HSL die Frischgewichte sowohl bei den Blättern als auch bei den Wurzeln im Vergleich zu den Kontrollpflanzen leicht verringert waren (siehe Abbildung 3.30). Da die Reduktion des Frischgewichtes jedoch knapp unterhalb des Signifikanzniveaus des t-Tests lag, ist dies lediglich als Tendenz zu betrachten.

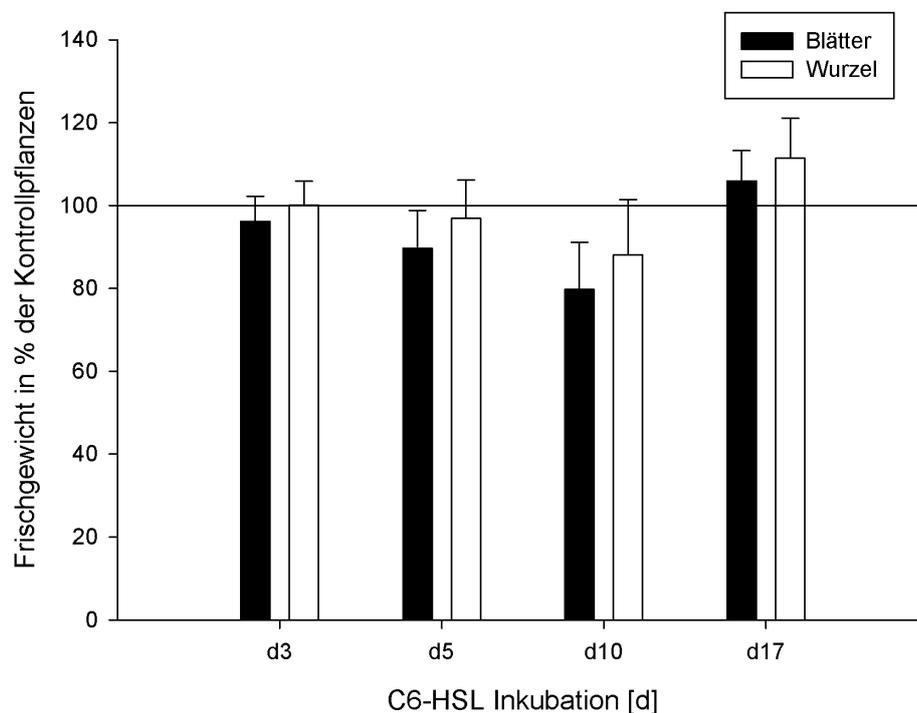


Abbildung 3.30 – Frischgewicht von Gerstenpflanzen unterteilt in Blätter und Wurzeln nach Langzeitinkubation mit 10 µM C6-HSL dargestellt in Prozent der Kontrollen (= durchgehende Linie bei 100%) (n = 24).

Bei der Langzeitbehandlung mit C8-HSL wurde das Frischgewicht von Wurzeln und Blättern bei der Ernte der Pflanzen ebenfalls bestimmt. Bei beiden Experimenten war dabei das Frischgewicht am Tag 5 nach der Behandlung in beiden Pflanzenteilen reduziert. Das Frischgewicht der Blätter war -14 % geringer als in den Kontrollen ($p=0,009$, t-test), das der Wurzeln -20 % geringer ($p=0,0009$, t-test). An allen anderen Tagen entsprach das Frischgewicht der behandelten Pflanzen dem Frischgewicht der Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 3.31).

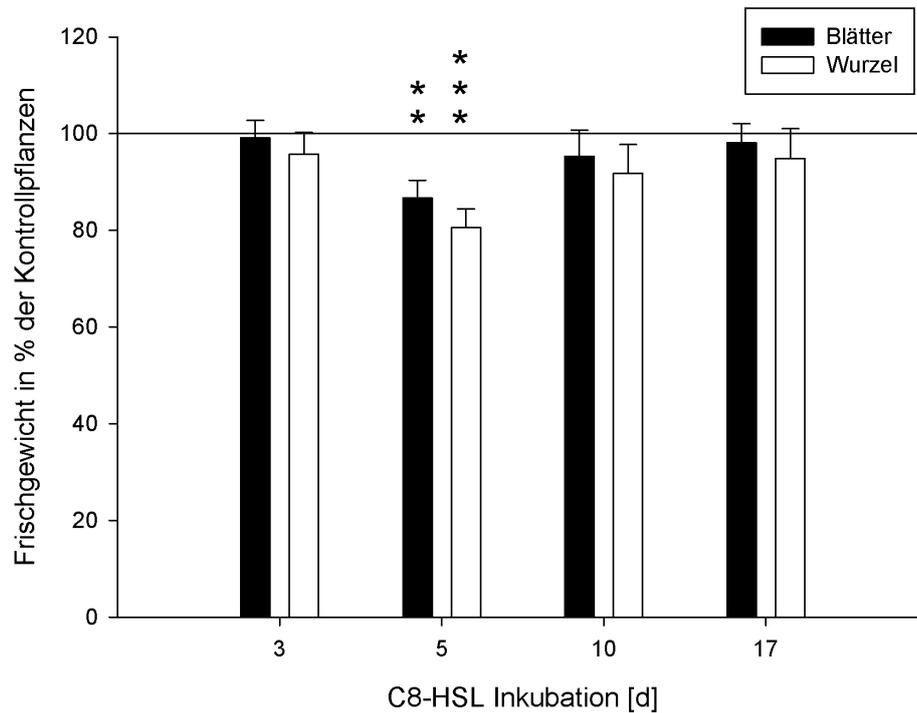


Abbildung 3.31 – Frischgewicht von Gerstenpflanzen unterteilt in Blätter und Wurzeln nach Langzeitinkubation mit 10 μM C8-HSL dargestellt in Prozent der Kontrollen (= durchgehende Linie bei 100%). Die Frischgewichte an Tag 5 nach C8-HSL Applikation sind signifikant verschieden zu den Kontrollpflanzen (t-test; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.; $n = 106$) ($n = 24$)

3.2.3 Applikation synthetischer AHLs und Inokulation mit Bakterien im Vergleich

Begleitend zu dieser Arbeit wurde eine Diplomarbeit durchgeführt (Bernhard Nägele, LMU betreut von Prof. Anton Hartmann, HMGU), in der die Interaktion von *S. liquefaciens* mit Gerste näher untersucht werden sollte (Nägele, 2010).

Gerstenkeimlinge (*Hordeum vulgare* L. cv. Barke) wurden mit *S. liquefaciens* MG1 und der AHL-negativ Mutante *S. liquefaciens* MG44 in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml Medium eine Stunde lang inokuliert und anschließend in das sterile Reagenzglas-system überführt. Die Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml Medium wurde gewählt, weil die so inokulierten Pflanzen in Vorversuchen die stärksten Enzymveränderungen aufwiesen. Die Pflanzen wurden anschließend bezüglich ihrer Morphologie untersucht und die Aktivität ausgewählter Enzyme bestimmt. Des Weiteren wurde die Besiedlung der zwei Bakterienstämme mikroskopisch und durch Bestimmung der „colony forming units“ (cfu) an der Wurzel kontrolliert. Beide Bakterienstämme waren in der Lage die Rhizosphäre von Gerste zu besiedeln (siehe Abbildung 3.32). Dabei hatte die Fähigkeit AHLs zu produzieren keinen Einfluß auf die Kolonisierung. Die Zahl der Bakterien pro Pflanze

schwankte zwischen $1 \cdot 10^8$ cfu am Tag 3 und $3 \cdot 10^{10}$ cfu am Tag 21 nach der Inokulation. Am Tag 3 nach der Inokulation war die Zellzahl pro Gramm Frischgewicht der Wurzel im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten deutlich erhöht. Dies lag vermutlich daran, dass sich das Frischgewicht der Wurzel zwischen Tag 1 und Tag 3 nach der Inokulation nur wenig veränderte. Die Bakterien konnten also im Verhältnis zum Frischgewicht die Wurzeln stärker besiedeln. Nach Tag 3 erhöhte sich das Frischgewicht, weshalb die cfu pro Gramm Wurzelfrischgewicht wieder deutlich geringer wurden. Insgesamt ist ersichtlich, dass *S. liquefaciens* die Rhizosphäre von Gerste im Glasperlensubstrat gleichbleibend gut über den gesamten Versuchszeitraum besiedeln konnte.

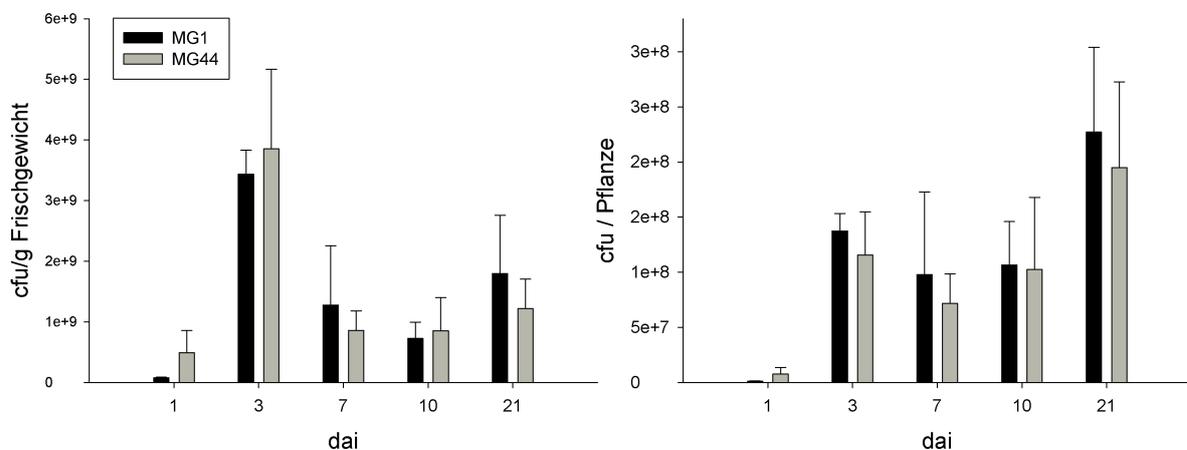


Abbildung 3.32 – Cfu von *S. liquefaciens* MG1 bzw. MG44 an den Wurzeln von Gerste. Links ist die cfu pro Gramm Frischgewicht der Wurzel dargestellt, rechts die cfu pro Wurzel einer Pflanze. Die Daten wurden von Bernhard Nägele zur Verfügung gestellt (Nägele, 2010).

Nach 11 bzw. 21 Tagen ab Zeitpunkt der Inokulation wurde sowohl das Frischgewicht in Blatt und Wurzel als auch die Länge des Sprosses bestimmt. An beiden Erntezeitpunkten war das Frischgewicht der Wurzeln der mit dem Stamm MG44 inokulierten Pflanzen im Vergleich zu den mit MG1 inokulierten Pflanzen signifikant um 11 % reduziert (t-test, $p < 0,05$) (Nägele, 2010). Das Frischgewicht des Sprosses war am Tag 11 nach der Inokulation in den MG44 behandelten Pflanzen signifikant um 8 % reduziert, am Tag 21 waren die Spross-Frischgewichte in allen Pflanzen wieder in etwa gleich. Auch die Spross-Länge war in den mit MG44-inokulierten Pflanzen am Tag 11 signifikant um 11 % reduziert. Bei einer Durchschnittslänge der MG1-inokulierten Pflanzen von 21,25 cm waren die mit MG44-inokulierten Pflanzen im Schnitt 2,3 cm kleiner.

10 Tage nach der Inokulation mit *S. liquefaciens* MG1 bzw. MG44 wurde die Aktivität der GSTs mit verschiedenen Modellsubstraten und Enzyme des antioxidativen Stoffwechsels gemessen. Die Proteine wurden dafür wie unter 2.2.9 beschrieben extrahiert und die

Messungen der Enzymaktivitäten wie unter 2.2.10 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die mit einer Kultur aus autoklavierten *S. liquefaciens* MG44 inokuliert wurden. Die Kontrollen wiesen dabei zu keinem Zeitpunkt eine bakterielle Besiedelung auf. Um den Einfluss der bakteriell produzierten AHLs auf Wurzeln und Blätter der Gerste im Vergleich zu der Inokulation mit der Reinsubstanz einschätzen zu können, wurden die Daten aus Nägele (2010) neu aufbereitet. In Tabelle 3.3 sind die Veränderungen der GST-Aktivität in Tabelle 3.4 die Veränderungen der Aktivitäten ausgewählter ROS-Enzyme 10 Tage nach Applikation mit *S. liquefaciens* MG1 bzw. C6-HSL dargestellt. In beiden Tabellen ist die Aktivität in % zur Kontrolle aufgetragen. Bei der Inokulation mit der Reinsubstanz dienten Pflanzen, die mit der gleichen Menge an Ethanol behandelt wurden, als Kontrolle; bei der Inokulation mit *S. liquefaciens* MG1 diente der Stamm MG44 als Kontrolle, da dieser keine AHLs produzieren kann.

Sowohl in den Blättern als auch in den Wurzeln waren die Aktivitäten der GST für CDNB in beiden Behandlungen leicht verringert. Zwischen der Behandlung mit MG1 und reinem C6-HSL gab es keinen signifikanten Unterschied. Auch bei den DCNB- und Fluorodifenaktivitäten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Art der Behandlung. Einzig die pNpa-Aktivität der Wurzeln war signifikant verschieden (t-test, $p < 0,001$) abhängig von der Behandlung.

Bei den antioxidativen Enzymen gibt es bei den meisten Enzymen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Änderung der Enzymaktivität in Abhängigkeit der Art der Behandlung. Lediglich die GR-Aktivitäten in den Blättern sind nach C6-HSL-Behandlung signifikant verschieden zu der Inokulation mit *S. liquefaciens* MG1 (t-test, $p < 0,05$). Auch hier zeigen die Enzyme bis auf diese Ausnahme die gleichen Tendenzen der Veränderungen der Aktivität nach der Behandlung mit den AHLs.

Tabelle 3.3 – Vergleich der GST-Aktivität in Gerste nach C6-HSL- und MG1-Inokulation.

	CDNB %	DCNB %	Fluorodifen %	pNpa %
Wurzel				* * *
MG1	79 ± 10	43 ± 35	133 ± 17	97 ± 13
C6-HSL	86 ± 6	84 ± 1	113 ± 9	37 ± 23
Blätter				
MG1	96 ± 13	102 ± 18	103 ± 10	103 ± 16
C6-HSL	95 ± 17	59 ± 21	118 ± 12	77 ± 22

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Tendenz, ob es zu einer Steigerung oder zu einer Verringerung der Enzymaktivität nach AHL-Behandlung kommt, unabhängig davon ist, ob die Gerstenpflanzen mit der AHL-Reinsubstanz oder mit von Bakterien

Tabelle 3.4 – Vergleich der Aktivität ausgewählter ROS-Enzyme von Gerste nach C6-HSL- und MG1-Inokulation.

	CAT %	APOX %	GR %	POX %
Wurzel				
MG1	89 ± 29	123 ± 31	64 ± 16	106 ± 21
C6-HSL	99 ± 0	140 ± 12	83 ± 39	140 ± 54
Blätter			*	
MG1	63 ± 18	100 ± 6	93 ± 12	94 ± 11
C6-HSL	65 ± 25	110 ± 4	150 ± 29	99 ± 21

produzierten AHLs behandelt wurden. Das artifizielle Versuchssystem der Applikation freier AHLs ist also geeignet, die pflanzliche Reaktion auf mikrobielles QS abzubilden.

3.2.4 AHL-Applikation direkt am Enzym

Aktivitäten gereinigter GSTs

Da viele GST-Aktivitäten sich spezifisch und recht schnell auf die Applikation von AHLs an den Wurzeln veränderten, sollte weiterhin untersucht werden, ob die Enzyme direkt mit den AHLs interagieren. Dabei können sowohl katalysierte als auch nicht katalysierte Effekte in Frage kommen. Aus diesem Grund wurden Proteinrohextrakte aus Wurzel- und Blattmaterial von im Gewächshaus angezogener Gerste hergestellt und die GSTs aus dem Extrakt weiter aufgereinigt. Die Aufreinigung der GSTs erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Der Proteinrohextrakt wird dazu auf eine Säule aus GSH-Agarose appliziert. GSTs binden an Glutathion und verbleiben so lange im Säulenmaterial, bis sie mit einem Puffer, welcher Glutathion in hohen Konzentrationen enthält, wieder von der Säule gelöst werden (siehe Abbildung 2.82.10). Es wurden zwei verschiedene Affinitätschromatographiemethoden getestet. Zum einen die salzlose Affinitätschromatographie nach Pascal *et al.* (1998), zum anderen eine an eine FPLC gekoppelte Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.2.11 und 2.2.11 für die genaue Durchführung). Zum Vergleich der beiden Chromatographiemethoden wurde aus insgesamt 40 g Blattmaterial von Gerste ein Proteinrohextrakt hergestellt, aufkonzentriert und je zur Hälfte auf die jeweilige Chromatographiesäule gegeben. In Abbildung 3.33 sind die Ergebnisse der beiden Affinitätschromatographiemethoden aus den Blattrohextrakten von Gerste zu sehen. Die Konjugation mit CDNB diente als Marker für die erfolgreiche Trennung von GST. Aufgrund der CDNB-Aktivitäten wurden die Einzelfraktionen zu größeren Fraktionen zusammengefasst (siehe farbige Markierung), auf ein Polyacrylamidgel gegeben und der Größe nach aufgetrennt. Neben den Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden auch die Spüllösungen der Säulen auf das Gel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Säule nach der Elution der GSTs keinerlei

Proteine mehr enthielt. Als Größenreferenz wurde eine Pferde-GST auf das Gel aufgetragen. Der größte Teil der Proteine des Rohextrakts lief durch die Säule, ohne an diese zu binden („blaue“ Fraktionen). Die Tatsache, dass die Konzentration der ersten Fraktionen bei der salzlosen Affinitätschromatographie auf der PAGE geringer erscheinen als bei der FPLC-gekoppelten Affinitätschromatographie, liegt an einer hohen Verdünnung der ersten Fraktion bei der salzlosen Affinitätschromatographie. Bei beiden Affinitätschromatographiemethoden erscheinen GST-Banden in den Fraktionen, bei denen sich gelöstes GSH im Puffer befand („rote“ und/oder „rosa“ Fraktionen). Bei der FPLC-gekoppelten Affinitätschromatographie befanden sich zusätzlich noch weitere Glutathion bindende Proteine in diesen Fraktionen, die größer sind als die GSTs. Die Spüllösungen enthielten in der ersten Spülfraktion der FPLC-gekoppelten Affinitätschromatographie noch restliche Proteine. Die Proteinbanden der letzten Spülfraktion sind ein Artefakt, das durch die Aufkonzentration entstanden ist. Die Spülfraktionen der salzlosen Affinitätschromatographie enthielten keinerlei Verunreinigungen. Die Fraktionen, die GSTs enthielten, wurden auf ein 2D-Gel aufgetragen. Auch hier konnte man bei der FPLC-gekoppelten Affinitätschromatographie andere Glutathion-bindende Proteine erkennen. Auf dem 2D-Gel der salzlosen Affinitätschromatographie sind lediglich GST-Isoenzyme zu sehen. Alle haben in etwa die gleiche Größe (20-25 kDa) und konnten anhand ihres Isoelektrischen Punktes weiter aufgetrennt werden. Der eingesetzte pH-Gradient der ersten Dimension reichte von pH 4 (linke Seite des Gels) bis pH 7 (rechte Seite des Gels). In den Blättern von Gerste befinden sich demnach mindestens 12 GST-Isoenzyme mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4,9 bis 6,4. Dixon *et al.* (2002) geben den isoelektrischen Punkt für nicht membrangebundene GSTs aus Pflanzen mit 4-5 an, eine aus Reis isolierte GST wies einen isoelektrischen Punkt von 6,4 auf (Hong *et al.*, 1999) und in Arabidopsis wurden für einzelne GSTs isoelektrische Punkte von 5,8 - 6,2 angegeben (Jiang *et al.*, 2007). Die hier ermittelten isoelektrischen Punkte der GSTs aus Gerste stimmen also mit typischen Werten pflanzlicher GSTs überein. Da die Aufreinigung der GSTs mit der salzlosen Affinitätschromatographie erfolgreicher war, wurden nur diese Extrakte für weitere Versuche genutzt.

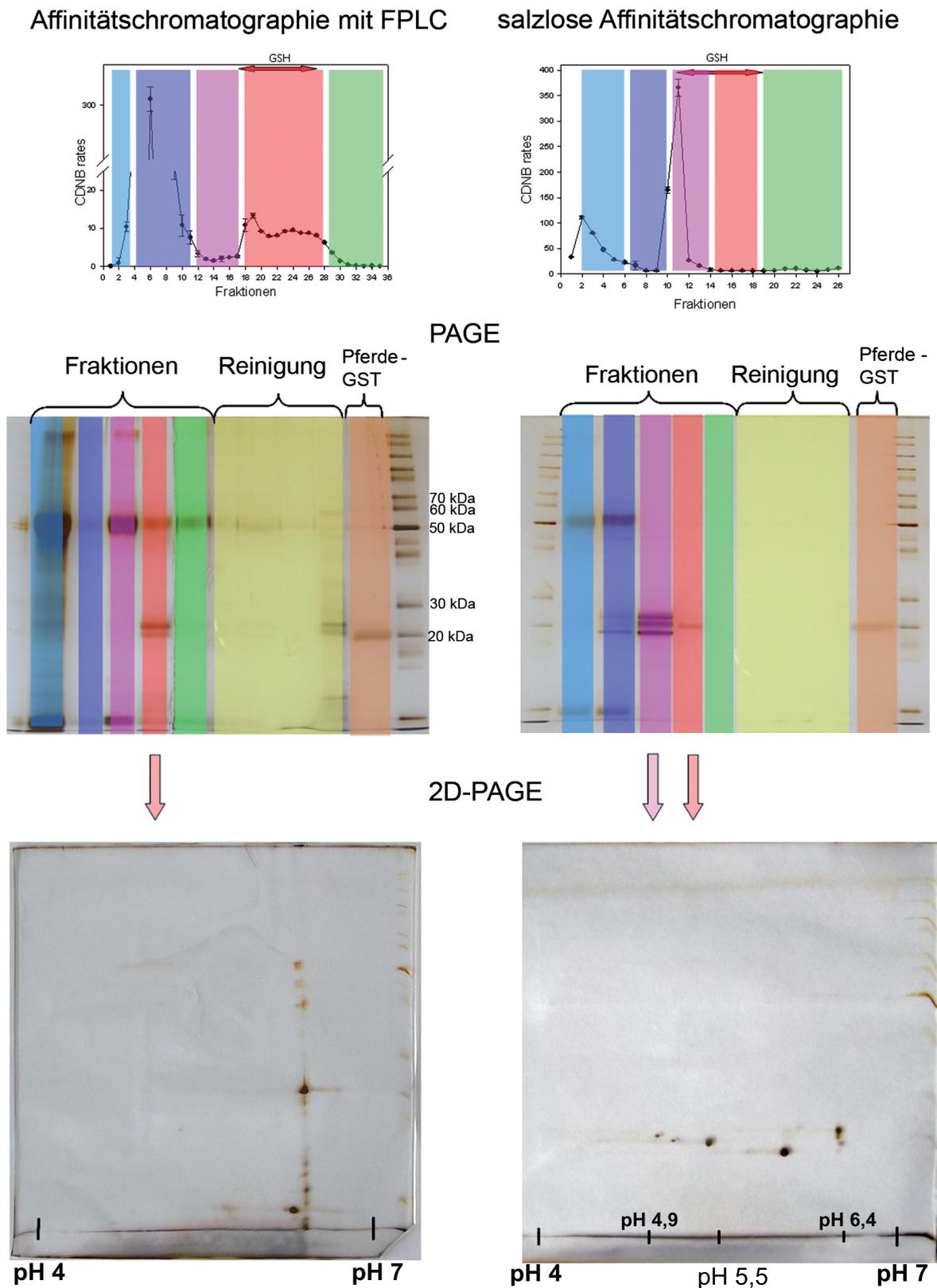


Abbildung 3.33 – Vergleich der salzlosen Affinitätschromatographie (rechts) mit der FPLC-gekoppelten Affinitätschromatographie (links) mittels PAGE. Oben: GST-Aktivitätsmessung der einzelnen Fraktionen mit dem Substrat CDNB. Die farbliche Überlagerung kennzeichnet die Zusammenfassung der Fraktionen nach ihrer Aktivität zum späteren Auftragen auf die PAGE. Mitte: PAGE der zusammengefassten Fraktionen. Als Referenz wurden eine Pferde-GST verwendet. Unten: 2D-Page. Die Pfeile geben an, welche Fraktion auf das 2D-Gel aufgetragen wurde.

Die GST-Aktivitäten wurden zuerst in Proteinrohextrakten gemessen. Dafür wurden 1 mM C8-HSL direkt in den Enzymextrakt gegeben und die GST-Aktivität mit verschiedenen Modellsubstraten nach 2 h Inkubationsdauer ermittelt.

Die GST-Aktivitäten im Rohextrakt von Blättern und Wurzeln waren bei der Messung mit verschiedenen Modellsubstraten nach Zugabe von C8-HSL unterschiedlich reguliert. Während die CDNB- und pNpa-Aktivitäten sich nach der Behandlung mit C8-HSL kaum veränderten, waren die DCNB-Aktivitäten in den Wurzel- und Blattextrakten im Vergleich zur Kontrolle stark verringert (-15 % bzw. -64 %). Die NBC-Aktivitäten waren nach der C8-HSL Behandlung in beiden Extrakten stark erhöht (Blatt: +66 %; Wurzel: +93 %) (siehe Abb 3.34).

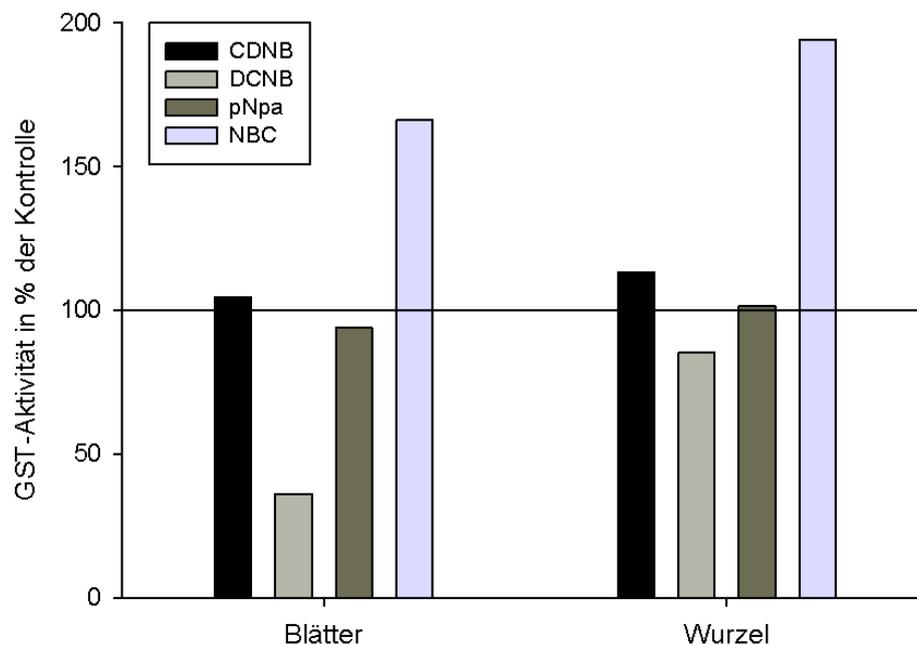


Abbildung 3.34 – Veränderung der GST-Aktivität in *H. vulgare* nach der Applikation von 1 mM C8-HSL in den Proteinrohextrakten. Die GST-Aktivität ist in % der Kontrollbehandlung dargestellt.

Danach wurden sie GSTs aus dem Rohextrakt mittels salzloser Affinitätschromatographie aufgereinigt und die einzelnen, gereinigten Fraktionen mit 1 mM C8-HSL behandelt. Die GST-Aktivität wurde mit verschiedenen Modellsubstraten 2 h nach der Inkubation gemessen.

Die CDNB-Aktivität, die im Rohextrakt keine Veränderungen nach der Applikation von C8-HSL aufwies, zeigt nach der Aufreinigung der GSTs ein differenziertes Aktivitätsmuster

(siehe Abbildung 3.35). So sind beispielsweise die CDNB-Aktivitäten der Wurzelextrakt-Fraktionen 13 und 17 im Vergleich zur Kontrolle verringert (-18 % bzw -26 %), während die Aktivität der Fraktion 19 im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht ist (+14 %).

Bei den Fraktionen der Blattextrakte ist die Aktivität in den Fraktion 12 reduziert (-13 %) und in der Fraktion 15 gegenüber der Kontrollbehandlung erhöht (+14 %). Da die CDNB-Aktivitäten sich im Proteinrohextrakt nach C8-HSL Zugabe kaum veränderten im Vergleich zur Kontrolle, die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen nach Aufreinigung dennoch unterschiedliche Aktivitätsmuster aufwiesen, ist vorstellbar, dass sich die Aktivität im Rohextrakt aus den Aktivitäten der Fraktionen zusammensetzt und in der Summe keine Veränderung in der Aktivität sichtbar wird.

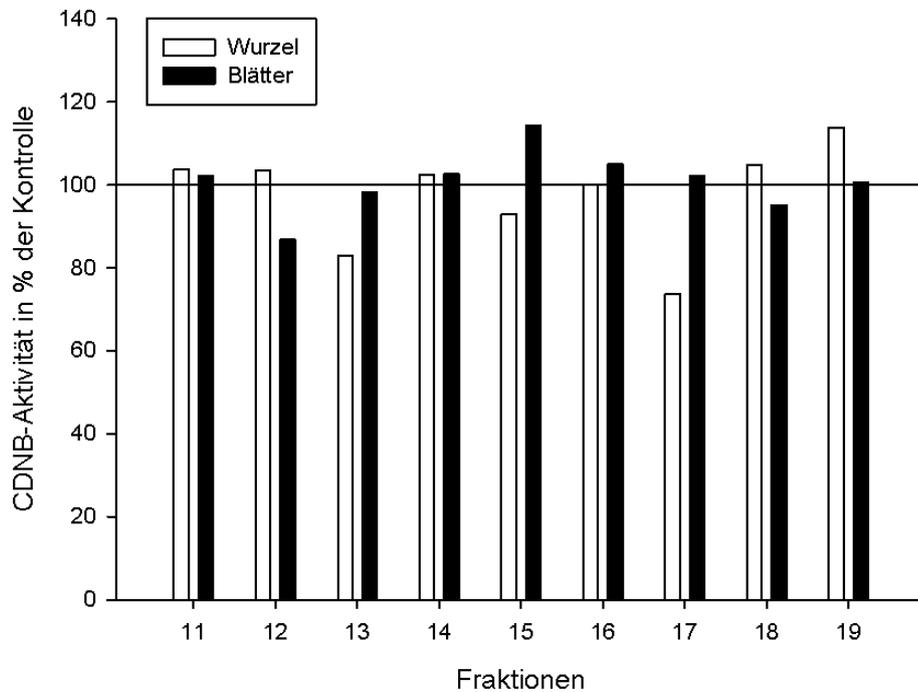


Abbildung 3.35 – CDNB-Aktivität in *H. vulgare* nach der Applikation von 1 mM C8-HSL zu den Fraktionen der Affinitätschromatographie. Die GST-Aktivität ist in % der Kontrollbehandlung dargestellt.

Die NBC-Aktivität der Blattextrakte ist vor allem in den Fraktionen 17, 18 und 19 auf bis zu 587% der Kontrollaktivität erhöht, die restlichen Fraktionen haben maximal bis zu 165% der Kontrollaktivität. Es ist vorstellbar, dass die erhöhte NBC-Aktivität des Blattrohextraktes (166%) vor allem durch die Aktivität der Fraktion 17 zustande kommt.

Beim Wurzelextrakt ist die Aktivität hauptsächlich in den Fraktionen 15 (340%) und 18 (290%) erhöht, wohingegen die Aktivität in Fraktion 11 gegenüber der Kontrollaktivität verringert ist (-29%) (siehe Abbildung 3.36). Auch hier ist anzunehmen, dass die erhöhte NBC-Aktivität im Wurzelrohextrakt (193%) aus der Summe der Aktivitäten der einzelnen Fraktionen gebildet wird.

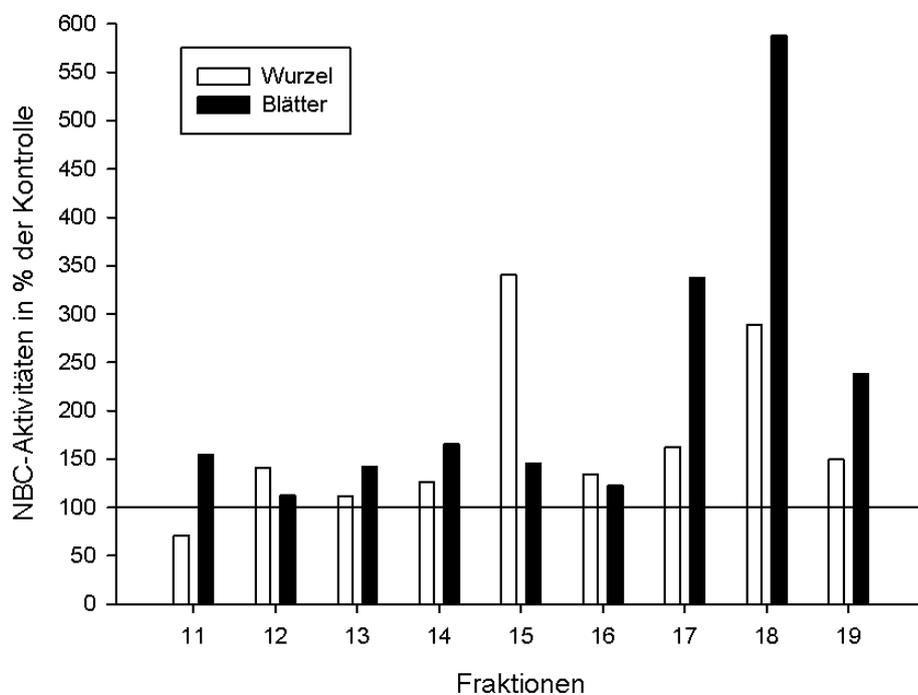


Abbildung 3.36 – NBC-Aktivität in *H. vulgare* nach der Applikation von 1 mM C8-HSL zu den Fraktionen der Affinitätschromatographie. Die GST-Aktivität ist in % der Kontrollbehandlung dargestellt.

Die pNpa-Aktivität in den gereinigten GST-Fractionen der Wurzel reagiert sehr unterschiedlich. Obwohl im Wurzelrohextrakt keine Veränderung der pNpa-Aktivität zu beobachten war, erhöhte sich die pNpa-Aktivität in Fraktion 11 der gereinigten GSTs der Wurzeln auf mehr als 400 % der Kontrollaktivität. Auch Fraktion 13, 18 und 19 zeigten gegenüber den Kontrollen eine stark erhöhte Aktivität. Im Gegensatz dazu war die Aktivität der Fraktion 12 (-62 %), 16 (-51 %) und 20 (-49 %) gegenüber der Kontrollaktivität reduziert.

Auch in den aufgereinigten Fraktionen des Blattmaterials gab es Fraktionen mit verringerter (z.B. Fraktion 13: -45 %) und mit erhöhter (z.B. Fraktion 12: +27 %) Aktivität.

Man kann dennoch davon ausgehen, dass sich die Veränderung der pNpa-Aktivität im Rohextrakt aus der Summe der Aktivitäten der einzelnen Fraktionen bildet. Da bei den Aktivitäten der aufgereinigten Blattextraktfraktionen Fraktionen mit stark erhöhter, aber auch stark erniedrigter Aktivität vorkamen, könnte dies in der Summe zu keiner signifikanten Veränderung der pNpa-Aktivität im Rohextraktes geführt haben.

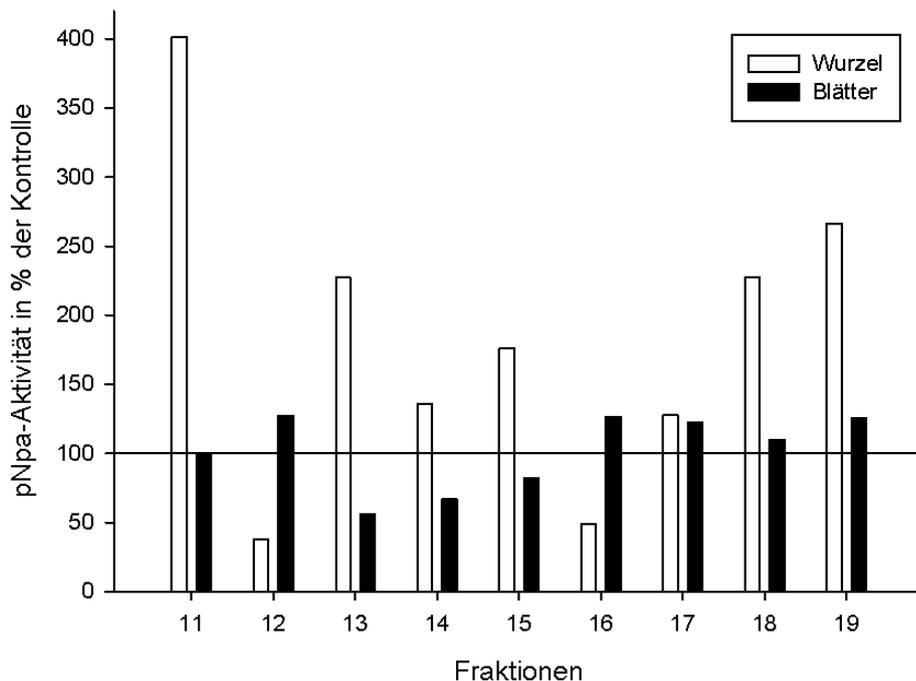


Abbildung 3.37 – pNpa-Aktivität in *H. vulgare* nach der Applikation von 1 mM C8-HSL zu den Fraktionen der Affinitätschromatographie. Die GST-Aktivität ist in % der Kontrollbehandlung dargestellt.

Bei der DCNB-Aktivität aufgereinigter Fraktionen der Blätter gibt es eine Fraktion mit deutlich verringerter Aktivität (Fraktion 16: -62 %) und drei Fraktionen mit deutlich erhöhter Aktivität (Fraktion 15: 265 %; Fraktion 17: 198 % und Fraktion 18: 177 %). In den nicht weiter aufgereinigten Rohextrakten der Blätter war die DCNB-Aktivität nach C8-HSL-Applikation jedoch um -64 % verringert.

Bei den aufgereinigten Fraktionen der Wurzelextrakte gab es nur eine Fraktion mit verringerter Aktivität nach C8-HSL Behandlung (Fraktion 19: -17 %). Alle anderen Fraktionen hatten im Vergleich zur Kontrollbehandlung eine leicht erhöhte Aktivität (bis zu 204 % der Kontrollaktivität). Im nicht weiter aufgereinigtem Wurzelrohextrakt war die DCNB-Aktivität nach der Behandlung mit C8-HSL jedoch um -15 % verringert. Die DCNB-Aktivität der Wurzelrohextrakte lässt sich also nicht allein aus der Summe der Aktivität der einzelnen Fraktionen bilden. Es ist jedoch bekannt, dass nicht alle GSTs an GSH-Agarose binden. In Weizen binden vor allem Phi-GSTs, die Tau-GSTs jedoch vor allem an S-Hexylglutathion (Cummins *et al.*, 1997). Es ist also möglich, dass bei der hier verwendeten Affinitätschromatographie einige GST-Isoenzyme zusammen mit den nicht GSH- bindenden Proteinen aus dem Rohextrakt verloren gingen.

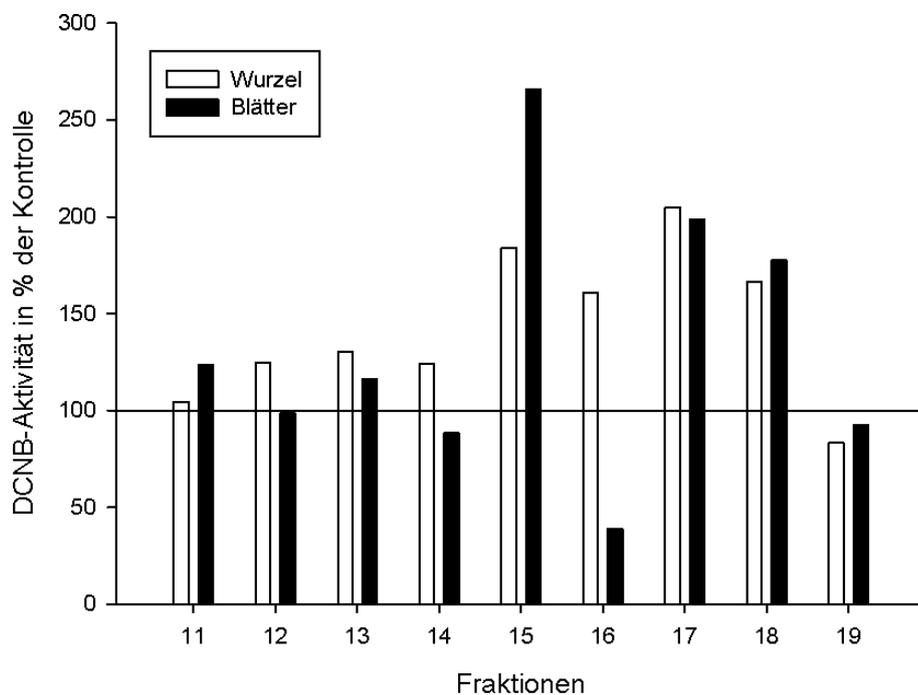


Abbildung 3.38 – DCNB-Aktivität in *H. vulgare* nach der Applikation von 1 mM C8-HSL zu den Fraktionen der Affinitätschromatographie. Die GST-Aktivität ist in % der Kontrollbehandlung dargestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass GST-Isoenzyme, obwohl sie teilweise das gleiche Substrat katalysieren, sehr unterschiedlich auf den direkten Kontakt mit AHLs reagieren. Zumeist konnten die GST-Aktivität der verschiedenen Modellsubstrate im Proteinrohextraktes aus der Summe der Aktivitäten der einzelnen aufgereinigten Fraktionen gebildet werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass einzelne GST-Isoenzyme bei der Reinigung mit der salzlosen Affinitätschromatographie verloren gingen.

P450-Monooxygenase (EC 1.14.-.-)

P450-Monooxygenasen sind Häm-Proteine, die endogene Substrate in verschiedenen Biosynthesewegen, aber auch verschiedenste Xenobiotika oxidieren können. Viele dieser Enzyme sind indirekt an der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligt, da sie an der Biosynthese von Lignin, Terpenen und Alkaloiden mitwirken. P450-Monooxygenasen reagieren in Pflanzen spezifisch auf verschiedene äußere Einflüsse wie die Zugabe von sogenannten „Safener“, aber auch auf Phytopathogene (Persans *et al.*, 2001). Da auch Fettsäuren von pflanzlichen P450-Monooxygenasen oxidiert werden (Pflugmacher and Sandermann, 1998), könnten auch die Acyl-Seitenketten der AHLs ein Substrat der P450-Monooxygenasen darstellen und so in der Pflanze weiter metabolisiert werden. Dies wurde mit dem unter Abschnitt 2.2.10 beschriebenen Testsystem untersucht. Dabei wurden 10 pmol CYP2C9 und 200 μ M C8-HSL als zu untersuchendes Substrat eingesetzt und der verbrauchte Sauerstoff während der Reaktion über die Fluoreszenz des in der Platte eingebetteten Fluorophors ermittelt. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals entspricht dabei dem Verbrauch an Sauerstoff. Die Enzymaktivität ermittelt sich aus dem verbrauchten Sauerstoff pro mg eingesetztem Protein (nkat/mg; für die genaue Berechnung siehe Abschnitt 2.2.10).

In Abbildung 3.39 ist die Zunahme der Fluoreszenz nach Zugabe von C8-HSL (schwarz) im Vergleich zur Kontrolle (weiß) zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass C8-HSL von CYP2C9 als Substrat genutzt werden kann. Die Berechnung der Aktivität erfolgte im linearen Bereich ($t = 40 \text{ min} - t = 60 \text{ min}$) der Kurve. Die CYP2C9-Aktivität betrug nach Abzug der Kontrollen 2,2 nkat/mg. Es gibt demnach P450-Monooxygenasen, die AHLs direkt als Substrat nutzen können und einen eventuellen ersten Schritt der Metabolisierung der AHLs einleiten.

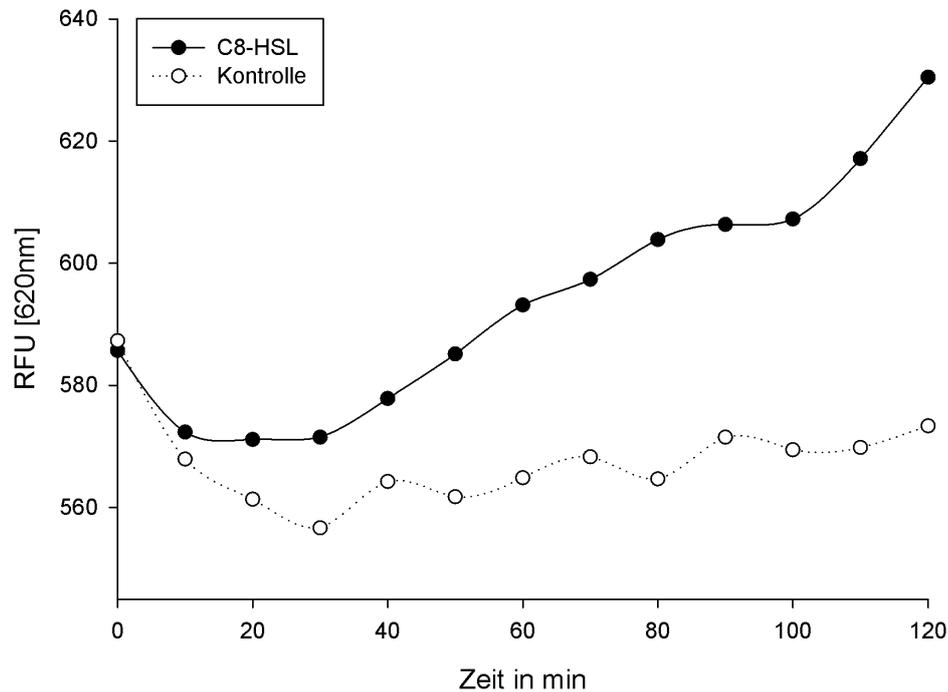


Abbildung 3.39 – Aktivität von CYP2C9 nach Applikation von 200 μM C8-HSL. Dargestellt ist die Aktivität nach Zugabe von C8-HSL als Substrat (schwarz) und die Aktivität der Kontrollen (weiß). Die Aktivität wurde mit dem BD-Oxygen Biosensor System gemessen.

POX-Aktivität im Apoplastensaft

Peroxidasen sind eine hochdiverse Proteinklasse. Die Entgiftung von H_2O_2 ist nicht die Hauptaufgabe der Klasse III-Peroxidasen. Bei POX-Reaktionen können Radikale entstehen, die die Vernetzung phenolischer Verbindungen, wie beispielsweise bei der Suberin- oder Ligninproduktion fördern. Außerdem können Klasse III-Peroxidasen ohne H_2O_2 Indol-3-essigsäure und noch weitere Substrate oxidieren (zusammengefasst in Veitch, 2004). Einige POX-Isoenzyme sind im Apoplasten lokalisiert (Shigeoka *et al.*, 2002).

Auch im Apoplastensaft von *H. vulgare* waren Peroxidasen vorhanden. Diese konnten jedoch nicht mit dem Substrat Guajacol, sondern nur mit dem Substrat TMB gemessen werden. Bereits eine Stunde nach der Zugabe von AHLs in den Apoplastensaft war die POX-Aktivität in den behandelten Apoplastensaftproben um mehr als die Hälfte reduziert. Die Inhibierung der TMB-Aktivität war dabei unabhängig von der Länge der Acyl-Seitenkette der eingesetzten AHLs. Versuche mit Enzymextrakten aus Wurzeln oder Blättern, aber auch mit reiner POX aus Meerrettich führten hingegen zu keinerlei Veränderungen der Enzymaktivität. Es gibt demzufolge im Apoplastensaft eine spezifische POX, die mit den AHLs interagieren kann.

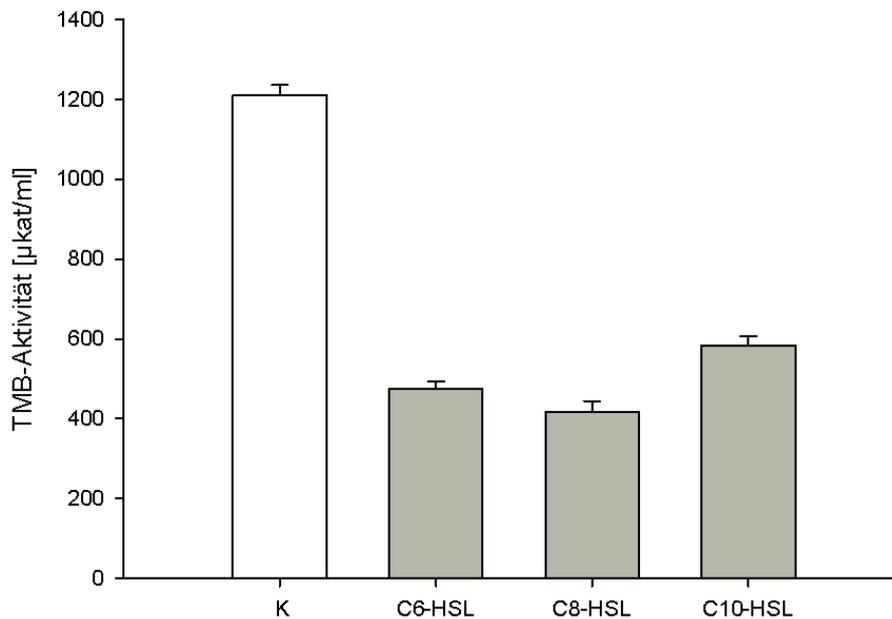


Abbildung 3.40 – POX-Aktivität im Apoplastensaft von Gerste. Gemessen wurde die Aktivität mit dem Substrat TMB 1 h nach der Zugabe von 100 µM des jeweiligen AHLs. Die Aktivität ist in µkat/ml Apoplastensaft angegeben. (n = 4)

3.2.5 Applikation am Halm

Da bei den Messungen der Enzymaktivitäten in den Blattextrakten abhängig davon, ob die AHLs an der Wurzel, oder am abgeschnittenen Halm appliziert wurden, Unterschiede auftraten, wurde nach einem möglichen „zweiten“ Signal gesucht, welches zu den beobachteten systemischen Veränderungen führte. Phytohormone können beispielsweise Enzymaktivitäten modulieren. Deshalb wurden Pflanzen mit je 10 µM JA, mJA, SA, mSA und ACC (einer Vorstufe von Ethylen) behandelt. Da auch H₂O₂ und pH-Wert-Veränderungen mögliche Signale für Pflanzen sein können, wurden die Pflanzen außerdem mit 10 µM H₂O₂ sowie mit MS-Medium von pH 3 bzw. pH 8,9 behandelt (das MS-Medium bei allen anderen Behandlungen inklusive der Kontrollen hatte einen Wert von pH 6). Die Pflanzen wurden 4 h lang behandelt, die Proteine, wie bereits beschrieben, extrahiert und die einschlägigen Enzymaktivitäten gemessen (n=15 je Behandlung).

Die CDNB-Aktivität reagierte bei allen Behandlungen nur wenig und war auch je nach dem, ob die Pflanzen an der Wurzel, oder am abgeschnittenen Halm mit AHLs behandelt wurden, nicht signifikant verschieden zu den Kontrollen (siehe Abbildung 6.4 im Anhang). Die DCNB-Aktivität hingegen war bei allen Behandlungen recht stark um bis zu -40 % verringert. Jedoch war auch hier kein Unterschied zwischen der AHL-Behandlung an Wurzel oder Halm und zwischen den anderen möglichen Signalsubstanzen sichtbar (siehe

Abbildung 6.5 im Anhang). Auch bei der NBC-Aktivität war kein Unterschied zwischen den verschiedenen AHL-Behandlungen erkennbar. Die NBC-GST-Isoenzyme reagierten aber stark auf die Behandlung mit C6-HSL an der Wurzel (+33 %) und auf die Behandlung mit ACC (+58 %) (siehe Abbildung 6.6 im Anhang).

Die NBoC-GST-Isoenzyme reagieren sehr viel differenzierter auf die Applikation mit den verschiedenen Signalsubstanzen. Bei der Applikation mit pH 8,9, SA und ACC erhöhten sich die Aktivitäten um bis zu +81 %, während sie bei allen anderen Substanzen geringer waren als die Aktivität in den Kontrollpflanzen (durchschnittlich -30 %). Zudem war die Aktivität in den Blättern verschieden reguliert, je nach dem, ob C6-HSL an der Wurzel (-21 %) oder am abgeschnittenen Halm (+24 %) appliziert wurde (siehe Abbildung 3.41).

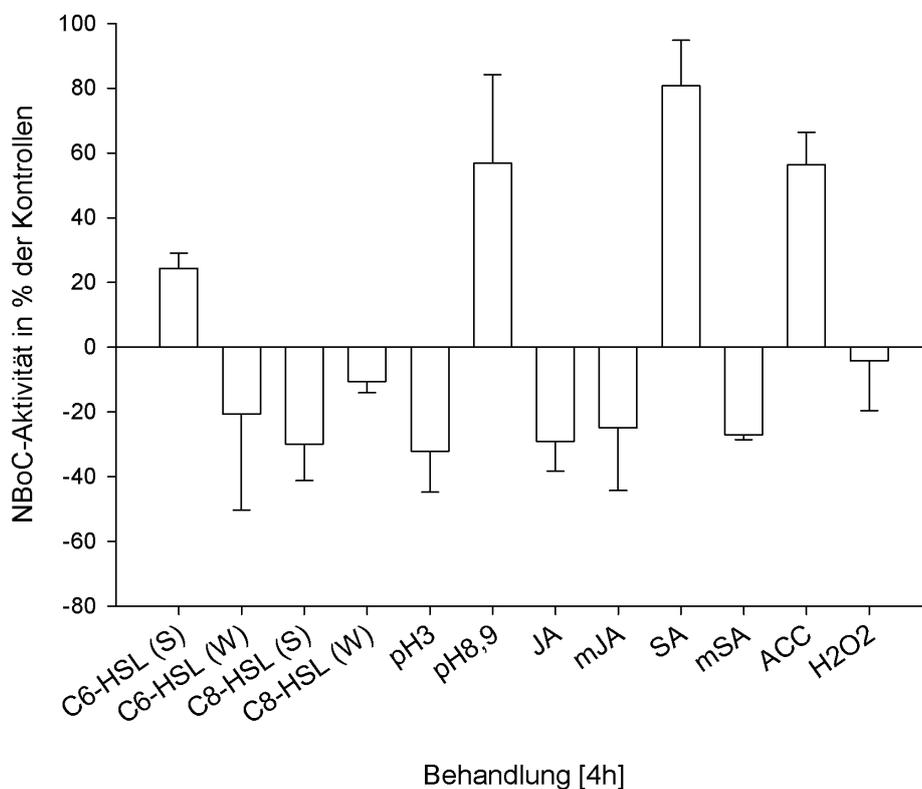


Abbildung 3.41 – NBoC-Aktivität der Blätter von *H. vulgare* 4 h nach Applikation von 10 μ M C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen + Standardabweichung gebildet.

Die Aktivität von Fluorodifen war 4 h nach der AHL-Applikation nur gering verändert, jedoch ist ein Trend je nach Art AHL-Behandlung sichtbar. Bei der Behandlung am abgeschnittenen Halm war die Aktivität leicht erhöht, nach der Behandlung an der Wurzel leicht erniedrigt im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Dies ist jedoch nicht signifikant und nur als Trend zu betrachten. Auf andere mögliche Signalsubstanzen reagierten die Fluorodifen-Isoenzyme nicht. Nur nach der Behandlung mit ACC erhöhte sich die Fluorodifenaktivität der Blätter um +38 % (siehe Abbildung 3.42).

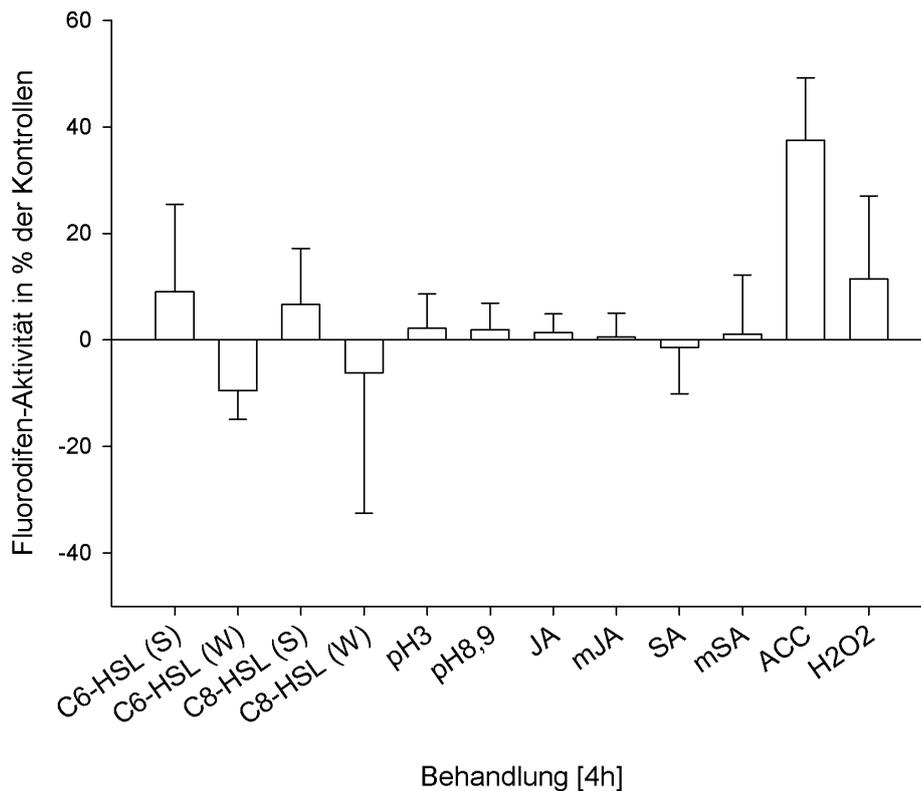


Abbildung 3.42 – Fluorodifen-Aktivität der Blätter von *H. vulgare* 4 h nach Applikation von 10 μ M C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen + Standardabweichung gebildet.

Die pNpa-Aktivitäten waren nach jeder Behandlung niedriger als in den Kontrollpflanzen. Einzig die Applikation mit H₂O₂ führte zu einer leichten Steigerung der pNpa-Aktivität. Die AHL-Applikation an den Wurzeln führte tendenziell zu einer stärkeren Verringerung der Enzymaktivität als die AHL-Applikation an den abgeschnittenen Halmen (siehe Abbildung 3.43).

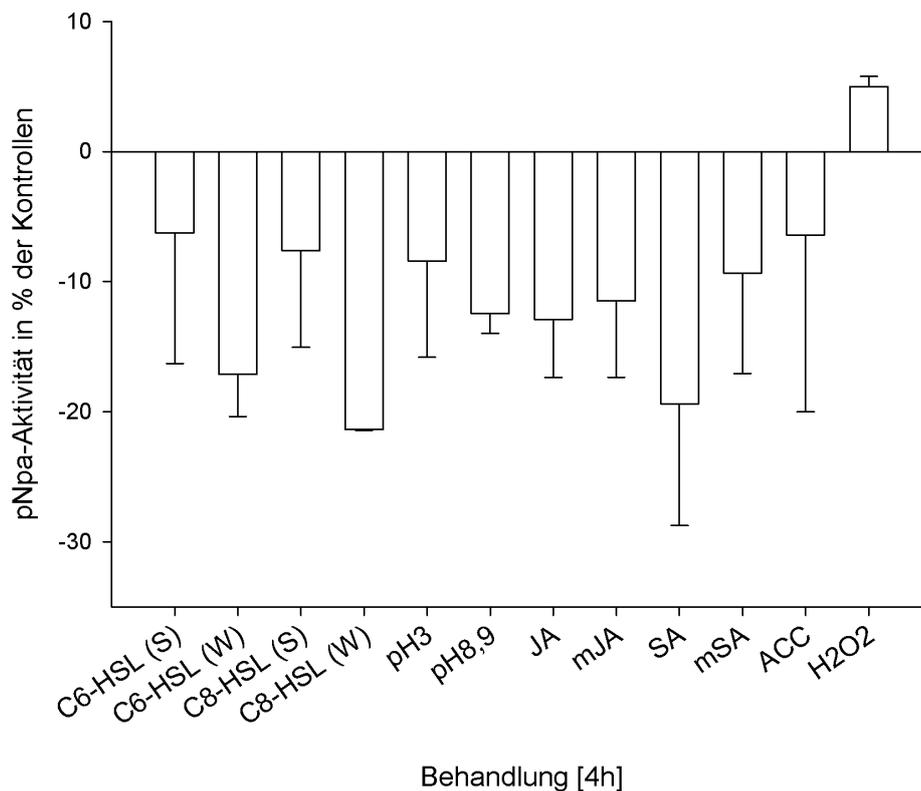


Abbildung 3.43 – pNpa-Aktivität der Blätter von *H. vulgare* 4 h nach Applikation von 10 μ M C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen + Standardabweichung gebildet.

Die SOD-Aktivität der Blätter unterscheidet sich bei Applikation von C8-HSL an der Wurzel und am Halm um 17%. Die Behandlung mit veränderten pH-Werten und die Applikation von mJA veränderten die SOD-Aktivität nicht. Nach der JA-Behandlung verringerte sich die SOD-Aktivität um -17% (ähnlich hoch, wie nach C8-HSL-Applikation an der Wurzel). Nach der Applikation von SA, mSA, ACC und H₂O₂ stieg die SOD-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle an, am stärksten war der Anstieg der Aktivität nach der Applikation von H₂O₂ (+37%) (siehe Abbildung 3.44).

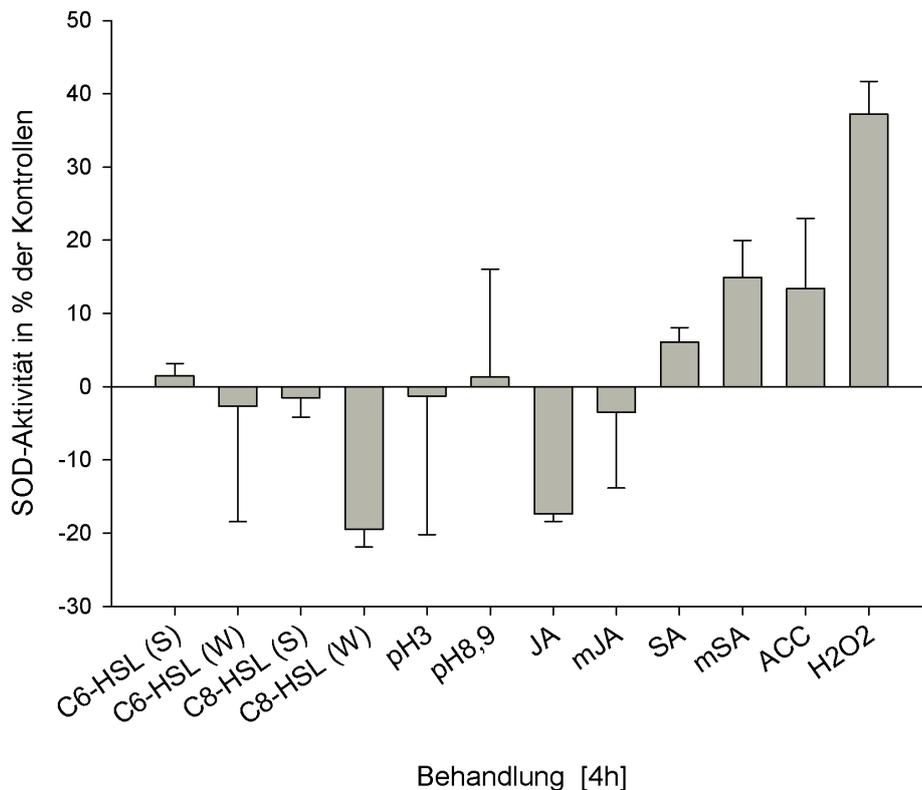


Abbildung 3.44 – SOD-Aktivität der Blätter von *H. vulgare* 4 h nach Applikation von 10 μ M C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen + Standardabweichung gebildet.

Der größte Unterschied der Enzym-Aktivität zwischen der C6-HSL Behandlung an der Wurzel und am Halm wurde bei der CAT gemessen (Differenz zwischen beiden Behandlungen 136 %). Auch bei der Behandlung mit C8-HSL waren die CAT-Aktivitäten verschieden, der Unterschied zwischen den Behandlungen fiel jedoch geringer aus (28 %). Die Behandlung mit pH3, JA und mJA veränderten die CAT-Aktivitäten der Blätter im Vergleich zur Kontrolle nicht; nach der Behandlung mit pH8,9, SA, mSA, ACC und H₂O₂ verringerte sich die Enzymaktivität um bis zu -49 % (siehe Abbildung 3.45).

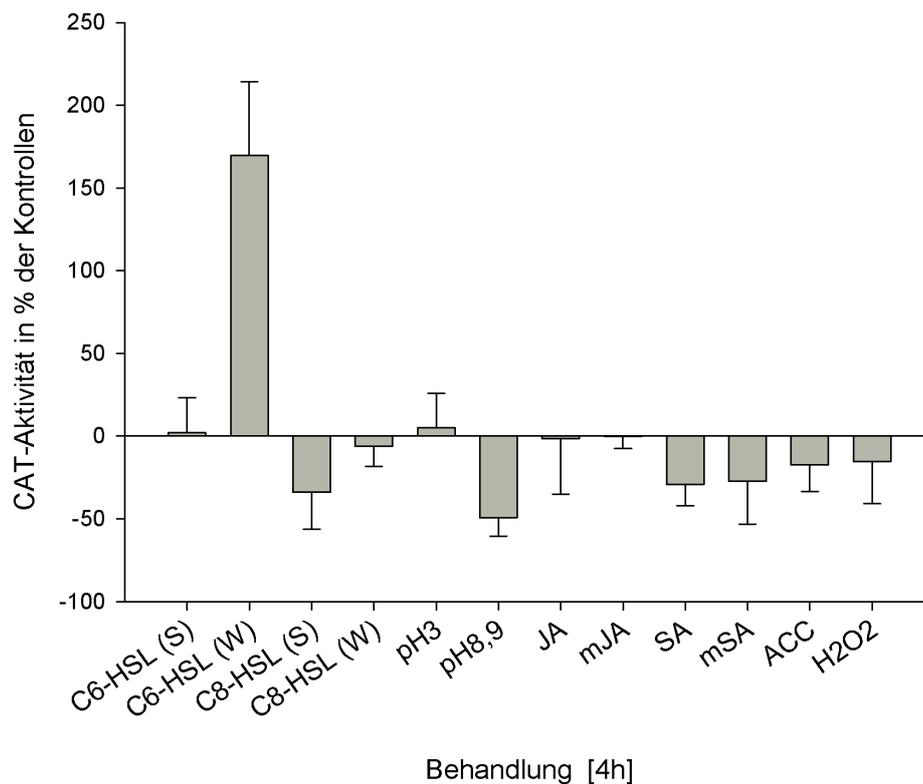


Abbildung 3.45 – CAT-Aktivität der Blätter von *H. vulgare* 4 h nach Applikation von 10 μ M C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen + Standardabweichung gebildet.

Die APOX-Aktivitäten nach AHL-Applikation waren bei beiden AHLs abhängig von der Art der Applikation (an den Wurzeln oder den abgeschnittenen Halmen). Bei C6-HSL betrug die Differenz zwischen den beiden Behandlungen 61 %, bei C8-HSL 74 %. Einzig die Behandlung mit C6-HSL an der Wurzel verringerte die APOX-Aktivität. Durch die Behandlung mit möglichen anderen Signalsubstanzen erhöhte sich die APOX-Aktivität der Blätter um bis zu 62 % (ACC) (siehe Abbildung 3.46).

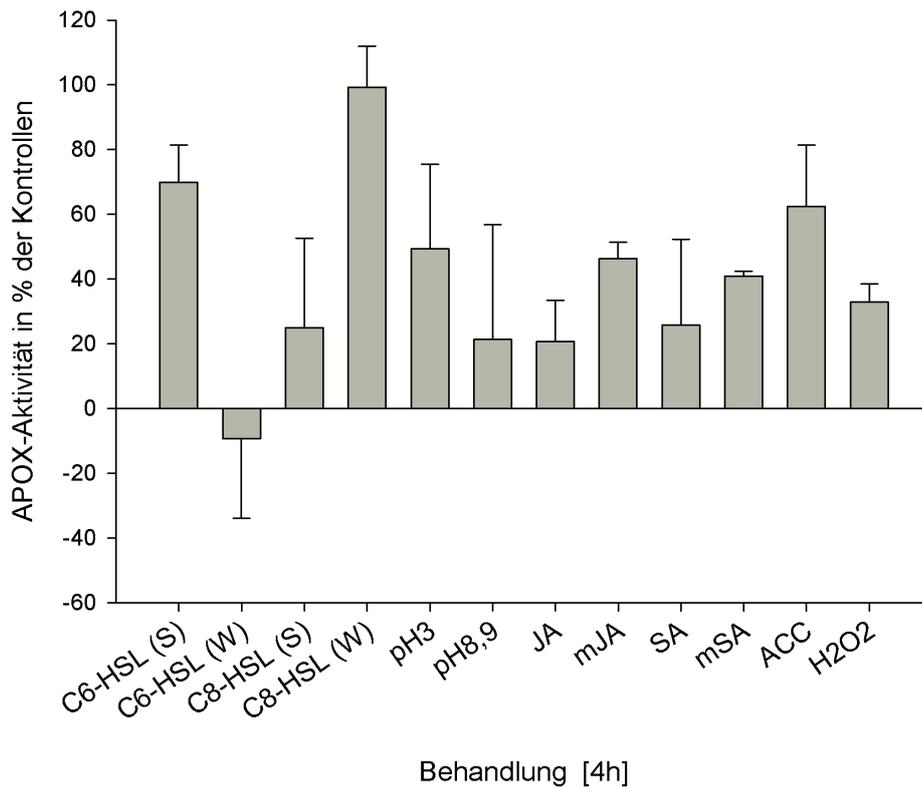


Abbildung 3.46 – APOX-Aktivität der Blätter von *H. vulgare* 4 h nach Applikation von 10 µM C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen + Standardabweichung gebildet.

Die GR-Aktivität verringerte sich nach AHL-Applikation in den Wurzeln, erhöhte sich jedoch nach AHL-Applikation an den abgeschnittenen Halmen bei beiden eingesetzten AHLs. Die Applikation der verschiedenen Signalsubstanzen erhöhte die GR-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen um bis zu 42 %. Dabei reagierte die GR auf alle applizierten Substanzen in etwa gleich (siehe Abbildung 3.47).

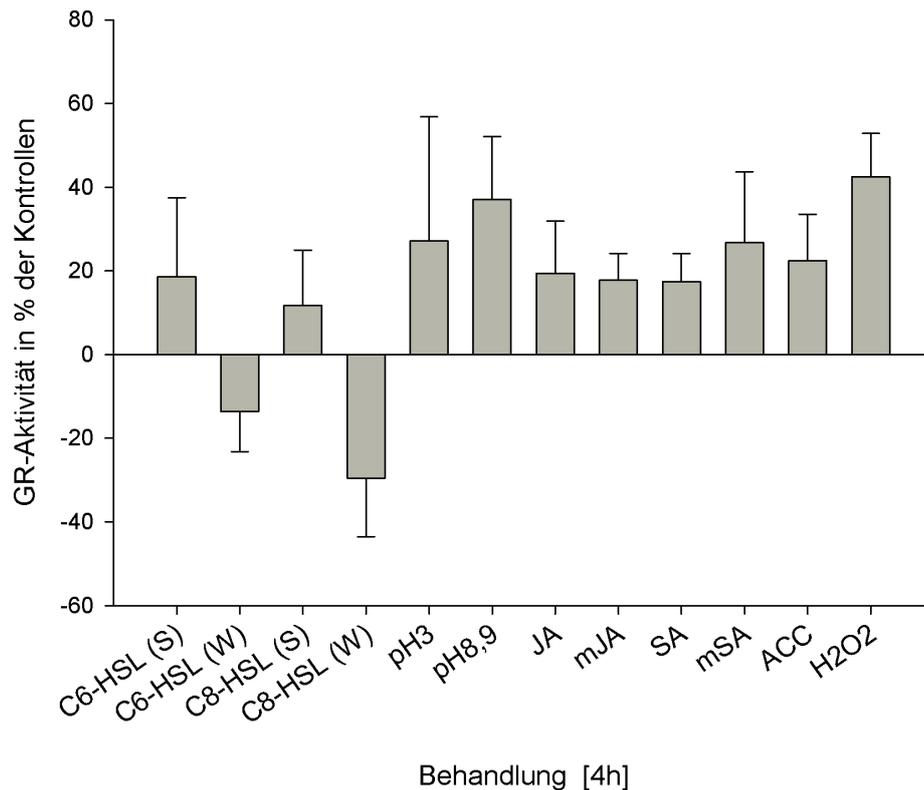


Abbildung 3.47 – GR-Aktivität der Blätter von *H. vulgare* 4 h nach Applikation von 10 μ M C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen + Standardabweichung gebildet.

Die POX-Aktivitäten der Blätter erhöhten sich nach C6-HSL Applikation unabhängig von der Art der Behandlung. Dennoch betrug die Differenz zwischen den beiden Behandlungen 78 %. Nach der Applikation mit C8-HSL verringerte sich die POX-Aktivität sowohl bei der Behandlung an den Wurzeln, als auch bei der Behandlung an den Halmen. Allerdings betrug die Differenz zwischen den Behandlungen 50 %. Im Allgemeinen reagierten die POX-Enzyme differenziert auf die Behandlung mit unterschiedlichen Signalsubstanzen. Während die Ansäuerung des Mediums die Aktivität um 27 % erhöhte, verringerte sich die Aktivität bei der Behandlung mit pH 9,8. Die Behandlung mit SA führte ebenfalls zur Verringerung der POX-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen. Bei den Behandlungen mit mSA, JA, mJA, ACC und H₂O₂ erhöhte sich die POX-Aktivität um 50-100 % (siehe Abbildung 3.48).

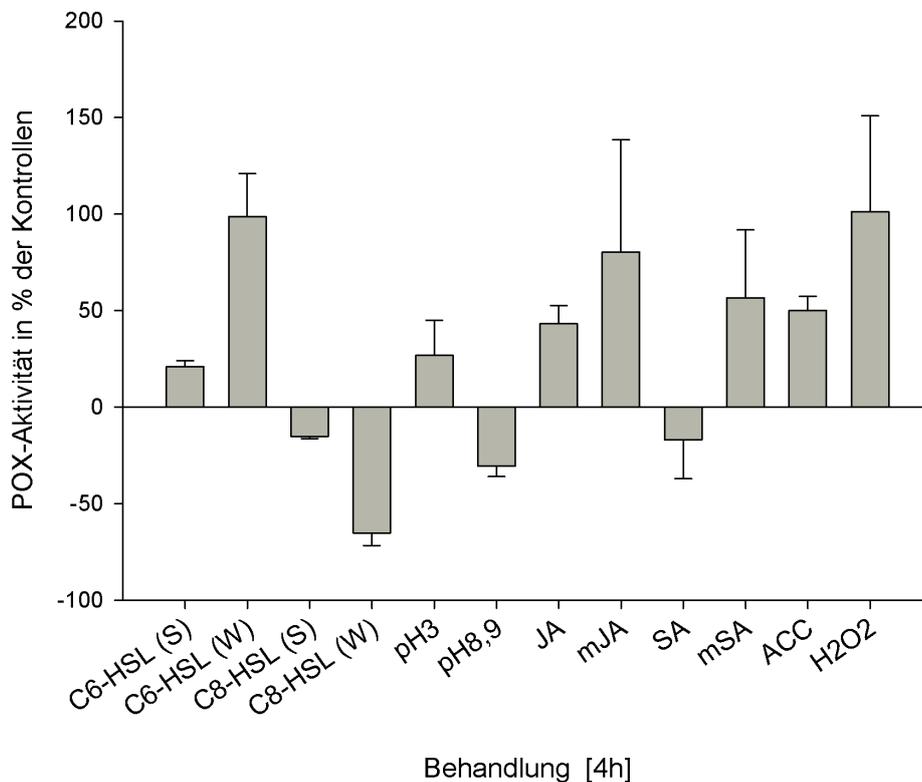


Abbildung 3.48 – POX-Aktivität der Blätter von *H. vulgare* 4 h nach Applikation von 10 μ M C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen + Standardabweichung gebildet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei den ausgewählten möglichen Signalsubstanzen in der ausgewählten Konzentration und Inkubationsdauer keines eindeutig als

Signal für die systemischen Enzymaktivitätsveränderungen in der Gerste in Frage kommt. Interessanterweise reagierten die gemessenen Enzymaktivitäten sehr unterschiedlich auf die möglichen Signalsubstanzen. Einige blieben mehr oder weniger konstant (CDNB-Aktivität), andere reagierten zwar stark auf die Applikation *per se*, konnten aber zwischen den verschiedenen Applikationen nicht differenzieren und zeigten lediglich eine allgemeine Stressreaktion (DCNB, pNpa). NBoC und SOD reagierten differenziert auf die unterschiedlichen möglichen Signalsubstanzen, unterschieden aber nicht, ob AHLs an der Wurzel, oder am Halm appliziert wurden. CAT, APOX und GR reagierten unterschiedlich, je nach dem ob AHLs an der Wurzel, oder am Halm appliziert wurden, unterschieden aber zwischen den anderen möglichen Signalen fast nicht. Lediglich die POX-Aktivität reagierte sowohl differenziert auf den Ort der AHL-Behandlung, als auch auf die verschiedenen möglichen Signalsubstanzen.

3.3 NO-Produktion in der Wurzel

NO ist ein neutrales Gas und in Pflanzen als Signal bei einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Neben der Keimung spielt NO eine Rolle beim Wurzelwachstum, bei der Öffnung der Stomata, bei der Blüte, beim Wachstum des Pollenschlauches und bei der Seneszenz der Blätter. Es ist aber auch bei der Reaktion auf abiotische und biotische (Pathogene und Symbionten) Umweltveränderungen beteiligt (zusammengefasst in Baudouin, 2011; Besson-Bard *et al.*, 2008). NO kann mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF-2DA in den Wurzeln mikroskopisch detektiert werden. DAF-2DA diffundiert in das Zellinnere und wird dort durch pflanzeigene Esterasen zu DAF-2 und beim Vorhandensein von NO und O₂ zu DAF-2T metabolisiert, welches bei einer Wellenlänge von 515 nm fluoresziert. Wurzeln von Gerstenkeimlingen wurden in einer 10 µM DAF-2DA-Lösung inkubiert und die Fluoreszenz nach der Zugabe von 10 µM C8-HSL unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop beobachtet. Nach der AHL-Behandlung wurde alle fünf Minuten ein Bild der Wurzel gemacht und die Steigerung der Fluoreszenz ermittelt, indem die Graustufen auf den Fotos in einem festgelegten Kreisdurchmesser in der Wurzelwachstumszone gemessen wurden. Die Graustufen zum Zeitpunkt der Behandlung (t = 0) wurden dabei auf 100 % gesetzt (siehe Abbildung 3.49 und Abschnitt 2.2.13). Zur Kontrolle wurden die Wurzeln lediglich mit Ethanol behandelt.

Die Fluoreszenz in den mit C8-HSL behandelten Wurzeln stieg fünf Minuten nach der Applikation im Vergleich zur Kontrollbehandlung an. Der stärkste Anstieg fand zwischen 10 min (113 %) und 20 min (178 %) statt. Die Fluoreszenz der Wurzeln der Kontrollen stieg in diesem Zeitraum nur schwach an (von 97 % auf 114 %). Danach stieg die Fluoreszenz in den behandelten Wurzeln nur noch langsam an und verringerte sich nach 40 min

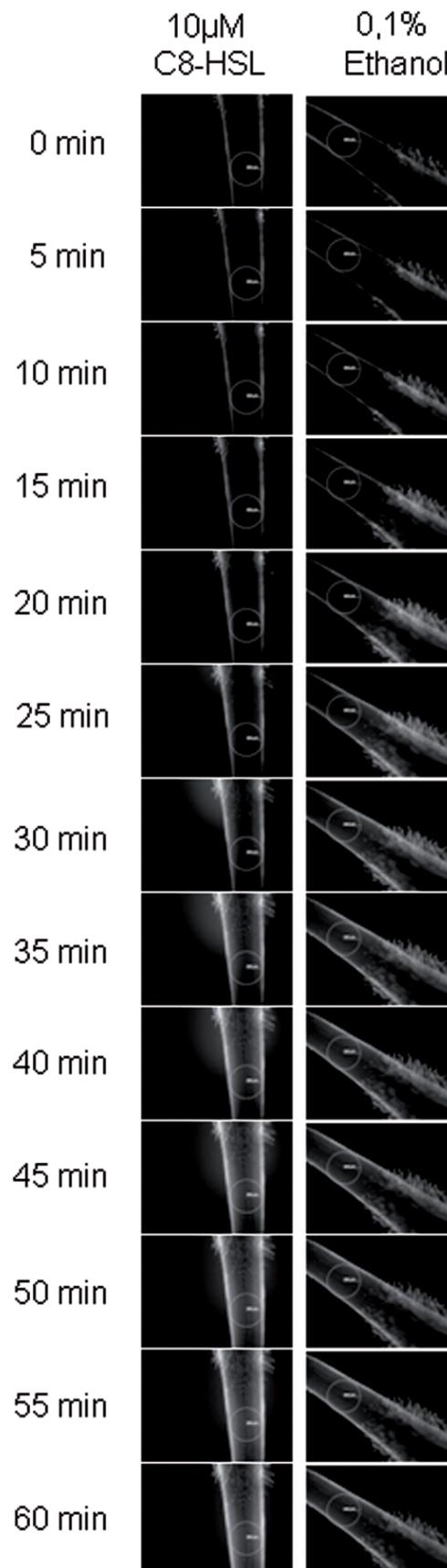


Abbildung 3.49 – Messung der Fluoreszenz von DAF-2DA behandelten Wurzeln am Mikroskop nach Zugabe von C8-HSL bzw. Ethanol. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines einzelnen Versuches.

Inkubationszeit wieder (siehe Abbildung 3.50). Auch die Fluoreszenz der Kontrollwurzeln stieg über den Behandlungszeitraum an und erreichte nach 60 min in etwa den gleichen Wert wie die mit C8-HSL behandelten Wurzeln. Wahrscheinlich ist der Anstieg der Fluoreszenz in den Kontrollwurzeln auf mechanische Reize bei der Applikation zurück zu führen. Der Anstieg der Fluoreszenz nach C8-HSL Applikation ist jedoch insbesondere kurz nach der Applikation viel stärker als in den Kontrollen und verläuft ähnlich dem der Positivkontrolle. In Abbildung 3.50 wurde die Fluoreszenz der Wurzel nach der Behandlung mit C8-HSL dargestellt. Die Fluoreszenz der Kontrolle ist dabei bereits abgezogen. Die Ergebnisse der linearen Regression der Fluoreszenz der Kontrollpflanzen wurde angegeben.

Als Positivkontrolle wurde 10 μ M SA eingesetzt, da SA in dieser Konzentration die NO-Produktion in der Wurzel induziert (Irma Tari, Biological Research Centre Szeged, Ungarn, Vortrag „10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants“ Budapest (2011) und Eva Hideg, Biological Research Centre Szeged, Ungarn, persönliche Kommunikation).

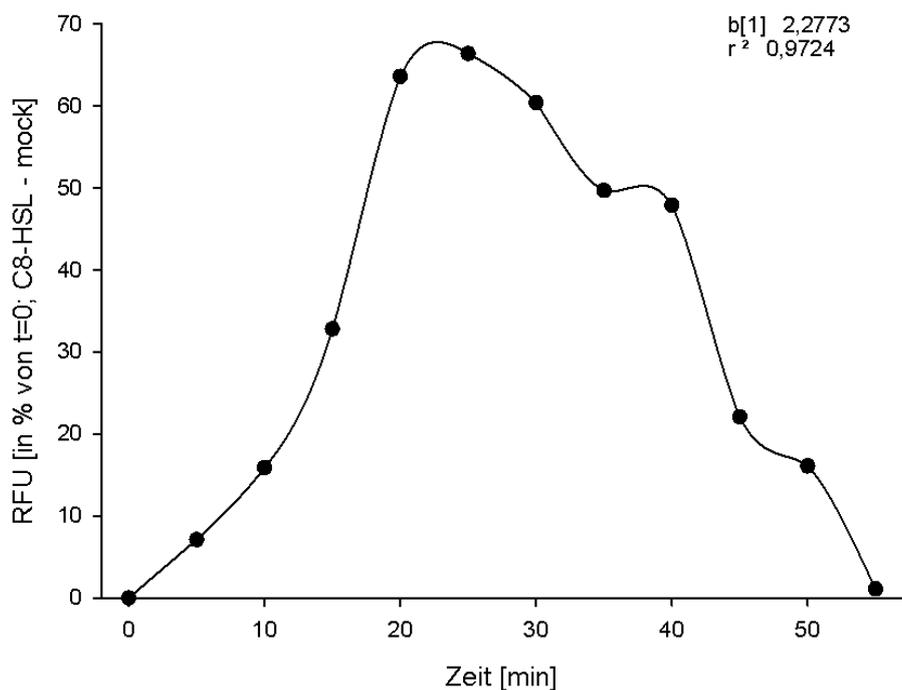


Abbildung 3.50 – NO-Produktion der Wurzel nach C8-HSL-Applikation nach Abzug der Fluoreszenz der Kontrollbehandlung. Der Anstieg der Fluoreszenz in den Kontrollbehandlung ist ebenso angegeben. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines einzelnen Versuches.

4 Diskussion

Vor etwa 450 Millionen Jahren besiedelten die ersten Pflanzen die Landmassen unserer Erde (Clarke *et al.*, 2011). Seit dieser Zeit mussten sie sich mit Bakterien auseinandersetzen, die schon vor ca. 3,5 Milliarden Jahren entstanden sind (Cavalier-Smith, 2006). Da Bakterien nicht nur auf den Blättern, sondern insbesondere in der Rhizosphäre sehr eng mit Pflanzen zusammenleben, ist leicht vorstellbar, dass Pflanzen im Lauf der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt haben, Bakterien zu erkennen und auf diese zu reagieren. Seit dem bekannt ist, dass Bakterien mit Hilfe von sogenannten „Autoinducern“ miteinander kommunizieren, entwickelte sich die Idee, dass auch eukaryotische Wirte die bakteriellen Signale nutzen, um die Kommunikation der Bakterien zu belauschen und in diese einzugreifen (unter anderem in D'Angelo-Picard *et al.*, 2004; Givskov *et al.*, 1996; Manefield *et al.*, 1999; Rasmussen *et al.*, 2000). Dabei scheint es, dass die Produktion von AHL-Molekülen unter Pflanzen-assoziierten Bakterien weit verbreitet ist (Cha *et al.*, 1998). Verschiedene Arbeiten zeigten, dass AHLs in Pflanzen spezifische Antworten auslösen und sogar zur Induktion der SAR führen können (Mathesius *et al.*, 2003; von Rad *et al.*, 2008; Schikora *et al.*, 2011; Schuegger *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurde deshalb zuerst untersucht, wie schnell AHLs in Pflanzen aufgenommen und systemisch transportiert werden können. Dafür wurden drei unterschiedliche Methoden angewendet, deren Vor- und Nachteile im Einzelnen diskutiert werden sollen.

Im darauf folgenden Teil wurden die Aktivitäten ausgewählter Stress induzierter Enzyme nach AHL-Behandlung analysiert. Im Vordergrund der Untersuchung standen hierbei der zeitliche und räumliche (Wurzel und Spross) Verlauf der pflanzlichen Antwort. Des Weiteren wurde nach Enzymen in der Pflanze gesucht, die in der Lage sind, direkt mit AHLs zu interagieren und so die Metabolisierung in der Pflanze einleiten können.

Ferner wurden typische Signalsubstanzen daraufhin untersucht, ob sie nachgeschaltete Signalkaskaden in der Pflanze anschalten.

Als Versuchspflanze wurde *Hordeum vulgare* L. cv. Barke gewählt, weil AHLs in der Rhizosphäre von Gerste durch Ausscheidung organischer Säuren stabilisiert werden (Götz *et al.*, 2007). Zudem besitzt Gerste im Gegensatz zu einigen Leguminosen (Delalande *et al.*, 2005) keine Lactonase, welche die applizierten AHLs schnell inaktivieren könnte. Die applizierte AHL-Konzentration liegt innerhalb der Konzentrationen, die in bakteriellen

Populationen gefunden wurden. Charlton *et al.* (2000) ermittelten beispielsweise eine AHL-Konzentration von 630 μM in Biofilmen von *P. aeruginosa*.

Die ausgewählten AHLs sind „Autoinducer“, von sowohl symbiotisch lebenden Bakterien (*Rhizobium leguminosarium*: C6- und C18-HSL, Blosser-Middleton and Gray, 2001; *Sinorhizobium meliloti*: C8-HSL, Gonzales and Marketon, 2003), als auch von phytopathogenen Arten (*Pectobacterium chrysanthemi*: C6- und C10-HSL, Barnard and Salmond, 2007; *Pseudomonas syringae* : C6-HSL, Elasri *et al.*, 2001).

4.1 Aufnahme und Transport von AHLs in Pflanzen

4.1.1 Tritium-markierte AHLs

Die Aufnahme und der Transport von AHLs wurde zuerst mit Tritium-markiertem C8- bzw. C10-HSL untersucht, da die Nutzung radioaktiv markierter Moleküle zur Untersuchung von verschiedenen Transportvorgängen in Pflanzen eine der sensitivsten Methoden darstellt, die derzeit zur Verfügung stehen. Mit dieser Methode konnte der Verbleib der AHLs im picomolaren Bereich verfolgt werden. Die AHL-Aufnahme erfolgte in den Blättern und in den Wurzeln nahezu linear; erste Signale konnten bereits 2 h nach der Applikation detektiert werden. Dabei wurde C8-HSL sowohl in den Blättern, als auch in den Wurzeln zu einem höheren Prozentsatz aufgenommen als C10-HSL. Dies liegt vermutlich an der höheren Lipophilität von C10-HSL im Vergleich zu C8-HSL, aufgrund der längeren Acyl-Seitenkette. Nach 16 h wurden 0,36 % C8-HSL bzw. 0,34 % C10-HSL in den gesamten grünen Teil der Pflanze aufgenommen. Da beide AHLs bereits kurz nach der Applikation sehr stark an die Wurzeloberfläche banden, konnte der Wurzeltransport nicht mit einer herkömmlichen AHL-Extraktion aus dem Gewebe untersucht werden. Auch bei Götz *et al.* (2007) erreichte die gemessene AHL-Konzentration in den Wurzel relativ schnell eine Sättigung. Das Waschen der Wurzeln mit dH_2O spielte dabei eine eher untergeordnete Rolle. Weshalb die Sättigung in Götz *et al.* (2007) erst nach 40 h eintrat, in den Versuchen dieser Arbeit hingegen bereits nach 2,5 h - 4 h, bleibt hingegen unklar.

Die Pitman-Kammer eignet sich gut, die AHL-Aufnahme und den Transport zu untersuchen, da die AHLs lediglich mit einem kleinen Teil der Wurzel in Kontakt kommen. Nach 24 h konnten 0,2 % transportiertes C8-HSL und 0,1 % C10-HSL nachgewiesen werden. Diese Zahlen sind geringer als die des nachgewiesenen AHLs in den Blättern nach nur 16 h. Vermutlich haben die AHLs auch an das Acrylglas und die Vaseline in der Kammer gebunden und wurden so der Lösung entzogen. Adsorption ist wahrscheinlich auch der Grund, weshalb die Standardabweichung besonders am Ende des Versuches so groß war. Dennoch ist die Pitman-Kammer eine gut geeignete Methode, mit der erstmals nachgewiesen werden konnte, dass die Aufnahme der AHLs über ABC-Transporter erfolgt und

damit ein aktiver Vorgang ist. Ob es sich hierbei um einen primär aktiven oder einen sekundär aktiven Transport handelt, bleibt bislang ungeklärt. Eindeutig konnte gezeigt werden, dass AHLs symplastisch über Plasmodesmata in der Wurzel transportiert werden. Die Wurzelquerschnitte der Maiskeimlinge deuteten zudem darauf hin, dass der Transport hauptsächlich im Zentralzylinder geschieht.

Da die Markierung der AHLs mit Tritium gleichmäßig über das gesamte Molekül erfolgte, konnte bei der Detektion des radioaktiven Signals nicht unterschieden werden, ob die AHLs als nicht-metabolisierte Substanz in der Pflanze vorlagen, oder bereits abgebaut waren. Götz *et al.* (2007) konnten ebenfalls C8- und C10-HSL mittels der Tritium-Markierung in den Blättern von Gerste detektieren, die Verifizierung mittels UPLC und FTICR-MS gelang allerdings lediglich für C8-HSL. Daraus wurde gefolgert, dass C10-HSL nur in metabolisierter Form in die Blätter gelangte.

Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden die Pflanzen in eine Halterung eingespannt und die Wurzeln bis zu einer Stunde mit C8- bzw. C10-HSL inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde ebenfalls der Spross geerntet und die AHLs aus diesem extrahiert und analysiert. Dabei fiel auf, dass die Radioaktivität im gesamten Spross, insbesondere nach der Applikation mit C8-HSL, viel höher war, als im Spross der Pflanzen, die im Reagenzglassystem mit AHLs inkubiert wurden. Da die Luftfeuchtigkeit in den Reagenzgläsern annähernd 100 % betrug, war die Transpiration in diesen nur gering. Beim Versuchsaufbau für die Bestimmung der Autoradiographie war die Transpiration der Pflanze deutlich erhöht. Unter den Bedingungen mit erhöhter Transpiration war die C8-HSL Aufnahme in den gesamten Spross bis zu 6,3-fach erhöht, die Aufnahme von C10-HSL bis zu 1,3-fach. Dabei ist zu beachten, dass dies nur vorläufige Ergebnisse sind. Da die Luftfeuchtigkeit während der Versuche nicht kontrolliert werden konnte, ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht genau geklärt, in welchem Umfang die Transpiration die AHL-Aufnahme und den AHL-Transport beeinflusst.

Durch Tritium-Markierungen an AHLs können diese höchst sensitiv detektiert werden. Die benötigten Probenvolumina sind relativ klein (1 ml) und die Tests sehr stabil. Die AHL-Aufnahme in die Pflanze kann zudem sehr gut quantifiziert werden. Durch die Art der Markierung am Molekül kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob dieses während des Aufnahmeprozesses in der Pflanze modifiziert wurde.

4.1.2 AHL-Sensorstämme

AHL-Sensorstämme werden routinemäßig zur Detektion von AHLs eingesetzt. Dabei handelt es sich um mutagenisierte Bakterienstämme, die selbst keine AHLs mehr herstellen

können, auf einem Plasmid aber einen AHL-Rezeptor und ein nachgeschaltetes Sensorprotein tragen (z.B. GFP). Je nach verwendetem AHL, Sensorstamm und Plasmid können AHLs bis zu einer Konzentration von 20 nM detektiert werden (Steidle *et al.*, 2001). Oft werden jedoch lediglich Detektionslimits von maximal 0,1 μ M erreicht (Schikora *et al.*, 2011).

Da durch die Versuche mit tritiierten AHLs gezeigt werden konnte, dass die AHLs in der Wurzel hauptsächlich durch den Zentralzylinder transportiert wurden und der Hauptteil der systemisch transportierten AHLs im Halm zu finden war, sollten anschließend AHLs im Apoplastensaft des Sprosses detektiert werden. Mit Hilfe von bakteriellen Sensorstämmen sollte zudem festgestellt werden, ob die AHLs in nicht-metabolisierter Form systemisch in der Pflanze transportiert werden. Mit Hilfe von klassischen, analytischen Methoden war dies für C8-HSL bereits gezeigt (Götz *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte mit Hilfe des Sensorstammes *S. liquefaciens* MG44 (pBAH9) der systemische Transport in Gerste ebenfalls verifiziert werden. Es zeigte sich zudem, dass C8-HSL hauptsächlich über den Apoplastensaft transportiert wurde. Ein Teil der aufgenommenen AHLs war jedoch mit den festen Bestandteilen des Halms assoziiert.

Die Detektion von AHLs durch eine Bakterienpopulation an den Wurzeln war nicht erfolgreich. Zwar konnten zu bestimmten Zeitpunkten die AHLs in der Rhizosphäre detektiert werden, deren Konzentration lag aber nur knapp über dem Detektionslimit. Die Produktion von AHLs in der Rhizosphäre war bei diesem Versuchsaufbau folglich nicht hoch genug, um auch eine Detektion in der Pflanze zu ermöglichen. Das Versuchssystem müsste weiter verbessert werden, um den optimalen Zeitpunkt für eine AHL-Detektion im Apoplastensaft zu ermitteln.

Bakterielle Sensorstämmen sind relativ schnell, ohne großen technischen Aufwand einsetzbar. Zudem können auch kleine Probenvolumina (bis zu lediglich 0,25 ml) getestet werden. Die mit Sensorstämmen erstellten Standardkurven sind jedoch vielfach nicht linear, sodass eine quantitative Analyse nicht möglich ist. Des Weiteren unterliegen die Standardkurven häufig relativ großen Schwankungen zwischen den Experimenten. Diese lassen sich zwar vermindern, indem die Übernachtskultur direkt aus einer Glycerinkultur entnommen wird, sind aber nicht vollständig zu beheben.

In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass AHLs mit kürzerer Acyl-Seitenkette ebenfalls systemisch in Pflanzen transportiert werden (Götz *et al.*, 2007; von Rad *et al.*, 2008). Bei langkettigen AHLs wie C10-HSL (Götz *et al.*, 2007) und oxo-C14-HSL (Schikora *et al.*, 2011) konnte bisher kein systemischer Transport nachgewiesen werden.

4.1.3 ELISA

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern konnte C10-HSL in dieser Arbeit auch systemisch in der Pflanze nachgewiesen werden. Die gemessene Konzentration im Apoplastensaft betrug dabei 0,7 μM C10-HS. Da der Apoplastensaft in der Gerste einen leicht sauren pH-Wert hat, kann davon ausgegangen werden, dass AHLs nicht hydrolysiert im Apoplastensaft vorlagen. Bei einer durchschnittlichen Ausbeute von 25 μl Apoplastensaft pro Pflanze hatte jede Pflanze ca. 0,034 % des applizierten C10-HSL aufgenommen. Diese Zahl berücksichtigt nicht die in die Blätter weiter transportierten AHLs. Aufgrund der Tatsache, dass in den Experimenten mit tritiierten AHLs der größte Anteil der Radioaktivität von C10-HSL im Halm zu finden war und der Anteil von Blatt 1 und 2 zusammen eher zu vernachlässigen ist, spielt dieser Faktor wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle. Von größerer Bedeutung sind vielmehr die an Zellen gebundenen AHLs. Mit Hilfe des Sensorstammes *S. liquefaciens* MG44 konnte C8-HSL nicht nur im Apoplastensaft, sondern zu einem geringeren Anteil auch im restlichen Halmmaterial detektiert werden. Die Bindung von C10-HSL an Oberflächen ist durch die längere Acyl-Seitenkette stärker als bei kurzkettigeren AHLs, wie die Adsorption tritiiertter AHLs an die Wurzeloberfläche zeigt. Ein Test des Extrakts des restlichen Halmmaterials war im Gegensatz zum Test mit dem bakteriellen Sensorstamm *S. liquefaciens* MG44 im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, weil der ELISA-Test aufgrund des Matrix-Effektes dafür neu optimiert werden muss.

Im Gegensatz zu klassischen, analytischen Methoden ist eine Vorbehandlung der Proben beim ELISA nicht notwendig. Des Weiteren ist das benötigte Probenvolumen im Vergleich recht klein (maximal 500 μl) und das Detektionslimit übertrifft teilweise das Limit von UPLC und FT-ICR-MS (Chen *et al.*, 2010b). Der Test *per se* ist schnell, robust und kostengünstig, muss jedoch für jedes AHL spezifisch optimiert werden. Außerdem muss bei der Verwendung verschiedener Proben der Matrixeffekt vorher untersucht werden, um den Test gegebenenfalls anzupassen. Der ELISA-Test eignet sich deshalb vor allem als Routinetest bei Proben mit gleicher Matrix und einem hohen Probendurchsatz, wie beispielsweise Untersuchung medizinischer Verbrauchsmittel.

Die Detektion systemisch transportierter - insbesondere langkettiger - AHLs gestaltet sich schwierig. In mehreren Arbeiten ist lediglich die Detektion kurzkettiger systemisch transportierter AHLs gelungen. Langkettige AHLs wurden ausschließlich in den Wurzeln bestimmt (Götz *et al.*, 2007; von Rad *et al.*, 2008; Schikora *et al.*, 2011). Von Rad *et al.* (2008) stellten aufgrund dieser Ergebnisse die These auf, dass kurzkettige AHLs wie C6-HSL von der Wurzel in die Blätter diffundieren können, während langkettige AHLs dies

aufgrund ihrer höheren Hydrophobizität nicht tun und in den Wurzeln akkumulieren. Die Erkenntnisse dieser Arbeit widerlegen dies jedoch. Langkettige AHLs, wie C10-HSL können systemisch in Pflanzen transportiert werden. Der Transport erfolgt dabei nicht durch Diffusion, sondern hauptsächlich symplastisch im Zentralzylinder. Die AHL-Aufnahme vollzieht sich durch ABC-Transporter und stellt somit einen aktiven Prozess der Pflanze dar. Der Transport in die Blätter wurde durch den Transpirationssog insbesondere bei C8-HSL verstärkt. Die Daten dieser Untersuchungen stammen lediglich aus zwei Einzelversuchen, weshalb weitere Untersuchungen nötig sind, um das Ergebnis zu verifizieren. Interessanterweise stellten Joseph and Phillips (2003) nach der Applikation mit HSL an Bohne eine um bis zu 30 % erhöhte Transpirationsrate fest. Eventuell spielt die erhöhte Transpiration dabei eine gezielte Rolle, um HSL schneller in die Pflanze aufzunehmen.

Beide AHLs binden stark an die Oberfläche der Gerstenwurzel. Dabei ist die Bindung von C10-HSL an die Wurzeloberfläche in etwa doppelt so hoch wie die Bindung von C8-HSL, da C10-HSL aufgrund der längeren Acyl-Seitenkette lipophiler ist. Man kann weiter spekulieren, ob die von von Rad *et al.* (2008) beschriebene Akkumulation langkettiger AHLs in der Wurzel eine wirkliche Akkumulation *in* diese ist, oder ob es sich vielmehr um eine vermehrte Bindung an die Wurzeloberfläche handelt.

4.2 Veränderungen der Aktivität ausgewählter Enzyme

Untersuchungen auf Proteomebene in *M. truncatula* ergaben, dass ca. 150 Proteine nach AHL-Applikation unterschiedlich akkumulierten. Nahezu ein Viertel der identifizierten Proteine spielen eine Rolle bei Abwehr- und Stressreaktionen (Mathesius *et al.*, 2003). In Tomatenpflanzen wurden Abwehrgene nach AHL-Behandlung verstärkt exprimiert (Schuhegger *et al.*, 2006) und auch in Gerste konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Aktivität einzelner GSTs und antioxidativer Enzyme nach AHL-Behandlung verändert (Götz, 2008). In dieser Arbeit sollte vor allem der zeitliche Ablauf der Enzymveränderungen dokumentiert werden. Die Veränderungen in den Pflanzen wurden auf dem Level der Enzymaktivität gemessen, da posttranskriptionale Veränderungen eine große Rolle spielen können. So ist zum Beispiel die CAT in Bohnenpflanzen nach Cadmiumzugabe auf Transkriptionsebene hochreguliert, die CAT-Enzymaktivität jedoch stark verringert (Romero-Puertas *et al.*, 2007)

4.2.1 Antioxidative Enzyme

Die in dieser Arbeit untersuchten antioxidativen Enzyme reagierten alle stark auf die AHLs. Die Reaktion lief dabei biphasisch ab. Die ersten - teils sehr starken - Enzymveränderungen geschahen dabei innerhalb der ersten 24 h. In einer zweiten Phase gab es

längerfristige Veränderungen der Enzymaktivitäten, die sich jedoch nach 17 Tagen - mit einigen Ausnahmen - in etwa auf dem Niveau der Kontrollen befanden.

Bei der Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroben entstehen in der Pflanze ROS in einem sogenannten oxidativen „burst“. Bereits nach wenigen Minuten kommt es zu einem ersten transienten „burst“ als generelle Antwort auf alle Mikroorganismen. Bei der Immunantwort mit einem avirulenten Pathogen findet einige Stunden später ein zweiter „burst“ statt und in dem betroffenen Gewebe kommt es anschließend zur „hypersensitive response“ (HR) und zum programmierten Zelltod. Die HR wurde zuerst von McCord and Fridovich (1969) entdeckt. Der zweite „burst“ findet ausschließlich bei der Interaktion mit avirulenten Pathogenen statt und ist für die HR erforderlich (zusammengefasst in De Gara *et al.*, 2003). Die Akkumulation von ROS wurde ebenfalls bei der Interaktion mit symbiotischen Bakterien (*Sinorhizobium meliloti*, Santos *et al.*, 2001) und arbuskulären Mycorrhizapilzen (Fester and Hause, 2005) beobachtet, auf die aber hier nicht näher eingegangen werden soll.

ROS können in das Gewebe eingedrungene Mikroorganismen direkt durch Bildung von Hydroxyradikalen töten oder aber durch die Versteifung der Zellwand dazu beitragen, dass diese sich langsamer ausbreiten. Dies gibt der Pflanze mehr Zeit, weitere Abwehrmechanismen einzuleiten. Die Versteifung der Zellwand erfolgt durch POX, die die Verknüpfung von Ligninvorstufen unter der Reduktion von H₂O₂ katalysiert (Passardi *et al.*, 2004). Da beim oxidativen „burst“ relativ große Mengen an ROS gebildet werden, herrschte eine Zeit lang die Vorstellung, dass die Menge der gebildeten ROS die antioxidativen Enzyme überlasten. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass ROS als sekundäre Botenstoffe in der Pflanze agieren. Heute herrscht die Ansicht vor, dass die Regulierung der antioxidativen Enzyme zur Feinabstimmung bei der Signalweiterleitung beiträgt (De Gara *et al.*, 2003).

ROS werden nach Pathogenbefall von im Plasmalemma lokalisierten NADPH-Oxidasen gebildet. Diese katalysieren dabei folgende Reaktion:



Einige NADPH-Oxidasen kommen überall in den Pflanzen vor, andere sind spezifisch im Wurzel- oder Pollengewebe lokalisiert (Sagi and Fluhr, 2006). Oft geht der Aktivierung der NADPH-Oxidasen das „spiking“ intrazellulärer Ca²⁺-Ströme voraus. Zusätzlich kann eine positive Rückkopplung stattfinden, indem die gebildeten ROS Ca²⁺-permeable Kanäle öffnen (Sagi and Fluhr, 2006).

Zu den wichtigsten antioxidativen Enzyme zählen die SODs, da sie die Dismutation von O₂⁻ zu H₂O₂ katalysieren. Die Reaktionsgeschwindigkeit der SODs wird dabei lediglich

von der Diffusionsgeschwindigkeit des O_2^- beeinflusst (Bowler *et al.*, 1992). Anhand der Co-Faktoren lassen sich SODs in drei Typen unterteilen. Fe-SODs und Mn-SODs sind sich strukturell sehr ähnlich und kommen sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten vor. Cu/Zn-SODs sind strukturell mit den anderen beiden SOD-Typen nicht verwandt und wurden (bis auf wenige Ausnahmen) bisher nicht in Prokaryoten nachgewiesen. Deshalb wird angenommen, dass Fe-SODs und Mn-SODs phylogenetisch älter sind und dass SODs im Laufe der Evolution zweimal entstanden sind (Bowler *et al.*, 1992). In Pflanzen sind die Fe-SODs in den Chloroplasten, Mn-SODs in den Mitochondrien und Cu/Zn-SODs im Zytoplasma lokalisiert (Alscher *et al.*, 2002). SODs kommen auch im Apoplasten (Shigeoka *et al.*, 2002) und in den Peroxisomen vor (die Mn-SODs sind dabei Membran-gebunden, die Cu/Zn-SODs frei löslich innerhalb der Peroxisomen) (Palma *et al.*, 2006). Damit sind SODs überall in der Pflanze anzutreffen, wo O_2^- entstehen könnte. Im Gegensatz zu den meisten anderen Organismen haben Pflanzen mehrere SOD-Isoenzyme (Scandalios, 1993).

In den Wurzeln war die SOD-Aktivität 2-4 h nach der Zugabe von C8-HSL stark erhöht. Dies könnte auf die erhöhte Produktion von ROS zurückzuführen sein, die anschließend entgiftet werden mussten. Innerhalb von 24 h erreichte die SOD-Aktivität wieder die Aktivität der Kontrollpflanzen.

Bei der Behandlung mit C6-HSL war dies nicht der Fall. Hier lag die SOD-Aktivität sogar unterhalb der Kontrollaktivität. Die Aktivität in den Blättern war bei beiden eingesetzten AHLs kurz nach der Behandlung stark erniedrigt und stieg nach 5 Tagen sehr stark an. Nach 17 Tagen Inkubation war die SOD-Aktivität in Wurzeln und Blättern bei beiden Behandlungen ungefähr auf dem Aktivitätsniveau der Kontrollpflanzen (Ausnahme: Aktivität der Blätter bei C6-HSL Behandlung). Besonders die Veränderungen der SOD-Aktivität kurz nach der Behandlung mit C8-HSL deutet auf einen oxidativen „burst“ hin. Es wäre möglich, dass der erste Erntezeitpunkt von 2 h nach Applikation bei C6-HSL Behandlung bereits zu spät war, um eine Erhöhung der SOD-Aktivität zu verfolgen. Aufgrund der kürzeren Acyl-Seitenkette ist C6-HSL hydrophiler als C8-HSL und kann möglicherweise in kürzerer Zeit in die Wurzel transportiert werden. Ein möglicher oxidativer „burst“ könnte demzufolge früher stattfinden.

Durch die erhöhte Aktivität der SOD in der Wurzel entsteht vermehrt H_2O_2 . Dieses kann sowohl von CAT als auch von APOX entgiftet werden.

CAT sind tetramere Proteine mit einem Häm-Porphyrinring. Viele Pflanzenarten haben - im Gegensatz zu tierischen Organismen - mehrere CAT-Isoenzyme. In *A. thaliana* besteht die CAT-Genfamilie aus drei Genen, die sich zu mindestens sechs Isoformen zusammensetzen können (McClung, 1997). Neben den Peroxisomen können CAT auch in Mitochondrien

lokalisiert sein (Shigeoka *et al.*, 2002). Willekens *et al.* (1997) schlagen vor, dass CAT in Pflanzen als ein H₂O₂-„sink“ fungieren. Transgener Tabak mit lediglich 10 % CAT-Aktivität entwickelte unter Lichtstress Nekrosen. Dabei war H₂O₂ selbst nicht erhöht, die Entgiftung des H₂O₂ fand über alternative Enzyme statt. Dafür war der Gehalt von GSSG an den nekrotischen Stellen stark erhöht und Ascorbat bis zu vierfach erniedrigt und dadurch die Redoxbalance der Blätter letztendlich gestört. Bei der Ausbildung der HR spielen neben der in den Peroxisomen lokalisierten CAT (Fath *et al.*, 2001) auch die alternativen Oxidasen in den Mitochondrien (Mizuno *et al.*, 2005) und die zytosolischen APOX (Mittler *et al.*, 1998) eine Rolle. Bei der Symbiose mit Rhizobien spielt die CAT ebenfalls eine wichtige Rolle, indem sie in den Wurzelknöllchen H₂O₂ entgiftet und so die sauerstoffempfindliche Nitrogenase schützt (Tejera García *et al.*, 2007). Auch bei mechanischen Verwundungen spielen ROS eine Rolle. So erhöhte sich nach der Verwundung der Blätter von Eisenkraut die SOD-Aktivität, wohingegen sich die CAT-Aktivität verringerte (Slesak *et al.*, 2008). Diese Reaktionen erfolgten bereits nach 15-30 min und führten zu einer Akkumulation von H₂O₂.

H₂O₂ akkumuliert bei abiotischem Stress an der inneren Seite der Plasmamembran oder in den Mitochondrien, während nach Pathogenbefall H₂O₂ im Apoplasten oder an der äußeren Seite der Plasmamembran akkumuliert (Gémes *et al.*, 2011). Die Zeit- und Ort-abhängige Produktion von H₂O₂ kann also der Pflanze dabei helfen, den gleichen sekundären Botenstoff verschieden zu interpretieren. Am wahrscheinlichsten ist, dass H₂O₂ von allen ROS als sekundärer Botenstoff agiert, da es relativ stabil ist und über Aquaporine transportiert werden kann (Apel and Hirt, 2004). Moller and Sweetlove (2010) diskutieren jedoch, dass H₂O₂ selbst nicht spezifisch genug ist, um die Genexpression zu ändern. In Prokaryoten, die nur aus einer Zelle ohne weitere Kompartimente bestehen, könnte H₂O₂ die Genexpression noch direkt verändern. In eukaryotischen Zellen ist der zelluläre Ort der Entstehung von H₂O₂ wichtig für die Interpretation des Signals (Gémes *et al.*, 2011). Als Alternative zu H₂O₂ schlagen Moller and Sweetlove (2010) oxidierte Peptide aus den von ROS zerstörten Proteinen als möglichen ROS-spezifischen sekundären Botenstoff in Eukaryoten vor, da diese auch spezifisch für den Ort des ROS-„burst“ sind.

Ähnlich wie nach der Zugabe von Elicitoren und allgemein für biotischen Stress beschrieben (Mittler, 2002), verringerten sich die CAT-Aktivitäten in den Wurzeln nach AHL-Behandlung sehr stark. Interessanterweise stieg die CAT-Aktivität in den Wurzeln fünf Tage nach AHL Applikation auf das 1,5-2 fache der Kontrollaktivität an. Die Ursache für diesen Anstieg genau nach fünf Tagen bleibt jedoch ungeklärt. Nach 17 Tagen war die CAT-Aktivität dann in etwa auf dem Niveau der Kontrollpflanzen.

Durch den Anstieg der SOD- und die Verringerung der CAT-Aktivität, sollte H₂O₂ kurz nach AHL-Applikation akkumulieren. Schikora *et al.* (2011) konnten zwar erhöhte

H₂O₂-Akkumulation in AHL-behandelten *A. thaliana* Pflanzen beobachten, wenn diese mit einem avirulenten Pathogen inokuliert wurden, allerdings nicht nach AHL-Behandlung allein. In den Blättern ist die CAT-Aktivität kurz nach Zugabe von C6-HSL sehr hoch. Dies ist eventuell auf den Transport der AHLs in die Blätter zurückzuführen, was in diesen zu einer erhöhten Produktion von ROS führt, welche entgiftet werden müssen.

APOX gehören zu den Klasse I Peroxidasen. Die APOX-Isoenzyme der höheren Pflanzen können in vier Gruppen eingeteilt werden. Allen ist jedoch ein Häm-Porphyrinring gemeinsam. Die Homologie innerhalb einer Gruppe beträgt dabei 70-80 %, zwischen den Gruppen immerhin noch 50-70 % (Shigeoka *et al.*, 2002). In Reis gibt es acht Isoformen, die durch komplexe evolutionäre Prozesse entstanden sind, die mehrere Genduplikationen involvierten (Teixeira *et al.*, 2004). APOX sind im Chloroplasten, im Zytosol und in den Mitochondrien lokalisiert (Shigeoka *et al.*, 2002). Die Aktivität der APOX verändert sich zumeist zusammen mit anderen Enzymen des antioxidativen Stressstoffwechsels wie beispielsweise der CAT (Shigeoka *et al.*, 2002).

Nach AHL-Behandlung zeigte sich bei der APOX-Aktivität ein ähnliches Bild wie bei der CAT. Auch hier verringerte sich die Aktivität in den Wurzeln kurz nach der Zugabe der AHLs (sowohl bei C6- als auch bei C8-HSL). Auch dies spricht für eine Akkumulation von H₂O₂ in den behandelten Wurzeln. Des Weiteren war hier die APOX-Aktivität in den Blättern der mit C8-HSL behandelten Pflanzen ebenso erhöht. Insgesamt ist zu sagen, dass sich die APOX-Aktivitäten in der Wurzel und im Blatt genau gegensätzlich verhielten. Während sich die CAT-Aktivität nach länger andauernder AHL-Inkubation in den Blättern kaum veränderte, war die APOX-Aktivität der Blätter - abhängig von der Zugabe von C6- bzw. C8-HSL - stärker reguliert. Laut Mittler (2002) sind CAT hauptsächlich für die Entgiftung großer Mengen von H₂O₂ zuständig, während APOX eher die Feinabstimmung übernimmt, wenn ROS als sekundäre Botenstoffe wirken. Eventuell fanden durch den Transport der AHLs in den Spross weitere Signalkaskaden in diesem statt, die H₂O₂ als sekundären Botenstoff verwendeten.

Die in dieser Arbeit untersuchten POX (gemessen mit Guajacol und TMB als Substrat) gehören alle zu den Klasse III Peroxidasen. Auch POX besitzen eine Häm-Gruppe und werden von einer Reihe paraloger Gene kodiert. *A. thaliana* besitzt beispielsweise 73 POX-Gene, *Oryza sativa* sogar 138 POX-Gene (zusammengefasst in Passardi *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu CAT brauchen POX einen Donator, um H₂O₂ zu reduzieren. Dazu gehören Phenole, Vorstufen von Lignin und andere Sekundärmetabolite (Passardi *et al.*, 2004). POX sind sowohl im Zytoplasma als auch im Apoplasten lokalisiert und sind somit die einzigen Enzyme im Apoplasten, die H₂O₂ umsetzen können (Shigeoka *et al.*, 2002).

Die POX-Aktivität in der Wurzel war kurz nach Zugabe von C6-HSL stark verringert und stieg innerhalb der ersten 24 h bis kurz über die Aktivität der Kontrollpflanzen.

Nach Zugabe von C8-HSL war die POX-Aktivität in den Wurzeln nur sehr kurz verringert und stieg rasch auf mehr als 150 % der Kontrollaktivität an.

In den Blättern war die POX-Aktivität bei beiden AHLs kurz nach Applikation stark erhöht und blieb auch nach 17 Tagen um den Faktor 1,5-2 erhöht. Ein eindeutiges Muster wie bei den CAT und APOX-Aktivitäten ist jedoch nicht zu erkennen.

Die APOX arbeitet normalerweise zusammen mit der GR, die entstandenes GSSG wieder zu GSH zu reduziert. GR sind wie APOX im Zytosol, Chloroplasten und in den Mitochondrien zu finden (Qureshi *et al.*, 2007). Die Erhaltung des GSH-Reservoirs in der Zelle ist von großer Bedeutung für die Akkumulation von SA und die Induktion von PR-Genen in den Pflanzen (Mhamdi *et al.*, 2010).

Die GR-Aktivität in den Wurzeln und Blättern folgte größtenteils der APOX-Aktivität. In den Wurzeln war sie kurz nach AHL-Applikation verringert und blieb bis zum Ende des Versuchs bei beiden verwendeten AHLs unterhalb der Aktivität der Kontrollpflanzen. Dies war zugleich der größte Unterschied zur APOX-Aktivität. Bei beiden AHLs stieg die APOX-Aktivität in den Wurzeln insbesondere 5-10 Tage nach der Applikation an. In diesem Zeitraum könnte sich also vermehrt GSSG in den Wurzeln gebildet haben und so eine Akkumulation von SA verhindern. Die GR-Aktivität der Blätter verblieb nach der Behandlung mit C8-HSL mehr oder weniger auf dem Niveau der Kontrollpflanzen, nach der Applikation mit C6-HSL folgte sie der APOX-Aktivität. Demnach ist im grünen Teil der Pflanze nicht mit einem Ungleichgewicht zwischen GSSG : GSH zu rechnen.

4.2.2 Morphologische Veränderungen

Bei *A. thaliana* wurden morphologische Veränderungen der Wurzel nach AHL-Applikation beobachtet. C4- und C6-HSL förderten beispielsweise das Streckungswachstum der Wurzel (von Rad *et al.*, 2008) und C10- bzw. C14-HSL das Wachstum von lateraler Wurzeln und der Wurzelhaare (Ortíz-Castro *et al.*, 2008). Die morphologischen Veränderungen scheinen allerdings Art-spezifisch zu sein, denn Götz (2008) konnte keine morphologischen Veränderungen in Gerste feststellen, lediglich Tendenzen waren zu erkennen. Daher wurde in dieser Arbeit auf die Untersuchung morphologischer Parameter größtenteils verzichtet. Lediglich das Frischgewicht von Wurzel und Spross der Pflanzen wurde bei der Langzeitinkubation bestimmt. Dabei ließ sich bei der Inkubation mit C6-HSL eine Tendenz der Reduktion des Frischgewichtes in Spross und Wurzel erkennen. Diese lag jedoch knapp unterhalb des Signifikanzniveaus des verwendeten t-Tests. Bei der Inkubation mit C8-HSL hingegen fand eine signifikante Reduktion der Frischgewichte in Spross und Wurzeln nach fünf

Tagen statt, die mit länger anhaltender Behandlung jedoch wieder verschwand. Da die Enzymaktivitäten besonders an Tag fünf der Inkubation sehr hoch waren, ist anzunehmen, dass in der Pflanze zu dieser Zeit Prozesse abliefen, die energieaufwändig waren und somit nicht in das Wachstum investiert werden konnte. Die Resistenz gegenüber Pathogenen und deren Kosten für die Fitness von Pflanzen wird in Heil (2001) diskutiert. Der Prozess nach AHL-Behandlung scheint lediglich transient zu sein, da sich die Frischgewichte nach 10 bzw. 17 Tagen nicht von den Kontrollpflanzen unterschieden.

4.2.3 GSTs

GSTs sind eine diverse und omnipräsente Proteinfamilie. Die klassische katalytische Funktion dieser Enzyme ist die Konjugation des Tripeptids Glutathion an ein Co-Substrat mit einem reaktiven elektrophilen Zentrum. GSTs wurden zuerst in den 1960er Jahren in Säugetieren entdeckt, pflanzliche GSTs entdeckte man in den 1970er Jahren. Seit dieser Zeit wurden GST-Aktivitäten bzw. die korrespondierenden Enzyme oder Gene in allen Pflanzen-, Tier- und Pilzarten entdeckt, die man untersucht hat. GSTs bestehen aus 25-29 kDa-Proteinen, die Homo- und Heterodimere bilden können. Pflanzliche GSTs unterscheiden sich in ihrer Sequenz erheblich von GSTs in Säugetieren und werden in acht Klassen eingeteilt: Phi, Tau, Zeta, Teta, Lambda, DHAR, Tetrachlorohydroquinon Dehalogenase und mikrosomale GSTs. Die Phi- und Tau-GSTs kommen ausschließlich in Pflanzen vor und sind gleichzeitig die am weitesten verbreiteten GSTs in diesen Organismen. Bei den Phi- und Tau-GSTs dimerisieren ausschließlich Untereinheiten der selben Klasse miteinander. Bei den anderen Klassen können sich auch Heterodimere aus Untereinheiten von verschiedenen Klassen bilden. Die DHAR und Lambda-Klassen Enzyme bleiben hingegen ausschließlich Monomere. Im Genom von *Arabidopsis* gibt es 48 GST-ähnliche Gene, darunter sind 28 Thau- und 13 Phi-GSTs. 34 der GST-Gene sind in „Clustern“ angeordnet, die aus mehreren Genduplikationen hervorgehen. Die Genduplikation ermöglichte eine Diversifizierung der Sequenzen der einzelnen GST-Gene im Laufe der Evolution und somit eine Auffächerung der Funktionen, die jedoch auch vielfach überlappen können. Die Identität der Aminosäure-Sequenz zwischen den verschiedenen GST-Klassen ist oft geringer als 30% und auch innerhalb der gleichen Klasse kann sie nur 30% betragen. Die Fähigkeit Heterodimere zu bilden vervielfacht die Zahl möglicher GST-Isoformen in Pflanzen. Jedoch ist bis heute nicht geklärt, ob das „Mischen“ der verschiedenen Untereinheiten auch funktional eine signifikante Bedeutung hat (zusammengefasst in Dixon *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2000; Mohsenzadeh *et al.*, 2011).

Schon in den 1970er Jahren wurde erkannt, dass GSTs nicht nur katalytische Eigenschaften besitzen, sondern auch als Bindeproteine fungieren. Das bereits vorher entdeckte Ligandin wurde als GST identifiziert. Jakoby *et al.* (1976) postulierten daraufhin drei

verschiedene Entgiftungsmechanismen für GSTs: 1. die Katalyse, 2. die Bindung von nicht-Substrat Substanzen und 3. die kovalente Bindung hochreaktiver Verbindungen, welche schließlich zur Zerstörung des Enzyms führt. Die Bindung von nicht-Substrat Liganden erfolgt dabei über eine dritte, hydrophobe Bindestelle (Ji *et al.*, 1996). Es binden vor allem lipophile Liganden, die selbst nicht mit GSH konjugiert sein müssen. Die Bindung eines Liganden an die dritte Bindestelle führt zu kleinen Konformationsänderungen des Enzyms (Ji *et al.*, 1996). Meist ist durch die Bindung eines Liganden die katalytische Aktivität der GST verringert (Edwards *et al.*, 2000). GSTs erfüllen in Pflanzen mehrere Funktionen:

1. Als Entgiftungsenzyme, indem sie toxische Xenobiotika mit GSH konjugieren.
2. Im Stressmetabolismus. Dort wirken sie unter anderem als Glutathion Peroxidase und reduzieren zytotoxische DNA und Lipid-Hydroperoxide. GSTs spielen ebenfalls für die Aufrechterhaltung der Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen eine große Rolle, indem sie die Nitrogenase und andere Proteine in den Knöllchen vor ROS schützen (Dalton *et al.*, 2009).
3. Als Transportproteine, indem sie beispielsweise Flavonoide binden und in die Vakuole transportieren (Mueller *et al.*, 2000). Einige GSTs fungieren ebenso als Auxin- und Cytokinin-Bindeproteine (Marrs *et al.*, 1995), woraufhin vorgeschlagen wurde, dass GSTs als Binde- und Transportproteine von Phytohormonen fungieren (Edwards *et al.*, 2000).

Dixon and Edwards (2009) konnten zeigen, dass einige Phi- und Tau-GSTs verschiedene Fettsäure-GSH-Konjugate binden können. Die Bindung der GSTs an Fettsäurekonjugate ist selektiv, abhängig von der Länge und Sättigung der Acylkette sowie dem Vorhandensein von Hydroxygruppen. Eine untersuchte GST (GSTU25) band ausschließlich Hydroxy-C6-Konjugate, andere (GSTU9 und GSTU10) hauptsächlich langkettige Konjugate. Auch Oxilipin-Konjugate werden von einigen GSTs gebunden (z. B. OPDA). Die Konjugation von OPDA kann zudem von den GSTs selbst katalysiert werden. Da OPDA ein Zwischenprodukt der JA-Biosynthese ist, könnte die OPDA-bindende GST eine regulatorische Rolle bei der Biosynthese von JA haben. Die Autoren diskutieren, dass die Selektivität der Bindung je nach Länge und Sättigung der Acylkette und dem Vorhandensein von Hydroxygruppen auch physiologisch relevant für die Pflanze sein muss. Des Weiteren schlagen die Autoren vor, dass nach der Bindung der Konjugate (die entweder spontan entstehen können oder selbst von den GSTs katalysiert werden) diese in verschiedenen Zellkompartimente transportiert werden, eventuell sogar in Interaktion mit GSH-Konjugat Transportern, ähnlich wie der Transport von Flavonoiden (Mueller *et al.*, 2000).

Die Applikation mit C6- bzw. C8-HSL führte schnell zu einer Veränderung der GST-Aktivität. Die Art der Veränderung war dabei abhängig vom Modellsubstrat und von dem verwendeten AHL. Auch bei den GSTs hatten die Kurven einen biphasischen Verlauf. Erste Reaktionen fanden bereits nach 2-stündiger Inkubation statt. In den Wurzeln verringerte sich die Aktivität bei allen gemessenen Substraten kurz nach C6-HSL-Behandlung. Kurz nach der Behandlung mit C8-HSL fand nur bei etwa der Hälfte der Substrate eine Verringerung der GST-Aktivität statt. In den Blättern erhöhte sich dagegen die Aktivität mit den verschiedenen Substraten oder blieb auf dem Niveau der Kontrollpflanzen (Ausnahme: DCNB bei Behandlung mit C8-HSL). Nach länger andauernder Inkubation mit den AHLs blieb die Aktivität in den Wurzeln zumeist verringert oder erreichte das Niveau der Aktivität der Kontrollpflanzen. Dabei war die Veränderung der Aktivität der einzelnen Modellsubstrate abhängig vom eingesetzten AHL. So war beispielsweise die pNpa-Aktivität nach 17 Tagen C6-HSL-Behandlung noch immer verringert, nach 17-tägiger C8-HSL-Behandlung jedoch in etwa auf dem Aktivitätsniveau der Kontrollpflanzen. Die GST-Aktivitäten in den Blättern waren nach länger andauernder Inkubation je nach verwendetem Modellsubstrat unterschiedlich reguliert. Dabei spielte ebenfalls eine Rolle, mit welchem AHL die Pflanze inokuliert wurde. Einzig die DCNB-Aktivität der Blätter war sowohl nach C6-HSL- als auch nach C8-HSL-Behandlung stark verringert.

Da GSTs auch direkt mit den AHLs interagierten und Dixon and Edwards (2009) zeigten, dass bestimmte GSTs Fettsäure-Konjugate binden und deren Konjugation mit GSH teilweise sogar selbst katalysieren, könnten AHLs diesen GSTs ebenfalls als Substrat dienen. Götz *et al.* (2007) zeigten zudem, dass die Aufnahme von AHLs in erster Linie innerhalb der ersten zwei Tage nach Applikation erfolgte. Die Bindung an AHL-Konjugate müsste demzufolge vor allem in diesem Zeitraum stattfinden. Tatsächlich war die GST-Aktivität bei fast allen Modellsubstraten zu diesem Zeitpunkt in den Wurzeln verringert. Eine Steigerung der GST-Aktivität in den Blättern nach längerer Inkubationsdauer könnte wiederum mit einer erhöhten Expression der Gene nach AHL-Applikation in Zusammenhang stehen. Von Rad *et al.* (2008) fanden nach der Inkubation mit C6-HSL in den Blättern von *A. thaliana* drei unterschiedlich regulierte GSTs und in den Wurzeln zwei unterschiedlich regulierte GSTs. Dabei war die Expression in beiden Geweben sowohl hoch- als auch runterreguliert. Wahrscheinlich sind nur bestimmte Isoenzyme an der Reaktion mit AHLs beteiligt.

Bei der Inkubation von C8-HSL mit aufgereinigten GSTs zeigte sich, dass die verschiedenen Isoenzyme unterschiedlich mit den AHLs interagieren. Dabei ähnelten die Enzymveränderungen der GST-Rohextrakte, den gemessenen Veränderungen *in planta*. Nach der Aufreinigung wurde ersichtlich, dass sich die Aktivität im Rohextrakt aus einzelnen und teils sehr unterschiedlichen Aktivitätsveränderungen der Isoenzyme zusam-

mensetzt. Besonders interessant ist die verringerte pNpa-Aktivität Fraktion 12 (-62%), 16 (-51%) und 20 (-49%) der aufgereinigten Blattextrakte, da GSTs bei der Umsetzung von pNpa als Esterase wirken. Lactonringe können ebenfalls von bestimmten Lipasen hydrolysiert werden (Enzelberger *et al.*, 1997). Es wäre also theoretisch möglich, dass pNpa-GSTs den Lactonring der AHLs hydrolysieren können. Ob die Verringerung der pNpa-Aktivität in den einzelnen aufgereinigten Fraktionen auf eine nicht-Substrat Bindung der AHLs oder auf eine echte Katalyse zurückzuführen ist, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Die Erhöhung der GST-Aktivität kann ebenfalls auf die Bindung der Acyl-Seitenkette im nicht-katalytischen Zentrum des Enzyms zurückzuführen sein (Schröder, 1996). Durch die Bindung im nicht-katalytischen Zentrum ändert sich die Konformation des Enzyms und somit auch die Konformation des katalytischen Zentrums. (Ji *et al.*, 1996).

AHLs könnten eventuell als natürlicher Ligand der GSTs von diesen gebunden und transportiert werden. Theoretisch wäre auch die Hydrolyse des Lactonrings durch eine GST-Esteraseaktivität denkbar. Die selektive Hemmung nach AHL-Behandlung einiger Isoenzyme im Proteinextrakt und *in planta* geben erste Hinweise, dass GSTs direkt mit AHLs interagieren. Die Tatsache, dass die Inhibierung der Isoenzyme erst nach einer Stunde Vorinkubation mit C8-HSL ihr Maximum erreicht und sich über eine länger andauernde Vorinkubation von bis zu vier Stunden nicht verändert, spricht eher für eine Bindung am nicht-katalytischen Zentrum der GSTs. Jedoch sind weitere Versuche nötig, um diese Hypothese zu verifizieren.

4.3 Vergleich der Verwendung von synthetischen AHLs mit einer Bakterienkultur

Ist die Applikation der Pflanzen mit synthetischen AHLs vergleichbar mit der Inokulation AHL-produzierender Bakterien? Um dies zu überprüfen wurden die Enzymaktivitäten nach der Applikation mit synthetischen AHLs bzw. nach Inokulation mit AHL-produzierenden Bakterien gemessen und miteinander verglichen. Dafür wurden Gerstenpflanzen mit C6-HSL bzw. mit *S. liquefaciens* MG1 für 10 Tage behandelt. *S. liquefaciens* wurde gewählt, weil die Bakterien die Rhizosphäre der Gerste sehr gut kolonisieren können und weil neben dem AHL-produzierenden Wildtypstamm MG1 eine AHL-negative Mutante MG44 zur Verfügung steht. Beide Stämme kolonisierten die Wurzel gleich gut. Bei der Beobachtung der Kolonisierung der Wurzel am Laser Scanning Mikroskop stellte sich allerdings heraus, dass *S. liquefaciens* MG1 die Wurzel in Biofilmen kolonisiert, während *S. liquefaciens* MG44 nur vereinzelt zu sehen war. Vermutlich wurden die Bakterien bei der Vorbereitung

der Proben für das Mikroskopieren heruntergewaschen. Der MG1 Stamm haftete besser an der Wurzeloberfläche (Nägele, 2010).

Die Veränderungen der GST-Aktivitäten folgten dabei zumeist den gleichen Trend beim Vergleich der beiden Behandlungen. Einzig die pNpa-Aktivität der Wurzeln war signifikant verschieden zwischen den beiden Behandlungen. Bei den Enzymen des antioxidativen Stoffwechsels zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier veränderten sich die Enzymaktivitäten nach der Behandlung im Vergleich zwischen den beiden Behandlungen mehr oder weniger gleich. Die einzige Ausnahme war hier die GR-Aktivität in den Blättern.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die Veränderungen der Enzymaktivitäten zwischen den beiden Behandlungen zwar einem ähnlichen Trend folgten, die einzelnen Aktivitäten im Vergleich meist nicht identisch waren. Da die Enzymaktivitäten bei der Applikation mit C6- und C8-HSL sich teilweise stark unterschieden, ist anzunehmen, dass hier ein ähnliches Phänomen eine Rolle spielte. Besonders die pNpa-Aktivität in den Wurzeln, aber auch die GR-Aktivität in den Blättern unterschieden sich am Tag 10 der Behandlung zwischen C6- und C8-HSL deutlich. *S. liquefaciens* produziert neben C6-HSL zusätzlich auch C4-HSL. Die Applikation mit synthetischem AHL erfolgte jedoch ausschließlich mit C6-HSL.

Im Unterschied zu der Behandlung mit den synthetischen AHLs, war das Frischgewicht und die Sprosslänge nach der Behandlung mit MG1 signifikant reduziert. Ob dies ebenfalls durch die zusätzlichen Produktion von C4-HSL induziert ist oder ob andere Signale, die nur von AHL-produzierenden Bakterien synthetisiert werden, dabei eine Rolle spielen, konnte hier nicht geklärt werden.

Dennoch sind die Unterschiede zwischen der Applikation mit synthetisch hergestellten AHLs und der Inokulation mit AHL-produzierenden Bakterien nicht allzu groß, sodass die Applikation mit synthetischen AHLs ein geeignetes Versuchssystem ist, pflanzliche Antworten auf bakterielle QS-Signale abzulichten.

4.4 Mögliche Enzyme, die den Abbau von AHLs in Gerste katalysieren

Götz (2008) konnte mittels UPLC und FTICR-MS zeigen, dass AHLs in *H. vulgare* metabolisiert werden. Die Spaltung der Acyl-Seitenkette vom Lactonring konnte jedoch nicht gemessen werden, da die Masse des Lactonrings (m/z 102) unterhalb der effektiven Messbereichs des FTICR/MS (m/z 150-10.000) lag und Fettsäuren im pflanzlichen Extrakt keine geeigneten Zielmoleküle darstellen, aufgrund der Schwierigkeiten, sie genau zuzuweisen. Es wurden verschiedene metabolisierte AHLs in den Wurzelextrakten gefunden (siehe Abbildung 4.1). Bei der Applikation mit C6-HSL konnte kein Metabolit detektiert

4.4. MÖGLICHE ENZYME, DIE DEN ABBAU VON AHLs IN GERSTE KATALYSIEREN

werden. Bei C8- und C10-HSL wurden Hydroxylierungen und Ketogruppen am C3-Atom der Acylseitenkette entdeckt, des Weiteren Verkürzungen der Acylkette um zwei C-Atome und ungesättigte Acylketten.

In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, welche Enzyme aus Gerste in der Lage sind, AHLs in der Pflanze weiter zu metabolisieren.

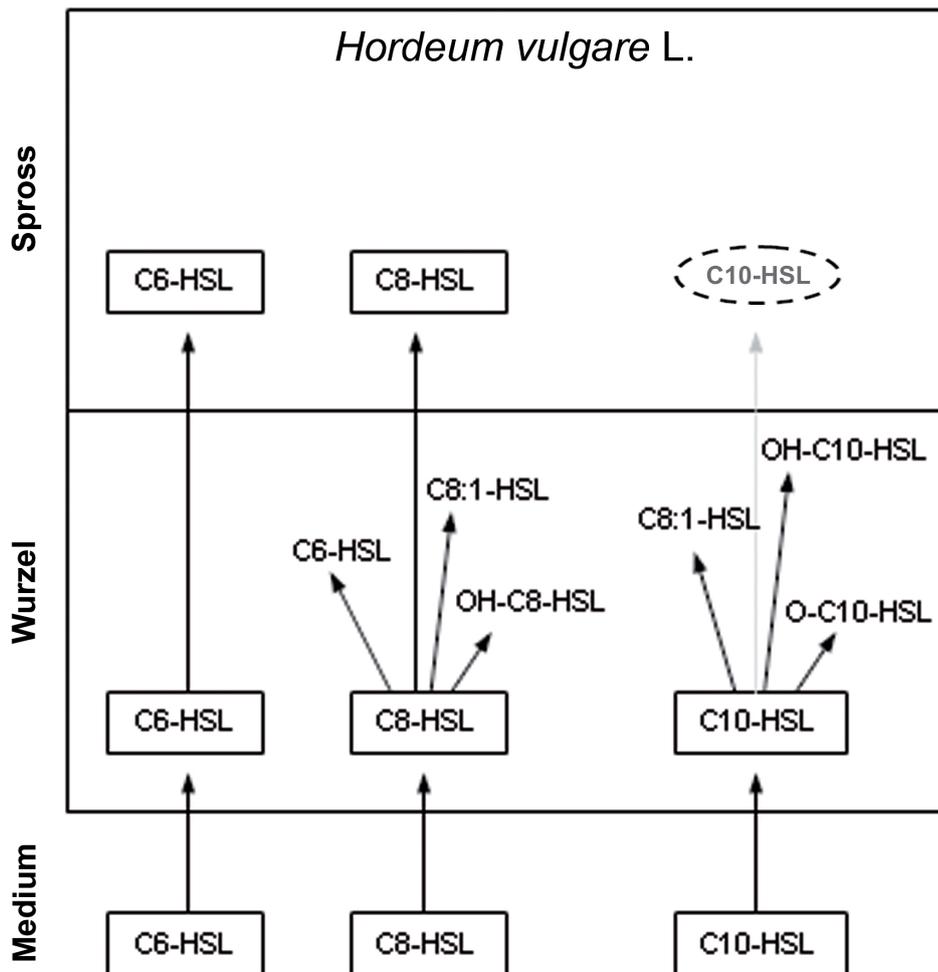


Abbildung 4.1 – AHL-Metabolite in Gerste detektiert mit UPLC und FTICR-MS (Götz, 2008). C10-HSL im Spross ist in grau eingezeichnet, da eine Detektion mit UPLC und FTICR-MS nicht gelang.

4.4.1 P450-Monooxygenasen

P450-Monooxygenasen bilden die drittgrößte Enzymgruppe in pflanzlichen Genomen. So besitzt *A. thaliana* beispielsweise 245 Gene, die für P450-Enzyme kodieren. In Pflanzen werden P450-Monooxygenasen in 127 Familien eingeteilt (Nelson and Werck-Reichhart, 2011). Allein die hohe Anzahl der Gene macht deutlich, wie divers und wichtig die

metabolischen Funktionen der P450-Monooxygenasen sind. P450-Enzyme spielen bei pflanzlichen Abwehrreaktionen eine Rolle, indem sie Polymerisierungsreaktionen von Lignin, Suberin und Cutin katalysieren (Nelson and Werck-Reichhart, 2011). In Algen konnte nachgewiesen werden, dass P450-Enzyme mit ihrer Oxidase-Funktion in der Lage sind, Fettsäuren zu hydroxylieren (Pflugmacher and Sandermann, 1998). Es wäre also vorstellbar, dass P450-Monooxygenasen fähig sind, die Acyl-Seitenkette nicht-substituierter AHLs zu hydroxylieren.

Mit dem BD-Oxygen Biosensor System wurde die Aktivität von CYP2C9 nach Zugabe von 200 μM C8-HSL gemessen. CYP2C9 konnte C8-HSL als Substrat verwenden und hatte eine Aktivität von 2,2 nkat/mg. Es ist vorstellbar, dass P450-Monooxygenasen am Abbau von AHLs *in planta* beteiligt sind. Die Einführung einer Hydroxylgruppe kann den weiteren Abbau erleichtern.

4.4.2 POX

POX weisen keine strenge Spezifität bezüglich ihrer Reduktionsmittel auf und einige Isoenzyme werden spezifisch nach der Infektion mit Pathogenen induziert (Hiraga *et al.*, 2001; Veitch, 2004). Bei den Reaktionen mit POX können Radikale entstehen, die Vernetzungsreaktionen phenolischer Verbindungen ermöglichen und so die Suberin- und Lignin-Produktion fördern (Veitch, 2004). Dies ist vermutlich einer der Gründe, weshalb die POX-Genexpression nach Verwundung oder Pathogenbefall stark erhöht ist. Des Weiteren können POX ohne H_2O_2 Indol-3-essigsäure und noch weitere Substrate oxidieren (zusammengefasst in Veitch, 2004).

Im Apoplastensaft von *H. vulgare* konnte in dieser Arbeit eine POX nachgewiesen werden. Durch Zugabe von 100 μM C8-HSL verringerte sich deren Aktivität um mehr als 50%. POX-Extrakte aus dem Spross und aus den Wurzeln sowie aufgereinigte Meerrettich-POX zeigten keine AHL-abhängige Inhibierung. Damit befindet sich die AHL-sensitive POX am Ort des AHL-Transports. Die genaue Katalyse der AHLs konnte jedoch bisher nicht geklärt werden.

4.5 Auf der Suche nach einem sekundären Botenstoff

Während dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die Aktivitäten einiger Enzyme in den Blättern verschieden reguliert waren je nachdem, ob die AHLs an der Wurzel oder am abgeschnittenen Halm appliziert wurden. Auch die Etablierung einer SAR nach AHL-Applikation, wie sie von Schuegger *et al.* (2006) und Schikora *et al.* (2011) beschrieben wird, lässt auf das Vorhandensein eines systemischen Signals schließen. Da bekannt ist, dass die SA zur Expression von PR-Genen und zur Etablierung der SAR eine Rolle spielt

(De Gara *et al.*, 2003), wäre SA ein möglicher Kandidat für solch ein systemisches Signal. SA leitet vermutlich die Akkumulierung von H_2O_2 ein, indem CAT und APOX gehemmt werden. Die Daten dieser Arbeit lassen zusätzlich auf die Bildung von H_2O_2 in der Wurzel während der Aufnahme von AHLs schließen. Auch H_2O_2 wurde als möglicher sekundärer Botenstoff getestet. Die Bedeutung weiterer „klassischer“ Phytohormone wie JA und Ethylen während der Regulation der pflanzlichen Immunantwort wurde bereits festgestellt (zusammengefasst in Pieterse *et al.*, 2009). Ein veränderter pH-Wert des Mediums wurde ebenfalls getestet, da einige Pflanzen bakterielles QS durch pH-Wert Änderungen inhibieren können (Nachin and Barras, 2000).

Dieser Versuch kam zu keinem eindeutigen Ergebnis. Keine der untersuchten Substanzen konnte die Aktivität in der Wurzel nach der Applikation am Halm wiederherstellen. Dies könnte mehrere Ursachen haben: 1) Eine andere Substanz wirkt als sekundärer Botenstoff bei der AHL-Aufnahme. 2) Die gewählte Konzentration von $10\ \mu M$ war nicht geeignet um die Reaktion auszulösen. 3) Mehrere der gewählten Substanzen wirken synergistisch und lösen so die Veränderungen im Spross aus.

Dennoch konnten interessante Beobachtungen gemacht werden. Nicht alle der ausgewählten Enzyme reagierten auf alle Substanzen. CDNB-GSTs reagierten beispielsweise kaum auf die Behandlung mit den verschiedenen Substanzen. DCNB-GSTs reagierten mit relativ stark verringerter Aktivität, dies jedoch auf jede der Applikationen mehr oder weniger gleich und zeigten eher allgemeine Stresssymptome. Ähnlich wie die CDNB-GSTs verhielten sich die pNpa-GSTs, außer dass diese als einziges auf die Behandlung mit H_2O_2 mit einer Steigerung der Enzymaktivität reagierten. Die NBC- und NBoC-GSTs reagierten differenziert auf die verschiedenen Signalstoffe. Dass Substanzen unterschiedlich auf die verschiedenen GST-Isoformen wirken, wurde bereits von Lyubenova *et al.* (2007) bei der Behandlung mit Cadmium und Neustifter (2007) bei der Behandlung mit Analgetika gezeigt. Bei Huber (2010) waren ebenfalls besonders die NBC- und NBoC-GSTs nach der Inkubation von *H. vulgare* mit Diclofenac stark induziert.

Die Aktivitäten der antioxidativen Enzyme waren unterschiedlich reguliert, je nachdem ob die AHLs am abgeschnittenem Halm oder an der Wurzel appliziert wurden. APOX und GR reagierten auf die anderen Substanzen mit erhöhter Aktivität, jedoch ohne dass die verschiedenen Substanzen unterschiedliche Veränderungen der Enzymaktivität hervorriefen. Die CAT-Aktivität verringerte sich nach der Inkubation mit basischem pH-Wert, SA, mSA, ACC und H_2O_2 . Die Inaktivierung von CAT durch SA ist bereits beschrieben (De Gara *et al.*, 2003). Die Verringerung der Aktivität der CAT durch H_2O_2 war eher ungewöhnlich, da CAT H_2O_2 entgiften sollte. Vorstellbar ist, dass bei der H_2O_2 -Applikation am Halm H_2O_2 nicht als Zellgift, sondern als sekundärer Botenstoff wirkte und weitere Signalkaskaden auslöste, welche schließlich die CAT-Aktivität verringerten.

Bei der Behandlung mit saurem pH-Wert, JA und mJA veränderte sich die CAT-Aktivität nicht. POX reagierte mit einer Induktion nach der Behandlung mit saurem pH-Wert, JA, mJA, mSA, ACC und H₂O₂ jedoch mit einer Reduktion der Aktivität nach der Behandlung mit pH 8,9 und SA. Die SOD-Aktivität veränderte sich bei der Behandlung mit unterschiedlichem pH-Wert nicht, war jedoch nach Behandlung mit Jasmonaten reduziert und bei allen anderen Substanzen aktiviert.

4.5.1 NO als möglicher sekundärer Botenstoff

NO reguliert unterschiedliche Prozesse in Pflanzen, so zum Beispiel die Expression von PR-Genen nach Pathogenbefall. In Pflanzen kann es sowohl aus Nitrit als auch aus L-Arginin synthetisiert werden. Die NO-Produktion in der Wurzel durch die Nitratreduktase ist wahrscheinlich durch die Phosphorylierung dieses Enzyms kontrolliert (Besson-Bard *et al.*, 2008). NO besitzt aufgrund seiner chemischen Eigenschaften keinen spezifischen Rezeptor, sondern agiert hauptsächlich durch Bindung an Übergangsmetalle in Proteinen oder kovalente Veränderungen an Cystein- bzw. Thyrosinresten (S-Nitrosilierung). Diese Art der posttranskriptionalen Veränderung wurde bereits an mehr als 100 Proteinen nachgewiesen (Besson-Bard *et al.*, 2008). In Pflanzen wurde die S-Nitrosilierung von Proteinen zuerst in *A. thaliana* gezeigt. Die nitrosilierten Proteine waren unter anderem an der Redoxkontrolle und bei der Stressantwort beteiligt (Lindermayr *et al.*, 2005).

Auch CAT und APOX sind putative Zielproteine von NO, deren Aktivität durch die Nitrosilierung an der Häm-Gruppe verringert wird. Nach Zugabe verschiedener NO-Donatoren zu CAT-Extrakten aus Tabak betrug die Inhibierung der CAT-Aktivität nach zwei Stunden -70 % bis -90 %. Die Aktivität der APOX war eine Stunde nach der Inkubation mit dem NO-Donator um -70 % reduziert (Clark *et al.*, 2000).

De-Nitrosilierungen können durch GSH erfolgen, was die Bildung von Nitrosoglutathion zur Folge hat. Nitrosoglutathion dient als endogenes NO-Reservoir (zusammengefasst in Besson-Bard *et al.*, 2008; Spadaro *et al.*, 2010).

In Weinpflanzen konnte gezeigt werden, dass die NO-Produktion positiv durch Elicitor erzeugte Ca²⁺-Ströme beeinflusst wird (Vandelle *et al.*, 2006). Gleichzeitig reguliert NO die Ca²⁺-Ströme in einer negativen Rückkopplung und entfernt auf diese Weise überschüssiges Ca²⁺.

Song *et al.* (2011) konnten zeigen, dass nach Applikation von 10 µM C4-HSL intrazelluläre Ca²⁺-Ströme in Wurzeln von *A. thaliana* entstehen, indem C4-HSL Ca²⁺-Kanäle öffnet. Die Ca²⁺-Ströme entstanden dabei 6s nach Beginn der Messung. Die Autoren diskutieren, dass Ca²⁺ den Pflanzen als internes Signalmolekül dient, den bakteriellen „Autoinducer“ zu erkennen.

In dieser Arbeit konnte nach der Applikation von 10 μ M C8-HSL eine erhöhte Produktion von NO in den Wurzeln von *H. vulgare* gemessen werden. NO wurde dabei ca. 10-20 min nach der Applikation gebildet. Dies entspricht den Beobachtungen von Vandelle *et al.* (2006), dass die NO-Produktion den Ca^{2+} -Strömen folgt. Des Weiteren sind sowohl die CAT- als auch APOX-Aktivität in den Wurzeln 2-4 h nach der Applikation mit C6- bzw. C8-HSL stark reduziert (Cat: -70 % bzw. -77 %; APOX: -54 % bzw. -56 %). Auch dies könnte demzufolge möglicherweise NO-induziert sein.

Beide zusammen - NO, und Ca^{2+} - könnten als „root to shoot“ Signale in der Pflanze wirken und weitere Signalkaskaden auslösen. Durch die starke Inhibierung der CAT und der APOX könnte H_2O_2 in den Wurzeln akkumulieren und ebenfalls als Signal in der Pflanze wirken. Dies konnte bisher allerdings nicht bestätigt werden (Schikora *et al.*, 2011). Intrazelluläre Ca^{2+} -Ströme sind außerdem für die Etablierung der SAR notwendig, indem sie die Synthese von SA durch Bindung an einen negativen Modulator regulieren (Du *et al.*, 2009). Bei der AHL-induzierten SAR in Tomatenpflanzen wurden 5-10 h nach der AHL Behandlung erhöhte Konzentrationen von SA gemessen (Schuhegger *et al.*, 2006).

Die Etablierung der SAR durch AHLs könnte demnach durch die schnelle Induktion von Ca^{2+} -Strömen erfolgen, die daraufhin die NO-Produktion in den Wurzeln stimulieren. Dies könnte anschließend zur vermehrten Produktion von SA führen, welche zusammen mit NO die CAT- und APOX-Aktivitäten in den Wurzeln hemmt. Die Inhibierung der beiden antioxidativen Enzyme sollte zur Akkumulation von H_2O_2 führen, welches dann, synergistisch mit anderen Substanzen, nachgeschaltete Signalkaskaden in der Pflanze reguliert.

4.6 Weiterführende Überlegungen

4.6.1 Hologenomtheorie

Pflanzen kommen natürlicherweise nicht ohne Bakterien vor. Diese besiedeln pflanzliche Oberflächen und können ebenfalls endophytisch mit Pflanzen assoziiert sein. Um den Einfluss von AHLs auf Pflanzen studieren zu können, ist das Wachstum in einem sterilen System unabdingbar, da bakterielle Kontaminanten selbst unkontrolliert AHLs produzieren könnten. Da das pflanzliche Immunsystem evolutionär darauf ausgerichtet ist, mit Mikroorganismen zu interagieren, ist der sterile Versuchsaufbau nicht unkritisch zu betrachten. Lau and Lennon (2011) zeigten, dass Pflanzen mit reduzierter mikrobieller Gemeinschaft in der Rhizosphäre kleiner und schwächer waren und die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft die natürliche Selektion beeinflusste.

In ihrer natürlichen Umgebung kommen Pflanzen ständig in Kontakt mit AHLs. Es ist somit durchaus möglich, dass die langfristigen Enzymveränderungen, die noch 17 Tage nach AHL-Behandlung vorhanden waren, den eigentlichen „Normalzustand“ von Pflanzen in nicht-steriler Umgebung darstellen. Jedoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Enzyme der Pflanzen die unterschiedlichen AHLs wahrnehmen können und unterschiedlich auf diese reagieren. Die kurzzeitige Antwort erfolgt dabei innerhalb weniger Stunden und beinhaltet mehrere „klassische“ Komponenten der pflanzlichen Immunantwort. Da die meisten Bakterien keine Pathogene sind, sondern mutualistisch oder kommensalistisch mit eukaryotischen Wirten leben, wurde die herkömmliche Ansicht eukaryotischer Immunsysteme in Frage gestellt. Demnach sind Immunsysteme primär keine Abwehrsysteme, sondern als Kommunikationsportal zwischen Pro- und Eukaryoten zu verstehen (Eberl, 2010). Im Sinne der Hologenomtheorie sind Eukaryoten demnach als Superorganismus anzusehen, der mit seinen Prokaryoten eine evolutionäre Einheit bildet (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008).

Am Beispiel von AHLs kann eine wechselseitige Kommunikation zwischen den Reichen gut illustriert werden. Pflanzen können die bakteriellen QS-Signale aktiv aufnehmen und auf diese unterschiedlich reagieren. Es gibt jedoch HSLs, die erst aus pflanzlichen Komponenten zusammengesetzt werden - aus p-Coumarat beispielsweise wird p-Coumaroyl-HSL (Schaefer *et al.*, 2008). Nach Fusarieninfektion exkretieren Gerstenpflanzen Zimtsäure, Coumarat, Ferulsäure und andere Substanzen in die Rhizosphäre (Lanoue *et al.*, 2010). Diese Substanzen haben alle antimikrobielle Wirkung, könnten aber ebenso ein „Hilferuf“ an bestimmte Bakterien sein. Ob p-Coumaroyl-HSL wiederum von Pflanzen aufgenommen wird und welche Effekte es in Pflanzen auslöst, ist bisher noch nicht untersucht.

4.6.2 QS-Signale als Antibiotika

In jüngerer Zeit wurde überlegt, ob QS-Signale bzw. Quorum Quenching-Signale als neue Antibiotika eingesetzt werden können. Die heute existierenden, bakterioziden Antibiotika unterliegen einem hohen Selektionsdruck, da diese die Bakterien abtöten. Dadurch haben sich vielfach resistente Pathogene entwickelt. Durch das Eingreifen in das QS-System werden die Bakterien hingegen lediglich „taub“ gemacht, sodass diese nicht länger in der Lage sind, koordinierte Aktionen durchzuführen. Der Selektionsdruck ist hierbei um ein vielfaches geringer als bei herkömmlichen Antibiotika. Diese Idee wurde bereits in populär-wissenschaftlichen Journalen diskutiert (Naik, 2008).

In *P. aeruginosa* konnten allerdings bereits erste Resistenzen gegen das am besten charakterisierte Quorum Quenching Molekül - ein bromiertes Furanon - festgestellt werden (Maeda *et al.*, 2011). Das Besondere daran ist, dass resistente *P. aeruginosa* bei Anwesenheit des Furanons noch virulenter sind. Auch neue Arten von Antibiotika müssen demnach mit Bedacht eingesetzt werden.

4.6.3 QS-Signale zur Biokontrolle und Pflanzenstärkung

Da AHLs selektiv auf Bakterien wirken, könnten diese zur Biokontrolle oder zur Pflanzenstärkung eingesetzt werden. Das humanpathogene Bakterium *Salmonella enterica* kann Gerste endophytisch besiedeln und bis in die Gerstenblätter transportiert werden (Kutter *et al.*, 2006). *S. enterica* produziert selbst zwar keine AHLs, besitzt aber das LuxR-Homolog SdiA und kann AHLs wahrnehmen. Der gezielte Einsatz von QS-Signalen oder Quorum Quenching Substanzen könnte die Besiedlung in der Pflanze eindämmen.

Auch der Einsatz von AHLs zur Pflanzenstärkung ist denkbar, um beispielsweise PGPRs in der Rhizosphäre spezifisch anzureichern. Dabei ist zu bedenken, dass eine Applikation von AHLs in die Rhizosphäre die gesamte Bakterienpopulation beeinflusst. Inwiefern sich eine Einflussnahme durch AHLs auf natürliche Populationen auswirkt, ist bisher zu wenig untersucht. Es können daher keine Vorhersagen getroffen werden, ob durch die Applikation von AHLs gezielt PGPRs angereichert werden können und wie lang ein solcher Effekt anhält. Zwar heben D'Angelo-Picard *et al.* (2004) hervor, dass durch die Exkretion von C6-HSL aus den Wurzeln von transgenen Tabakpflanzen die Rhizosphärengemeinschaft nicht beeinflusst wird, jedoch gibt es bis heute zu wenig Studien, um genaue Aussagen darüber treffen zu können.

4.7 Schlussfolgerungen

- AHLs werden aktiv durch ABC-Transporter in die Wurzel aufgenommen und systemisch in die Pflanze transportiert. Der Transport erfolgt dabei hauptsächlich symplastisch über den Zentralzylinder. Aufnahme und Transport erfolgen demnach aktiv und nicht durch Diffusion. Ob die Aufnahme primär oder sekundär aktiv erfolgt, ist nicht geklärt. Auch langkettige AHLs (C10-HSL) werden systemisch in die Blätter von *H. vulgare* transportiert.
- AHLs binden in Abhängigkeit ihrer Kettenlänge unterschiedlich stark an die Wurzel-Oberfläche. Die Bindung der AHLs ist dabei mit 25 % Acetonitril nicht abwaschbar. C10-HSL bindet in etwa doppelt so stark an die Wurzeloberfläche wie C8-HSL. Da die Oberflächenbindung den Nachweis eines Wurzeltransports maskiert, muss dieser mit einem geeigneten Testsystem, wie beispielsweise der Pitman-Kammer, untersucht werden. Hierbei muss die Bindung der AHLs an die Kammer allerdings berücksichtigt werden.
- Ausgewählte Enzyme des antioxidativen Stoffwechsels reagieren spezifisch auf die Behandlung mit AHLs. Die Aktivitäten der Enzyme ändern sich dabei in einem biphasischem Verlauf. Kurz nach AHL-Applikation sind vor allem die CAT- und APOX-Aktivitäten der Wurzeln stark reduziert. Im Spross ist die Aktivität der meisten Enzyme kurz nach der Behandlung erhöht. Gegen Ende der Behandlungsdauer von 17 Tagen haben die meisten Enzyme in etwa wieder das Niveau der Kontrollpflanzen erreicht, einige Enzymaktivitäten bleiben allerdings auch langfristig verändert (beispielsweise die POX in den Blättern).
- GSTs reagieren ebenso in einem biphasischem Verlauf auf die Behandlung mit AHLs. Die einzelnen GST-Isoenzyme reagieren dabei spezifisch. Die Reaktion ist außerdem vom applizierten AHL abhängig (C6- bzw. C8-HSL). Die Aufreinigung der GSTs ergab, dass Isoenzyme, die mit dem gleichen Modellsubstrat gemessen wurden, unterschiedlich auf AHLs reagieren. Vermutlich binden AHLs GSTs am nicht-katalytischen Zentrum.
- Neben GSTs können auch POX und P450-Monooxygenasen direkt mit AHLs interagieren bzw. diese als Substrat verwenden. Beide Enzyme könnten zur Metabolisierung der AHLs in *H. vulgare* beitragen.
- Der Vergleich der Enzymaktivitäten von mit C6-HSL- bzw. *S. liquefaciens*- behandelten Pflanzen zeigte, dass die Behandlung mit synthetischen AHLs geeignet ist, pflanzliche Antworten auf bakterielle AHLs abzulichten. Es konnte des Weiteren

gezeigt werden, dass *S. liquefaciens* die Rhizosphäre von Gerste sehr gut kolonisiert, unabhängig davon ob der AHL-produzierende Wildtypstamm oder die AHL-negative Mutante eingesetzt wurde.

- In dieser Arbeit konnte erstmals NO als möglicher sekundärer Botenstoff in Pflanzen bei AHL-Applikation verifiziert werden. NO bildete sich ca. 10-20 min nach AHL-Behandlung und könnte zusammen mit SA die Enzymaktivitäten in den Wurzeln regulieren.
- Die Untersuchung mit anderen klassischen sekundären Botenstoffen führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Feststellbar war jedoch, dass die am Stress-Stoffwechsel beteiligten Enzyme unterschiedlich auf diese Signalstoffe reagieren. Vorstellbar ist, dass die verschiedenen Signalsubstanzen in Pflanzen synergistisch wirken. Vertiefte Untersuchungen auf diesem Gebiet sind dringend erforderlich.
- Pflanzen haben im Lauf der Evolution die Fähigkeit entwickelt, bakterielle Kommunikationssignale systemisch aufzunehmen und individuell auf diese zu reagieren. Durch die Ausscheidung von Quorum Quenching Signalen können die zudem in das QS System der Bakterien eingreifen. Bakterielle „Autoinducer“ sind ein Beispiel für die wechselseitige Kommunikation zwischen Pflanzen und Prokaryoten, die wir gerade erst zu verstehen beginnen.

5 Zusammenfassung

Seit der Entstehung eukaryotischen Lebens waren diese in ständigen Kontakt mit prokaryotischen Mikroorganismen. In den 1970er Jahren wurde entdeckt, dass Bakterien über einen Prozess namens „Quorum Sensing“ (QS) mit Hilfe sogenannter „Autoinducer“ (beispielsweise AHLs) miteinander kommunizieren können. Eine Reihe bakterieller Prozesse sind QS reguliert, beispielsweise die Sporulation, das Schwarmverhalten oder die Expression von Virulenzgenen. Eukaryotische Wirtsorganismen können bakterielles QS belauschen, aber auch modulieren.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass AHLs aktiv durch ABC-Transporter in die Wurzel von *H. vulgare* aufgenommen werden. Der Transport erfolgt in der Wurzel hauptsächlich symplastisch durch den Zentralzylinder. Beide untersuchten AHLs (C8- und C10-HSL) werden zudem systemisch in den Spross transportiert. Die unterschiedliche Hydrophobizität von C8- und C10-HSL beeinflusst deren Adsorption an Oberflächen und somit auch den Transport in der Pflanze.

Nach der Aufnahme in die Pflanze lösen AHLs spezifische Reaktionen bei den Enzymen des antioxidativen Stoffwechsels aus. Dabei ist die Aktivität der meisten Enzyme in den Wurzeln kurz nach AHL-Applikation reduziert und in den Blättern erhöht. Nach der kurzzeitigen Reaktion (innerhalb der ersten 24 h) erfolgt eine zweite Reaktion der Enzyme. Dabei nähern sich die Enzymaktivitäten mehr oder weniger dem Aktivitätsniveau der Kontrollpflanzen an.

Einige Enzyme können zudem direkt mit AHLs interagieren. Die Interaktion mit Klasse III Peroxidasen und P450-Monooxygenasen führt wahrscheinlich zum beginnenden Abbau der AHLs in der Pflanze. Die Interaktion mit GSTs beruht vermutlich auf der Bindung der AHLs am nicht-katalytischen Zentrum der Enzyme. Die verschiedenen GST-Isoenzyme reagieren dabei hochspezifisch. Während klassische Phytohormone nicht die erwarteten Veränderungen in den Enzymaktivitäten hervorriefen, konnte NO als möglicher sekundärer Botenstoff in der Interaktion zwischen C8-HSL und *H. vulgare* identifiziert werden.

Literaturverzeichnis

- Ahmer, B.M.M., 2004. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology* 52, 933–945.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 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.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 233–266.
- Barnard, A.M.L., Salmond, G.P.C., 2007. Quorum sensing in *Erwinia* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 415–423.
- Bassler, B.L., 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109, 421–424.
- Baudouin, E., 2011. The language of nitric oxide signalling. *Plant Biology* 13, 233–242.
- Beck von Bodman, S., Farrand, S.K., 1995. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. *Journal of Bacteriology* 177, 5000–5008.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D., 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 59, 21–39.
- Blosser-Middleton, R.S., Gray, K.M., 2001. Multiple *N*-acyl homoserine lactone signals of *Rhizobium leguminosarum* are synthesized in a distinct temporal pattern. *Journal of Bacteriology* 183, 6771–6777.
- Boller, T., He, S.Y., 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324, 742–744.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 83–116.

- Bradford, M.M., 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.
- Bürün, B., Çoban Poyrazoglu, E., 2002. Embryo culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Turkish Journal of Biology* 26, 175–180.
- Cavalier-Smith, T., 2006. Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 969–1006.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., Farrand, S.K., 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 1119–1129.
- Charlton, T.S., 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, 530–541.
- Chen, X., Buddrus-Schiemann, K., Rothballer, M., Krämer, P.M., Hartmann, A., 2010a. Detection of quorum sensing molecules in *Burkholderia cepacia* culture supernatants with enzyme-linked immunosorbent assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398, 2669–2676.
- Chen, X., Kremmer, E., Gouzy, M.F., Clausen, E., Starke, M., Wöllner, K., Pfister, G., Hartmann, A., Krämer, P.M., 2010b. Development and characterization of rat monoclonal antibodies for *N*-acylated homoserine lactones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398, 2655–2667.
- Chhabra, S.R., Philipp, B., Eberl, L., Givskov, M., Williams, P., Cámara, M., 2005. Extracellular communication in bacteria. *Topics in Current Chemistry* 240, 279–315.
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A., Klessig, D.F., 2000. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 1380–1384.
- Clarke, J.T., Warnock, R.C.M., Donoghue, P.C.J., 2011. Establishing a time-scale for plant evolution. *New Phytologist* 192, 266–301.
- Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R., 1997. Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener fenchlorazole-ethyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 59, 35–49.

- Dalton, D.A., Boniface, C., Turner, Z., Lindahl, A., Kim, H.J., Jelinek, L., Govindarajulu, M., Finger, R.E., Taylor, C.G., 2009. Physiological roles of glutathione s-transferases in soybean root nodules. *Plant Physiology* 150, 521–530.
- van Dam, N.M., 2009. How plants cope with biotic interactions. *Plant Biology* 11, 1–5.
- D'Angelo-Picard, C., Faure, D., Carlier, A., Uroz, S., Raffoux, A., Fray, R., Dessaux, Y., 2004. Bacterial populations in the rhizosphere of tobacco plants producing the quorum-sensing signals hexanoyl-homoserine lactone and 3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone. *FEMS Microbiology Ecology* 51, 19–29.
- De Gara, L., De Pinto, M.C., Tommasi, F., 2003. The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 863–870.
- DeAngelis, K.M., Firestone, M.K., Lindow, S.E., 2007. Sensitive whole-cell biosensor suitable for detecting a variety of *N*-acyl homoserine lactones in intact rhizosphere microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3724–3727.
- 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.
- Devillers, I., de Wergifosse, B., Bruneau, M.P., Tinant, B., Declercq, J.P., Touillaux, R., Rees, J.F., Marchand-Brynaert, J., 1999. Synthesis, structural characterization and antioxidative properties of aminopyrazine and imidazolopyrazine derivatives. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* , 1481–1488.
- Dicke, M., 2009. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant Cell Environment* 32, 654–665.
- Diekmann, F., 2005. Translokation von Fremdstoff-Metaboliten und ihr Einfluss auf die Rhizosphäre. Dissertation. Technischen Universität München.
- Dixon, D.P., Edwards, R., 2009. Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 21249–21256.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3, 3004.1–3004.10.

- Djordjevic, M.A., Oakes, M., Li, D.X., Hwang, C.H., Hocart, C.H., Gresshoff, P.M., 2007. The *Glycine max* xylem sap and apoplast proteome. *Journal of Proteome Research* 6, 3771 – 3779.
- 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., Zhang, L.H., 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of Microbiology* 43, 101–109.
- Du, L., Ali, G.S., Simons, K.a., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S.N., Poovaiah, B.W., 2009. Ca^{2+} /calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* 457, 1154–1158.
- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., Oppenheimer, N.J., 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20, 2444–2449.
- Eberl, G., 2010. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal Immunology* 3, 450–60.
- Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C., Stewart, G.S.A.B., Christiansen, G., Chhabra, S.R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S.r., Givskov, M., 1996. Involvement of *N*-acyl-l-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Molecular Microbiology* 20, 127–136.
- Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V., 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5, 193–198.
- Elasri, M., Delorme, S., Lemanceau, P., Stewart, G., Laue, B., Glickmann, E., Oger, P.M., 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.
- Englmann, M., Fekete, A., Kuttler, C., Frommberger, M., Li, X., Gebefuegi, 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* 1160, 184–93.
- Enzelberger, M.M., Bornscheuer, U.T., Gatfield, I., Schmid, R.D., 1997. Lipase-catalysed resolution of γ - and δ -lactones. *Journal of Biotechnology* 56, 129–133.

- Fath, A., Bethke, P.C., Jones, R.L., 2001. Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiology* 126, 156–166.
- Fekete, A., Kuttler, C., Rothballer, M., Hense, B.A., Fischer, D., Buddrus-Schiemann, K., Lucio, M., Müller, J., Schmitt-Kopplin, P., Hartmann, A., 2010. Dynamic regulation of *N*-acyl-homoserine lactone production and degradation in *Pseudomonas putida* IsoF. *FEMS Microbiology Ecology* 72, 22–34.
- Fester, T., Hause, G., 2005. Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 15, 373–379.
- Figge, M.J., Robertson, L.A., Ast, J.C., Dunlap, P.V., 2011. Historical microbiology: revival and phylogenetic analysis of the luminous bacterial cultures of M. W. Beijerinck. *FEMS Microbiology Ecology* 78, 463–472.
- Foyer, C.H., 1993. Ascorbic Acid, in: Alscher, R.G., Hess, J.L. (Eds.), *Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press, pp. 31–58.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176, 269–275.
- Galloway, W.R.J.D., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., Spring, D.R., 2011. Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chemical reviews* 111, 28–67.
- Gémes, K., Poór, P., Horváth, E., Kolbert, Z., Szopkó, D., Szepesi, A., Tari, I., 2011. Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiologia Plantarum* 142, 179–192.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S.r., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *Journal of Bacteriology* 178, 6618–6622.
- Gonzales, J.E., Marketon, M.M., 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing *Rhizobia*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 574–592.
- Götz, C., 2008. 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. Dissertation. Technische Universität München.

- Götz, C., Fekete, A., Gebefuegi, I., Forczek, S.T., 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.
- Haddock, S.H.D., Moline, M.A., Case, J.F., 2010. Bioluminescence in the sea. *Annual Review of Marine Science* 2, 443–493.
- Hauben, L., Moore, E.R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J., 1998. Phylogenetic Position of Phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology* 21, 384–397.
- Heil, M., 2001. The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *European Journal of Plant Pathology* 107, 137–146.
- Henke, J.M., Bassler, B.L., 2004. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* 186, 6902–6914.
- Hense, B.A., Kuttler, C., Müller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., Kreft, J.U., 2007. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nature Reviews. Microbiology* 5, 230–239.
- Herring, P.J., 2002. Marine microlights: the luminous marine bacteria. *Microbiology Today* 29, 174–176.
- Herring, P.J., Watson, M., 1993. Milky Seas: A Bioluminescent Puzzle. *The Marine Observer* 63, 22–30.
- 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.
- Hong, S.H., Park, H.J., Kong, K.H., 1999. Purification and biochemical properties of glutathione S-transferase from *Oryza sativa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 122, 21–27.
- Huber, C., 2010. Evaluierung der pflanzlichen Entgiftungskapazität für Humanarzneimittel in der Phytoremediation am Beispiel der Wirkstoffe Paracetamol und Diclofenac. Dissertation. Technische Universität, München.
- Hughes, D.T., Sperandio, V., 2008. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews. Microbiology* 6, 111–120.

- Huse, H., Whiteley, M., 2011. 4-Quinolones: smart phones of the microbial world. *Chemical Reviews* 111, 152–159.
- Jackson, M.B., Saker, L.R., Crisp, C.M., Else, M.A., Janowiak, F., 2003. Ionic and pH signalling from roots to shoots of flooded tomato plants in relation to stomatal closure. *Plant and Soil* 253, 103–113.
- Jacobi, C.A., Schiffner, F., Henkel, M., Waibel, M., Stork, B., Daubrawa, M., Eberl, L., Gregor, M., Wesselborg, S., 2009. Effects of bacterial *N*-acyl homoserine lactones on human Jurkat T lymphocytes-OdDHL induces apoptosis via the mitochondrial pathway. *International Journal of Medical Microbiology* 299, 509–519.
- Jaenicke, L., 1984. Einführung in die Praxis des Biochemikers. Institut für Biochemie der Universität zu Köln.
- Jahoor, A., Patel, R., Bryan, A., Do, C., Krier, J., Watters, C., Wahli, W., Li, G., Williams, S.C., Rumbaugh, K.P., 2008. Peroxisome proliferator-activated receptors mediate host cell proinflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Journal of Bacteriology* 190, 4408–4415.
- Jakoby, W.B., Ketley, J.N., Habbig, W.H., 1976. Rat glutathione S-transferases: binding and physical properties, in: Arias, I.M., Jakoby, W.B. (Eds.), *Glutathione: Metabolism and Function*. Raven Press, New York, pp. 213–223.
- Ji, X., von Rosenvinget, E.C., Johnson, W.W., Armstrong, R.N., Gilliland, G.L., 1996. Location of a potential transport binding site in a sigma class glutathione transferase by x-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 8208–8213.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N.S., Deyholos, M.K., 2007. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany* 58, 3591–607.
- Joint, I., Tait, K., Callow, M.E., Callow, J.A., Milton, D., Williams, P., Cámara, M., 2002. Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science* 298, 1207.
- Joseph, C.M., Phillips, D.A., 2003. Metabolites from soil bacteria affect plant water relations. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 189–192.
- Kanamaru, K., Kanamaru, K., Tatsuno, I., Tobe, T., Sasakawa, C., 2000. SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology* 38, 805–816.

- Karban, R., 2008. Plant behaviour and communication. *Ecology Letters* 11, 727–739.
- Kudla, J., Batistic, O., Hashimoto, K., 2010. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22, 541–563.
- Kutter, S., Hartmann, A., Schmid, M., 2006. Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria spp.*. *FEMS Microbiology Ecology* 56, 262–271.
- Lamoureux, G., Rusness, D., 1989. The role of glutathione and glutathione-S-transferases in pesticide metabolism, selectivity, and mode of action in plants and insects. *Coenzymes and cofactors* 3, 153–196.
- Lanoue, A., Burlat, V., Schurr, U., Röse, U.S.R., 2010. Induced root-secreted phenolic compounds as a belowground plant defense. *Plant Signaling & Behavior* 5, 1037–1038.
- Lapota, D., Galt, C., Losee, J.R., Huddell, H.D., Orzech, J.K., Nealson, K.H., 1988. Observations and measurements of planktonic bioluminescence in and around a milky sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 119, 55–81.
- Lara-Nuñez, A., Romero-Romero, T., Ventura, J.L., Blancas, V., Anaya, A.L., Cruz-Ortega, R., 2006. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant, Cell and Environment* 29, 2009–2016.
- Lau, J.A., Lennon, J.T., 2011. Evolutionary ecology of plant-microbe interactions: soil microbial structure alters selection on plant traits. *New Phytologist* 192, 215–224.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Durner, J., 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137, 921–930.
- 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, 465–473.
- Lyubenova, L.S., 2007. Untersuchungen der Entgiftungskapazität verschiedener Pflanzenarten im Hinblick auf ihre Verwendung für die Phytoremediation unter Berücksichtigung von Schwermetallen. Dissertation. Technische Universität München.
- Maeda, T., Garcia-Contreras, R., Pu, M., Sheng, L., Garcia, L., Tomas, M., Wood, T.K., 2011. Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. *The ISME Journal*, ahead of print.
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated

- homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 145 (Pt 2, 283–291.
- Manefield, M., Rasmussen, T.B., Henzter, M., Andersen, J.B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M., 2002. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* 148, 1119–1127.
- Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M., Walbot, V., 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* 375, 397–400.
- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B.G., Bauer, W.D., 2003. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1444–9.
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1997. Quorum sensing and *Chronobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acyl homoserine lactones. *Molecular Microbiology* 143, 3703–3711.
- McClung, C.R., 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology & Medicine* 23, 489–496.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase - an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* 244, 6049–6055.
- Menone, M.L., 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.
- Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Taconnat, L., Saindrenan, P., Gouia, H., Issakidis-Bourguet, E., Renou, J.P., Noctor, G., 2010. *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiology* 153, 1144–60.
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55, 165–199.
- Miller, S.D., Haddock, S.H.D., Elvidge, C.D., Lee, T.F., 2005. Detection of a bioluminescent milky sea from space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14181–14184.

- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405–410.
- Mittler, R., Feng, X., Cohen, M., 1998. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* 10, 461–473.
- Mizuno, M., Tada, Y., Uchii, K., Kawakami, S., Mayama, S., 2005. Catalase and alternative oxidase cooperatively regulate programmed cell death induced by beta-glucan elicitor in potato suspension cultures. *Planta* 220, 849–853.
- Mohsenzadeh, S., Esmaili, M., Moosavi, F., Shahrtash, M., Saffari, B., Mohabatkar, H., 2011. Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. *African Journal of Biotechnology* 10, 8160–8165.
- Mole, B.M., Baltrus, D.a., Dangl, J.L., Grant, S.R., 2007. Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends in Microbiology* 15, 363–371.
- Moller, I.M., Sweetlove, L.J., 2010. ROS signalling – specificity is required. *Trends in Plant Science* 15, 370–374.
- Mueller, L.A., Goodman, C.D., Silady, R.A., Walbot, V., 2000. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology* 123, 1561–1570.
- Nachin, L., Barras, F., 2000. External pH: an environmental signal that helps to rationalize pel gene duplication in *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 882–886.
- Nägele, B., 2010. Interaktion von N-Acyl-Homoserinlacton-produzierenden *Serratia liquefaciens* und Gerstenpflanzen. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Naik, G., 2008. Deep inside bacteria: a germ of human personality. *Wall Street Journal* September, A18.
- Nealson, K.H., Hastings, J.W., 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews* 43, 496–518.
- Nealson, K.H., Hastings, J.W., 2006. Quorum sensing on a global scale: massive numbers of bioluminescent bacteria make milky seas. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2295–2297.

- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology* 104, 313–322.
- Nelson, D., Werck-Reichhart, D., 2011. A P450-centric view of plant evolution. *The Plant Journal* 66, 194–211.
- Neustifter, J.E., 2007. Phytoremediation organischer Schadstoffe mit Hilfe von *Phragmites australis*. Dissertation. Technische Universität München.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 249–279.
- Olry, A., Schneider-Belhaddad, F., Heintz, D., Werck-Reichhart, D., 2007. A medium-throughput screening assay to determine catalytic activities of oxygen-consuming enzymes: a new tool for functional characterization of cytochrome P450 and other oxygenases. *The Plant Journal* 51, 331–340.
- Orabi, J., Backes, G., Wolday, A., Yahyaoui, A., Jahoor, A., 2007. The horn of africa as a centre of barley diversification and a potential domestication site. *Theoretical and Applied Genetics*. 114, 1117–1127.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J., 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* 4, 701–712.
- Ortíz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M., López-Bucio, J., 2008. *N*-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 31, 1497–1509.
- Palma, J.M., Jiménez, A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Lundqvist, M., Gómez, M., Sevilla, F., del Rio, L.A., 2006. Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants. *Journal of Experimental Botany* 57, 1747–1758.
- Pascal, S., Debrauwer, L., Ferte, M.P., Anglade, P., Rouimi, P., Scalla, R., 1998. Analysis and characterization of glutathione S-transferase subunits from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 134, 217 – 226.
- 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.

- Persans, M.W., Wang, J., Schuler, M.a., 2001. Characterization of maize cytochrome P450 monooxygenases induced in response to safeners and bacterial pathogens. *Plant Physiology* 125, 1126–1138.
- Pflüger, E.F.W., 1875. Ueber die Phosphorescenz verwesender Organismen. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 11, 222–263.
- Pflugmacher, S., Sandermann, H.J., 1998. Cytochrome P450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae. *Plant Physiology* 117, 123–128.
- Pflugmacher, S., Schröder, P., Sandermann, H., 2000. Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 54, 267–273.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5, 308–316.
- Pitman, M.G., 1971. Uptake and transport of ions in barley seedlings. *Australian Journal of Biological Sciences* 24, 407–421.
- 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.
- Polle, A., Krings, B., Rennenberg, H., 1989. Superoxide dismutase activity in needles of norwegian spruce trees (*Picea abies* L.). *Plant Physiology* 90, 1310–1315.
- Qureshi, M.I., Qadir, S., Zolla, L., 2007. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology* 164, 1239–1260.
- von Rad, U., Klein, I., Dobrev, P.I., Kottova, J., Zazimalova, E., Fekete, A., Hartmann, A., Schmitt-Kopplin, P., Durner, J., 2008. Response of *Arabidopsis thaliana* to *N*-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* 229, 73–85.
- Rasmussen, T.B., Manefield, M., Andersen, J.B., 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 Pt 12, 3237–3244.
- Redfield, R.J., 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in Microbiology* 10, 365–370.

- Rees, J.F., de Wergifosse, B., Noiset, O., Dubuisson, M., Janssens, B., Thompson, E.M., 1998. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools. *The Journal of Experimental Biology* 201, 1211–1221.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodríguez-Serrano, M., Gómez, M., del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2007. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology* 164, 1346–1377.
- Rothballe, M.H., 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. Dissertation. Ludwig-Maximilian-Universität München.
- Ruby, E.G., Morin, J.G., 1979. Luminous enteric bacteria of marine fishes: a study of their distribution, densities, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 406–411.
- Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Hamood, A.N., 2000. The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 2, 1721–1731.
- Sagi, M., Fluhr, R., 2006. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* 141, 336–340.
- Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Touati, D., Puppo, A., 2001. Oxidative burst in alfalfa - *Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 86–89.
- Sappl, P.G., Carroll, A.J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A., Singh, K.B., 2009. The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *The Plant Journal* 58, 53–68.
- 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, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101, 7–12.
- Schaefer, A.L., Greenberg, E.P., Oliver, C.M., Oda, Y., Huang, J.J., Bittan-Banin, G., Peres, C.M., Schmidt, S., Juhaszova, K., Sufrin, J.R., Harwood, C.S., 2008. A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* 454, 595–599.

- Schikora, A., Carreri, A., Charpentier, E., Hirt, H., Schenk, S.T., Stein, E., Molitor, A., Zuccaro, A., Kogel, K.H., 2011. *N*-acyl-homoserine lactone confers resistance towards biotrophic and hemibiotrophic pathogens via altered activation of AtMPK6. *Plant Physiology* 157, 1407–1418.
- Schröder, P., 1996. Entgiftung elektrophiler Xenobiotika durch Konjugation mit Glutathion und Metabolismus der Glutathionkonjugate. Habilitationsschrift. Technische Universität, München.
- Schröder, P., Juuti, S., Roy, S., Sandermann, H., Sutinen, S., 1997. Exposure to chlorinated acetic acids: responses of peroxidase and glutathione S-transferase activity in pine needles. *Environmental Science and Pollution Research* 4, 163 – 171.
- Schröder, P., Stampfl, A., 1999. Visualization of glutathione conjugation and inducibility of glutathione-S-transferases in onion (*Allium cepa* L.) epidermal tissue. *Zeitschrift für Naturforschung* 54c, 1033–1041.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., Hutzler, P., Schmid, M., Van Breusegem, F., Eberl, L., Hartmann, A., Langebartels, C., 2006. Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell and Environment* 29, 909–918.
- Schulte, D., Close, T.J., Graner, A., Langridge, P., Matsumoto, T., Muehlbauer, G., Sato, K., Schulman, A.H., Waugh, R., Wise, R.P., Stein, N., 2009. The international barley sequencing consortium – at the threshold of efficient access to the barley genome. *Plant Physiology* 149, 142–147.
- 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, E.K., Terentyev, D., Bryan, A., Sennoune, S., Martinez-Zaguilan, R., Li, G., Gyorke, S., Williams, S.C., Rumbaugh, K.P., 2006. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer modulates host cell responses through calcium signalling. *Cellular Microbiology* 8, 1601–1610.
- Slesak, I., Slesak, H., Libik, M., Miszalski, Z., 2008. Antioxidant response system in the short-term post-wounding effect in *Mesembryanthemum crystallinum* leaves. *Journal of Plant Physiology* 165, 127–137.
- Smith, A.P., Nourizadeh, S.D., Peer, W.A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A.S., Goldsbrough, P.B., 2003. Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and

- encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *The Plant Journal* 36, 433–442.
- Smith, E.F., 1911. *Bacteria in Relation to Plant Diseases*. vol. 2. Technical Report. Carnegie Institution Report. Washington DC: Carnegie Institution.
- Song, S., Jia, Z., Xu, J., Zhang, Z., Bian, Z., 2011. *N*-butyryl-homoserine lactone, a bacterial quorum-sensing signaling molecule, induces intracellular calcium elevation in *Arabidopsis* root cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414, 355–360.
- Spadaro, D., Yun, B.W., Spoel, S.H., Chu, C., Wang, Y.Q., Loake, G.J., 2010. The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiologia Plantarum* 138, 360–371.
- 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, 5761–5770.
- Steppuhn, A., Gase, K., Krock, B., Halitschke, R., Baldwin, I.T., 2004. Nicotine's defensive function in nature. *PLoS Biology* 2, 1074–1080.
- Stevens, A.M., Queneau, Y., Soulère, L., Beck von Bodman, S., Doutheau, A., 2011. Mechanisms and synthetic modulators of AHL-dependent gene regulation. *Chemical Reviews* 111, 4–27.
- Surette, M.G., Miller, M.B., Bassler, B.L., 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1639–1644.
- Taga, M.E., Bassler, B.L., 2003. Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14549–14554.
- Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J.C., Standiford, T.J., Ishiguro, M., Yamaguchi, K., 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer *N*-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infection Immunology* 71, 5785–5793.
- Teixeira, F.K., 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 García, N.A., 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.
- Teplitski, M., Mathesius, U., Rumbaugh, K.P., 2011. Perception and degradation of *N*-acyl homoserine lactone quorum sensing signals by mammalian and plant cells. *Chemical Reviews* 111, 100–116.
- Teplitski, M., Robinson, J.B., Bauer, W.D., 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 637–648.
- 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, M.J., 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* 45, 822–833.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W., Foyer, C.H., 1998. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology* 117, 1103–1114.
- Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentéjac, M., Alain, P., 2006. Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 429–440.
- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65, 249–259.
- Verhage, A., van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., 2010. Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiology* 154, 536–540.
- Verma, S., Dubey, R.S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164, 645–655.
- Verne, J., 1990. 20.000 Meilen unter dem Meer. Verlag neues Leben, Berlin.
- Visick, K.L., Ruby, E.G., 2006. *Vibrio fischeri* and its host: it takes two to tango. *Current Opinion in Microbiology* 9, 632–638.

- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 319–346.
- Wheeler, G.L., Tait, K., Taylor, A., Brownlee, C., Joint, I., 2006. Acyl-homoserine lactones modulate the settlement rate of zoospores of the marine alga *Ulva intestinalis* via a novel chemokinetic mechanism. *Plant, Cell and Environment* 29, 608–618.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., Salmond, G.P.C., 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 365–404.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Perspective Prokaryotes : The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6578–6583.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal* 16, 4806–4816.
- Williams, P., 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153, 3923–3938.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., Cámara, M., 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362, 1119–1134.
- Xu, F., Byun, T., Deussen, H.J., Duke, K.R., Dussen, H.J., 2003. Degradation of ₂N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *Journal of Biotechnology* 101, 89–96.
- Young, R.E., Roper, C.F., 1976. Bioluminescent countershading in midwater animals: evidence from living squid. *Science* 191, 1046–1048.
- Zheng, H., Zhong, Z., Lai, X., Chen, W.x., Li, S., Zhu, J., 2006. A LuxR / LuxI-Type quorum-sensing system in a plant bacterium *Mesorhizobium tianshanense* controls symbiotic nodulation. *Journal of Bacteriology* 188, 1943–1949.
- Zhu, J., Winans, S.C., 1999. Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4832–4837.
- Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 723–735.

Zipfel, C., Robatzek, S., 2010. Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni, vidi...? *Plant Physiology* 154, 551–554.

6 Anhang

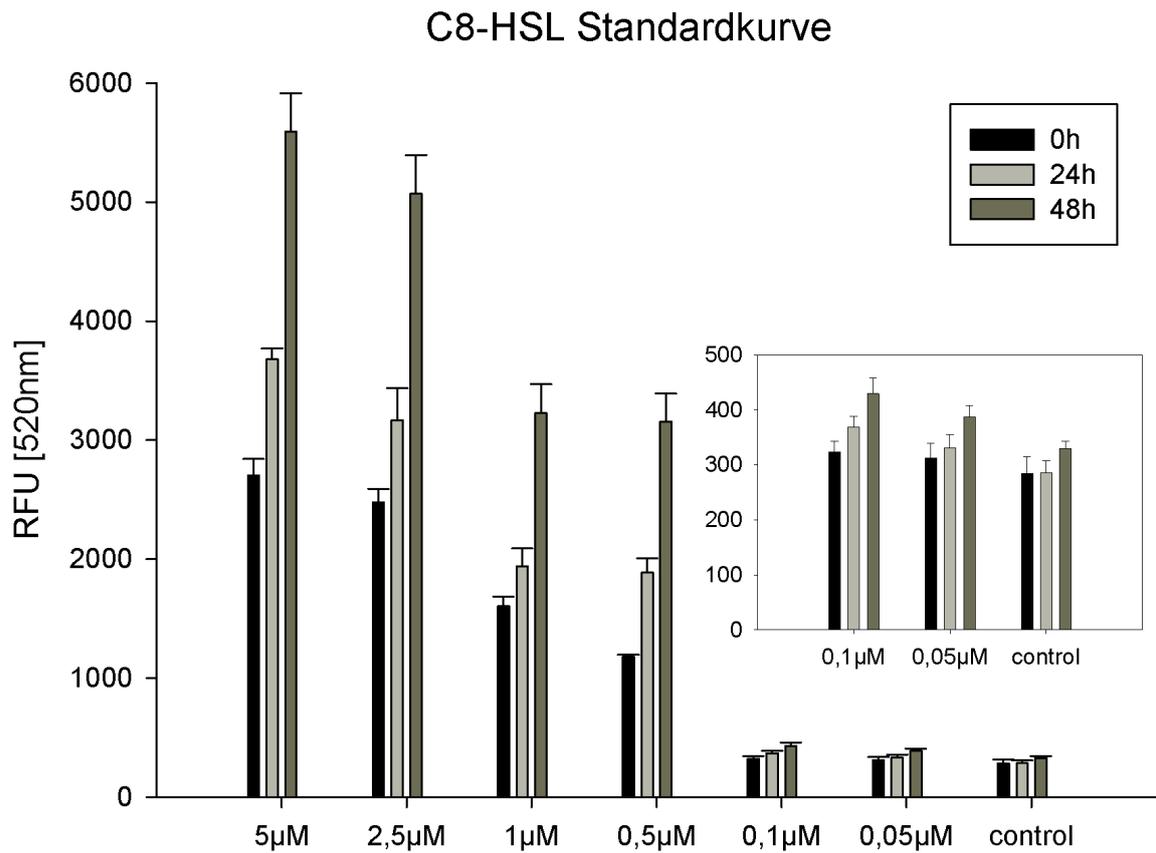


Abbildung 6.1 – Standardkurve von C8-HSL mit dem Sensorstamm *S. liquefaciens* MG44 im Vergleich direkt nach dem Versuch, nach 24 h und nach 48 h Inkubation bei Raumtemperatur.

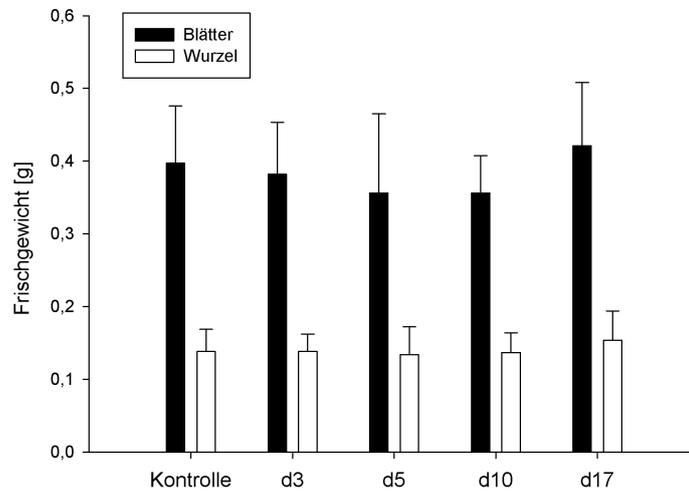


Abbildung 6.2 – Frischgewicht von Gerstenpflanzen unterteilt in Blätter und Wurzeln nach Langzeitinkubation mit C6-HSL.

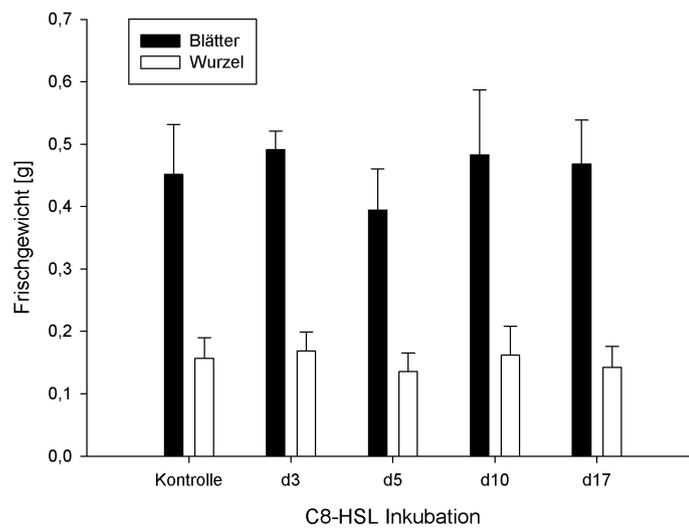


Abbildung 6.3 – Frischgewicht von Gerstenpflanzen unterteilt in Blätter und Wurzeln nach Langzeitinkubation mit C8-HSL.

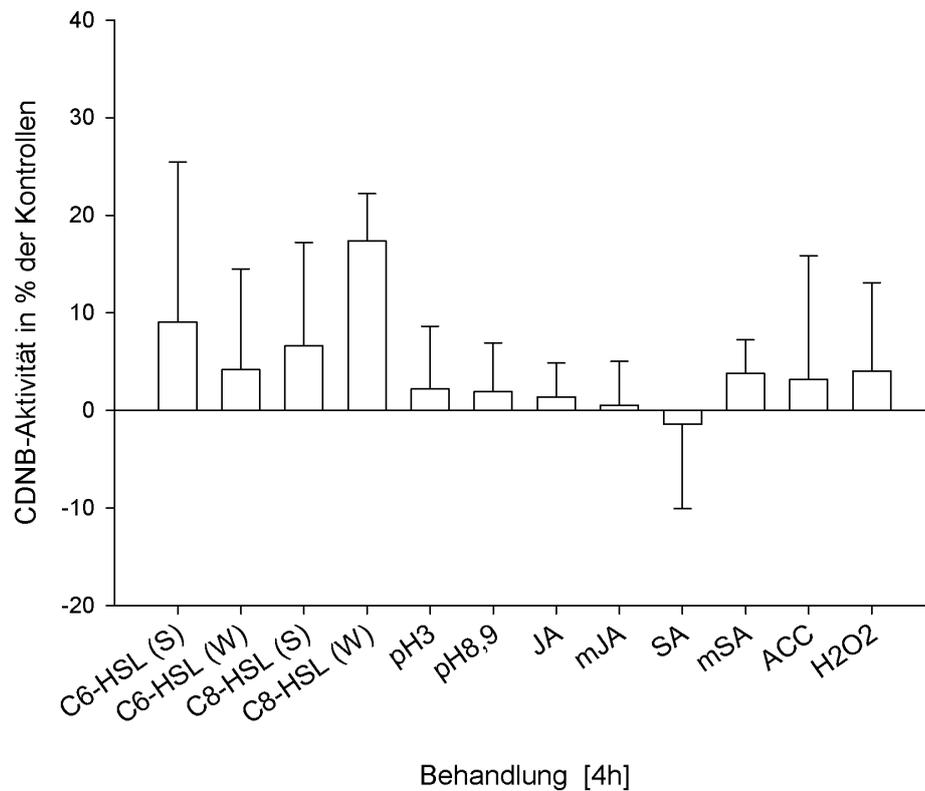


Abbildung 6.4 – CDNB-Aktivität der Blätter 4 h nach Applikation von C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen \pm SE gebildet.

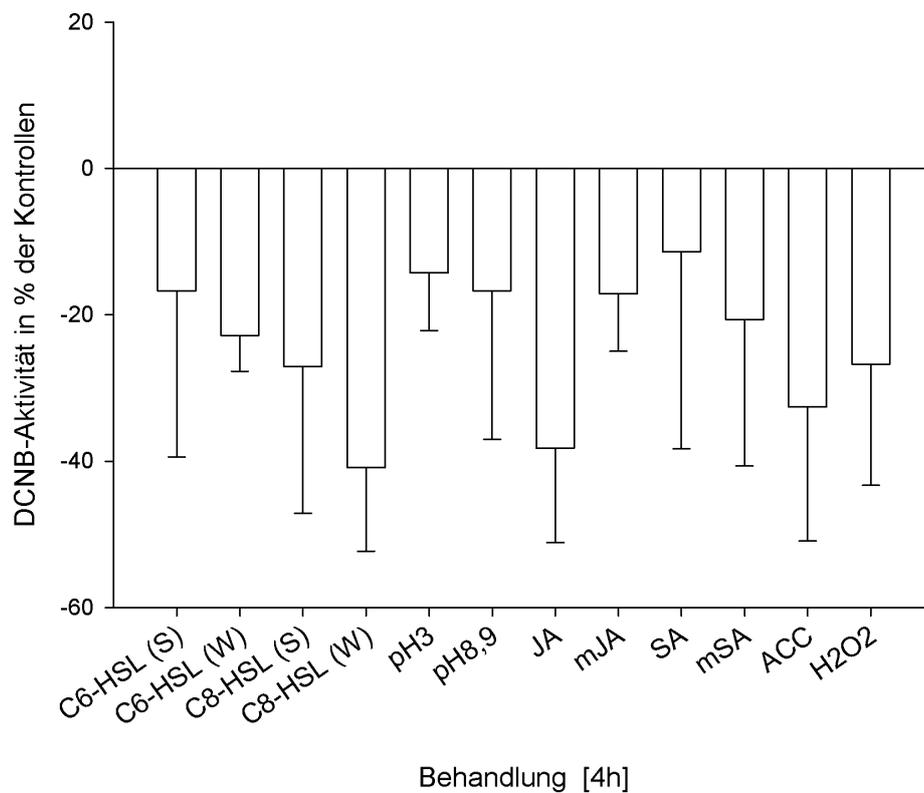


Abbildung 6.5 – DCNB-Aktivität der Blätter 4 h nach Applikation von C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen \pm SE gebildet.

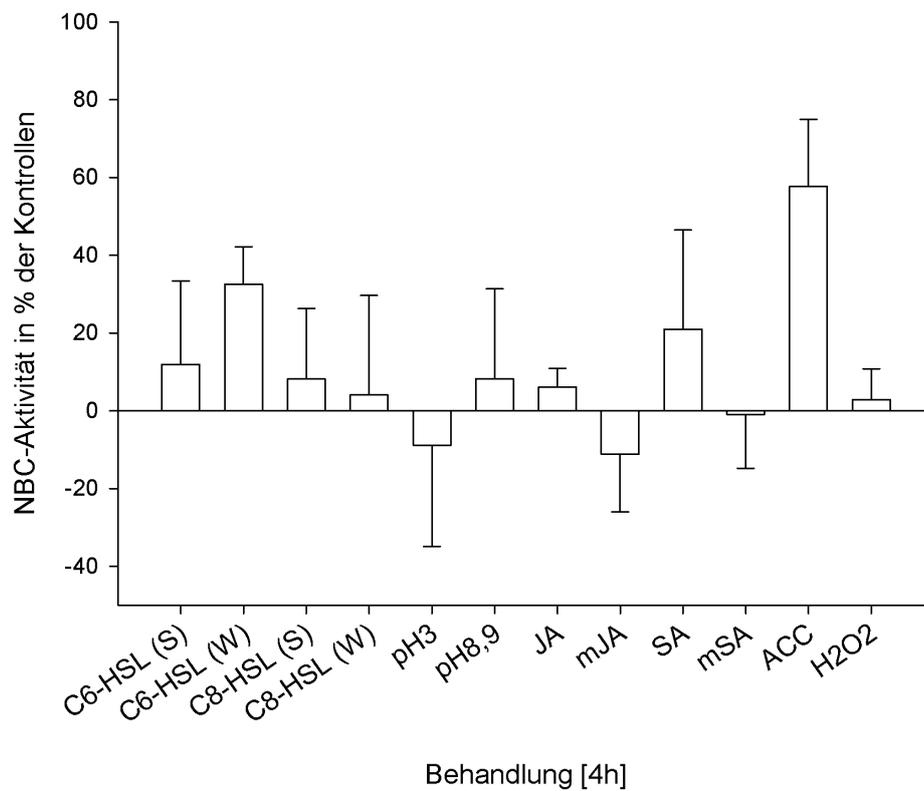


Abbildung 6.6 – NBC-Aktivität der Blätter 4 h nach Applikation von C6- bzw. C8-HSL und verschiedenen anderen Substanzen. Zusätzlich zur Applikation der AHLs am Halm (S) ist die Aktivität in den Blättern nach AHL-Applikation an den Wurzeln (W) dargestellt. Pro Behandlung wurde der Mittelwert aus 15 Pflanzen \pm SE gebildet.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken:

Prof. Peter Schröder dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Thema zu arbeiten. Außerdem dafür, dass er stets ein offenes Ohr hat, für die vielen interessanten Diskussionen (auch außerhalb der Wissenschaft) und für die stetigen Ermutigungen an internationalen Konferenzen teilzunehmen und seine Geduld.

Prof. Wolfgang Oßwald für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Prof. Anton Hartmann für die anregenden Diskussionen und dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, nach Ende der Promotion in seiner Arbeitsgruppe weiter zu arbeiten.

Dem gesamten Schröder-Clan für die sehr herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Ihr habt es mir sehr leicht gemacht, mich hier wohl zu fühlen! Vielen Dank auch für die stets schnelle und freundliche Hilfe bei allen Fragen und für die tolle Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bedanken bei: Rudi Harpaintner, Bernadett Bartha, Dr. Christian Huber, Dr. Mohammadali Khalvati, Corinna Wilfinger und Dr. Christine Götz.

Ganz besonderer Dank geht an Dr. Lyudmila Lyubenova und Maximilian Krönauer, weil ihr zwei super Büro-Kollegen seid. (Und Max: vielen Dank für die Bilder!)

Außerdem denen, die kamen und gingen und halfen: Felix Neubauer, Michaela Saur, Veronica Protivova, Christoph Zott und Isabel Hinsenkamp.

Der AG Schmid/Hartmann dafür, dass ich so nett in euren Laboren aufgenommen wurde und für die Beantwortung aller Fragen bezüglich der Sensorstämme. Besonderer bedanke ich mich bei Dr. Michael Schmid (auch für die Hilfe bei sämtlichen Computer-Problemen), Dr. Michael Rothballe für die kompetente Beratung, Angelo Weiss, Kerstin Hochwind und Matthias Zeiller für die schöne Zeit. Dr. Katharina Buddrus-Schiemann für die tollen Gespräche und für ihr offenes Ohr.

Und ganz besonders bei Dr. Doreen Fischer und Andreas Hofmann, einfach wegen allem (ihr wisst schon, was ich meine).

Der AG Krämer für die Aufnahme im ELISA-Labor. Dr. Xiao Chen und Ana-Lilia Novak für die Hilfe beim Erlernen des ELISAs. Ein besonderer Dank geht an Dr. Petra Krämer - ich habe so viel gelernt während der kurzen Zusammenarbeit und bin mir sicher, ich hätte noch viel mehr lernen können.

Dr. Miroslav Matucha, Dr. Sandor Forzcek und allen weiteren Mitarbeitern am UEB in Prag. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Brit Matucha für die leckeren Kuchen und die tolle Stadtführung.

Den fleißigen Korrekturlesern, die auf humorvolle Art versucht haben, mir die deutsche Rechtschreibung näher zu bringen (Ja Doreen, ich meine dich!).

Dem „Schwimmteam“: Doreen, Angie und Linda, sowie der morgendlichen Kaffeerunde: Max, Rudi und Corinna, weil so auch für Entspannung gesorgt war.

Meiner Familie, die mich bei Allem stets unterstützt hat.

Marcus - ohne dich hätte ich das nicht so gut geschafft. Danke, dass du immer für mich da bist!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Tina Sieper (geb. Riedel)
Geboren am 22.06.1982 in Gera

Promotion

11/2007 - 01/2012 Promotion an der Technischen Hochschule München (TUM)
an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Durchgeführt am Helmholtz Zentrum München in Neuherberg,
Abteilung Mikrogen Pflanzen Interaktionen unter der Leitung von
Prof. Dr. Schröder, Arbeitsgruppe Ökophysiologie der Wurzel

Studium

2007 **Abschluss: Diplom Biologin (Note 1,3)**

2001 - 2007 Studium der Biologie an der Friedrich Schiller Universität Jena
Hauptfach: Botanik
Nebenfächer: Mikrobiologie und Genetik
Diplomarbeit: „Exploring the interaction of *Nicotiana attenuata*
with *Glomus intraradices*“, betreut durch Dr. Karin Groten
und Prof. Ian Baldwin am Max Planck Institut
für Chemische Ökologie (MPI-CE) Jena

Schulbildung

2001 **Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,4)**

1993 - 2001 Albert-Schweizer Gymnasium Gera, Abitur

1991 - 1993 Staatliche Grundschule 7 Gera

1989 - 1991 28. Polytechnische Oberschule Fritz Gäßler Gera