

**Untersuchungen zur Rolle von
reaktiven Sauerstoffspezies
bei Ozon-induziertem Zelltod in Pflanzen**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Heike Wohlgemuth
aus
Pforzheim/Baden-Württemberg
28.03.2002

Teile der vorliegenden Arbeit sind publiziert:

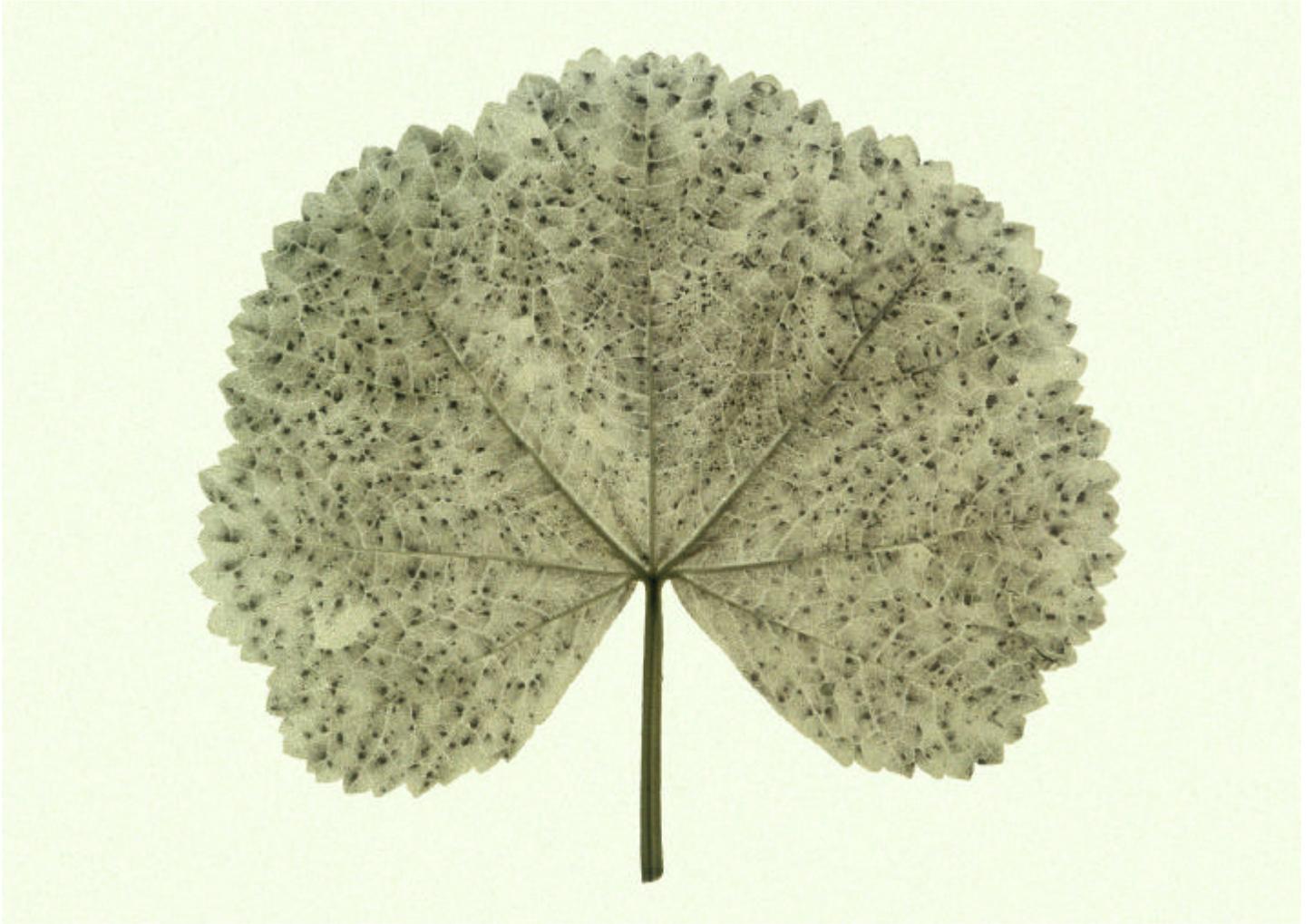
Wohlgemuth, H., Mittelstraß, K., Kschieschan, S., Bender, J., Weigel, H.-J., Overmyer, K., Kangasjärvi, J., Sandermann, H. and Langebartels, C. (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environ.* 25, in press.

Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschan, S., Grün, S., Sandermann, H. (2002) Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol. and Biochem.*, in press.

Die Dissertation wurde am 28.03.2002 bei der
Ludwig-Maximilians-Universität München eingereicht.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Sandermann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Ebel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2002



Blatteiner Malve (*Malva sylvestris* L.) nach Ozon-Exposition und anschließendem Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Ozon.....	1
1.1.	Eigenschaften und Vorkommen des Gases	1
1.2.	Ozon als Schadgas bei Pflanzen.....	2
1.3.	Aufnahme und Reaktionen von Ozon in Blättern.....	2
2.	Reaktive Sauerstoffspezies	5
2.1.	Entstehung und Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies	5
2.2.	Ozon-induzierter oxidativer Stress.....	8
2.3.	Enzymatische Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beim „oxidativen Burst“.....	10
2.4.	Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies als Signalmoleküle und bei pflanzlichem Zelltod	15
3.	Weitere Signalmoleküle bei der Induktion pflanzlicher Abwehr und bei programmiertem Zelltod.....	18
3.1.	Salicylsäure	18
3.2.	Ethylen.....	21
3.3.	Jasmonsäure	23
3.4.	Stickstoffmonoxid	24
4.	Themenstellung	26
II.	Material und Methoden	27
1.	Geräte	27
2.	Chemikalien.....	28
2.1.	Feinchemikalien und Enzyme	28
2.2.	Molekularbiologische Reagenzien.....	28
3.	Pflanzenmaterial	29
3.1.	Art und Herkunft des Pflanzenmaterials	29
3.2.	Anzuchtbedingungen	30
3.3.	Ernte	32
4.	Ozonbehandlung	32
4.1.	Ozonbehandlung in den Expositions-küvetten.....	32
4.2.	Ozonexposition im Freiland	34
4.2.1	Tabak.....	34
4.2.2	Exposition der Pflanzen in Open-top Kammern.....	34
5.	Messung der stomatären Leitfähigkeit	36
6.	Messung von Parametern der Ethylenbiosynthese.....	37
6.1.	Bestimmung der Ethylenemission	37
6.2.	Bestimmung des Gehalts an 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure.....	38
7.	Gewinnung von Apoplasten-Flüssigkeit aus Tabakblättern.....	39
8.	Nachweis phenolischer Inhaltsstoffe in der Apoplasten-Flüssigkeit von Tabakblättern als Hinweis auf cytosolische Verunreinigung	40
9.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
9.1.	Aufkonzentrierung von Probenextrakten.....	43
9.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	43
9.3.	Auftrennung von Proteinextrakten mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
9.3.1	SDS-Gelelektrophorese.....	43
9.3.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
10.	Aktivitätsbestimmung von Oxalatoxidase.....	45

11.	Aktivitätsbestimmung von Superoxiddismutase.....	46
12.	Bestimmung der Gehalte an Salicylsäure	47
13.	Histochemische Detektion von reaktiven Sauerstoffverbindungen	49
13.1.	Detektion von Wasserstoffperoxid mittels Diaminobenzidin-Färbung	49
13.2.	Detektion von Superoxidanion-Radikalen mit Hilfe des Farbstoffs Nitroblautetrazolium	50
14.	Histochemischer Nachweis von β-Glucuronidase Aktivität.....	50
15.	Infiltrationen verschiedener Substanzen in den Apoplasten.....	51
16.	Behandlung mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	52
17.	Bonitur der Blattschäden	52
18.	Mikroskopie	53
18.1.	Vergleichende Auszählung der Stomata bei Blättern von <i>M. sylvestris</i> und der Tabaksorte Bel W3.....	53
18.2.	Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie von Blattquerschnitten	54
18.3.	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	54
19.	Molekularbiologische Methoden	55
19.1.	Häufig verwendete Medien, Puffer-Systeme und Lösungen.....	55
19.2.	Sterilisation und RNase-Inhibition	56
19.3.	Primer.....	56
19.4.	Isolierung von Nukleinsäuren.....	56
19.4.1	Gesamt-RNA.....	56
19.4.1.1	Isolierung nach der TRIZOL-Methode	56
19.4.1.2	Isolierung nach der RNA-Rapid Extraktionsmethode	57
19.4.2	Genomische DNA.....	58
19.4.3	Plasmid DNA (QIAprep Spin)	58
19.5.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	58
19.6.	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in nicht-denaturierenden Agarose-Gelen	59
19.7.	Northern Analyse	59
19.7.1	Herstellung von spezifischen, mit Digoxigenin-dUTP markierten Sonden.....	59
19.7.2	Elektrophoretische Auftrennung der RNA in denaturierenden Gelen.....	60
19.7.3	Northern Blotting	60
19.7.4	Hybridisierung der Transkripte	61
19.7.5	Detektion der Transkripte	61
19.8.	cDNA-Synthese	62
19.9.	Quantifizierung der cDNA.....	62
19.10.	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	63
19.10.1	Design der Primer	63
19.10.2	PCR-Amplifikation.....	63
19.10.3	Quantifizierung der PCR-Produkte	66
19.11.	Elution von DNA aus Agarose Gelen.....	66
19.12.	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten	66
19.12.1	Ligation.....	66
19.12.2	Transformation.....	67
19.12.3	Sequenz-Analysen.....	67
20.	Statistik	67
III. Ergebnisse		68
1.	Vergleichende Untersuchungen zur Ozonempfindlichkeit der Tabaksorten Bel B und Bel W3	68
1.1.	Charakterisierung der Blattschäden.....	68

1.2.	Vergleich der Entstehung von Blattschäden mit der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies	70
1.3.	Ozonexposition von Tabakpflanzen der Sorte Bel W3 im Freiland	81
1.4.	Ozonbehandlung in Kammerversuchen über mehrere Tage hinweg.....	83
1.5.	Abhängigkeit der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies vom Abstand zur Ozonbehandlung	86
1.6.	Induktion verschiedener Signalmoleküle ausgelöst durch Ozonexposition	87
2.	Charakterisierung weiterer Nutz- und Wildpflanzen bezüglich ihrer Ozon-Empfindlichkeit	91
2.1.	Tomatenpflanzen (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	91
2.1.1	Ausbildung von Blattschäden und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies nach Ozonexposition.....	91
2.1.2	Bildung des Pflanzenhormons Ethylen bei Kontroll- und Ozon-behandelten Tomatenpflanzen.....	95
2.2.	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	96
2.2.1	Entstehung von Blattschäden und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies bei Kontroll- und Ozon-exponierten Pflanzen.....	97
2.2.2	Ozon-induzierte Emission von Ethylen bei verschiedenen <i>Arabidopsis</i> -Ökotypen.....	103
2.3.	Malve (<i>Malva sylvestris</i> L. und <i>M. moschata</i> L.)	105
2.3.1	Korrelation der Blattschäden mit der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies	105
2.3.2	Vergleich der Ozon-induzierten Emission von Ethylen zwischen <i>M. moschata</i> und <i>M. sylvestris</i>	109
2.3.3	Freilandversuche von <i>M. sylvestris</i> und zwei verschiedenen Ampferarten.....	111
2.3.3.1	Ozoninduzierte Blattschäden und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies	111
2.3.3.2	Induktion des Gehalts der Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure	113
2.4.	Mikroskopische Untersuchungen zur räumlichen und zeitlichen Verteilung der Akkumulation reaktiver Sauerstoffverbindungen bei Tabak und Malve.....	115
2.4.1	Malve	115
2.4.2	Tabak.....	117
2.5.	Hemmung des „oxidativen Bursts“ durch Inhibitoren verschiedener Enzyme ..	124
3.	Untersuchung möglicher am „oxidativen Burst“ beteiligter Enzyme in Tabak.....	127
3.1.	Potentielle Beteiligung einer Oxalatoxidase am Ozon-induzierten „oxidativen Burst“ in <i>Nicotiana tabacum</i> L.	127
3.1.1	Unterschiede im Proteinmuster der apoplastischen Flüssigkeit zwischen Pflanzen der Tabaksorten Bel B und Bel W3	128
3.1.2	Detektion von Oxalatoxidase-Aktivität im Apoplasten von Tabak.....	131
3.1.3	Suche nach den Genen für Germin-ähnliche Proteine in Tabak	135
3.2.	Beteiligung von NADPH-Oxidase homologen Enzymen und Superoxiddismutase an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Tabak.....	136
3.2.1	Identifikation und Charakterisierung von zwei Isoformen der NADPH-Oxidase in Tabak.....	136
3.2.2	Nachweis von Superoxiddismutase-Aktivität in der Apoplastenflüssigkeit von Tabak Bel B und Bel W3	142
3.2.3	Expressionsstudien der beiden putativen NADPH-Oxidase Isoformen in Tabak.....	144
3.2.3.1	Expression der Gene <i>Ntrboh D</i> und <i>F</i> in verschiedenen Geweben.....	144

3.2.3.2	Transkript-Analyse für <i>Ntrboh D</i> und <i>F</i> während und nach einer Ozon- behandlung	147
3.2.3.3	Induktion der Genexpression von <i>Ntrboh D</i> und <i>F</i> in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration.....	156
3.2.3.4	Einfluss einer Infektion der Tabaksorte Bel W3 mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> auf die Expression von <i>Ntrboh D</i> und <i>F</i>	158
3.2.3.5	Infiltration potentieller Induktoren der <i>Ntrboh D</i> und <i>F</i>	161

IV. Diskussion163

1.	Korrelation der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies mit Ozon- induziertem Zelltod.....	163
1.1.	Auftreten von Symptomen und reaktiven Sauerstoffspezies in Ozon-behandelten Nutz- und Wildpflanzen.....	163
1.2.	Zelluläre Lokalisation und Verlauf der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies.....	168
1.3.	Auftreten von Ozon-induzierten reaktiven Sauerstoffspezies und Zelltod im Freiland	170
1.4.	Zusammenhang von reaktiven Sauerstoffspezies und Zelltod.....	171
2.	Weitere Ozon-induzierte Signalmoleküle sowie Lokalisation verschiedener Stress-Antworten.....	173
2.1.	Ethylen.....	173
2.2.	Salicylsäure	175
2.3.	Stickstoffmonoxid	177
2.4.	Vernetzung der verschiedenen, zu oxidativem Zelltod- führenden Signalwege .	179
2.5.	Auftreten von Abwehrreaktionen und Signalmolekülen entlang der Blattadern	181
3.	Potentielle Enzyme des Ozon-induzierten „oxidativen Bursts“	182
3.1.	Oxalatoxidase.....	183
3.2.	NADPH-Oxidase	185
3.2.1	Isolierung und Sequenzvergleich mit putativen NADPH-Oxidasen	185
3.2.2	Expressionsanalysen der putativen NADPH-Oxidase Homologe <i>Ntrboh D</i> und <i>F</i> in Tabak.....	191

V. Zusammenfassung.....200

VI. Literaturverzeichnis203

VII. Anhang.....217

1.	Verwendete Primer.....	217
1.1.	Primer für Oxalatoxidase/Germin- ähnliche Proteine.....	217
1.2.	Primer für NADPH-Oxidase	217
2.	Sequenzen	219

Verwendete Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
ACO	ACC-Oxidase
ACS	ACC-Synthase
AOT40	Accumulated dose over a threshold of 40 nl ⁻¹
ATP	Adenosintriphosphat
AWF	Aoplastische Waschflüssigkeit
BSA	Rinderserumalbumin
Carboxy-PTIO	[2-(4-Carboxyphenyl)-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid]
cv.	Kultivar
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyliodonium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FG	Frischgewicht
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
GUS	Glucuronidase Reportergen
HR	Hypersensitive Reaktion (hypersensitive reaction)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
Konj. SA	Konjugierte Salicylsäure
MES	(2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)
NADPH	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid phosphat
NBT	Nitroblautetrazolium
PR	Pathogenesis-related
pv.	Pathovar
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.E.	Standardfehler
SA	Salicylsäure
SAR	Systemisch erworbene Resistenz (systemic acquired resistance)
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TMV	Tabakmosaik-Virus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronsäure

I. Einleitung

1. Ozon

1.1. Eigenschaften und Vorkommen des Gases

Ozon ist bei Raumtemperatur ein blaues Gas. Es zeichnet sich durch hohe Reaktivität aus, da es als eines der stärksten Oxidationsmittel besonders mit ungesättigten, organischen Verbindungen reagiert (Hoigné & Bader, 1983; Kley et al., 1999). In höheren Konzentrationen entwickelt es einen stechenden Geruch und wirkt beim Menschen hauptsächlich auf Schleimhäute reizend. Das Gas wurde 1839 durch Christian F. Schönbein bei der Elektrolyse von Wasser entdeckt und nach dem griechischen Wort „riechen“ benannt. Als Einheit wird neben nl l^{-1} noch $\mu\text{g m}^{-3}$ verwendet. Bei 20°C und 1013 mbar entspricht $1 \text{ nl l}^{-1} = \text{etwa } 2 \mu\text{g m}^{-3}$ (Stockwell et al., 1997).

Ozon kommt natürlich in unserer Atmosphäre vor. Hier spielt es eine ambivalente Rolle. In der Stratosphäre schützt es die Erde vor schädlicher UV-Strahlung, in der Troposphäre wirkt es als Schadgas. Seit Beginn der Industrialisierung stieg hier die Konzentration von 5-15 nl l^{-1} (Dollard et al., 1995) auf 40-60 nl l^{-1} (Enquete Kommission "Schutz der Erdatmosphäre" des deutschen Bundestages, 1995). Als Spitzenwerte können kurzzeitig bis zu 250 nl l^{-1} z.B. in Gebieten des San Bernadino (USA) auftreten (Stockwell et al., 1997). Zum einen stammt das troposphärische Ozon aus der Stratosphäre, wobei hier jedoch der Austausch über die Tropopause in Durchschnitt langsam ist (Guderian, 1985). Zum anderen entsteht das erdnahe Gas in Verbindung mit der Verbrennung fossiler Energieträger, indem es täglich neu aus Stickstoffdioxid und Kohlenwasserstoffen unter Zufuhr von Lichtenergie gebildet wird (Kley et al., 1999).

Die Spitzenwerte für Ozon treten in den Mittagsstunden während der Sommermonate auf, da hier die Lichtintensität maximal ist. Neben zeitlichen Konzentrationsschwankungen können auch räumliche festgestellt werden. So entstehen zwar die anthropogen bedingten Vorläufersubstanzen in den Ballungszentren, die höchsten Ozonkonzentrationen werden jedoch meist in ländlichen „Reinluftgebieten“ gemessen (Guderian, 1985; Sandermann et al., 1997). Zum einen kann Ozon über weite Strecken verfrachtet werden. Zum anderen fungieren in Städten durch Kraftfahrzeugverkehr emittiertes Stickstoffmonoxid und ungesättigte

Kohlenwasserstoffe als „Ozonfänger“. NO reagiert dabei mit Ozon zu NO₂ und O₂ (Sandermann et al., 1997).

1.2. Ozon als Schadgas bei Pflanzen

1944 ergaben erste Beobachtungen, dass photochemischer „Smog“ Pflanzen schädigen kann. In den 50er Jahren wurde spezifisch Ozon als Luftschadstoff für Pflanzen entdeckt und zwar an Wein (Richards et al., 1958), Kiefern (Miller et al., 1963) und an Tabak im Osten der USA (Connecticut, Maryland, Florida) (Heggestad & Middleton, 1959). Seit 1959 konnte das Auftreten von sogenannten „Wetterflecken“ auf Tabakblättern mit erhöhten Ozonwerten korreliert werden (Heggestad & Middleton, 1959). Diese „Wetterflecken“ sind seit Beginn der 20er Jahre an Tabak bekannt (Langebartels & Sandermann, 1999) und wurden ab etwa 1951 ein Problem für Tabakzüchter. So führten diese Symptome zu starken Wertverlusten der Ernten. Nachdem sie ab 1955 das größte Krankheitsproblem von Tabak in Connecticut Valley darstellten, wurden Forschungsprojekte zur Bestimmung der Ursachen des Auftretens der „Wetterflecken“ und zur Zucht toleranter Tabakkultivare initiiert (Heggestad & Middleton, 1959). In Tabak-Züchtungsstudien, durchgeführt in Beltsville, Maryland, wurden Standardkultivare mit neuen Züchtungslinien verglichen und dabei u.a. festgestellt, dass Ozon-Sensitivität ein erbliches Pflanzenmerkmal darstellt (Heggestad, 1991). 1959 wurden in einem Züchtungsprogramm in einer Reihe von 20 Tabakpflanzen ein bis zwei Individuen mit deutlich größeren „Wetterflecken“ entdeckt (Heggestad, 1991). Diese zeigten sich als äußerst Ozon-empfindlich und bildeten die Ausgangspflanzen der Tabaksorte Bel W3. Die eng verwandte Sorte Bel B wurde als Ozon-tolerant aus einer nahe verwandten Züchtungslinie ausgesucht. Seit dieser Zeit findet die Tabaksorte Bel W3 als Bioindikator für phytotoxische Ozonkonzentrationen weltweit Verwendung (Heggestad, 1991).

1.3. Aufnahme und Reaktionen von Ozon in Blättern

Nachdem die Cuticula relativ Ozon-impermeabel ist, erfolgt die Aufnahme des Schadgases fast ausschließlich über die Stomata der Blätter während des Gasaustausches (Abb. 1).

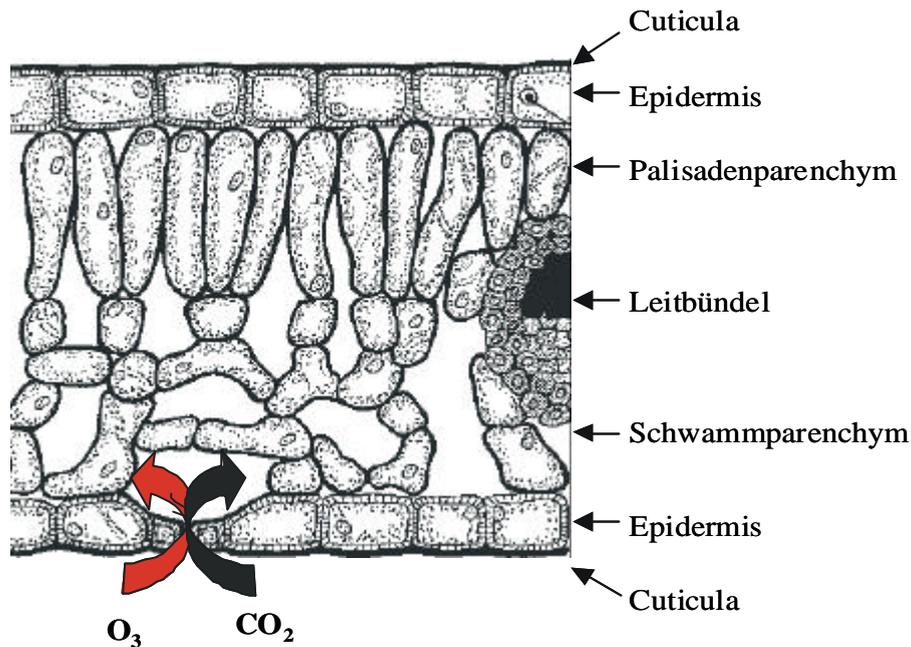


Abb. 1: Schematischer Querschnitt durch ein Blatt. Neben den einzelnen Zellschichten ist die Aufnahme des Schadgases Ozon und von CO_2 dargestellt.

Ozon führt häufig zu einer Verringerung der stomatären Leitfähigkeit durch Schließen der Spaltöffnungen (Lyons et al., 1999). Eine Verringerung des Öffnungszustandes der Stomata führt konsequenterweise zu einer verminderten Aufnahme von CO_2 und Photosyntheserate und dadurch zu geringerem Wachstum. Durch die Reaktivität von Ozon und seiner Transformationsprodukte im Apoplasten der Mesophyllzellen (Abb. 1) werden hauptsächlich Zellmembranen geschädigt. Im Extremfall führt dieses z.B. bei der Tabaksorte Bel W3 zur Entwicklung von sichtbaren Blattschäden. Zunächst zeichnen sich in dieser Tabaksorte entstehende Blattschäden als sogenannte „water-soaked areas“ ab, später entwickeln sie sich zu weißen, pergamentartigen Stellen. Im Aussehen erinnern diese Blattschäden damit stark an eine hypersensitive Antwort bei einer inkompatiblen Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen. Hier werden Pathogene durch Pflanzen abgewehrt, indem infizierte Pflanzenzellen durch ein spezifisch aktiviertes Zelltodprogramm absterben (Beers & McDowell, 2001; Shirasu & Schulze-Lefert, 2000).

Man schätzt, dass in Europa und den USA etwa 5-15 % der Ernteverluste durch Ozon ausgelöst werden (Manning & von Tiedemann, 1995), bei empfindlichen Sorten sogar 10 - 30 % (Dierkesmann & Sandermann, 2000). Allerdings wurden die meisten Studien in sogenannten Open-top Kammern unter optimaler Bewässerung der Pflanzen und bei konstanter Windgeschwindigkeit durchgeführt (Langebartels & Sandermann, 1999). Diese Umweltbedingungen resultieren in einer verstärkten Ozonaufnahme der Blätter durch weit

geöffnete Stomata. Tatsächlich gehen in der Natur erhöhte Ozonkonzentrationen meist einher mit geringer Wasserversorgung, hohen Temperaturen und niedrigen Windgeschwindigkeiten, so dass aufgrund der geschlossenen Spaltöffnungen nur geringe Mengen des Schadgases ins Blattinnere gelangen. Unter Berücksichtigung solcher Faktoren konnten Krupa et al. (1994) nur in 7 von 73 Studien tatsächlich Ernteeinbußen aufgrund ambienter Ozonkonzentrationen feststellen.

Im Zuge von Bemühungen um Luft-Qualitätsstandards ist die UN-ECE (United Nations Economic Commission for Europe) seit 1988 bestrebt, kritische Level für Ozon zu definieren. Ziel ist es, jene Konzentrationen in der Atmosphäre zu bestimmen, oberhalb derer nachteilige Effekte an Kultur- und Wildpflanzen auftreten (Kärenlampi & Skärby, 1996). Aus Untersuchungen wurde jene Ozonbelastung innerhalb von drei Monaten definiert, bei der mit einem 10%igen Ernteverlust zu rechnen ist (Fuhrer & Achermann, 1994). Grenzwerte für die Ozonschädigung von Pflanzen werden dabei nicht mehr als Mittelwerte der Konzentrationen über einen ausgewählten Zeitraum ausgedrückt, sondern als kumulative Dosis. Hierbei wird die Summe der Stundenmittelwerte oberhalb von 40 nl l^{-1} aufaddiert (accumulated dose over a threshold of 40 nl l^{-1} , AOT40, Kärenlampi & Skärby, 1996). Mit dem AOT40-Wert sollen sowohl die akut schädigende Wirkung von einzelnen Spitzenkonzentrationen als auch die chronischen Wirkungen lang andauernder, leicht erhöhter Belastungen berücksichtigt werden. Für Kulturpflanzen wurde hauptsächlich auf Studien von Weizen basierend ein Wert von 3000 nl l^{-1} eingeführt. An dieser Pflanzenart wurden die umfassendsten Studien zur Abhängigkeit der Ernteerträge von den AOT40-Werten durchgeführt (Fuhrer & Achermann, 1994). Zusätzlich ist für eine Reihe weiterer Kultur-Pflanzen bekannt, dass sie Ozon-Schäden entwickeln, so u.a. für Kartoffel, Luzerne, Klee, Soja und Tomate (Fuhrer & Achermann, 1994).

Effekte auf Wildpflanzen sind im Vergleich zu Kulturpflanzen schwieriger zu quantifizieren (Lyons et al., 1999). Während Kulturpflanzen in der Regel nach einer Vegetationsperiode abgeerntet werden und die Ozon-Effekte auf die Ernteerträge festgestellt werden können, überdauern viele Wildpflanzen mehrere Vegetationsperioden. Aufgrund des Mangels an experimentellen Studien wurde der für die Kulturpflanzen hauptsächlich in Kurzzeitexperimenten bestimmte kritische Level für natürliche Vegetation übernommen (Davison & Barnes, 1998). Viele Wildpflanzen zeigen sich jedoch mindestens so empfindlich gegenüber Ozon wie Kulturpflanzen (Davison & Barnes, 1998). Ozon-induzierte Symptome sind hier in Form von Chlorosen und Nekrosen z.B. bei *Malva sylvestris* L., aber auch als unspezifische Blattverfärbungen wie Rotfärbung von Blättern der Gattung *Rumex* L. und als

verfrühte Seneszenz beschrieben (Bergmann et al., 1999). Zusätzlich ist bekannt, dass das Schadgas leichte Veränderungen in der genetischen Zusammensetzung von Wildpflanzen-Gemeinschaften bewirken kann, und es somit natürliche und gesteuerte Ökosysteme beeinflusst (Barnes et al., 1999). Die Möglichkeit für bestimmte Populationen, eine Ozon-Resistenz zu entwickeln, wurde klar von Whitfield et al. (1997) mit Pflanzen aus verschiedenen *Plantago major* L.-Populationen gezeigt. Allerdings gibt es im Moment noch keine Hinweise darauf, was die „Kosten“ einer gebildeten Resistenz sind. Ebenfalls sind die an der Entwicklung der Resistenz beteiligten Gene immer noch unbekannt, und man weiß nicht einmal, ob sich alle Pflanzen derselben Mechanismen bedienen (Barnes et al., 1999).

Die festgelegten AOT40-Werte werden in Europa und Nordamerika allerdings häufig überschritten (Kley et al., 1999; Stockwell et al., 1997). Viele Wildpflanzenarten zeigen zudem schon Schäden unterhalb dieses AOT40-Standards (Fuhrer & Achermann, 1999), so dass dringend weitere Untersuchungen benötigt werden. So reagieren z.B. *Cirsium arvense* L. und *Sonchus asper* L. schon auf akkumulierte Ozondosen von $<1500 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$ (AOT40) (Bergmann et al., 1999).

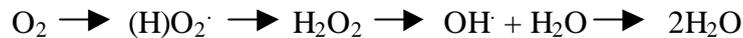
Nach der Aufnahme von Ozon durch die Stomata zerfällt es zu über 95 % bereits im Geweberaum außerhalb der Plasmamembran, dem Apoplasten (Dierkesmann & Sandermann, 2000). Bei dieser Reaktion entstehen u.a. reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 , O_2^- , OH^\cdot und $^1\text{O}_2$ (Heath & Taylor, 1997). Diese und Ozon selbst greifen Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren der Membranen an. Über Addition eines Ozon-Moleküls an die Doppelbindungen entstehen zunächst Criegee-Zwitterionen, die Addition eines Wassermoleküls an das Zwitterion wiederum resultiert in Carbonylverbindungen und Wasserstoffperoxid (Elstner, 1990). Schließlich kann es zur Zerstörung der Membranen kommen. Darüber hinaus werden zahlreiche funktionelle Gruppen von Proteinen wie Sulfhydryl-, Amino-, Alkohol- und Aldehyd-Gruppen oxidiert. Insbesondere die Oxidation freier SH-Gruppen führt zum Funktionsverlust einer Reihe von Enzymen (Hippeli & Elstner, 1996).

2. Reaktive Sauerstoffspezies

2.1. Entstehung und Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies

Pflanzen benötigen wie alle aeroben Organismen Sauerstoff (Dat et al., 2000). Die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser liefert die nötige Energie zur Aufrechterhaltung lebensnotwendiger

zellulärer Prozesse. Bei einer unvollständigen Reduktion entstehen jedoch reaktive Sauerstoffspezies, die viele biologische Moleküle wie DNA, Proteine und Lipide oxidieren können (Van Breusegem et al., 2001). Die Reduktion von molekularem Sauerstoff erfolgt in vier Schritten über eine Reihe verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (Hippeli et al., 1999):



Der erste Schritt dieser Reaktionskette benötigt Energiezufuhr (Wojtaszek, 1997), die weiteren Schritte sind exotherm und können spontan oder aber katalysiert ablaufen (Dat et al., 2000). Abb. 2 stellt eine Zusammenfassung möglicher Bildungs- und Reaktionswege von reaktiven Sauerstoffspezies dar.

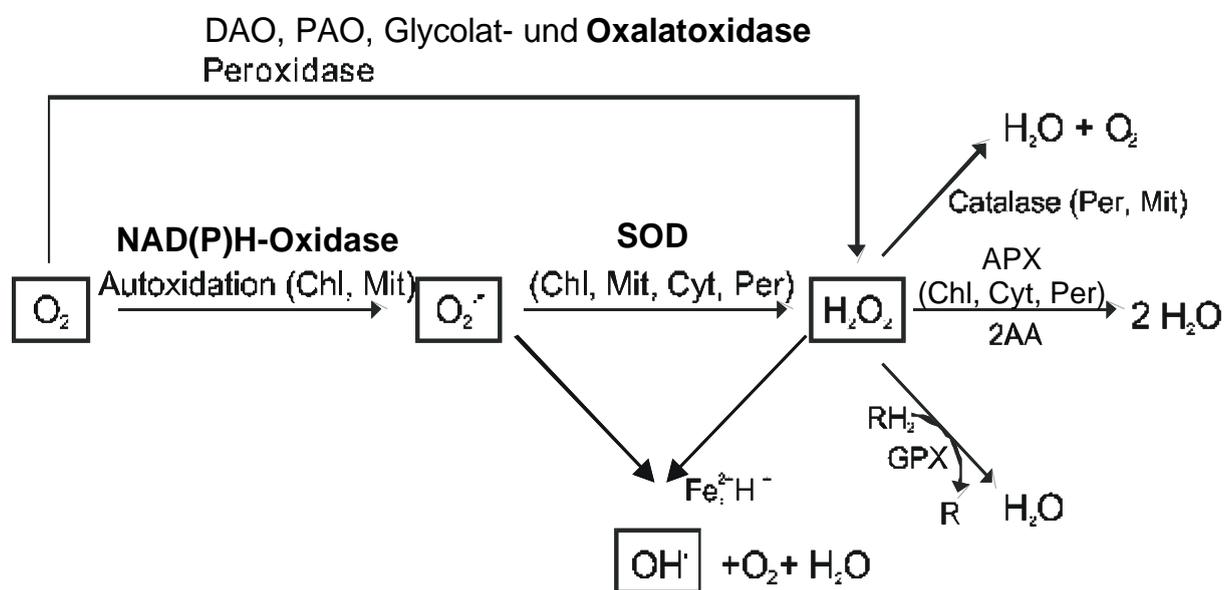


Abb. 2: Potentielle Bildungs- und Reaktionswege von reaktiven Sauerstoffspezies in Pflanzen. DAO = Diaminoxidase, PAO = Polyaminoxidase, APX = Ascorbat-Peroxidase, GPX = Glutathion-Peroxidase, Chl = Chloroplast, Mit = Mitochondrien, Cyt = Cytosol, Per = Peroxisomen.

HO_2^\cdot und $\text{O}_2^{\cdot-}$ sind sehr reaktiv, besitzen jedoch nur eine geringe Halbwertszeit (Kley et al., 1999; Van Breusegem et al., 2001). H_2O_2 entsteht aus $\text{O}_2^{\cdot-}$ über spontane Dismutation oder mittels Katalyse durch Superoxiddismutase (SOD; Abb. 2; Scandalios, 1993). Diese Verbindung ist deutlich stabiler mit einer Halbwertszeit von ca. 1 ms und kann durch Zellmembranen diffundieren (Wojtaszek, 1997). OH^\cdot zeichnet sich durch sehr hohe Reaktivität bei einer Halbwertszeit von weniger als 1 μs aus (Elstner, 1990). Das Hydroxylradikal kann in der sogenannten Haber-Weiss-Reaktion aus H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot-}$, aber auch über Reaktion von H_2O_2 mit Eisen oder Kupfer (Fenton-Reaktion) gebildet werden (Abb. 2;

Wojtaszek, 1997). Reaktive Sauerstoffspezies können zudem als Beiprodukte des mitochondrialen Elektronentransports, während der Photosynthese und bei der Photorespiration entstehen (Dat et al., 2000).

Im Normalfall sind Pflanzen gegen das Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies gewappnet. Sie besitzen verschiedene antioxidative Enzyme und Metabolite in unterschiedlichen Zellkompartimenten (Dat et al., 2000; Foyer et al., 1997; Langebartels et al., 2002).

Superoxiddismutasen sind Metall-haltige Enzyme, die $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 und O_2 dismutieren (Scandalios, 1993). Aufgrund des Metall-Cofaktors können drei SOD-Typen unterschieden werden: Kupfer und Zink-haltige (Cu/Zn), Mangan-haltige (Mn) sowie Eisen-haltige (Fe) Formen (Kliebenstein et al., 1998). Typischerweise kommen Cu/ZnSODs im Cytosol oder Plastiden, FeSODs im Chloroplasten und MnSODs in Mitochondrien vor (Abb. 2). Dabei zeigen sich Cu/Zn-Formen durch Cyanid hemmbar, FeSODs werden durch H_2O_2 irreversibel inaktiviert, während MnSODs von keinem der beiden Inhibitoren gehemmt werden (Scandalios, 1993). Die Existenz apoplastidärer Isoformen wurde u.a. von Vanacker et al. (1998) in Gerste nachgewiesen. In *Arabidopsis* gibt es mindestens sieben verschiedene Isoformen, die unterschiedlich reguliert werden (Kliebenstein et al., 1998).

Catalasen und Peroxidasen sorgen für den Abbau von H_2O_2 zu Wasser (Dat et al., 2000; Foyer et al., 1994). Catalasen sind Häm-haltige Enzyme, von denen es drei Hauptisoformen gibt, die in unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien vorkommen (Dat et al., 2000). Sie benötigen keinen Elektronen-Donor für die Disproportionierung von H_2O_2 . Während Catalasen hohe Umsatzraten aber eine geringe Affinität für H_2O_2 besitzen, haben Peroxidasen eine höhere Affinität zu dieser Sauerstoffverbindung, benötigen aber einen Elektronen-Donor (Asada, 1997). Im Gegensatz zu Catalasen, die hauptsächlich in Peroxisomen lokalisiert sind, können Peroxidasen in allen Zellkompartimenten gefunden werden (Asada, 1997). Bei Peroxidasen kann in Abhängigkeit des Elektronen-Donors zwischen Ascorbat- und Glutathion-Peroxidasen unterschieden werden. Glutathion-Peroxidasen scheinen dabei hauptsächlich für den Abbau von Lipid-Hydroperoxiden verantwortlich zu sein (Eshdat et al., 1997).

Als niedermolekulare Antioxidantien wirken **Ascorbat** und **Glutathion**, die über den Halliwell-Asada-Weg zusammenwirken und regeneriert werden (Lea et al., 1998; Sharma & Davis, 1997). Millimolare Konzentrationen von Ascorbat können in vielen pflanzlichen Geweben gefunden werden (Horemans et al., 1999). Im allgemeinen sind die Mengen in jungen Geweben höher als in alten. Die wichtige Rolle dieser niedermolekularen Verbindung als Reduktionsmittel von reaktiven Sauerstoffspezies konnte u.a. mit Hilfe verschiedener

Arabidopsis-Mutanten nachgewiesen werden (Conklin et al., 2000). Das Gleichgewicht zwischen Ascorbat und seiner oxidierten Form, Dehydroascorbat, wird bestimmt durch Gewebealter und Stress-induziertes Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies und ist zusätzlich von Pflanzenart zu Pflanzenart verschieden (Horemans et al., 1999).

Glutathion ist eine niedermolekulare Thiol-Verbindung, von der es eine reduzierte (GSH) und eine oxidierte Form (GSSG) gibt (Foyer et al., 1997). Unter normalen Bedingungen macht GSH etwa 90-99 % des Glutathion-Pools aus, dies kann sich jedoch durch verstärktes Auftreten von Oxidantien zugunsten von GSSG verändern. GSH wird für die Regeneration von Ascorbat aus Dehydroascorbat benötigt (Lea et al., 1998). Zusätzlich können eine Reihe von phenolischen Inhaltsstoffen wie Flavonoide als Radikalfänger fungieren (Bors et al., 1992; Bors et al., 1996).

2.2. Ozon-induzierter oxidativer Stress

Durch die Einwirkung von biotischen oder abiotischen Stressfaktoren kann das Gleichgewicht von Oxidantien und Antioxidantien gestört werden, es kommt zu oxidativem Stress. Die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies kann dabei im Extremfall zur Schädigung der Pflanze führen. So können Schwermetallbelastungen (Dat et al., 2000), Kälte-Stress (Allen, 1995), Ozon-Exposition (Pell et al., 1997; Sharma & Davis, 1997), Hochlicht (Allen, 1995; Dat et al., 2000), UV-B Strahlung (Surplus et al., 1998), mechanischer Stress (Orozco-Cardenas & Ryan, 1999) und Xenobiotika ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien bewirken.

Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, entstehen durch Ozonexposition reaktive Sauerstoffspezies im Apoplasten der Pflanze. Dies erfolgt durch die Reaktion von Ozon mit organischen Komponenten des extrazellulären Kompartiments. Nachdem Ozon relativ schlecht wasserlöslich ist, stellt sich die Frage, ob die dabei gebildeten ROS-Konzentrationen von signifikanter Bedeutung sind (Lyons et al., 1999). Lange Zeit wurde die Entwicklung der Blattschäden direkt auf die toxische Wirkung von Ozon und der aus den Reaktionen des Schadgases im Apoplasten entstehenden ROS zurückgeführt (Foyer et al., 1994; Heath & Taylor, 1997). In der Zwischenzeit sprechen aber mehrere Befunde dafür, dass in Ozon-empfindlichen Pflanzen eine aktive Bildung an ROS auftritt (Pellinen et al., 1999; Schraudner et al., 1998). So konnte am Beispiel der Ozon-empfindlichen Tabaksorte Bel W3 gezeigt werden, dass die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies biphasisch verläuft (Abb. 3). Dabei trat sowohl bei der Ozon-toleranten Sorte Bel B als auch bei Bel W3 ein erster Peak

von H_2O_2 während der Ozonexposition auf. Nur bei der sensitiven Sorte konnte ein zweiter, erhöhter und verlängerter Peak mit einem Maximum vier bis fünf Stunden nach Ende der Behandlung, aber deutlich vor dem Auftreten erster Blattschäden detektiert werden. Es wurde vermutet, dass dieser Peak als Verstärker der Ozon-Effekte dient und Zelltod sowie Läsionen-Bildung auslöst (Schraudner et al., 1998). Dieser biphasische Verlauf erinnert an die extrazelluläre, oft biphasische Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in inkompatiblen Interaktionen mit Pathogenen (Lamb & Dixon, 1997; Scheel, 2002).

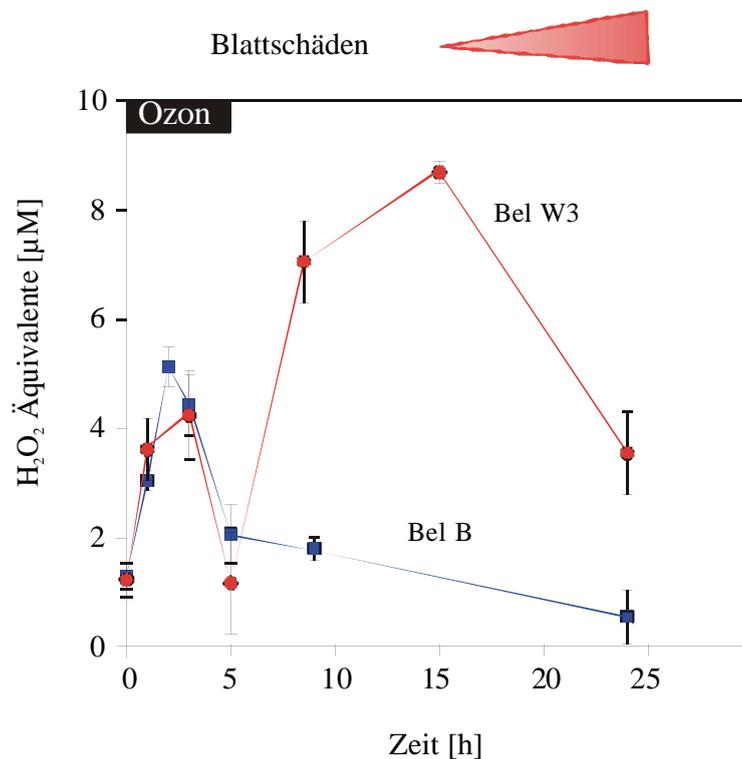


Abb. 3: Detektion von H_2O_2 im Apoplasten der Tabaksorten Bel B und Bel W3 während und nach Ozonexposition (Schraudner et al., 1998). Der schwarze Balken symbolisiert die Dauer der Ozonbehandlung, das rote Dreieck zeigt den Zeitraum der Blattschäden-Entwicklung.

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Ozon (70×10^{-9} s; Heath & Taylor, 1997) und der davon abstammenden ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$: 2-4 μs ; H_2O_2 : 1 ms; Dat et al., 2000) in biologischen Geweben sowie Messungen von Runeckles & Vaartnou (1997), nach denen 15min nach Beendigung der Exposition kein aus Ozon entstandenes Signal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) mehr nachzuweisen war, muss zumindest der zweite Peak an ROS in Bel W3 von der Pflanze stammen.

Diese Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erinnert damit an die Reaktion einer Pflanze auf Pathogene. Die rasche Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies am Ort der Infektion wird hier „oxidativer Burst“ genannt. So führt die Inokulation sowohl mit virulenten als auch avirulenten Pathogenen zu einem schnellen, ersten Peak von ROS, auf den nur im Falle einer

inkompatiblen Interaktion ein zweiter, verlängerter Peak folgt (Lamb & Dixon, 1997). Der zweite „Burst“ scheint damit für die Ausbildung der Resistenz und den Zelltod verantwortlich zu sein (Lamb & Dixon, 1997). Die Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies bei dem Auftreten von Zelltod ist zur Zeit Gegenstand von Diskussionen (Beers & McDowell, 2001; Bethke & Jones, 2001; Dorey et al., 1999; Jabs, 1999; Shirasu & Schulze-Lefert, 2000). Der Begriff „oxidativer Burst“ wird in der Zwischenzeit auch zur Beschreibung der schnellen, transienten Produktion von ROS bei abiotischem Stress verwendet. Als erster konnte Doke (1983) die Pathogen-induzierte Bildung von ROS in Kartoffeln während einer inkompatiblen Reaktion zeigen. Dieser biphasische oxidative Burst ist notwendig und ausreichend, pflanzliche Abwehrgene und damit die Resistenz der Pflanze zu induzieren (Lamb & Dixon, 1997).

2.3. Enzymatische Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beim „oxidativen Burst“

Verschiedene Enzyme werden bei der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, besonders beim oxidativen Burst während der Pathogenabwehr, diskutiert (Abb. 2; Baker & Orlandi, 1995; Lamb & Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997).

In Frage kommen zunächst apoplastidäre **Diamin- und Polyamin-Oxidasen**. Diese sind besonders aus dem Apoplasten vieler Vertreter der *Fabaceae* bekannt. Diaminoxidasen katalysieren folgende Reaktion (Tipping & McPherson, 1995):



Polyamin-Oxidasen kommen sowohl in Pflanzen als auch in Tieren vor (Federico et al., 2001). In Versuchen von Allan & Fluhr (1997) an Tabak erfolgte durch Zugabe von Aminen wie Putrescin eine apoplastidäre, Catalase-sensitive Produktion von H_2O_2 . Die Akkumulation von Di- und Polyaminen durch verschiedene Stressfaktoren wie Ozon konnte u.a. in Gerste und Weizen nachgewiesen werden (Bouchereau et al., 1999; Raab & Weinstein, 1990; Rowland-Bamford et al., 1989).

Arbeiten von P. Reupold mit *Pisum sativum* L. im Rahmen einer Dissertation (Reupold, 1991) und von Peters et al. (1989) mit *Phaseolus vulgaris* L. zeigten jedoch, dass Diamin-Oxidasen deutlich durch Ozon um bis zu 85 % gehemmt wurden. Bei Reupold (1991) nahm mit steigender Blattschädigung die Inhibierung des Enzyms zu. Peters et al. (1989) demonstrierten, dass das Produkt H_2O_2 selbst einen hemmenden Effekt auf Diamin-Oxidasen

ausübt. Eine mögliche Beteiligung bei der ROS-Bildung konnte damit ausgeschlossen werden.

In Abschnitt 2.1 wurden Peroxidasen als H_2O_2 -abbauende Enzyme beschrieben. Hinweise auf **Zellwand-gebundene Peroxidasen**, die unter alkalischen Bedingungen nicht H_2O_2 abbauen, sondern bilden, stammen von Bolwell et al. (1995). Während im Apoplasten im Normalzustand leicht saure Bedingungen herrschen, kommt es während einer Pathogenabwehr oder Elicitorbehandlung durch Ionenströme kurzzeitig zu einer Alkalisierung (Ebel & Mithöfer, 1998; Jabs et al., 1997). Dies könnte zur Aktivierung pH-abhängiger Zellwand-Peroxidasen führen. Durch eine Veränderung im aktiven Zentrum des Enzyms wird O_2^- durch die Oxidation des Cystein-Restes in der Nähe des Häms gebildet, welches sofort zu H_2O_2 umgesetzt wird (Wojtaszek, 1997).

Zur Zeit ist jedoch das apoplastidäre Reduktionsmittel noch unbekannt (Bolwell, 1999). *In vitro*-Studien wiesen bisher gesättigte Fettsäuren als die besten Elektronen-Donoren aus. Gezeigt wurde eine Co-Lokalisation einer *in vitro* H_2O_2 -produzierenden Isoform mit der Akkumulation von H_2O_2 in *P. vulgaris* (Bolwell, 1999). Kürzlich wurde eine Isoform in *P. vulgaris*, FBPI, identifiziert, die bei Expression in *Pichia pastoris* unter Verwendung von Cystein bei einem pH-Wert von 7,2 H_2O_2 generierte (Blee et al., 2001). Die Genexpression von *FBPI* zeigte sich zudem durch einen Elicitor induzierbar. Darüber hinaus erwiesen sich mit antisense-*FBPI*-Konstrukten transformierte *Arabidopsis*-Pflanzen als deutlich empfindlicher gegenüber virulenten Stämmen von *Pseudomonas syringae* und einer Anzahl an pilzlichen Pathogenen (Blee et al., 2001).

Oxalatoxidasen sind besonders aus Monokotylen bekannt. Sie katalysieren die Umsetzung von Oxalat und Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid und Kohlenstoffdioxid (Lane, 1994). 1993 entdeckten Lane et al. (1993), dass ein während der Keimung von Weizen in großen Mengen auftretendes Protein namens Germin Oxalatoxidase-Aktivität besitzt. Dieser Nachweis konnte erbracht werden, nachdem eine hohe Sequenzhomologie von Weizen-Germin mit einer aus Gerstenwurzeln isolierten Oxalatoxidase (Schmitt, 1991) deutlich wurde. Germin ist ein apoplastidäres, multimeres, glycosyliertes Protein mit hoher Resistenz gegen Hitze, Proteasen und H_2O_2 (Lane et al., 1993). Antikörper gegen Germin detektierten weitere Isoformen in Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Mais und Reis (Lane et al., 1992).

Auch in dikotylen Pflanzen konnten Proteine mit Sequenzhomologien von 50-90 % zu Germin gefunden werden (Dunwell et al., 2000), so z.B. in *Arabidopsis thaliana* (Membré et

al., 1997), *Sinapis alba* L. (Heintzen et al., 1994), Tabak (Carter et al., 1999), *Prunus persica* Batsch (Ohmiya et al., 1998) und *Pharbitis nil* L. (Ono et al., 1996). In Anlehnung an Germin werden homologe Proteine als Germin-ähnliche Proteine (GLPs für Germin-like proteins) zusammengefasst. Aufgrund spezifischer struktureller Domänen gehören Germin und Germin-ähnliche Proteine wiederum zu der Überfamilie der Cupine (Dunwell et al., 2000).

Die Funktion vieler Germin-ähnlicher Proteine ist bisher unbekannt (Bernier & Berna, 2001). Fest steht, dass viele in Abhängigkeit der pflanzlichen Entwicklung (Dumas et al., 1995; Lane et al., 1992; Membré et al., 1997) und in unterschiedlichen Geweben (Carter et al., 1999; Goyal et al., 1999; Membré et al., 1997), z.T. mit circadianer Rhythmik (Heintzen et al., 1994; Ono et al., 1996) detektiert werden können. Eine Rolle bei der Abwehr von Pathogenen kommt der Germin-ähnlichen Oxalatoxidase von Gerste zu (Dumas et al., 1995; Zhang et al., 1995): Dieses Enzym wird durch die Infektion mit dem Pilz *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* induziert. Für ein weiteres, zu der Gersten-Oxalatoxidase relativ ähnliches Protein, jedoch ohne Oxalatoxidase-Aktivität (Oxalatoxidase-ähnliches Protein) wurde ebenfalls eine Beteiligung an der Abwehr des Mehltau-Pilzes nachgewiesen (Wei et al., 1998). Oxalatoxidase-Aktivität konnte ansonsten nur für wenige Germin-ähnliche Proteine gezeigt werden, so z.B. für ein Protein aus *Pinus caribaea* L. (Neutelings et al., 1998).

Nachdem bei der Abwehr avirulenter Pathogene eine NADPH-abhängige Bildung von $O_2^{\cdot-}$ in Kartoffeln gezeigt wurde (Doke, 1985), lag die Vermutung der Existenz einer **NADPH-Oxidase** in Pflanzen nahe. Die NADPH-abhängige Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies konnte in den folgenden Jahren in zahlreichen Systemen, wie z.B. Elicitor-behandelten Soja-Zellkulturen bestätigt werden (Mithöfer et al., 1997). Dieses Enzym war bis dahin aus menschlichen Leucozyten bekannt. Hier erfolgt als Abwehr von Mikroorganismen durch die schnelle Produktion von $O_2^{\cdot-}$ durch eine NADPH-Oxidase. Diese katalysiert folgende Reaktion:



Während neutrophile Granulocyten und Macrophagen auf die Abwehr von Bakterien spezialisiert sind, eliminieren eosinophile Granulocyten hauptsächlich Parasiten. Alle diese Zelltypen phagozytieren zunächst die Mikroorganismen, so dass diese vollständig von einer Zellmembran umgeben sind. Anschließend wird zum Abtöten des Pathogens neben NO und OCI von der NADPH-Oxidase produziertes $O_2^{\cdot-}$ in den phagocytotischen Spalt abgegeben (Henderson & Chappell, 1996). Die NADPH-Oxidase setzt sich in diesen Zellen aus verschiedenen Untereinheiten zusammen (Abb. 4). Zunächst gibt es ein in der

Plasmamembran lokalisiertes, aus einem Heterodimer bestehendes Flavocytochrom b_{558} . Das Heterodimer umfasst die beiden Proteine gp91phox und p22phox (Abb. 4). Dazu kommen drei im Cytosol befindliche Untereinheiten, p47phox, p67phox und p40phox, die wohl mit p67phox assoziiert ist (Wientjes et al., 1993). Der Zusatz „phox“ bei den einzelnen Untereinheiten steht dabei für „phagocyte oxidase“. Ein schematisches Modell dieser NADPH-Oxidase ist in Abb. 4 zu sehen.

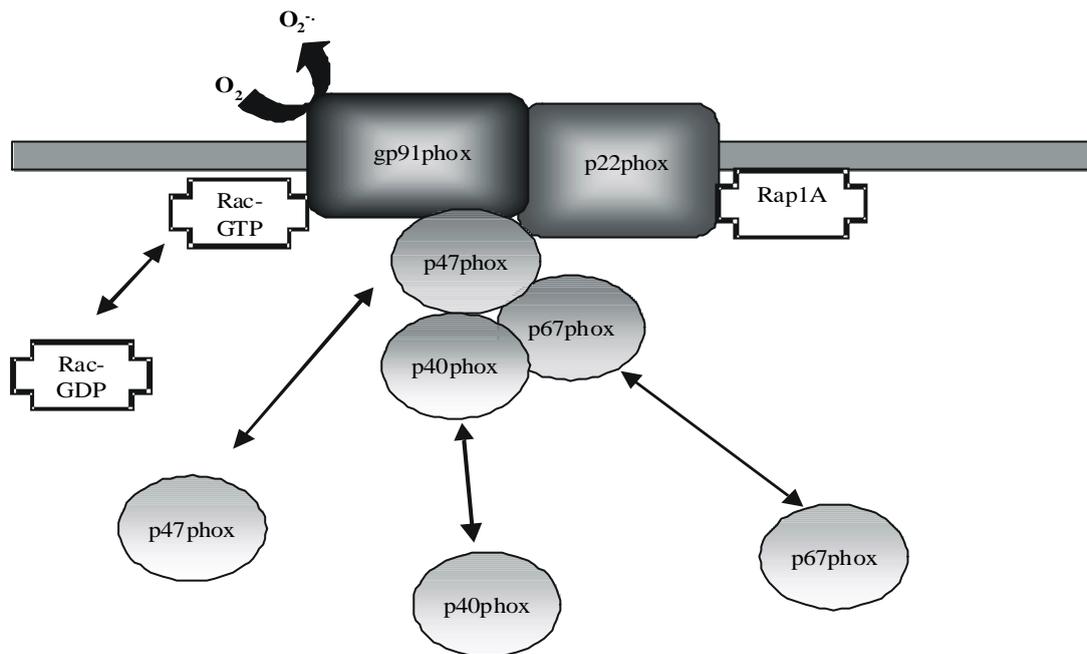


Abb. 4: Schematisches Modell der menschlichen NADPH-Oxidase. Diese stellt einen Multikomponenten-Komplex aus fünf Untereinheiten (gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox und p40phox) dar. Dazu kommen noch G-Proteine wie Rap1A und Rac. Nach Stimulierung des Enzyms erfolgt die reversible Translokation der cytosolischen Untereinheiten zu der Plasmamembran (durch Pfeile angedeutet) und $O_2^{\cdot-}$ wird in die phagozytische Vakuole abgegeben.

p22phox besitzt ein Molekulargewicht von 22 kDa und liegt unglykosyliert vor. gp91phox zeigt in Gelen je nach Glykosylierung ein Molekulargewicht zwischen 70 und 110 kDa. An dieser Untereinheit findet auch die Häm-Bindung statt (Yu et al., 1998), die das Heterodimer stabilisiert (Yu et al., 1999). Damit stellt gp91phox die zentrale katalytische Untereinheit dar, an der der Elektronentransport und die Reduktion des Sauerstoffs erfolgt (Abb. 4). Schließlich sind noch niedermolekulare GTP-bindende Proteine der ras-Unterfamilie an der Bildung eines funktionellen Enzymkomplexes beteiligt: Rap1A, welches Membran-assoziiert ist sowie Rac1 oder Rac2, die im Cytosol liegen (Gabig et al., 1995). Als Vertreter dieser Unterfamilie

zeichnen sie sich dadurch aus, dass sie als Monomere vorliegen und eine Größe von ca. 21 kDa besitzen (Henderson & Chappell, 1996).

Dies stellt die inaktive, unstimulierte Form der NADPH-Oxidase dar. Während einer Aktivierung finden zunächst Phosphorylierungsprozesse statt, und die cytosolischen Untereinheiten wandern zu der Plasmamembran. Phosphoryliert werden p47phox, p40phox, p67phox und das Rap1A-Protein (Babior, 1999). Die Aktivierung von Rac erfolgt durch Bindung von GTP. Die Interaktion zwischen den cytosolischen Komponenten und dem Cytochrom b_{558} -Komplex findet wahrscheinlich zwischen p47phox und gp91phox statt (Henderson & Chappell, 1996). Die Funktion der G-Proteine liegt nur in einer Aktivitätssteigerung des Enzymkomplexes. Über die Funktion der cytosolischen Untereinheiten ist noch sehr wenig bekannt. So scheint die Untereinheit p47phox nicht direkt für die Funktionalität des Enzyms und damit für den Elektronentransport benötigt zu werden, sie fungiert eher als Adapter zwischen dem Cytochrom und den anderen cytosolischen Untereinheiten (Freeman & Lambeth, 1996). Nach der Assemblierung der Untereinheiten werden schließlich in einer Elektronentransportkette über die Plasmamembran hinweg Elektronen von NADPH auf Sauerstoff übertragen. O_2^- dient dabei als Vorläufer für weitere reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 .

In verschiedenen Pflanzen konnten in der Zwischenzeit Homologe der *gp91phox* detektiert und kloniert werden: In *Oryza sativa* L. (Groom et al., 1996), mehrere Isoformen in *Arabidopsis thaliana* L. (Keller et al., 1998; Torres et al., 1998), zwei Isoformen in *Lycopersicon esculentum* Mill. (Amicucci et al., 1999, wfi1 AC AF148534), in *Potamogeton crispus* L. (Amicucci et al., 1999) und zwei Isoformen in *Solanum tuberosum* L. (Yoshioka et al., 2001).

Antikörper gegen cytosolische Untereinheiten der menschlichen NADPH-Oxidase ergaben deutliche Signale in verschiedenen Pflanzenproben (Desikan et al., 1996; Xing et al., 1997). Die Hemmung der Bildung von O_2^- in elicitierten Pflanzenzellen durch Diphenyleniodonium (DPI), einem Hemmstoff des menschlichen Enzymkomplexes sowie anderer flavin-haltiger Oxidasen, ließ einen analogen Mechanismus in Pflanzen vermuten (Desikan et al., 1998; Levine et al., 1994). Gleichzeitig wies ein Versuch mit Membran- und cytosolischen Fraktionen aber auch auf Unterschiede zwischen dem pflanzlichen und dem menschlichen System hin: Eine Kombination der Membranfraktion von *Arabidopsis* mit Cytosol der neutrophilen Granulocyten konnte nach Zugabe eines Elicitors O_2^- -Bildung auslösen, die umgekehrte Kombination jedoch nicht (Desikan et al., 1996). Beim Versuch, die mit den menschlichen Antikörpern reagierenden cytosolischen Proteine aufzureinigen, ergab sich

jedoch, dass diese keine Homologe zu den cytosolischen Untereinheiten der menschlichen NADPH-Oxidase darstellten (Tenhaken & Rübel, 1999).

Nachgewiesen ist die Existenz des G-Proteins Rac in Pflanzen. So waren zunächst Nachweise mit Antikörpern gegen die menschlichen Rac-Proteine in Tabak (Kieffer et al., 1997) und Tomate (Xing et al., 1997) positiv. Klonierung von *rac* erfolgte u.a. aus Reis (Kawasaki et al., 1999), *Medicago sativa* L. (Schiene et al., 2000) und Soja (Park et al., 2000). Die Beteiligung an der Regulation der NADPH-Oxidase wurde mit Hilfe transgener Pflanzen gezeigt. So kam es in *rac*-antisense-Pflanzen nach Elicitation zu keinem oxidativen Burst (Kawasaki et al., 1999; Schiene et al., 2000).

Die vorgestellten ROS-produzierenden Enzym-Systeme könnten zum einen in unterschiedlichen Pflanzen vorkommen. So scheint die Bildung von H₂O₂ in *P. vulgaris* durch eine spezifische, zellwandgebundene Peroxidase-Isoform zu erfolgen (FBP1; Bolwell, 1999), in *H. vulgare* wurde die Produktion von H₂O₂ nach Infektion mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* durch eine Oxalatoxidase (Dumas et al., 1995; Zhang et al., 1995) gezeigt. Auf der anderen Seite könnten mehrere Systeme auch parallel in derselben Pflanze existieren und gleichzeitig oder in Abhängigkeit des Stressfaktors induziert werden (Allan & Fluhr, 1997; Pellinen et al., 1999).

2.4. Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies als Signalmoleküle und bei pflanzlichem Zelltod

Reaktive Sauerstoffspezies sind zunächst aufgrund ihrer hohen Reaktivität toxisch für Zellen und gelten dadurch als Auslöser von Zelltod. Darüber hinaus zeigt sich, dass sie wichtige Komponenten von Abwehrreaktionen und Signalketten darstellen (Lamb & Dixon, 1997; Rao et al., 2000). So besitzen sie in Abwehrreaktionen gegen Pathogene zunächst direkt antimikrobielle Eigenschaften. Darüber hinaus katalysieren sie als eine der schnellsten Abwehrstrategien strukturelle Veränderungen in den Zellwänden z.T. innerhalb von 2-5 Minuten (Grant & Loake, 2000). Glykoproteine, besonders Hydroxyprolin-haltige, werden oxidativ mit der Zellwand vernetzt (Bolwell, 1999). Dies führt zu einer Stärkung der Zellwand als Barriere, um eine Ausbreitung des Pathogens zu verhindern oder zu verlangsamen (Lamb & Dixon, 1997). H₂O₂ induziert als Signalmolekül die Bildung von Phytoalexinen, das sind niedermolekulare Verbindungen mit antimikrobieller Aktivität

(Wojtaszek, 1997). Reaktive Sauerstoffspezies induzieren die Expression einer Reihe von Abwehrgenen. Levine et al. (1994) konnten z.B. die Induktion von Glutathion-S-transferase nachweisen, Chamnongpol et al. (1998) erhielten eine erhöhte Expression von *PR1* und Desikan et al. (1998) zeigten die Induktion der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (*PAL*). Eine Reihe von weiteren Genen wird in der Expression durch H_2O_2 verändert (Desikan et al., 2001). Darunter fallen Gene der Signal-Transduktion, des Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus, Transkriptionsfaktoren, des Energie-Haushaltes und weitere Gene unbekannter Funktion. Vor allem das längerlebige und membrangängige Molekül H_2O_2 kann als bewegliches Signal für Nachbarzellen dienen (Allan & Fluhr, 1997; Levine et al., 1994), aber auch zu der Entwicklung von lokaler und systemischer Resistenz in *A. thaliana* bei Infektion mit einem avirulenten Stamm von *Pseudomonas syringae* beitragen (Alvarez et al., 1998).

Darüber hinaus spielen reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle bei dem pflanzlichen Zelltod. Zelltod ist ein wichtiger Prozess während Wachstum und Entwicklung sowie bei der Antwort auf verschiedene Stressfaktoren (Rao & Davis, 2001). So treten Zelltod und reaktive Sauerstoffspezies bei der Bildung und Lignifizierung der Leitbahnen (Olson & Varner, 1993), bei der Entwicklung von Aerenchym (Drew et al., 2000) und beim Absterben der Aleuron-Schicht in keimendem Getreide (Bethke & Jones, 2001) auf, ferner während der Seneszenz, während der hypersensitiven Reaktion gegen avirulente Pathogene (Doke & Ohashi, 1988; Levine et al., 1994; Wojtaszek, 1997) und bei oxidativem Stress (Dat et al., 2000; Schraudner et al., 1998). In allen Fällen handelt es sich bei dem auftretenden Zelltod um ein kontrolliertes Absterben der Zellen, in einigen Punkten vergleichbar mit der Apoptose in Tieren (Jabs, 1999). Apoptose wurde definiert als Veränderung in der Zellstruktur, die in dem Auftreten von „apoptotic bodies“ und DNA-Fragmentation gipfelt. Auch in Pflanzen treten in einigen Fällen DNA-Fragmentation im Zellkern und Chromatin-Kondensation, zusammen mit Schrumpfung der Zellen, Kondensation des Cytoplasmas und Vesikelbildung aus den Zellmembranen auf (Houot et al., 2001). Von DNA-Fragmentation und Chromatin-Kondensation explizit bei Ozon-induziertem Zelltod berichten Rao & Davis (2001). Cystein-Proteasen, sogenannte Caspasen und Caspasen-ähnliche Proteine, scheinen als ubiquitäre Komponenten bei der Regulation von programmiertem Zelltod (PCD) in allen Eukaryoten, so auch in Pflanzen, vorhanden zu sein (Lam & del Pozo, 2000). Der Nachweis einer Beteiligung von Caspase-ähnlichen Proteinen an der Kontrolle von PCD in Pflanzen erfolgte bis jetzt jedoch immer indirekt, z.B. über den Einsatz Caspase-spezifischer Inhibitoren. Die Expression des tierischen Zelltod-Regulators Bax, eines Mitglieds der Bcl-2-Familie, führte in Tabak zur Aktivierung eines endogenen Zelltod-Programmes, das sich sehr ähnlich zu der

durch Tabakmosaikvirus (TMV) ausgelösten hypersensitiven Reaktion zeigte (Lacomme & Santa Cruz, 1999).

Der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies scheint eine wichtige Rolle als Modulator der Stressantworten zuzukommen (Dat et al., 2000). So führt die Behandlung von Soja-Zellkulturen mit 1-2 mM H_2O_2 zu einer Gen-Aktivierung, während 6-8 mM H_2O_2 Zelltod auslösen (Levine et al., 1994). Darüber hinaus entscheidet die Konzentration an H_2O_2 auch über die Art des Zelltodes: Konzentrationen um 10 mM resultieren in Tabak-Zellkulturen in einem programmierten Zelltod, Konzentrationen über 50 mM führen zum nekrotischen, d.h. unkontrollierten Absterben der Zellen (Houot et al., 2001). Levine et al. (1994) postulierten als erste die entscheidende Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei Zelltod während der hypersensitiven Antwort (HR, für „hypersensitive response“). Zum einen konnten sie die Zelltod-fördernde Wirkung von exogen appliziertem H_2O_2 auf Soja-Zellkulturen demonstrieren. Zum anderen korrelierten sie das Auftreten des zweiten Peaks von ROS ausgelöst nur durch einen avirulenten Pathogen-Stamm mit dem Auftreten von Zelltod während HR. Ein virulenter Stamm führte in Soja-Zellkulturen nur zu einer monophasischen Akkumulation von ROS und zu keiner HR.

Trotz zahlreicher Hinweise auf die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies in Stressantworten bleiben bestimmte Schlüsselfragen noch unbeantwortet. Es ist unklar, welche reaktive Sauerstoffspezies für die Induktion der Reaktionen verantwortlich ist. In verschiedenen Pflanzenarten können bei unterschiedlichen Behandlungen entweder H_2O_2 oder $\text{O}_2^{\cdot-}$ oder beide Spezies nachgewiesen werden (Wojtaszek, 1997). Ebenso ist unbekannt, welche Faktoren das Ausmaß der absterbenden Blattfläche bestimmen. Schließlich gibt es eine Vielzahl von Hinweisen darauf, dass die reaktiven Sauerstoffspezies nicht alleine Abwehrreaktionen und Zelltod auslösen, sondern noch weitere Signalmoleküle nötig sind. Darüber hinaus kann die Induktion bestimmter Abwehrreaktionen und Zelltod anscheinend auch unabhängig von reaktiven Sauerstoffspezies erfolgen (Dorey et al., 1999): Tabakzellkulturen, die mit α - bzw. β -Megaspermin behandelt wurden, zeigten trotz Hemmung des oxidativen Bursts durch DPI in elicitierten Tabakzellkulturen Zelltod, ebenso erwies sich die Aktivierung von PAL als unabhängig von H_2O_2 .

3. Weitere Signalmoleküle bei der Induktion pflanzlicher Abwehr und bei programmiertem Zelltod

3.1. Salicylsäure

Salicylsäure kommt in Pflanzen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen zu (Durner et al., 1997). Historisch konnte zunächst gezeigt werden, dass exogene Applikation von Salicylsäure oder Aspirin zu der Induktion von Abwehrgenen und verstärkter Resistenz z.B. gegen Tabakmosaik Virus führt, bevor die Verbindung als endogene Komponente der Signalwege pflanzlicher Abwehr identifiziert wurde (Durner et al., 1997).

Im Gegensatz zu Tieren sind Pflanzen in der Lage, Salicylsäure zu synthetisieren und Salicylsäure-abhängige physiologische Programme zu aktivieren (Alvarez, 2000). Die Biosynthese von Salicylsäure erfolgt dabei über das im Shikimatweg gebildete Chorismat (Abb. 5). Aus Chorismat wird über Zwischenstufen die Aminosäure Phenylalanin gebildet, diese gilt als Ausgangsverbindung für die Synthese von Salicylsäure (Ribnicky et al., 1998). Die Reaktion von Phenylalanin zu Zimtsäure stellt auf dem Syntheseweg einen Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt dar und wird von dem hoch regulierten Enzym PAL katalysiert. Nach weiteren Zwischenschritten bildet die Benzoessäure-2-Hydroxylase aus Benzoessäure Salicylsäure (Ribnicky et al., 1998). Neueste Erkenntnisse weisen auf die Möglichkeit hin, dass Pflanzen neben dem oben ausgeführten Syntheseweg noch einen zweiten besitzen können (Abb. 5). In verschiedenen Bakterien wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* wird Salicylsäure aus Chorismat über Isochorismat-Synthase (ICS) und Pyruvat-Lyase (PL) gebildet. Kürzlich konnten in *Arabidopsis* Isoformen der Isochorismat-Synthase identifiziert werden, und eine Pathogenbehandlung führte zu einer deutlichen Induktion der Genexpression (Wildermuth et al., 2001). Über Sequenzvergleiche in Datenbanken konnten die Autoren zusätzlich zu ICS homologe Sequenzen in Soja und Tomate finden. Damit erscheint die Synthese von Salicylsäure in Pflanzen über diesen zweiten Weg möglich.

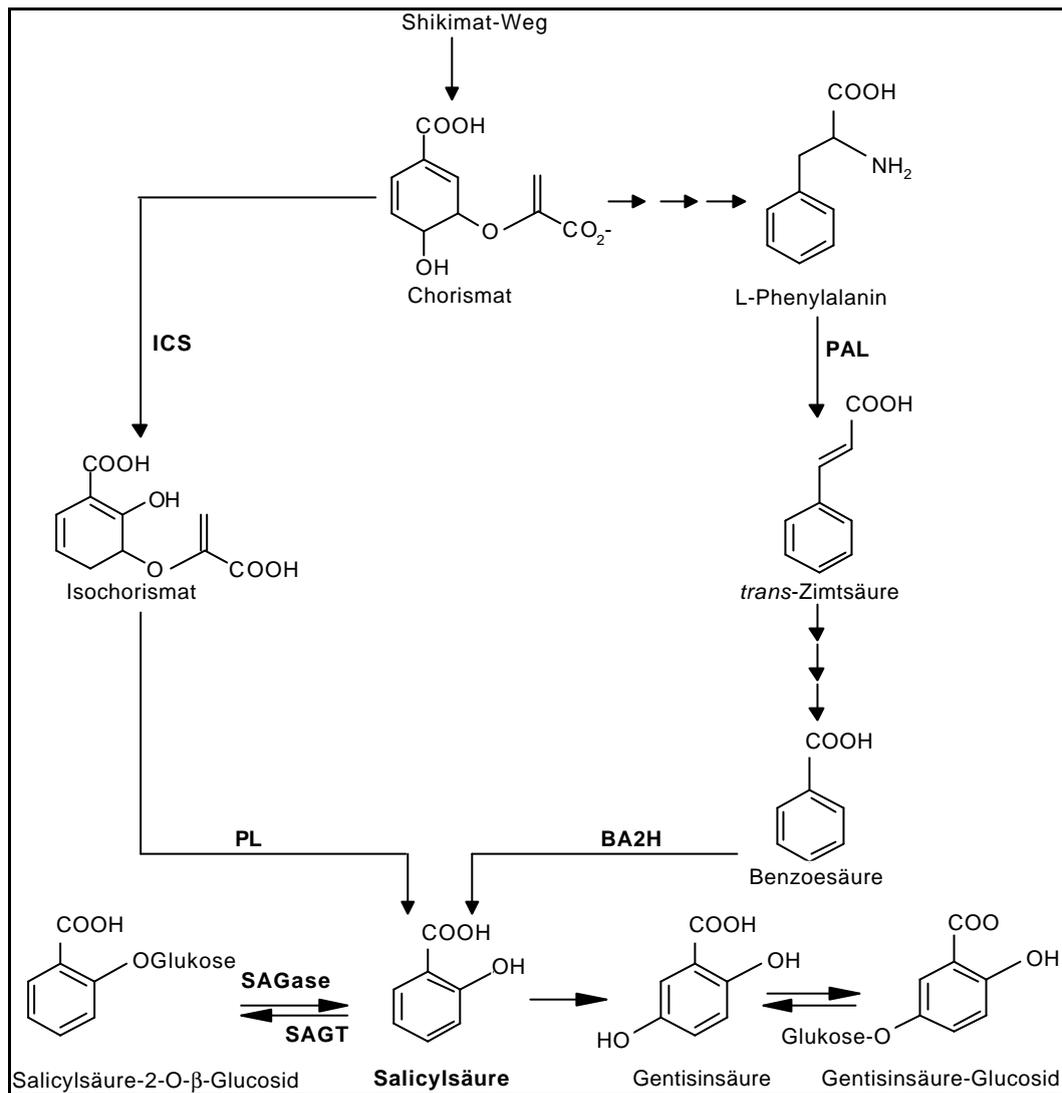


Abb. 5: Mögliche Biosynthesewege der Salicylsäure. PAL = Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, BA2H = Benzoessäure-2-Hydroxylase, SAGase = Salicylsäure-β-Glucosidase, SAGT= UDP-Glucose:Salicylsäure Glucosyltransferase, SAMT = Salicylsäure-Methyltransferase, ICS = Isochorismat-Synthase, PL = Pyruvat-Lyase (zusammengestellt aus Hock & Elstner, 1995; Moeder, 1999 und Wildermuth et al., 2001, verändert).

Ein großer Anteil der Salicylsäuregehalte liegt in Pflanzen in konjugierter Form, meist glucosyliert, vor. Das Hauptkonjugat in Tabak stellt das Salicylsäure-2-O-β-glucosid (Abb. 5) dar (Alvarez, 2000). Weiterhin kann Salicylsäure noch zu Gentisinsäure (2,5-Dihydroxybenzoessäure) umgesetzt werden. Eine Beteiligung von Gentisinsäure an pflanzeigenen Abwehrreaktionen ist bislang nur aus Tomate bekannt (Bellés et al., 1999). Als gasförmiges, flüchtiges Derivat von Salicylsäure könnte Methylsalicylat als Botenstoff innerhalb des Blattgasraumes und zu benachbarten Pflanzen fungieren (Heiden et al., 1999; Ribnicky et al., 1998).

Eine Schlüsselrolle nimmt Salicylsäure in der Aktivierung der Pathogenresistenz ein (Durner et al., 1997). Sie akkumuliert hier lokal in den infizierten sowie in distalen pflanzlichen

Gewebe. Diese Resistenz geht häufig mit der kontrollierten Bildung von Läsionen im Bereich der Pathogeninfektion, der sogenannten hypersensitiven Antwort, einher. Salicylsäure aktiviert hierbei induzierbare Abwehrprogramme, die zu der Resistenz führen. Dies geschieht zum einen durch die Induktion der Gen-Expression verschiedener PR-Proteine. Zum anderen ist sie zusammen mit reaktiven Sauerstoffspezies für Zelltod verantwortlich und unbedingt notwendig bei der Etablierung systemisch erworbener Resistenz (SAR; systemic acquired resistance; Durner et al., 1997). Systemisch erworbene Resistenz tritt nach erfolgreicher Abwehr eines Pathogens in angrenzendem Gewebe, aber auch in distalen Bereichen auf und zeigt sich durch eine schnellere und stärkere pflanzliche Antwort gegenüber einer Sekundärinfektion.

Relativ unklar ist die Rolle von Salicylsäure bei der Entstehung von Läsionen. Infiltration von Salicylsäure ergab keinen HR-ähnlichen Zelltod. Allerdings lässt das räumliche und zeitliche Muster der Salicylsäure-Akkumulation während der HR vermuten, dass diese Verbindung zur Kontrolle des Zeitpunktes und der Größe der Läsion beiträgt (Alvarez, 2000). Bei der HR werden die höchsten Konzentrationen an Stellen entstehender Läsionen gemessen, im angrenzenden, gesunden Gewebe sind gegenüber nicht-infizierten Pflanzen noch leicht erhöhte Werte zu verzeichnen. Eventuell entscheidet dieser Konzentrationsgradient über das Ausmaß der Läsion (Alvarez, 2000).

Kontrovers wird das Zusammenspiel von ROS und Salicylsäure bei der Resistenzantwort diskutiert. Kawano et al. (1998) konnten in Tabak-Zellkulturen die Salicylsäure-induzierte Bildung von Superoxid nachweisen. Außerdem ist die phenolische Verbindung in der Lage, die H₂O₂-abbauenden Enzyme Catalase und Ascorbat-Peroxidase zu inhibieren (Chen et al., 1993; Durner & Klessig, 1995). Diese Befunde sprechen für eine Rolle von Salicylsäure in der Abwehr-Signalkette oberhalb von reaktiven Sauerstoffspezies. Andererseits deuten Experimente mit ROS-Scavenger und transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen auf eine Rolle von H₂O₂ oberhalb von Salicylsäure hin (Surplus et al., 1998). Diese transgenen Pflanzen waren aufgrund der Überexpression des bakteriellen Salicylat-Hydroxylase-Gens (NahG) nicht in der Lage, Salicylsäure zu akkumulieren. Zusätzlich konnte die Induktion der Salicylsäurebiosynthese durch H₂O₂ nachgewiesen werden (Bi et al., 1995; Neuenschwander et al., 1995). In mit einem avirulenten Stamm von *Pseudomonas syringae* infizierten Tabakpflanzen wurde jede Phase der ROS-Akkumulation von einem Anstieg der Salicylsäurekonzentration gefolgt (Draper, 1997). Damit erweist sich auch die Salicylsäure-Bildung als biphasisch. Wahrscheinlich arbeiten reaktive Sauerstoffspezies und Salicylsäure

bei der Pathogenabwehr in Einklang als selbst-amplifizierendes System (Van Breusegem et al., 2001): H_2O_2 induziert Salicylsäure, Salicylsäure verstärkt die H_2O_2 -Akkumulation.

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Salicylsäure auch durch abiotische Stressfaktoren induziert wird. Dies konnte für Hitzestress (Dat et al., 1998), für UV-B Strahlung (Surplus et al., 1998) und für Ozon-Exposition (Rao & Davis, 1999; Sharma & Davis, 1997; Yalpani et al., 1994) nachgewiesen werden. Yalpani et al. (1994) konnten ein signifikantes Ansteigen der Gehalte an freier und konjugierter Salicylsäure in Tabak während einer 4tägigen Exposition mit hohen Ozonwerten messen. Während die maximale Induktion der Konjugate schon nach dem ersten Behandlungstag erfolgte, konnten die höchsten Konzentrationen an freier Salicylsäure am vierten Behandlungstag festgestellt werden. Gleichzeitig konnte auch ein aktivierender Einfluss von Ozon auf das Enzym Benzoessäure-2-Hydroxylase gezeigt werden. Versuche von Rao & Davis (1999) wiesen auf einen Zusammenhang von Ozon-Sensitivität und Salicylsäure-Akkumulation hin: Im Vergleich zweier *Arabidopsis*-Ökotypen bildete der empfindlichere (Cvi-0) deutlich mehr Salicylsäure als der Ozon-tolerante Ökotyp (Col-0).

3.2. Ethylen

Ethylen (C_2H_4) ist ein endogenes Pflanzenhormon welches verschiedene Entwicklungs- und Wachstumsprozesse wie Samenkeimung, Zellelongation, Fruchtreifung, Seneszenz und Abszission in Pflanzen reguliert (Alonso et al., 1999; Johnson & Ecker, 1998; Kieber, 1997). Darüber hinaus ist Ethylen an Stressantworten beteiligt. So kann bei Pathogenabwehr, Verwundung und Überflutung erhöhte Ethylenemission gemessen werden. Ethylen induziert in diesen Fällen Abwehrantworten wie beschleunigte Seneszenz, Abwurf von infizierten Organen und Induktion spezifischer Abwehrgene (Chang & Shockey, 1999). Außerdem gilt Ethylen als früher, beständiger Marker für Ozon-Sensitivität in Pflanzen (Sandermann, 1996; Wellburn & Wellburn, 1996). Im Vergleich von Ozon-toleranten und -sensitiven Pflanzen produzieren die ersteren kein oder deutlich weniger Ethylen als empfindliche Sorten und Arten (Wellburn & Wellburn, 1996). Historisch wurde angenommen, dass Ozon direkt mit Ethylen reagiert und Formaldehyd sowie H_2O_2 bildet (Elstner et al., 1985).

Die Ozon-induzierte Ethylenemission ist das Resultat einer Aktivierung spezifischer Isoformen Ethylen-bildender Enzyme (Tuomainen et al., 1997). Die Synthese erfolgt aus dem im Yang-Zyklus gebildeten S-Adenosylmethionin (SAM) über 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC; katalysiert durch ACC-Synthase), welches durch ACC-Oxidase zu Ethylen umgewandelt wird (Abb. 6; Johnson & Ecker, 1998). SAM stellt jedoch nicht nur die

Ausgangsverbindung für die Ethylenbiosynthese dar, sondern auch für die damit konkurrierende Polyamin-Synthese (Bouchereau et al., 1999).

Sowohl ACC-Synthase als auch ACC-Oxidase sind stark regulierte Enzyme (Moeder, 1999; Tuomainen et al., 1997). Von beiden Enzymen gibt es mehrere Isoformen, die in Abhängigkeit der Entwicklung und infolge verschiedener Stressfaktoren unterschiedlich exprimiert werden. Selektive Induktion spezifischer Isoformen konnte nach Verwundung, Überflutung, mechanischem Stress, Pathogen-Abwehr, Ozon-Exposition, aber auch nach Ethylenbehandlung nachgewiesen werden (Johnson & Ecker, 1998). Der Gehalt an ACC korreliert in Ozon-behandelten Pflanzen mit der Menge an emittiertem Ethylen, so dass Gehalte dieses Vorläufers zum Abschätzen der Ethylen-Induktion verwendet werden können (Langebartels et al., 1991; Tuomainen et al., 1997). Darüber hinaus ist ACC nicht nur der Vorläufer für Ethylen, sondern scheint auch als bewegliches Kurzstreckensignal innerhalb der Ethylen-Signalkette im Apoplasten zu fungieren (Moeder et al., 1999). Alternativ kann ACC auch mit Malonat zu Malonyl-ACC (MACC; Martin & Saftner, 1995) bzw. mit Glutamat zu γ -Glutamyl-ACC (GACC; Martin et al., 1995) konjugiert werden (Abb. 6).

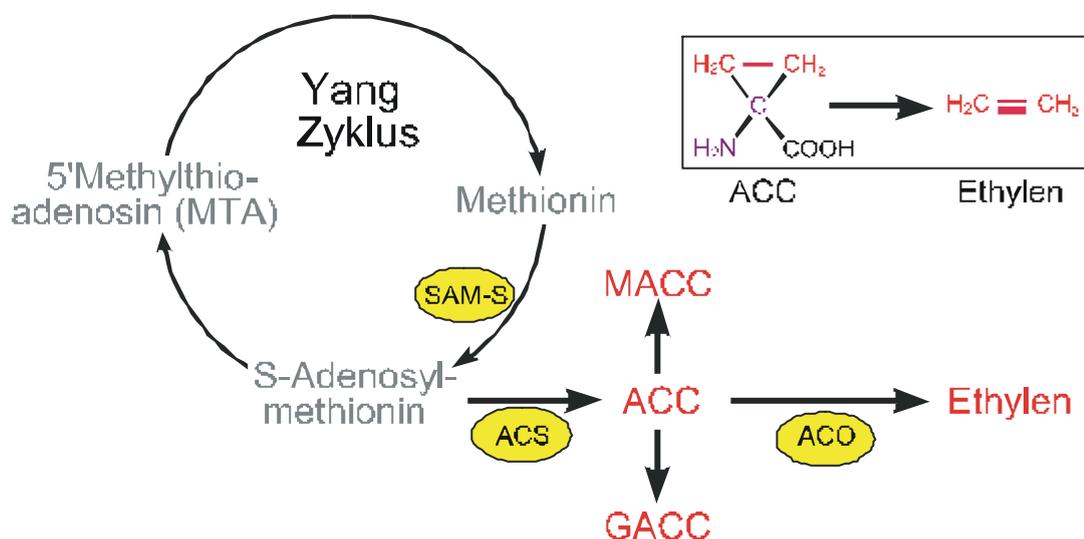


Abb. 6: Reaktionsschema der Ethylenbiosynthese und mögliche Induktoren der Syntheseenzyme. SAM-S = SAM-Synthetase, ACS = ACC-Synthase, ACO = ACC-Oxidase, ACC = 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure, MACC = Malonyl-ACC, GACC = γ -Glutamyl-ACC (aus Langebartels et al., 2000, verändert).

Mit Hilfe von extern appliziertem Ethylen, sowie unter Verwendung von Mutanten und Transformanten, wurde die Rolle von Ethylen in Stressantworten untersucht. Ethylen aktiviert

zunächst Abwehrgene wie basische PR-Proteine und Peroxidasen (Kieber, 1997). Mit transgenen Tabakpflanzen konnte nachgewiesen werden, dass Ethylen Resistenz gegen nicht pathogene Boden-Pilze vermittelt, aber auch das Wahrnehmen und Erkennen von Nachbarpflanzen ermöglicht (Knoester et al., 1998). Das Pflanzenhormon scheint eine wichtige Rolle in der sogenannten induzierten systemischen Resistenz (ISR) zu spielen (Pieterse et al., 1998). Diese wird durch die Besiedelung der Pflanzenwurzeln mit speziellen, nicht-pathogenen Rhizobakterien ausgelöst, und die Signalkette zeigt sich im Gegensatz zu SAR unabhängig von Salicylsäure (Ton et al., 2001).

Schließlich kommt Ethylen eine wichtige regulatorische Rolle in der Entstehung von Läsionen zu. In Tabak-Zellkulturen war das Hormon in der Lage, in bestimmten Phasen des Zellzyklus programmierten Zelltod zu induzieren (Herbert et al., 2001). In Tabakpflanzen zeigte sich die Bildung der TMV-induzierten Läsionen Ethylen abhängig. Inhibitoren der Ethylenbiosynthese und -perzeption führten zu einer deutlichen Verringerung der Läsionen (Ohtsubo et al., 1999).

3.3. Jasmonsäure

Neben reaktiven Sauerstoffspezies, Salicylsäure und Ethylen ist an Pathogen- und Ozon-induzierten Reaktionen Jasmonsäure (JA) beteiligt. Jasmonsäure stellt ein Stresssignal dar, das primär an Verwundungsantworten beteiligt ist (Van Breusegem et al., 2001). Eine Verwundung von pflanzlichem Gewebe aktiviert Phospholipasen, deren Aktivität aus Membransystemen Linolensäure freisetzt. Linolensäure wird durch die Aktivität von Lipoxygenasen (LOX) dioxygeniert und schließlich nach Cyclisierung durch Oxidation in Jasmonsäure umgesetzt (Örvar et al., 1997). Jasmonat wird im Gegensatz zu Salicylsäure für die Entwicklung der ISR zusammen mit Ethylen benötigt (Ton et al., 2001, siehe Einleitung Abschnitt 3.2). In Ozon-induzierten Antworten scheint Jasmonsäure eher die Rolle eines negativen Zelltodregulators innezuhaben. Jasmonsäure greift hierfür an zwei unterschiedlichen Stellen in die Signalwege ein: Zum einen vermindert Jasmonsäure die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies, zum anderen schwächt es die Wirkung von Salicylsäure bei Zelltod (Rao et al., 2000; Van Breusegem et al., 2001). Vorbehandlungen mit Jasmonsäure, Verwundung oder Methyljasmonat resultieren in einer deutlichen Verringerung der Ozon-induzierten-Läsionen (Örvar et al., 1997; Rao et al., 2000).

3.4. Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist als intra- und interzelluläres Signalmolekül verschiedener Zellfunktionen in Tieren bekannt (Wendehenne et al., 2001). In Pflanzen stellt NO einen Effektor von Wachstum, Entwicklung und Pathogenabwehr dar (Durner & Klessig, 1999): z.B. induziert es Blattexpansion, Wurzelwachstum und Phytoalexin-Produktion. Hinweise auf eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Pathogenen resultieren u.a. aus der Infektion von Tabakpflanzen mit TMV. Nur in resistenten Pflanzen konnte eine verstärkte NO-Bildung gemessen werden (Durner et al., 1998). Die Inokulation von Soja-Zellkulturen mit *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* stimulierte die NO-Produktion in Form eines biphasischen Verlaufs nur in einer inkompatiblen Interaktion (Delledonne et al., 1998). Darüber hinaus wurde NO als „second messenger“ während der hypersensitiven Antwort identifiziert und besitzt hier sowohl komplementäre als auch antagonistische Funktionen zu H_2O_2 (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998).

Im Immunsystem von Säugern wirken reaktive Sauerstoffspezies und NO oft zusammen bei der Abtötung von Bakterien und Tumorzellen durch Makrophagen (Delledonne et al., 1998). NO könnte auch in Pflanzen direkt mit $O_2^{\cdot-}$ reagieren und die cytotoxische Verbindung Peroxynitrit und Hydroxylradikale bilden (Van Camp et al., 1998). Während eine Behandlung von pflanzlichen Zellkulturen mit NO in Abwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies keinen Zelltod induzierte, konnte der ROS-induzierte Zelltod durch NO deutlich verstärkt werden (Delledonne et al., 1998). Bisher nicht erforscht ist eine potentielle Akkumulation von NO bei abiotischem Stress in Pflanzen. Zusätzlich scheint NO die Abwehrantworten durch Wechselwirkung mit Salicylsäure zu beeinflussen. Die Behandlung von Tabakblättern mit NO induzierte signifikant die endogene Salicylsäure-Akkumulation durch Aktivierung der PAL (Durner et al., 1998).

Die Herkunft von NO ist bisher unbekannt (Bolwell, 1999). Fraglich ist, ob es in Pflanzen ein Homolog zu der NO-Synthase (NOS) in Säugern gibt. Diese katalysiert die NADPH-abhängige Bildung von NO und Citrullin aus L-Arginin und Sauerstoff (Durner & Klessig, 1999; Wendehenne et al., 2001). Zwar werden NOS-Aktivitäten in Form von Citrullin-Akkumulation und immunreaktive Proteine mit Antikörpern gegen NO-Synthase von Mäusen z.T. in Pflanzen detektiert (Barroso et al., 1999; Delledonne et al., 1998), bisher gibt es jedoch keine genetischen Beweise für deren Existenz. Darüber hinaus ist fraglich, ob der in Säugern benötigte Co-Faktor der NOS, BH_4 , in Pflanzen synthetisiert wird (Wendehenne et al., 2001). Als alternative Quellen werden Enzyme aus dem Nitrat/Nitrit-Metabolismus oder

aber die nicht-enzymatische Reduktion von Nitrit diskutiert (Wendehenne et al., 2001).
Corpas et al. (2001) konnten kürzlich Peroxisomen als Ort der NO-Produktion nachweisen.

4. Themenstellung

Als potentielles Schadgas bei Pflanzen ist Ozon schon seit über 50 Jahren bekannt. Biochemische und physiologische Zusammenhänge zwischen erhöhten Ozonkonzentrationen und dem Auftreten von Blattschäden in Form von Zelltod sind allerdings immer noch Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen und nur ansatzweise geklärt.

In dieser Arbeit sollte die Entstehung von Läsionen als Marker für Ozonempfindlichkeit mit der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies („oxidative Burst“) räumlich und zeitlich korreliert und dadurch die Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies bei der Initiation von Zelltod nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen sollten neben Kultur- auch Wildpflanzen umfassen, so dass eine Auseinandersetzung mit zur Zeit gültigen Ozongrenzwerten möglich ist. Versuche im Freiland unter ambienten und leicht erhöhten Ozonkonzentrationen wurden durchgeführt, um erstmals nachzuprüfen, ob ein „oxidativer Burst“ auch unter ambienten Ozonwerten im Feld vorkommt.

Die Verwendung unterschiedlich empfindlicher Pflanzen sollte eine Aussage über potentielle Ursachen unterschiedlicher Ozontoleranz im Pflanzenreich ermöglichen. In diesem Zusammenhang wurden auch Messungen von Signalmolekülen wie Ethylen und Salicylsäure angestrebt. Nachdem die Beteiligung von NO bei der Pathogenabwehr nachgewiesen ist, sollte erstmals dessen Akkumulation nach einer Ozonbehandlung untersucht werden.

Die aktive, Ozon-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies als Resultat einer selbst-amplifizierenden Antwort sollte durch eine Analyse potentieller Enzyme nachgewiesen werden, die zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Tabak befähigt sind. Als erster Kandidat wurde die Untersuchung einer Oxalatoxidase angestrebt, auf deren Vorkommen in Tabak Vorarbeiten hingewiesen hatten. Zu der menschlichen NAD(P)H-Oxidase homologe Gene waren zu Beginn der Arbeit nur aus *Arabidopsis thaliana* L. und *Oryza sativa* L. bekannt. In einem zweiten Schritt sollten daher erstmals Isoformen der katalytischen Untereinheit gp91phox in Tabak identifiziert und charakterisiert werden. Hierzu wurden Expressionsstudien in verschiedenen Geweben sowie nach Behandlung mit reaktiven Sauerstoffspezies und Pathogenen angestrebt. Schließlich sollte die Induktion von Isoformen der NADPH-Oxidase in Tabak durch Ozon und eine potentielle Beteiligung beim Ozon-induzierten oxidativen Burst geprüft werden.

II. Material und Methoden

1. Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Elektrophorese-Apparatur Mini-PROTEAN II Cell	BioRAD, München
Fluorostar II microplate reader	Tecan, Crailsheim
Gaschromatograph AutoSystem XL	Perkin-Elmer, Überlingen
Geltrockner 2003	LKB, Bromma, Schweden
Heizschrank	Memmert, Schwabach
Horizontalgelapparaturen	Easy-Cast, Erlangen
HPLC (Gold 7.11, System Gold)	Beckman Coulter, Unterschleißheim
Hybridisierungsöfen Hybrid 2000	H. Sauer, Reutlingen
Image Master VDS mit Software Imagemaster 1D Elite, Version 2.0	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Konzentratoren: Centricon YM-10, YM-30	Millipore, Eschborn
Membranpumpe MD 4C	Kremer und Kreiler, München
Microplate-Reader Thermomax mit Software Softmax	Molecular Devices, USA
Mikroskope: Axioskop, konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510	Zeiss, Oberkochen
Milli-Q Water System	Millipore, Eschborn
Ozonanalysator CSI 3100	Columbia Scientific Instruments, Austin, USA
Ozongenerator 500 Ozongenerator 503	Fischer, Meckenheim
PCR-Maschinen PTC-200 PCRExpress	MJ Research (Biozym Diagnostik), Oldendorf Thermo Hybaid, Frankfurt
pH Meter 743	Knick, Berlin
Photometer Ultrospec 3100 <i>pro</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Porometer CQP 130a	Walz, Effeltrich
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, USA
Wasserbad	Bachofer, Reutlingen
Zentrifugen Kühlzentrifuge 3K12 Kühlzentrifuge J2-21 Tischzentrifuge 5415	Sigma Laborzentrifugen, Osterode (Harz) Beckman Coulter, Unterschleißheim Eppendorf, Hamburg

2. Chemikalien

2.1. Feinchemikalien und Enzyme

3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
4-Chlor-1-naphthol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure (X-Gluc)	Biomol, Hamburg
Carboxy-PTIO	Alexis Deutschland, Grünberg
Catalase (Rinderleber)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
4,5-Diaminofluorescein diacetat (DAF-2DA)	Alexis Deutschland, Grünberg
Diphenyliodoniumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dithioerythritol DTE	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glucose-Oxidase (<i>Aspergillus niger</i>)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaleidoscope Prestained Standard	BioRAD, München
Nitroblautetrazolium	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Oxalatoxidase (Gerste)	Roche Diagnostic, Mannheim
OxyBurst Green H ₂ HFF BSA	Molecular Probes, Leiden, NL
Peroxidase (Meerrettich)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Precision Protein Standard	BioRAD, München
Sigmamarker Low, high and wide range	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Superoxiddismutase (Meerrettich)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Xanthin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Xanthin-Oxidase (aus Buttermilch)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2. Molekularbiologische Reagenzien

Agarose Gel DNA Extraction Kit	Roche Diagnostic, Mannheim
AGS Gold DNA Polymerase	Thermo Hybaid, Heidelberg
cDNA-Synthese Reagenzien	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Marker pBR328 Mix I	MBBL, Bielefeld
DNase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Genome Clean System	Thermo Hybaid, Heidelberg
Northern Blot Reagenzien	Roche Diagnostic, Mannheim
Nucleon Resin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pAW109 RNA	Perkin-Elmer, Überlingen
pGEM-T Vector System	Promega, Heidelberg
PicoGreen TM	Molecular Probes, Leiden, NL
QIAprep Spin, Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RiboGreen TM	Molecular Probes, Leiden, NL
RNase H	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe

3. Pflanzenmaterial

3.1. Art und Herkunft des Pflanzenmaterials

Nicotiana tabacum L., Virginischer Tabak (*Solanaceae*):

- cv. Bel B, zur Verfügung gestellt von Prof. T.A. Mansfield, Lancaster, UK
- cv. Bel W3 von Dr. G.H.M. Krause, Landesanstalt für Immissionsschutz, Essen
- cv. Xanthi von Prof. F. Bernier, Strasbourg (F)
- transgene Pflanzen auf dem Hintergrund cv. Xanthi, ebenfalls von Prof. F. Bernier (Berna & Bernier, 1997; Berna & Bernier, 1999). Diese transgenen Pflanzenlinien enthalten Teile oder das gesamte Gen einer Oxalatoxidase aus Weizen (*gf-2.8*; AC M63223).
 - Oxo-Gus: Pflanzen dieser Linie besitzen ein chimäres Gen, das aus dem Promotor einer Weizen-Oxalatoxidase und dem Reportergen β -Glucuronidase (Gus) aus *E. coli* besteht. Ort und Zeitpunkt der Induktion der Oxalatoxidase kann so durch die Aktivität der β -Glucuronidase *in situ* nachgewiesen werden (siehe Material und Methoden Abschnitt 14).
 - Oxo-2.8: diese Pflanzen enthalten das Gen einer Oxalatoxidase aus Weizen.
 - 35S-Oxo: diese Linie ist gekennzeichnet durch den Besitz eines chimären Gens bestehend aus dem CaMV 35S-Promotor und dem codierenden Bereich einer Weizen Oxalatoxidase.

Lycopersicon esculentum Mill., Tomate (*Solanaceae*):

Bei den Versuchspflanzen handelt es sich um kommerziell erhältliche Sorten.

Sorte	Vertreiber / Herkunft
Ailsa Craig	Syngenta, Bracknell, GB
DRK 2003	De Ruitersamen, Bergschenhoek, NL
Trust	De Ruitersamen, Bergschenhoek, NL
Piedmont	Syngenta, Bracknell, GB
Money Maker	Sutton Samen /Syngenta, Bracknell, GB
Thomas	Novartis, NL
Solairo	De Ruitersamen, Bergschenhoek, NL
Nikita	CEAM, Paterna, ES
Roma	Gärtner Pötschke, Marburg

***Arabidopsis thaliana* L., Ackerschmalwand (*Brassicaceae*):**

Alle Samen wurden über das Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC) in Nottingham bezogen (<http://nasc.nott.ac.uk/>).

Ökotyp	Herkunft	Stocknummer
Ws-2 (Wassilewskija)	Vasljevici/Dnjepr	N1601
LC-0	Loch Ness, GB	N1306
Sha (Shokhdara)	Tadschikistan	N929
Jl-1 (Jelinka)	Vranov u Brno	N1248
Lan-0 (Lanarck)	Lanark, GB	N1304
Np-0 (Nieps)	Nieps / Salzwedel	N1396
Cvi-0 (Cape Verde Islands)	Cape Verde Islands	N902
Sap-0 (Slapy)	Slapy, Cz	N1506
Ler-1 (Landsberg erecta)	Landsberg, D	N1642
Col-0 (Columbia)	Columbia, USA	N1092

***Malva spec.*, Malve (*Malvaceae*):**

Die Samen von *Malva sylvestris* L. Wilde Malve und *Malva moschata* L. Moschusmalve stammen von der Firma Bornträger, Offstein.

***Rumex spec.*, Ampfer (*Polygonaceae*):**

Die Samen von *R. crispus* L. (Krauser Ampfer) und *R. obtusifolius* L. (Stumpfblättriger Ampfer) wurden von der Firma Bornträger, Offstein bezogen.

3.2. Anzuchtbedingungen***A. thaliana*:**

Die verschiedenen Ökotypen wurden in einer klimatisierten Anzuchtskammer (VB 101/S, Vötsch, Balingen) ohne Anschluss an Reinluft (Ozonkonzentration $< 20 \text{ nl l}^{-1}$) bei einer Temperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (Tag u. Nacht), einer relativen Luftfeuchte von $70 \pm 5 \%$ und einem 14stündigen Tag-Nacht-Zyklus (7-21:00 Uhr Licht mit einer Intensität von $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, PPFR 400-700 nm, Warmton und Daylight Lampen, Sylvania, Erlangen) angezogen.

Die Samen wurden in einer 4:1 (v/v) Mischung aus Floraton 1 Erde (Floragard, Oldenburg) und Sand ausgesät, mit Frischhaltefolie abgedeckt und zur Stratifikation (Induktion der Samenkeimung durch Kälte) für fünf Tage bei 8°C im Dunklen gehalten. Der verwendete

Sand war eine Mischung aus 3:1 (v/v) Kristall Quarzsand (dorsilit, Hirschau) und Schweissersand (dorsilit). Anschließend wurden die Pflanzen in der oben beschriebenen Anzuchtammer weiterkultiviert. Nach der Keimung wurden die Pflanzen zu je fünf in ein Töpfchen (5 × 5 cm, schwarz) pikiert. Vier Wochen nach Aussaat wurde mit den Versuchen begonnen; geerntet wurden jeweils ganze Blattrosetten.

Die restlichen Pflanzen wurden in einer mit Reinfluft versorgten Klimakammer (HPZ 90/50, Vötsch) mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14/10 h bei einer Lufttemperatur von 25/20 ± 2°C und einer konstanten relativen Luftfeuchte von 70 ± 5 % angezogen. Die Lichtphase begann um 6:00 Uhr MEZ, die Lichtintensität betrug auf Pflanzenhöhe ca. 120 µmol m⁻² s⁻¹ (Leuchtstoffröhren F96T12/CW/VHO/SS 195 W, cool white, Sylvania).

Die Samen der Pflanzen wurden auf Erde (Pater T-Erde) ausgebracht und bis zur Keimung mit Frischhaltefolie abgedeckt. Nach drei bis vier Wochen konnten die Keimlinge in Einzeltöpfe pikiert werden. Die Größe der Töpfe für Tomaten- und Malvenpflanzen betrug 11x11x12 cm, die runden Plastiktöpfe der Tabakpflanzen besaßen einen Durchmesser von 14 cm. Die Pflanzen wurden täglich mit deionisiertem Wasser von unten gegossen, sowie zweimal in der Woche mit Mineraldünger (100 ml pro Pflanze aus einer Stammlösung von 2,5 ml l⁻¹ Substral, Thompson, Düsseldorf) versorgt.

Übersicht über das Alter der verschiedenen Pflanzenarten zu Versuchsbeginn:

Pflanze	Alter der Pflanzen zu Versuchsbeginn in den Klimakammern	Alter der Pflanzen zu Versuchsbeginn in den Freilandversuchen
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4 Wochen	-
<i>Rumex acetosa</i>	5 Wochen	7 Wochen
<i>Rumex crispus</i>	5 Wochen	7 Wochen
<i>Rumex obtusifolius</i>	-	7 Wochen
<i>Malva moschata</i>	4 Wochen	-
<i>Malva sylvestris</i>	4 Wochen (5-6 Folgeblätter, Blatt 1 noch nicht voll expandiert)	7 Wochen (5-6 Folgeblätter, Blatt 1 noch nicht voll expandiert)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	6 Wochen (ca. 20-30 cm hoch, Blatt 1 > 5 cm)	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	9 Wochen (7-8 Folgeblätter; Blatt 1 > 8 cm)	9 Wochen (7-8 Folgeblätter; Blatt 1 > 8 cm)

Die Durchnummerierung der Pflanzenblätter erfolgte stets vom Apex in Richtung Wurzel.

3.3. Ernte

Von den *Arabidopsis*-Pflanzen wurden jeweils ganze Blattrosetten geerntet, von allen anderen Pflanzen jeweils einzelne, mittelalte Blätter, von Tomatenpflanzen Fiederblättchen. Von Tabak wurde meist eine Blatthälfte für Analysen, die zweite Hälfte zur Bonitur der Blattschäden verwendet (Material und Methoden Abschnitt 17). Das Blattmaterial wurde anschließend entweder mit entsprechenden Lösungen infiltriert (Material und Methoden Abschnitt 13) oder sofort in Aluminiumtüten verpackt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

4. Ozonbehandlung

4.1. Ozonbehandlung in den Expositionsküvetten

Expositionsküvetten:

In einer der Anzuchtskammer vergleichbaren Klimakammer (Raab und Thiele, München) befanden sich vier Plexiglas Küvetten (70x110x110 cm) für die Ozonbehandlung. Diese wurden mit Aktivkohle und Pural-Filter gereinigter Frischluft versorgt (Langebartels et al., 2000). In den Zuluftstrom konnte Ozon zudosiert werden. Ein schwenkbarer Ventilator pro Küvette sorgte für eine gleichmäßige Verteilung des Gases und für eine Verringerung des Grenzflächenwiderstandes der Blätter (Abb. 7). Die Windgeschwindigkeit betrug auf Pflanzenhöhe zwischen $0,3$ und $1,3 \text{ m s}^{-1}$. Über Teflonschläuche wurde Luft aus den Küvetten zu einem Ozonanalysator geleitet, so dass eine kontinuierliche Bestimmung der Ozonkonzentration in der unmittelbaren Nähe der Versuchspflanzen möglich war. Luftfeuchte, Temperatur und Lichtintensität entsprachen den Bedingungen der Anzucht.



Abb. 7: *M. sylvestris*-Pflanzen in einer der vier Ozon-Expositionsküvetten.

Ozonerzeugung und –analyse:

Die Ozonerzeugung erfolgte mit Hilfe eines Ozongenerators (Model 500, Fischer, Meckenheim) und reinem Sauerstoff durch elektrische Entladung (Langebartels et al., 1991). Die Bestimmung der Ozonkonzentration wurde UV-spektrometrisch mit einem Ozonanalysator (CSI 3100, Columbia Scientific Instruments, USA) durchgeführt. Die Istwerte wurden manuell über einen Massendurchflussregler (GSF, Neuherberg) an die Sollwerte angeglichen und von einem Schreiber (Lamman, Servokass 600) aufgezeichnet.

Ozonbehandlung der Pflanzen:

Alle Versuchspflanzen wurden am Abend vor dem Behandlungsbeginn in die Expositionsküvetten umgestellt, um eine Adaptation der Pflanzen zu ermöglichen.

Die Versuchspflanzen wurden in der Regel einer fünfstündigen Ozonbehandlung (9:00-14:00 Uhr) unterzogen und anschließend in Reinfluft weiterkultiviert. Die Ozonkonzentrationen betragen dabei zwischen 150 und 450 nl l^{-1} , je nach Pflanzenart. Die genauen Angaben finden sich bei der Beschreibung der einzelnen Versuche. Entsprechende Kontrollpflanzen erhielten gefilterte Frischluft ohne Ozonzusatz.

4.2. Ozonexposition im Freiland

4.2.1 Tabak

Drei in den Anzuchtskammern angezogene Pflanzen der Tabaksorte Bel W3 (neun Wochen alt) wurden im Sommer für 14 Tage (03.08.-16.08.99) im Freiland unter Schattierung im Pflanzgarten des Institutes kultiviert und bezüglich der Entwicklung von Blattschäden beobachtet. Zusätzlich wurde am Erntetag die Akkumulation von H_2O_2 (Material und Methoden Abschnitt 13.1) sichtbar gemacht. Während dieser Zeit herrschten maximale Ozonkonzentrationen von etwa 65 nl l^{-1} .

4.2.2 Exposition der Pflanzen in Open-top Kammern

Open-top Kammern

Auf dem Gelände des Instituts für Agrarökologie der FAL Braunschweig befand sich eine Anlage aus 24 Open-top Kammern, mit denen die Auswirkungen kontrolliert zugeführter Schadgase wie z.B. SO_2 , NO_2 und O_3 auf Wildpflanzen und auf die Produktionsleistung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen experimentell untersucht werden konnte (Weigel & Jäger, 1988). Der Durchmesser der Kammern betrug ca. 3,2 m und die Höhe belief sich auf 3,4 m. Dies führt zu einer Grundfläche von ca. $7,8 \text{ m}^2$ und einem Gesamtvolumen von ca. 26 m^3 . Die konusförmige Verengung am oberen Ende der Kammern und eine Dachabdeckung verminderten ein Eindringen von Außenluft und schlossen den natürlichen Niederschlag aus.

Die Kammern waren mit einer transparenten UV-stabilisierten Polyethylenfolie Typ SPR3 (POLY-DRESS, Neumünster) von 0,2 mm Dicke bespannt, deren Lichtdurchlässigkeit im Bereich der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) bei ca. 88-90 % lag.

Die durch den Einblasstutzen zugeführte Luft wurde zuvor über Aktivkohleplatten und Filtersysteme geleitet. Dies führte zu einer Reduktion gas- und partikelförmiger Schadstoffe. Die zu dosierenden Schadgase wurden über Dosierleitungen, die in die Gebläseeinheiten enden, in die Kammern geleitet. Eine detaillierte Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise der Kammern ist der Beschreibung von Weigel & Jäger (1988) zu entnehmen.

Durch das Schadgasdosiersystem (Messer-Griesheim, Duisburg) war eine kontrollierte Dosierung der je nach Versuchsaufbau erwünschten Schadgase möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit Ozon gearbeitet, das aus reinem Sauerstoff mittels

elektrischer Entladung (O₃-Generator Modell 503, Fischer) erzeugt wurde. Bei den hier verwendeten Generatoren handelte es sich um einen Proportional- und einen Konstantgenerator. Durch einen Massenflussregler (TYLAN) konnten die Ozonkonzentrationen in den Kammern so geregelt werden, dass sie dem Ozontagesgang der Umgebungsluft folgten.

Bei der prozentualen Anpassung der Ozonkonzentration in den Versuchskammern wurde die Ozonkonzentration einer NF-Kammer (**n**on **f**iltered), die mit ungefilterter Umgebungsluft versorgt wurde, als Referenz verwendet. Bei einer Dosierung von 100 % ergaben sich aber trotzdem unterhalb der Außenkonzentration liegende Werte, da sich die Konzentration des äußerst reaktiven Ozons bis zum Eindringen in die Kammern verringerte. Die Schadgaskonzentrationen jeder Kammer wurden mit einem Schadgasmeßsystem (Messer-Griesheim, Duisburg) geregelt und überwacht. Mit einer Probengas-Vorabsaugung wurden in Pflanzenbestandshöhe (50 cm) stündlich Proben der eingebrachten Luft aus den Kammern entnommen und analysiert. Die Ozonkonzentrationen wurden mittels UV-Absorption (Monitor Labs, Modell 8810) gemessen (Abb. 8). Die während des Betriebs der Anlage anfallenden Daten der Schadgaskonzentrationen der 26 Messstellen und der Klimastationen wurden von einem Datenerfassungssystem aufgezeichnet. (Weigel & Jäger, 1988).

Versuchsaufbau

Insgesamt wurden drei verschiedene Wildpflanzenarten (*R. obtusifolius*, *R. crispus*, *M. sylvestris*) zwei unterschiedlichen Ozonbehandlungen ausgesetzt. Die Ozonkonzentrationen waren wie folgt:

NF (non filtered): Die Ozonkonzentration dieser Kammer entsprach zu jedem Zeitpunkt in etwa der Ozonkonzentration der Umgebungsluft (Abb. 8). Geringfügige Abweichungen der Ozonkonzentration kamen durch die hohe Reaktivität des Ozons zustande.

NF+O₃: Die Ozonkonzentration der zweiten Behandlung entsprach einer Ozonkonzentration von ungefähr 1,7× der Ozonkonzentration der Umgebungsluft (Abb. 8).

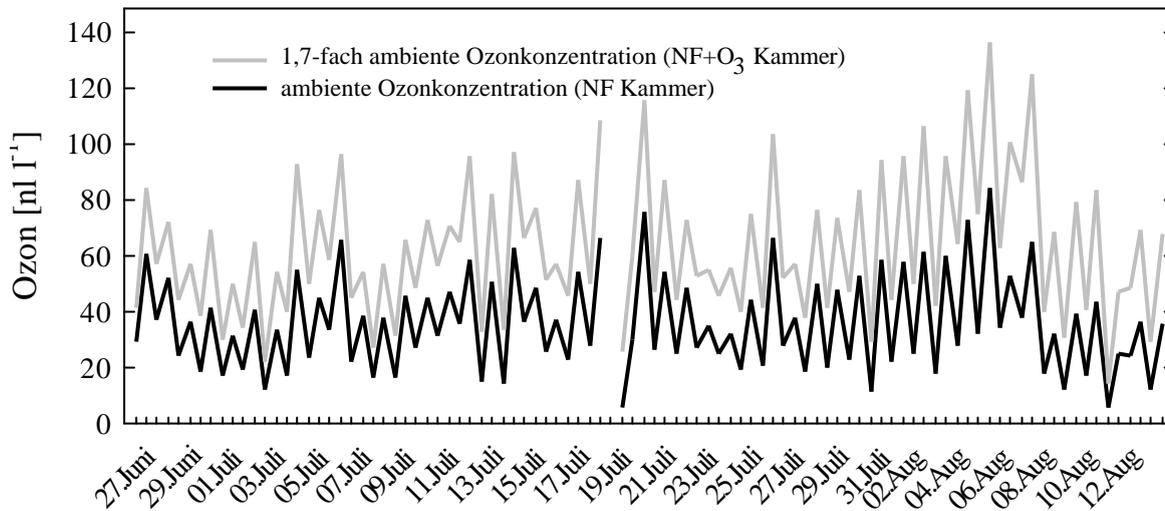


Abb. 8: Tagesmittelwerte (12 h) der Ozonkonzentration der Umgebungsluft und Ozonkonzentration der NF+O₃ Kammer (1,7× ambiante Ozonkonzentration) über den Versuchszeitraum vom 26.06.-12.08.1999, gemessen auf dem Gelände des Instituts für Agarökologie der FAL Braunschweig. Aufgrund einer Störung der Rechenanlage am 18. Juli keine Aufzeichnung der Ozonwerte.

5. Messung der stomatären Leitfähigkeit

Die stomatäre Leitfähigkeit wurde bei *M. sylvestris* nach Infiltration von Diphenyleniodonium (DPI), einem Inhibitor von flavinhaltigen Oxidasen wie NADPH-Oxidase, überprüft (Abb. 9). Damit sollte sichergestellt werden, dass die mit Inhibitor behandelten Pflanzen in der anschließenden Behandlung mit Ozon wie die entsprechenden Kontrollpflanzen die Stomata geöffnet hatten. Das Messgerät, ein CQP 130a Porometer (Walz, Effeltrich) konnte gleichzeitig stomatäre Leitfähigkeit, Transpiration, Nettphotosynthese, Lichtstärke, relative Luftfeuchte, Temperatur, Druck und CO₂-Gehalt der Umgebungsluft bestimmen. Alle Daten wurden online mit einem Computer aufgezeichnet. Die vorsichtig in den Messkopf eingespannte Blattfläche einer Malve betrug 10 cm². 1,5 h nach der Infiltration war die infiltrierte Flüssigkeit völlig verdunstet, und es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Transpirations- und Assimilationsrate sowie der stomatären Leitfähigkeit zwischen DPI-infiltrierten und unbehandelten Pflanzen.

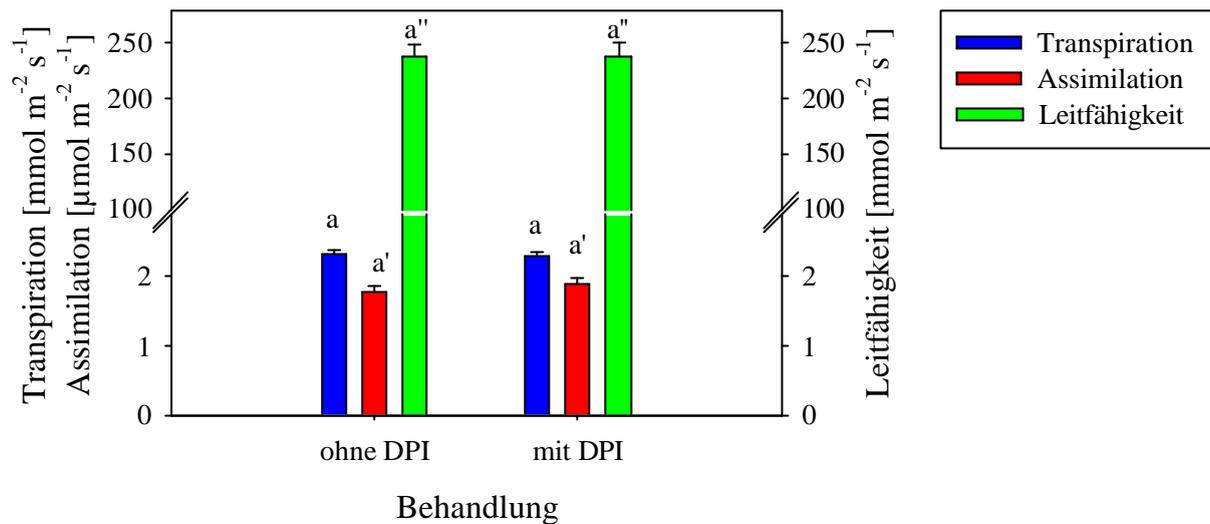


Abb. 9: Transpirations- und Assimilationsrate sowie stomatäre Leitfähigkeit der Blätter von *M. sylvestris* kurz vor Beginn der Ozonbehandlung. In einen Teil der Blätter wurde zuvor der Inhibitor von Flavin-haltigen Oxidasen, Diphenyliodonium (DPI), infiltriert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. (n=5).

6. Messung von Parametern der Ethylenbiosynthese

Die Ernte von Blattmaterial für die Messung von Parametern der Ethylenbiosynthese erfolgte immer zwei Stunden nach Beginn der Ozonbehandlung bzw. zu dem entsprechenden Zeitpunkt bei Kontrollpflanzen.

6.1. Bestimmung der Ethylenemission

Blattstücke oder ganze Blattrosetten mit ca. 100-300 mg von *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in mit Wasser angefeuchtete Filterpapiere eingerollt, in Glasröhrchen (Volumen $V = 6,5$ ml) gesteckt und diese mit Silikonsepten verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde 1 ml Gas mit einer Insulin-Einwegspritze (Becton Dickinson, Dublin, Irland) aus dem Röhrchen entnommen und in einen Gaschromatographen (AutoSystem XL, Perkin-Elmer, Überlingen) mit einer Porapak Q-Säule (Durchmesser 1/8“, Länge 60 cm) und einem Flammen-Ionisations-Detektor (FID) eingespritzt. Die Injektor-, Säulen- und Detektortemperaturen betragen 150, 40 und 200°C. Als Trägergas wurde Stickstoff (5.0, Linde, Unterschleißheim) mit einer Flussrate von 30 ml min⁻¹ verwendet. Die

Flussraten der für den Detektor benötigten Gase betragen 450 ml min^{-1} für synthetische Luft und 45 ml min^{-1} für Wasserstoff. Unter diesen Bedingungen betrug die Retentionszeit für Ethylen 0,75 Minuten, für Ethan 1,1 Minuten. Zur Umrechnung der gemessenen Ethylen-Flächeneinheiten in $\text{nmol g}^{-1} \text{ FG h}^{-1}$ wurde eine Eichung mit Ethylenstandardgas (1056, Messer, Griesheim) durchgeführt. 1 ml dieses Standardgases, welches 0,0641 nmol Ethylen entsprach, wurde drei Mal in den Gaschromatographen eingespritzt und der Mittelwert der erhaltenen Flächeneinheiten gebildet. Die Umrechnung der Probenkonzentrationen erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Ethylen [nmol g}^{-1} \text{ FG]} = 0,0641 \text{ nmol ml}^{-1} * \frac{\text{Fläche des Probenpeaks}}{\text{MW (Fläche des Eichgaspeaks)}} * \frac{6,5 \text{ ml}}{\text{Einwaage}}$$

0,0641 nmol Ethylen in 1 ml Standardgas

6,5 ml entspricht dem Gesamtvolumen der Glasröhrchen

Die Fläche des Eichgaspeaks wurde ermittelt aus drei Wiederholungen der Einspritzung von 1 ml Ethylenstandardgas.

6.2. Bestimmung des Gehalts an 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure

Das geerntete Pflanzenmaterial wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zum Zeitpunkt der Analyse bei -80°C gelagert. Die Bestimmung von 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) und Konjugaten (Gesamt-ACC minus freies ACC) erfolgte in Abwandlung nach Tuomainen et al. (1997). 200 mg in Stickstoff gemörserteres Blattmaterial wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 1,2 ml einer 2 %igen (v/v) Metaphosphorsäure und einer Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidonphosphat (PVPP) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 20100 g und 4°C für 15 Minuten wurden 1000 μl Überstand abgenommen, erneut zentrifugiert und ca. 900 μl Überstand bei -80°C aufbewahrt. Für die Bestimmung von ACC und Gesamt-ACC wurden jeweils 200 μl des Extraktes eingesetzt.

Für die ACC-Bestimmung wurde dem auf Eis gehaltenen Extrakt 500 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ und 100 μl einer 10 mM HgCl_2 -Lösung zugefügt und das Röhrchen gasdicht verschlossen. Die Umsetzung von ACC zu Ethylen erfolgte durch Zugabe von 200 μl Oxidationslösung (gesättigte NaOH-Lösung und NaClO-Lösung, Sigma, Deisenhofen im Verhältnis 1:3 v/v).

Die Messung erfolgte nach 13minütiger Inkubation unter kräftigem Schütteln mit dem Gaschromatographen wie für Ethylen (Material und Methoden Abschnitt 6.1) beschrieben.

Gesamt-ACC, bestehend aus freiem ACC und ACC-Konjugaten, wurde zunächst einer sauren Hydrolyse unterzogen (Zugabe von 40 µl 12 N HCl, 3 h bei 120°C). Diese wurde mit 240 µl 2 N NaOH nach dem Abkühlen gestoppt. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und 220 µl H₂O und 100 µl 10 nM HgCl₂ zugegeben. Die Umsetzung zu Ethylen erfolgte wie bei ACC mit Hilfe der Oxidationslösung, die Messung wurde in Abschnitt 6.1 beschrieben.

Der ACC-Gehalt berechnete sich wie folgt:

$$\text{ACC [nmol g}^{-1}\text{ FG]} = \frac{\text{Fläche des Probenpeaks}}{\text{MW (Flächen des Eichpeaks)}} * \text{ACC Standard [nmol]} * \frac{\text{Endvol. [ml]} *}{\text{Testvol. [ml]} *}$$

$$\frac{\text{Gasraum Reaktionsgefäß [ml]}}{\text{Testvol. Gas [ml]} * \text{Einwaage}}$$

Die Menge an konjugiertem ACC wurde durch Subtraktion des Gehalts an freiem ACC von der Gesamt-ACC-Menge berechnet.

7. Gewinnung von Apoplasten-Flüssigkeit aus Tabakblättern

Mittelalte Blätter der Tabakpflanzen wurden sieben Stunden nach Ozonbehandlung bzw. Kontrollpflanzen zu dem entsprechenden Zeitpunkt abgeschnitten, die Mittelrippe entfernt, gewogen und dann Vakuum-infiltriert mit 200 ml Acetat-Puffer (50 mM Natriumacetat, pH 5, 100 mM KCl, 5 mM DTE). Die infiltrierte Fläche betrug dabei ca. 80-90 % der Blattfläche. Anschließend wurden die Blätter vorsichtig mit Papiertüchern trocken getupft und mit der Schnittfläche nach oben und Blattunterseite nach außen 20 min bei 1000 g und 4°C in Eppendorf Variotips abzentrifugiert. Die Apoplasten-Flüssigkeit wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das Volumen der gewonnenen Flüssigkeit betrug ca. 300-500 µl g⁻¹ FG.

8. Nachweis phenolischer Inhaltsstoffe in der Apoplasten-Flüssigkeit von Tabakblättern als Hinweis auf cytosolische Verunreinigung

Wie von Möder (1999) gezeigt werden konnte, lassen sich bestimmte phenolische Inhaltsstoffe als cytosolische Marker einsetzen. So liegt der prozentuale, apoplastische Anteil phenolischer Verbindungen bei unbehandelten Kontrollen im Bereich der apoplastischen Aktivitäten cytosolischer Markerenzyme (Hexosephosphat Isomerase, Malat Dehydrogenase). Diese Bestimmung war für die Messung der Superoxiddismutase-Aktivität in der Apoplastenflüssigkeit nötig.

Wie in Material und Methoden Abschnitt 7 vorgestellt, wurde die Apoplastenflüssigkeit von Blatt vier und fünf von drei ozonbehandelten Pflanzen gewonnen, allerdings wurde der Acetatpuffer durch einen Citratpuffer (20 mM Citronensäure/Natriumcitrat, pH 4, 25 mM Ascorbat) ersetzt. Die gewonnene Flüssigkeit wurde mit Stickstoff bis zur Trockene abgeblasen, in 100 µl 75 %igem (v/v) Methanol gelöst und von dem klaren Überstand nach einer Zentrifugation 20 µl mit der HPLC (Beckman Gold 7.11) nach Turunen et al. (1999) analysiert:

UV-Detektor 166	Beckmann, München
Fluoreszenz-Detektor RF-535	Shimazu, München
Diodenarray-Detektor 168	Beckmann, München
RP-18 Spherisorb ODS-Säule	Bischoff, Leonberg

Gradientenprogramm:

Laufmittel A: 980 ml H ₂ O _{bidest.} ; 20 ml 5 % Ammoniumformiat in Ameisensäure		
Laufmittel B: 882 ml Methanol; 96 ml H ₂ O _{bidest.} ; 20 ml 5 % Ammoniumformiat in Ameisensäure		
Gradient:	0-5 min	100 % A
	5-45 min	auf 100 % B
	45-50 min	auf 100 % A
	50-60 min	100 % A

Aliquots von 10 μl wurden mit einem Probengeber (Model 231, Abimed) aufgetragen. Der Fluss betrug konstant 1 ml min^{-1} . Die Detektion der eluierenden Verbindungen erfolgte mit den oben genannten Detektoren unter den folgenden Bedingungen:

UV-Absorption bei 280 nm

Fluoreszenzdetektion (Anregung bei 300 nm und Emission bei 400 nm)

Diodenarray-Detektion zwischen 250 und 450 nm

Das Ergebnis dieser Messung ist in Abb. 10 dargestellt. In Gesamtblattextrakten treten drei Hauptkomponenten auf: neo-, krypto- und n-Chlorogensäure. Zusätzlich ist noch ein unbekannter Peak bei 28,97 min zu detektieren. Signifikante Unterschiede waren hier nicht zwischen Blatt 4 und 5 zu verzeichnen. Die Peaks in den Apoplastenflüssigkeiten erwiesen sich als deutlich geringer, dafür konnten aber mehr phenolische Inhaltsstoffe unterschieden werden, wovon die meisten jedoch nicht identifizierbar waren. Das Auftreten von Acetosyringon wurde schon von W. Möder beschrieben (Moeder, 1999). Die hohen Standardfehler bei der Apoplastenflüssigkeit von Blatt 4 beruhen auf den höheren Werten eines Blattes. Dieses zeigte bei der Gewinnung der Flüssigkeit, zum Zeitpunkt 7h nach Behandlungsbeginn, schon deutliche Schäden. Normalerweise werden die Läsionen erst später sichtbar. Bildete man das prozentuale Verhältnis zwischen den Konzentrationen der neo-, krypto- und n-Chlorogensäure aus der Apoplastenflüssigkeit zu den Gesamtblattextrakten, so betragen diese für Blatt 4 rund 4 %, für Blatt 5 etwa 2 %. Eine Berechnung ohne die Werte des stark geschädigten Blatt 4 würde in ähnlichen Ergebnissen wie bei Blatt 5 resultieren.

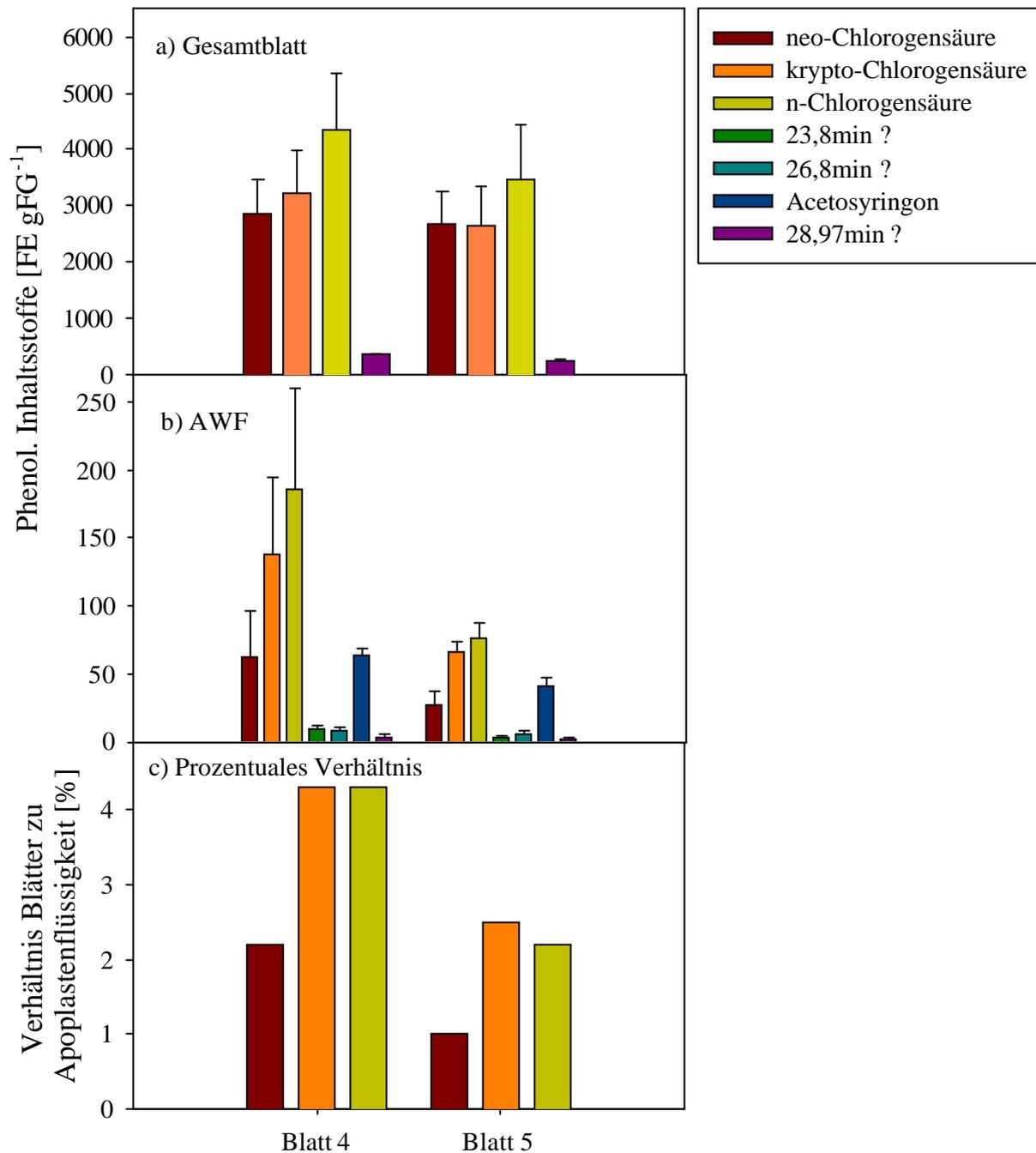


Abb. 10: Bestimmung der phenolischen Inhaltsstoffe in Ozon-behandelten Blättern der Tabaksorte Bel W3. Das prozentuale Verhältnis zwischen den verschiedenen Chlorogensäuren in der Apoplastenflüssigkeit und Gesamtblattextrakten gilt als Marker für die Verunreinigung der Apoplastenflüssigkeit durch cytosolische Substanzen. ? = unbekannte Verbindung. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. (n=3). R_T = Retentionszeit.

9. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

9.1. Aufkonzentrierung von Probenextrakten

Extrakte, die mittels Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt werden sollten, wurden für die meisten Versuche zunächst mit Hilfe von Centricon YM-10 oder YM-30 (Millipore, Eschborn) nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert.

9.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Um vergleichbare Mengen an Protein auf ein Polyacrylamid Gel aufzutragen, wurde davor der Proteingehalt jeder Probe nach Bradford (1976) bestimmt. Die Messung wurde an einem Microplate-Reader (Molecular Devices, USA) durchgeführt, der die Absorption der Proben bei 590 nm bestimmte. Die Auswertung (Abzug des Nullwertes, Berechnung der Eichgeraden und der Mittelwerte der Proteinkonzentrationen mit Standardabweichung) erfolgte durch die dazugehörige Software SOFTMAX.

9.3. Auftrennung von Proteinextrakten mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese

9.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Mit einer leicht veränderten Methode nach Laemmli (1970) wurden Proteine in einem diskontinuierlichen Tris-Puffersystem aufgetrennt. In der Mini-PROTEAN® II Cell (BioRad) wurden Gele einer Größe von ca. 7x8 cm mit folgender Zusammensetzung gegossen:

Trenngel:

Stammlösung	Volumen [μ l]		
	12,5 %	10 %	7,5 %
1,0 M Tris-HCl, pH 8,8	3375	3375	3375
Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	3750	3000	2250
10 % (w/v) SDS	90	90	90
50 % (v/v) Glycerin	225	225	225
H ₂ O	1500	2250	3000
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	45	45	45
TEMED	9	9	9

Sammelgel 5 %:

Stammlösung	Volumen [μ l]
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	600
Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	400
10 % (w/v) SDS	24
H ₂ O	1400
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	12
TEMED	2,4

Zur Vorbereitung wurde für alle Proben das Volumen für die gewünschte Menge an aufzutragendem Protein ermittelt und dann mit **Probenpuffer** (Laemmli-/Spalt-Puffer; 0,1 M Tris-HCl, pH 6,8, 20 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) im Verhältnis 2:1 gemischt und mit 9,1 % (v/v) Mercaptoethanol versetzt.

Für denaturierende Gele wurde die Mischung anschließend 6 min bei 95°C denaturiert, 5 min mit ca. 20000 g bei 4°C zentrifugiert und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gelagert. Davon konnten je nach verwendetem Kamm 10 bis 30 μ l auf das Gel aufgetragen werden.

Die Elektrophorese erfolgte mit einem Tris-Glycin-Puffer (**Laufpuffer**, 25 mM Tris, pH 8,4, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) ca. 1 Stunde mit 18 mA bei einem Gel und entsprechend 36 mA bei zwei Gelen.

Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde eine Coomassie-Färbung verwendet (0,05 % (w/v) Coomassie R-250, 5 Vol. Methanol, 1 Vol. Eisessig, 5 Vol. H₂O bidest). Die Gele

wurden 2-3 h bei RT oder 1h bei 50°C gefärbt, anschließend 2h bei RT mit Entfärberlösung (10 % (v/v) Eisessig, 10 % (v/v) Methanol in Wasser) entfärbt. Nach Entfärbung wurden diese Gele einige Zeit in Wasser gelagert und anschließend in Cellophan getrocknet.

Die Nachweisgrenze betrug mit dieser Methode mit BSA als Standardprotein ca. 100 ng pro Bande (F. Kaffarnik, mündliche Mitteilung).

9.3.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

a) Ohne Denaturieren der Proben

Von SDS-resistenten Proteinen wie dem Enzym Oxalatoxidase konnte nach einer Auftrennung in SDS-haltigen Gelen noch ohne Schwierigkeiten Aktivitäten bestimmt werden. Dazu wurde lediglich die SDS-Konzentration im Probenpuffer von 4 % auf 1 % gesenkt und auf das Hitzedenaturieren der Proben nach Zugabe des Probenpuffers und Mercaptoethanol verzichtet. Die Aktivitätsbestimmung wird in Material und Methoden Abschnitt 10 erläutert.

b) Ohne Denaturieren der Proben und ohne Zugabe von SDS in die Gele

Für Aktivitätsbestimmungen von SDS-sensitiven Enzymen (z.B. Superoxiddismutase, SOD) wurde auf Zusatz von SDS in allen Lösungen verzichtet und dieses Volumen durch Wasser ersetzt. Zusätzlich wurde auch hier keine Hitzedenaturierung durchgeführt und dem Probenpuffer kein Mercaptoethanol zugefügt.

10. Aktivitätsbestimmung von Oxalatoxidase

Der Aktivitätsnachweis erfolgte auf einer Nitrocellulose-Membran mit Hilfe einer Farbreaktion (Dumas et al., 1995; Zhou et al., 1998).

Von verschiedenen Tabaksorten wurde ein Test auf Oxalatoxidase Aktivität in der Apoplastenflüssigkeit sowie in Gesamtblattextrakten durchgeführt.

Zur Gewinnung der Apoplastenflüssigkeit wurden die entsprechenden Blätter mit Natrium-Acetat-Puffer infiltriert (50 mM Na-Acetat, pH 5,0, 100 mM KCl, 5 mM DTE (frisch)) und wie in Material und Methoden Abschnitt 7 beschrieben behandelt. Gesamtblattextrakte wurden durch Zugabe von 1 ml Na-Acetatpuffer auf 0,5 g gemörsertes Blattmaterial nach einer Inkubation von 10 min bei RT und anschließender Zentrifugation bei 20100 g für 10 min gewonnen. Diese Proben wurden mit Centricon YM-30 aufkonzentriert.

Nach Auftrennung der Proben durch ein natives 7,5 % SDS-Polyacrylamid Gel (nur 1% SDS im Probenpuffer; Proben wurden nicht Hitze-denaturiert) wurde dieses 1 h bei 12 V mit Hilfe einer Transblot SD Semi-dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRAD) auf eine Nitrocellulose-Membran 0,45 Micron (BioRAD) geblottet. Der Marker (Kaleidoscope Prestained Standards bzw. Prestained Precision Protein Standards, BioRAD) wies dabei einen vollständigen Transfer nach. Auf die Membran wurden anschließend 5 ml Substrat-Lösung (2 mM Oxalat, 50 mM Succinat, 3,5 mM EDTA, pH 4) und 3 ml Entwicklungs-Lösung (40 U Meerrettich-Peroxidase, 0,6 mg ml⁻¹ 4-Chlor-1-naphthol) gegeben. Nach etwa 10 min zeigte sich an der Stelle von Oxalat-Oxidase Aktivität eine Bande von blauvioletter Färbung. Hier setzte das Enzym Oxalat zu H₂O₂ um, welches anschließend mit der Peroxidase und dem 4-Chlor-1-naphthol die violette Bande hervorruft. Als Positivkontrolle diente Oxalatoxidase aus Gerste (Sigma), von der 8 µg pro Tasche auf das SDS-Gel aufgetragen wurden.

11. Aktivitätsbestimmung von Superoxiddismutase

Der Nachweis von Superoxiddismutase Aktivität wurde in einem „in-Gel-Assay“, mit Hilfe einer Farbreaktion nach Beauchamp & Fridovich (1971) durchgeführt. Dabei werden Superoxidradikale durch Starklicht-Exposition aus Riboflavin gebildet, die mit Nitroblautetrazolium (NBT) einen blau-violetten Farbkomplex bilden. An Stellen mit Superoxiddismutase-Aktivität werden entstehende Superoxidradikale sofort zu H₂O₂ dismutiert und können somit nicht mit NBT reagieren. Diese Stellen nehmen keine dunkelblaue Färbung an. Wie in Material und Methoden Abschnitt 10 wurde Apoplastenflüssigkeit mit einem Natrium-Acetatpuffer gewonnen und aufkonzentriert, jedoch mit einem Centricon YM-10 Konzentrator. Jeweils 25-35 µg Gesamtprotein wurden pro Spur auf einem 10 %igem, nativen Polyacrylamid-Gel aufgetragen und bei 25 mA und 4°C für etwa 2 Stunden aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit Wasser gewaschen und für 30 min in 100 ml Färbelösung inkubiert:

Lösung 1: 70 ml

20 mg Nitroblautetrazolium (NBT)

65 ml H₂O bidest.

200 µl 0,5 M EDTA

5 ml 1 M Kaliumphosphat (pH 7,8)

330 µl TEMED

Lösung 2: 30 ml

5 % (w/v) Riboflavin in H₂O bidest.

Anschließend wurde das Gel in Wasser gewaschen und unter Starklicht exponiert. Nach kurzer Zeit wurden weiße Banden auf violettfarbigem Hintergrund sichtbar.

Die verschiedenen SOD-Isoformen wurden durch den Gebrauch spezifischer Inhibitoren identifiziert (Sandalo & Rio, 1987). So waren die Cu/Zn- und FeSOD-Isoformen durch H₂O₂ hemmbar, die Cu/Zn-Isoform zusätzlich durch KCN, während die Mn-abhängige Isoform durch keine der beiden Chemikalien hemmbar war.

Inhibition mit H₂O₂:

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Wasser gewaschen und für 30 min in 10 ml Inhibitor-Lösung (1 ml 1 M K-Phosphat, pH 7,8, 40 µl 0,5 M EDTA, 6 µl 30 %iges H₂O₂) inkubiert, bevor das Gel in die oben genannte Färbelösung überführt wurde.

Inhibition mit KCN:

Hier setzte sich die 10 ml Inhibitor-Lösung aus 1 ml 1 M K-Phosphat, pH 7,8, 40 µl 0,5 M EDTA, 2 mM KCN zusammen. Nach einer Inkubation von 30 min wurde das Gel ebenfalls wie oben beschrieben gefärbt.

Die weißlich erscheinenden Aktivitätsbanden wurden fotografisch mit einem Image Master VDS (Amersham Pharmacia Biotech) festgehalten.

12. Bestimmung der Gehalte an Salicylsäure

Die Extraktion erfolgte nach einer modifizierten Methode von Meuwly & Métraux (1993). 0,2 g unter flüssigem Stickstoff homogenisiertes Blattmaterial wurde mit 5 ml 100 %igem Methanol für 30 Sekunden unter Schütteln extrahiert. Nach Zentrifugation bei 30000 g (10 min, 4°C) wurde das Pellet nochmals in 4 ml Methanol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die beiden Überstände vereinigt und das Lösungsmittel bei 38°C im Vakuum mittels eines Rotationsverdampfers (RE111, Büchli, Flawil, CH) abgezogen. Nach Aufnahme in 2 ml 20 %ige (v/v) Ameisensäure und Ansäuerung mit 50 µl 32 %iger (v/v) Salzsäure auf einen pH-Wert kleiner 1,5 wurden die Proben zweimal gegen Ethylacetat:Cyclohexan (1:1, v/v) ausgeschüttelt (5 und 3ml) und die vereinigte organische Phase im Vakuum einrotiert.

Die wässrige Phase wurde mit 1,3 ml 32 %iger Salzsäure auf 4N HCL eingestellt und dann in verschlossenen Pyrexgläsern für eine Stunde bei 80°C hydrolysiert. Die freigesetzten

Verbindungen wurden wie oben beschrieben zweimal gegen Ethylacetat:Cyclohexan ausgeschüttelt und anschließend einrotiert.

Die Proben wurden dann in 500 µl Laufmittel A, 20 % Methanol aufgenommen und nach Zentrifugation (20000 g, 5 min, 4°C) mittels HPLC aufgetrennt.

Die Quantifizierung erfolgte mit folgender HPLC-Anlage:

Intelligent Pump I 6200A	Merck/Hitachi, Darmstadt
Autosampler Basic Marathon	Spark, Holland
Fluoreszenz-Detektor RF-535	Shimazu, München
Chromato Integrator D 2500	Merck/Hitachi, Darmstadt
RP-C-18 Nucleosil-Säule	Bischoff, Leonberg

Gradientenprogramm:

Laufmittel A:	27 mM Natriumacetat, 30 mM Zitronensäure, pH 5,0	
Laufmittel B:	27 mM Natriumacetat, 30 mM Zitronensäure in 95 % Methanol	
Gradient:	0-20 min	100 % A
	20-25 min	auf 100 % B
	25-35 min	100 % B
	35-40 min	auf 100 % A
	40-45 min	100 % A

Aliquots von 20 µl wurden auf eine RP-C-18 Nucleosil-Säule aufgetragen. Der Fluss betrug dabei konstant 1,5 ml min⁻¹. Salicylsäure wurde mit dem Fluoreszenzdetektor bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 305 und 407 nm detektiert. Die Retentionszeit betrug ca. 11 min. Aus den Flächeneinheiten der Chromatogramme wurde mit Hilfe der folgenden Formeln die Gehalte an Salicylsäure (SA) berechnet:

Freie Salicylsäure:

$$\text{freie SA } \left[\frac{\text{nmol}}{\text{g FG}} \right] = 25 * 1,3 * 0,0724 * \frac{1}{\text{Einwaage [g]}} * \frac{\text{Fläche des Probenpeaks}}{\text{MW der Flächen der Standardpeaks}}$$

Wiederfindungsrate 75 %

Konjugierte Salicylsäure:

$$\text{konj. SA } \left[\frac{\text{nmol}}{\text{g FG}} \right] = 25 * 1,43 * 0,0724 * \frac{1}{\text{Einwaage [g]}} * \frac{\text{Fläche des Probenpeaks}}{\text{MW der Flächen der Standardpeaks}}$$

Wiederfindungsrate 70 %

Die Messung von Salicylsäure war über einen großen Konzentrationsbereich linear (Moeder, 1999).

13. Histochemische Detektion von reaktiven Sauerstoffverbindungen

13.1. Detektion von Wasserstoffperoxid mittels Diaminobenzidin-Färbung

Die Detektion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erfolgte an abgeschnittenen Blättern, Blattrossetten oder Blatthälften mindestens 30 Minuten, in der Regel zwei bis drei Stunden nach Beendigung der Ozonexposition mittels Vakuuminfiltration einer Färbelösung. Diese bestand aus: MES-Puffer 10 mM (Sigma) pH 6,5 (NaOH) und 0,1 % (w/v) 3,3'-Diaminobenzidin-hydrochlorid (DAB). DAB polymerisiert in Anwesenheit von H_2O_2 und Peroxidase Aktivität zu einem braunen unlöslichen Farbstoff. Schraudner et al. (1998) hatten mittels Co-Infiltration einen limitierenden Einfluss von Peroxidase bei der Entwicklung der DAB-Flecken in Tabak ausgeschlossen. Detektiert werden H_2O_2 Konzentrationen ab 0,1 μM , eine starke Farbentwicklung kann man ab 1-10 μM beobachten (Thordal-Christensen et al., 1997).

Der Infiltrationsschritt musste zwei bis drei Mal wiederholt werden. Die infiltrierten Blätter wurden danach 45 min ins Halbdunkel (keine direkte Lichtexposition) gestellt, bevor sie mit

96 % (v/v) Ethanol unter leichtem Erwärmen entfärbt wurden. Während der Puffer im Kühlschrank bis zu einer Woche haltbar war, musste der Farbstoff zum Schutz vor Auto-Oxidation erst kurz vor der Verwendung zugegeben werden.

Als Nachweis der Spezifität von DAB gegenüber H_2O_2 wurden manche Pflanzen gleichzeitig mit der Färbelösung mit Catalase infiltriert (100 U ml^{-1} , Rinderleber; 1 U setzt $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ pro min bei einem pH-Wert von 7,0 und 25°C um). Catalase setzt H_2O_2 zu H_2O und O_2 um, und es sollte dadurch zu einer deutlichen Verringerung der braungefärbten Blattfläche kommen.

13.2. Detektion von Superoxidanion-Radikalen mit Hilfe des Farbstoffs Nitroblautetrazolium

Die Detektion von Superoxidanion-Radikalen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) erfolgte analog zur H_2O_2 Detektion (Material und Methoden Abschnitt 13.1) durch Vakuuminfiltration einer Lösung aus 0,1 % (w/v) 4-Nitroblautetrazolium (NBT), 10 mM Natriumazid und 50 mM Kaliumphosphat, pH 6,4. NBT reagiert mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikalen zu blauem, unlöslichem Formazan (Doke & Ohashi, 1988). Die Inkubationszeit betrug im Gegensatz zu der H_2O_2 -Färbung nur 20 min und erfolgte im Dunkeln. Zum Nachweis der spezifischen Detektion der Superoxidanion-Radikale durch NBT (Baker & Orlandi, 1995) wurde in manchen Pflanzen gleichzeitig mit der Färbelösung Superoxiddismutase (Meerrettich) infiltriert (240 U ml^{-1} , Jabs et al., 1996). Durch SOD erfolgt eine Disproportionierung der Radikale zu H_2O_2 und O_2 , die Formazanbildung sollte folglich deutlich reduziert werden.

14. Histochemischer Nachweis von β -Glucuronidase Aktivität

Tabakpflanzen der Sorte Xanthi, die mit einem chimären Gen aus dem Promotor einer Weizen-Oxalatoxidase und dem Reporter gen β -Glucuronidase transformiert waren (zur Verfügung gestellt von Prof. F. Bernier, Strasbourg, F), sollten über die Lokalisation einer möglichen Enzym-Aktivierung durch Ozon Aufschluss geben. Dazu wurden abgeschnittene Blathälften nach einer fünfstündigen Ozonbehandlung und einer Weiterkultivierung in Reinluft von 2 bzw. 19 Stunden oder nur mit Reinluft behandelte Pflanzen mit folgendem Puffer Vakuum-infiltriert:

50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0

10 mM Na₂EDTA

0,1 % Triton X-100

0,1 mM Kaliumferricyanid FeII/FeIII Tetrakalium-hexacyanoferrat(II)/Trikalium-hexacyanoferrat (III) (1:1)

Als Substrat wurde 1 mM 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Glukuronsäure (X-Gluc, Biomol) zugesetzt. Anschließend wurden die Blätter über Nacht in dieser Lösung bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag über eine ethanolische Reihe (60, 80, 90, 95 %, v/v) entfärbt. An Orten der β -Glukuronidase-Aktivität bildete sich während der Inkubation nach oxidativer Dimerisierung des entstehenden Produktes ein blaues Präzipitat.

15. Infiltrationen verschiedener Substanzen in den Apoplasten

Um ein Auftreten verschiedener Substanzen im Apoplasten zu simulieren, wurden Lösungen mit einer Spritze ohne Kanüle (Einmalspritzen Omnifix Tuberkulin) vorsichtig von der Blattunterseite in den Interzellularraum infiltriert (Willekens et al., 1997). Die infiltrierte Lösung breitete sich um die Infiltrationsstelle im Mesophyll aus, was durch dunkle Verfärbung des Bereiches sichtbar wurde. Nach ca. einer Stunde war diese Verfärbung wieder verschwunden, was auf eine schnelle Aufnahme der Flüssigkeit in die Zellen bzw. Verdunstung schließen ließ.

Infiltration von Diphenyliodonium

DPI gilt als Hemmstoff von flavinhaltigen Oxidasen wie z.B. der NADPH-Oxidase (Jabs et al., 1996; Mithöfer et al., 1997). Mit dieser Substanz sollte die Superoxid-Akkumulation in *Arabidopsis* und *M. sylvestris* gehemmt werden. Dazu wurde in *Arabidopsis* eine 10 μ M wässrige Lösung und in *M. sylvestris* eine 7 μ M Lösung 2-3 Stunden vor Beginn der Ozonbehandlung mit einer Spritze in mittelalte Blätter infiltriert.

Infiltration von K252a

K252a (BioMol) ist ein Alkaloid des Bodenpilzes *Nocardopsis sp.* und inhibiert ein breites Spektrum von Proteinkinasen. Eine 0,5 μ M Lösung wurde wie DPI vor Beginn der Ozonbehandlung in Fiederblättchen der Tomatensorte Roma infiltriert.

Infiltration von reaktiven Sauerstoffspezies-bildende Systemen

Hierbei handelt es sich um zwei Systeme, die entweder H_2O_2 (Glucose/Glucose-Oxidase; Jabs et al., 1996) oder O_2^- (Xanthin/Xanthin-Oxidase; Overmyer et al., 2000) bilden.

Eingesetzt wurden folgende Konzentrationen in Wasser, pH 6,5:

G/GO: 10 mM Glucose, 25 U ml^{-1} Glucose-Oxidase (aus *Aspergillus niger*)

X/XO: 1 mM Xanthin, 0,2 U ml^{-1} Xanthin-Oxidase (aus Buttermilch)

1 U setzt 1 μmol Substrat in einer Minute bei einem pH-Wert von 5,1 (GO) bzw. 7,5 (XO) um. Als Kontrolle wurde Natriumphosphat infiltriert. Die Blätter wurden nach 2 h geerntet.

Infiltration des NO-Donors Natriumnitroprussid

Von Natriumnitroprussid (SNP) wurde eine 0,5 mM Lösung in die Blätter infiltriert. Geerntet wurde nach zwei Stunden Inkubationszeit.

16. Behandlung mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

10 ml eines Luria-Bertani-Flüssigmediums wurden mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* aus einer Glycerin-Stammkultur (Stammnummer 10604 der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) angeimpft und zur Vermehrung für 24 h bei 30°C in einen Schüttler gestellt. Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl der Übernachtskultur wurde eine Verdünnungsreihe in 10 mM MgSO_4 erstellt und die verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agarplatten aufgebracht. Die Lebendkeimzahl berechnet sich aus der Anzahl der gewachsenen Kolonien multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor. Betrug die Keimzahl z.B. $1 \cdot 10^7 \text{ cfu ml}^{-1}$ (colony forming units) und sollte ein Titer von $1 \cdot 10^6 \text{ cfu ml}^{-1}$ infiltriert werden, so wurden 7 ml der Bakteriensuspension bei 3220 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert, und das Bakterien-Pellet in 70 ml 10 mM MgSO_4 resuspendiert. Diese Lösung bzw. als Kontrolle eine reine MgSO_4 -Lösung wurde anschließend in Blatt 4 und 5 von Tabak Bel W3 infiltriert.

17. Bonitur der Blattschäden

Die Blattschäden wurden 24 oder 48 h nach Beginn der Ozonbehandlung visuell abgeschätzt als prozentualer Anteil der geschädigten Fläche an der Gesamtblattfläche. Die Bonitur erfolgte meist durch zwei voneinander unabhängige Wissenschaftler/-innen.

18. Mikroskopie

18.1. Vergleichende Auszählung der Stomata bei Blättern von *M. sylvestris* und der Tabaksorte Bel W3

Mit der Auszählung der Spaltöffnungen pro Flächeneinheit von *M. sylvestris* und der Tabaksorte Bel W3 sollte die Bestimmung des Verhältnisses der Stomata von Blattober- zu Blattunterseite berechnet werden. Von den Oberflächen von mindestens fünf verschiedenen, mittelalten Blättern wurde zunächst ein Nagellackabzug erstellt und an diesem die Anzahl der Stomata auf einer Fläche von $1,25 \text{ mm}^2$ ausgezählt:

Pflanze	Stomata Blattoberseite	Mittelwert	Stomata Blattunterseite	Mittelwert	Verhältnis Ober-/unterseite
Tabak	18	19	39	40,8	0,47
	21		37		
	19		41		
	17		42		
	20		45		
Malve	19	19,44	34	34	0,57
	20		31		
	17		37		
	22		32		
	21		36		
	18				
	19				
	19				
	20				

Beide Pflanzenarten besitzen amphistomatäre Blätter, Stomata sind sowohl auf der Blattober- als auch –unterseite zu finden. Bei Tabak ließen sich im Mittelwert 19 Spaltöffnungen pro $1,25 \text{ mm}^2$ auf der physiologischen Blattoberseite zählen, auf der Unterseite waren es ca. 41. Auf der gleichen Fläche befanden sich bei *M. sylvestris* ca. 19 Stomata auf der Oberseite und 34 auf der Blattunterseite.

18.2. Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie von Blattquerschnitten

Mit Hilfe von Blattquerschnitten ozonbehandelter Tabakpflanzen der Sorte Bel W3 sollte die Akkumulation von H_2O_2 auf histologischer Ebene lokalisiert werden. Dafür wurden die ozonbehandelten Pflanzen bzw. entsprechende Kontrollpflanzen eine Stunde nach Beendigung der Ozonexposition mit DAB (Material und Methoden Abschnitt 13.1) und alternativ mit dem Fluoreszenzfarbstoff OxyBurst Green $\text{H}_2\text{HFF BSA}$ ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in 10 mM MES-Puffer pH 6,5, Molecular Probes) infiltriert. Die Kopplung des letztgenannten Farbstoffs an BSA unterbindet freie Diffusion über intakte Membranen. Die von Hand angefertigten Blattquerschnitte wurden auf den Objektträgern in Ethanol entfärbt und danach an einem Axioskop (Zeiss, Oberkochen) im Hellfeld oder unter Fluoreszenz (Anregung: 488 nm, Detektion: >530 nm) betrachtet. Aufnahmen wurden mit 20facher oder 40facher Vergrößerung mit Hilfe einer Zeiss Mikroskop Kamera MC 100 gemacht.

Darüber hinaus wurden auch Blattquerschnitte Ozon-behandelter Malvenblätter mit der Hellfeldmikroskopie auf die Lokalisation der O_2^- -Radikale untersucht. Die Blätter wurden hierfür eine Stunde nach Ende der Ozonbehandlung mit NBT (Abschnitt 13.2) infiltriert und anschließend wie die Tabakproben behandelt.

18.3. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Methode der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie erlaubt das Betrachten einer ausgewählten Ebene innerhalb eines Objektes und ermöglicht somit auch die Arbeit mit Objekten, die für eine Untersuchung mit herkömmlichen Lichtmikroskopen zu dick sind. In einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop werden zunächst die von einer Laser-Lichtquelle einfallenden Strahlen gebündelt, so dass der Brennpunkt auf einen bestimmten Punkt definierter Tiefe im Objekt trifft. Das von diesem Punkt reflektierte Licht wird durch die Linse wiederum fokussiert, so dass es durch eine kleine Öffnung in der vor dem Detektor angebrachten Blende wandern kann. Die von den Bereichen ober- und unterhalb des betrachteten Punktes reflektierte Strahlung, deren Erfassung durch den Detektor zu einem unscharfen Bild führen würde, wird durch die Blende ferngehalten. Durch horizontale Bewegung des Brennpunktes im Objekt wird die gesamte Ebene Punkt für Punkt gescannt. Durch das Erfassen vieler paralleler Ebenen entsteht durch Verrechnung der Einzelbilder ein dreidimensionales Gesamtbild des Objekts (Hutzler et al., 1998).

Zur Visualisierung von H_2O_2 und NO in intakten Blattstückchen von ozonbehandelten Tabakpflanzen der Sorte Bel W3 oder entsprechenden Kontrollpflanzen wurden diese frühestens 0,5 h nach Beendigung der Ozonbehandlung (Material und Methoden Abschnitt 4.1) mit dem Fluoreszenzfarbstoff OxyBurst Green $\text{H}_2\text{HFF BSA}$ ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in 10 mM MES-Puffer pH 6,5, Molecular Probes) bzw. 4,5-Diaminofluoresceindiacetat (DAF-2DA, Alexis; $10 \mu\text{M}$ in 10 mM Tris/HCl pH 7,2) infiltriert. Anschließend wurden die Blattstückchen kurz in Puffer gewaschen, auf einen Objektträger gebracht und an einem Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen), angeschlossen an ein Zeiss LSM510 Laser Scanning Mikroskop bei 10- oder 40facher Vergrößerung angeschaut. Als Anregung diente ein Argon Laser der Wellenlänge 488 nm, die Fluoreszenz der Präparate wurde nacheinander in den Spektralbereichen 515-565 nm (Grün) und >590 nm (Rot) detektiert. Neben Einzel- und seriellen Aufnahmen wurden auch Zeitserien sich entwickelnder Läsionen festgehalten. Als Nachweis der Spezifität wurden in einigen Blattstückchen gleichzeitig mit den betreffenden Farbstoffen entweder Catalase (Rinderleber, 100 U ml^{-1} zusammen mit OxyBurst Green) oder der NO-Scavenger [2-(4-Carboxyphenyl)-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxid (PTIO, $100 \mu\text{M}$, zusammen mit DAF-2DA) infiltriert. Die Arbeiten zur Laser Scanning Mikroskopie wurden am Institut für Pathologie, Neuherberg, unter der Leitung von Dr. P. Hutzler durchgeführt.

19. Molekularbiologische Methoden

19.1. Häufig verwendete Medien, Puffer-Systeme und Lösungen

Die Lösungen wurden meist nach Angaben von Sambrook & Russell (2001) hergestellt.

Ampicillin:	100 mg ml^{-1} in H_2O
Luria-Bertani (LB)-Medium:	1 % (w/v) Bacto-Trypton, pH 7 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
SOC-Medium:	2 % (w/v) Bacto-Trypton, pH 7 0,5 % Bacto-Hefeextrakt 0,05 % (w/v) NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl_2

	10 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	20 mM Glucose
20xSSC:	0,3 M Na-Citrat, pH 7
	3 M NaCl
TBE-Puffer:	45 mM Tris-HCl, pH 8,3
	45 mM Borsäure
	1 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8
	1 mM EDTA

19.2. Sterilisation und RNase-Inhibition

Alle verwendeten Lösungen, Puffer, deionisiertes Wasser und Kunststoff-Utensilien wurden vor Gebrauch für 20 min bei 121°C autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Membranfilter sterilfiltriert. Lösungen für RNA-Analysen wurden mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert.

19.3. Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von U. Linzner (Institut für Pathologie, GSF Neuherberg) nach der Di-phosphoramidit-Methode unter Verwendung eines ABI Synthesizer 394 hergestellt. Die Sequenzen sind im Anhang angegeben.

19.4. Isolierung von Nukleinsäuren

19.4.1 Gesamt-RNA

19.4.1.1 Isolierung nach der TRIZOL-Methode

120 mg unter flüssigem Stickstoff gemörstertes Pflanzenmaterial wurde mit 1 ml TRIZOL (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und 10 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Hierzu wurden 200 µl Chloroform (Merck, Darmstadt) gegeben, gemischt und wieder 3min

inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) wurde die wässrige obere Phase abgenommen, erneut mit Chloroform versetzt und zentrifugiert. Auf die wässrige Phase wurden 500 µl Isopropanol pipettiert und die Mischung für mindestens 10 min auf Eis gestellt. Eine anschließende Zentrifugation (15000 g, 10 min, 4°C) pelletierte die RNA. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die RNA in 0,1 % (w/v) mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser aufgenommen und die jeweilige Konzentration photometrisch bestimmt.

19.4.1.2 Isolierung nach der RNA-Rapid Extraktionsmethode

Diese Extraktion erfolgte nach Kiefer et al. (2000) und wurde für die Proben der quantitativen RT-PCR-Analysen (Material und Methoden Abschnitt 19.10) herangezogen.

120 mg unter flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit 1 ml 65°C warmen Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8; 25 mM EDTA; 2 mM NaCl; 2 % (w/v) CTAB; 2 % (w/v) PVP; 0,5 % (w/v) Spermidin; 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Bei Wurzelmaterial wurde zusätzlich noch 0,5 % CaCl₂ zugefügt. Danach wurden 500 µl Chloroform und 100 µl Harz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) zugegeben und wieder gut gemischt. Anschließend wurde die Lösung 10 min bei RT auf einen Schüttler gestellt. Nach Zentrifugation bei 15000 g für 5 min und 4°C wurde der Überstand abgenommen und noch einmal mit 500 µl Chloroform behandelt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Nukleinsäuren gefällt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Für den folgenden DNase-Verdau wurde das Pellet zunächst in 44,5 µl Wasser gelöst und 5 µl DNase-Puffer (400 mM Tris-HCl, 60 mM MgCl₂, pH 7,5) sowie 0,5 µl DNase (Amersham Pharmacia) zugegeben. Dieses Gemisch wurde danach für 30 min bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde mit 50 µl Isopropanol gefällt und zentrifugiert, abschließend noch mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet wieder in 25-30 µl Wasser gelöst.

Die RNA wurde nach Bestimmung der Konzentration bei -80°C aufbewahrt.

19.4.2 Genomische DNA

Genomische DNA wurde mit Hilfe des Genome Clean Systems (Thermo Hybaid, Heidelberg) isoliert. Dafür wurde auf 0,3-0,6 g Pflanzenmaterial 600 μ l Lysispuffer (Puffer 1 aus dem Kit) gegeben und bei 68°C für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von 900 μ l Chloroform und gutem Mischen der Proben wurde bei RT und 9000 g für 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend abgenommen und mit 900 μ l Wasser und 100 μ l Präzipitationspuffer (Puffer 2) versetzt. Eine Zentrifugation für 5 min bei 17500 g und RT pelletierte die Nukleinsäuren. Das Pellet wurde in 300 μ l 1,0 M NaCl (Puffer 3) resuspendiert und mit 1 ml absoluten Ethanol gemischt. Abschließend wurde für 20 min bei RT und 17500 g zentrifugiert und das getrocknete Pellet in 50 μ l Wasser gelöst. Der Abbau der RNA erfolgte durch eine Behandlung für 20 min bei 37°C mit RNase A (5 μ l einer 10 mg ml⁻¹ Stammlösung).

Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei -20°C bzw. für einige Tage auch bei 4°C.

19.4.3 Plasmid DNA (QIAprep Spin)

In einer 5 ml LB/Ampicillin-Flüssigkultur (100 μ l ml⁻¹) wurden erfolgreich transformierte Zellen (Material und Methoden Abschnitt 19.12) bei 37°C und 250 rpm über Nacht vermehrt.

3 ml von dieser bakteriellen LB-Übernachtskultur wurden anschließend zur Isolierung der Plasmid DNA eingesetzt, welche exakt nach der Qiagen Anleitung (QIAprep Spin, Miniprep Kit) durchgeführt wurde. Die Plasmid DNA wurde zum Schluss mit 50 μ l Wasser eluiert und nach Konzentrationsbestimmung bei -20°C aufbewahrt oder direkt zum Sequenzieren gegeben.

Gleichzeitig wurden zusätzlich von den Übernachtskulturen Stammkulturen angelegt (850 μ l der Übernachtskultur + 150 μ l Glycerin) und bei -80°C gelagert.

19.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurden spektrophotometrisch (Utrospec 3100 *pro*, Amersham Pharmacia Biotech) durch Messung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm (Nukleinsäuren), $\lambda = 280$ nm (Proteine) und $\lambda = 320$ nm (kurze Nukleinsäurefragmente)

bestimmt. Eine Überprüfung der Ergebnisse für RNA erfolgte durch Auftragen von 1 µg RNA auf ein Agarose-Gel.

19.6. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in nicht-denaturierenden Agarose-Gelen

RNA und DNA wurden in Horizontalgelapparaturen (Easy-Cast, Erlangen) in 1 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Als Puffersystem diente TBE (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3). Für RNA-Elektrophorese wurde die Gelapparatur vor Gebrauch gut mit RNase ZAP (Biohit, Helsinki) gereinigt, um eine Kontamination mit RNasen auszuschließen. Zur Anfärbung der Nukleinsäuren wurde der Gellösung Ethidiumbromid ($0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$) zugefügt, so dass sie im UV-Durchlicht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) sichtbar waren. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 10 % (v/v) Probenpuffer (50 % TE pH 8,0, 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau) versetzt. Als Längenstandards wurden DNA Standards von MBBL (pBR328 Mix I, Bielefeld) bzw. MBI Fermentas (Gene RulerTM, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von $5-9 \text{ V cm}^{-1}$ für 1-2 h durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit einem Transilluminator (ImageMaster VDS, Amersham Pharmacia Biotech) dokumentiert.

19.7. Northern Analyse

Alle während der Northern Analyse verwendeten Geräte mussten als Schutz gegen RNasen zuvor gründlich mit RNase ZAP gereinigt werden.

19.7.1 Herstellung von spezifischen, mit Digoxigenin-dUTP markierten Sonden

Die Sonden wurden mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers aus 10 ng cDNA hergestellt. Folgendes Programm wurde verwendet, wobei sich die Annealing-Temperatur nach den spezifischen Primern der betreffenden Gene richtete:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
95	5	1
95	1	38
spezif. Temp.	0,5	
72	0,5	
72	10	1

Während der Amplifikation wurden in die Sonden DIG-dUTP eingebaut, die bei der späteren Detektion (Material und Methoden Abschnitt 19.7.5) durch die Anti-DIG-Antikörper erkannt wurden. Hergestellt wurden Sonden für die Detektion der Oxalatoxidase gf-2.8 (M63223), sowie für die D- und F-Isoform der NADPH-Oxidase aus Tabak. Die Primer sind im Anhang angegeben. Die Aufbewahrung der Sonden erfolgte bei -20°C .

19.7.2 Elektrophoretische Auftrennung der RNA in denaturierenden Gelen

Die RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Der hierzu verwendete Gelpuffer enthielt 20 mM MOPS (pH 7), 3 % (v/v) Formalin, 5 mM Na-Acetat und 1 mM EDTA. Die RNA-Proben (10 μg Gesamt-RNA) wurden vor dem Auftragen mit 0,8 Vol. Probenpuffer (20 mM MOPS pH 7, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, 1,5 % (v/v) Formaldehyd, 25 % (v/v) Formamid deionisiert, eine Spatelspitze Bromphenolblau) versetzt, für 10 min bei 65°C hitzedenaturiert, auf Eis gekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Horizontalgelapparaturen (Easy Cast) bei einer Spannung von $5\text{-}9\text{ V cm}^{-1}$ für 1-2 h. Als Laufpuffer diente eine Lösung aus 20 mM MOPS pH 7, 5 mM Na-Acetat und 1 mM EDTA. Anschließend wurden die Gele mit einem Transilluminator auf gleichmäßiges Auftragen der Proben überprüft.

19.7.3 Northern Blotting

Nach der denaturierenden Gelelektrophorese wurde das Gel kurz mit 20x SSC gewaschen und die aufgetrennte RNA mittels Kapillarblot (Sambrook & Russell, 2001) über Nacht auf eine Nylonmembran (Nylon membranes, positively charged; Roche) transferiert. Als Transferpuffer diente ebenfalls 20x SSC. Am nächsten Tag wurden die Membran und das Gel auf einen möglichst vollständigen Transfer überprüft und zur Dokumentation unter UV-Licht

fotografiert. Zur Fixierung der RNA wurde die Membran mit 254 nm UV-Licht bestrahlt (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, USA) und konnte in Folie eingeschweißt im Kühlschrank bis zur Hybridisierung aufbewahrt werden.

19.7.4 Hybridisierung der Transkripte

Zur Prähybridisierung wurden 10 ml Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb, Granules, Roche, Mannheim) mit der Membran in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben und bei 50°C mindestens 30 min in einem Hybridisierungsofen (Hybrid 2000, H. Sauer, Reutlingen) inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die hergestellten Dig-Sonden für 10 min bei 95°C denaturiert und ein Renaturieren durch sofortige Lagerung auf Eis verhindert. Die Hybridisierung erfolgte nach Zugabe von 3,5 µl Sonde in 1 ml Hybridisierungslösung bei 50°C über Nacht. Nach der Hybridisierung wurde die Membran für 2x 5min mit 2x SSC mit 0,1 % SDS bei RT, dann 2x 15 min mit 0,1x SSC und 0,1 % SDS bei 50°C gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundfärbung musste bei allen Schritten das Trockenfallen der Membran sorgfältig verhindert werden.

19.7.5 Detektion der Transkripte

Für die Detektion musste die Membran zunächst noch einmal für 2 min mit 10x Waschpuffer (Roche) gewaschen werden, anschließend wurde sie für 30 min in einer 1%igen Blockierlösung (Roche) inkubiert. Die Antikörperbindung erfolgte während einer 30minütigen Inkubation der Membran mit der in der Blockierlösung 1:10000 verdünnten Antikörperlösung (Anti Dig-AP, Roche). Danach wurde die Membran wieder 2x für je 15 min mit Waschpuffer gewaschen. Für die anschließende Äquilibration wurde die Membran für 2 min in 3 ml Detektionspuffer (Roche) gegeben. Während der 5minütigen Inkubation der Membran in Lumineszenz-Reagenz CSPD (Roche), katalysierte das an den Antikörper gekoppelte Enzym alkalische Phosphatase die Umsetzung des Lumineszenz-Reagenz zu Lichtenergie. Vor der Exposition wurde die feuchte Membran in eine Plastikhülle eingeschweißt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde der Film in einer Röntgenkassette für 30-120 min der Membran exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte mit Hilfe einer Filmentwicklungsmaschine Curtix 60 (Agfa-Gevaert, Leverkusen).

19.8. cDNA-Synthese

Alle Reagenziensysteme für die cDNA-Synthese wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Jeweils 5 µg der in Material und Methoden Abschnitt 19.4.1 isolierten Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Dabei wird die Erststrang cDNA-Synthese von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) katalysiert. Für die Initiation der Synthese wurde ein oligo(dT)-Primer (12-18 Nukleotide) benutzt, der an den poly(A) Schwänzen der 3'-Enden von eukaryotischen mRNA Molekülen bindet. Um den Abbau von RNA durch RNasen zu verhindern, wurde ein RNase Inhibitor (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben.

5 µg der isolierten Gesamt-RNA wurden zusammen mit dem oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die reverse Transkription wurde für 60 min bei 42°C nach Zugabe von 200 U Superscript II, 1x Puffer, 10 mM DTT, 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie 20 U RNase Inhibitor durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Inkubation von 10 min bei 70°C beendet. Daran angeschlossen erfolgte ein Verdau der RNA durch Zugabe von 2 U DNase-freier RNase H (Amersham Pharmacia Biotech) und 50 µg RNase A bei 37°C für 20 min. Für quantitative RT-PCR-Analysen mit gleichzeitiger Amplifikation einer Bezugsbande als relativer Standard wurde in jede Probe vor der cDNA-Synthese als interner Standard 2,5 µl pAW109 RNA (Perkin Elmer) dazugegeben.

19.9. Quantifizierung der cDNA

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mit Hilfe des RiboGreenTM RNA quantitation kits (Molecular Probes) nach Kiefer et al. (2000) durch ein Fluoreszenzphotometer (Fluorostar microplate reader, Tecan). Dafür wurde die einzelsträngige cDNA 1:100 in TE-Puffer verdünnt und jeweils 100 µl der verdünnten Probe mit 100 µl des 1:2000 in TE verdünnten RiboGreenTM Reagenz versetzt und gegen eine Standardkurve vermessen (Anregung: 480 nm, Emission: 520 nm).

19.10. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

19.10.1 Design der Primer

Alle eingesetzten Primer besaßen eine Länge von 20-26 Basen.

Primer für Germin-ähnliche Proteine:

Zunächst wurden degenerierte Primer mit Hilfe ansequenzierter Peptide eines Proteins aus der Tabaksorte Bel B mit Ähnlichkeit zu Germin-ähnlichen Proteinen entwickelt. Zusätzlich wurden degenerierte Primer in konservierte Regionen bekannter Germin-ähnlicher Proteine aus *Solanum tuberosum* L. (AF067731) und *L. esculentum* (AW035078) gelegt sowie spezifische Primer für das Gen *Nectarin* (AF132671) aus Tabak entworfen.

Primer für NADPH-Oxidase:

Diese Primer wurden in Anlehnung an bekannte Sequenzen pflanzlicher Isoformen der NADPH-Oxidase (*A. thaliana*, *Oryza sativa* L., *Potamogeton crispus* L., und besonders *L. esculentum*) zunächst degeneriert, dann spezifisch entworfen. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang angegeben.

19.10.2 PCR-Amplifikation

Alle Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt, welches sich aus 1x Reaktionspuffer, 0,2 mM dNTPs, 2,5 U DNA Polymerase, 0,2 µM Primer (forward und reverse), 1 µl bzw. 10 ng cDNA-Probe und sterilem Wasser zusammensetzte.

In Abhängigkeit der Primer, der Größe und der Expression des betreffenden Gens wurde folgendes Programm in Annealing-Temperatur, Extensionszeit und Zyklenzahl angepasst:

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	26-40
Annealing	spezifisch für Primer	0,5	
Extension	72	0,5-3	
Extension	72	10	1

Für die Amplifikation von Nukleinsäuren mit unspezifischen Primern wurde häufig eine „Touch down“-Methode eingesetzt:

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	9
Annealing	spezifisch für Primer dann jeden Zyklus 1°C weniger	0,5	
Extension	72	0,5-3	
Denaturierung	95	1	30
Annealing	spezifisch für Primer	0,5	
Extension	72	0,5-3	
Extension	72	10	1

Quantitative RT-PCR-Analysen:

Quantitative RT-PCR-Analysen wurden nach zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Die erste Methode beruhte auf dem Einsatz von 10 ng quantifizierter cDNA (Material und Methoden Abschnitt 19.9) pro PCR-Ansatz. Bei der zweiten Variante wurde den 5 µg RNA jeder Probe vor der cDNA-Synthese ein artifizieller RNA-Standard (pAW109 RNA, Perkin Elmer) zugefügt (Wang et al., 1989). Aus dieser Gesamt-cDNA wurde 1 µl pro PCR eingesetzt. Neben den Primern für das untersuchte Gen mussten diesem Ansatz zusätzlich 0,5 µl des Primerpaares DM151 und DM152 (siehe Anhang) zur Amplifikation des artifiziellen, internen Standards zugefügt werden.

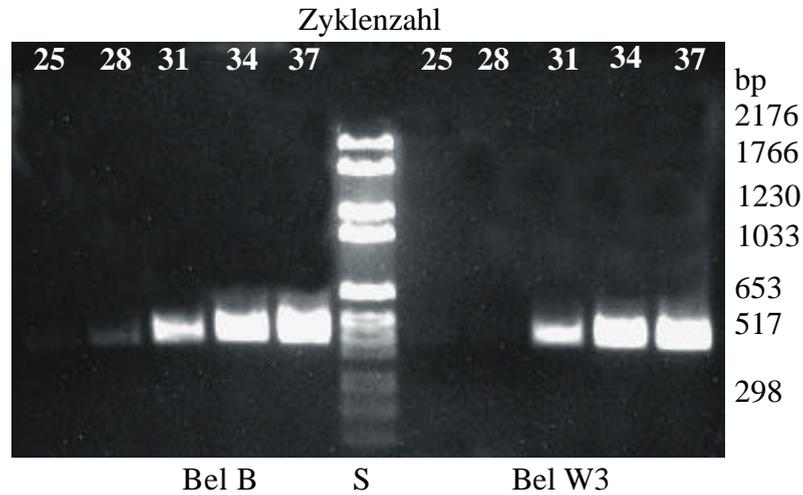
In beiden Fällen wurde zunächst die optimale Zyklenzahl der PCR-Analysen für das zu untersuchende Gen ermittelt. Die Amplifikation von Transkripten folgt einer sigmoidalen Sättigungskurve. Quantitative Expressionsanalysen machen keinen Sinn im Sättigungsbereich, sondern nur in der linearen Phase, wo Unterschiede zwischen den Behandlungen sichtbar werden. Je stärker ein Gen exprimiert wird, desto schneller wird diese Sättigung in einer PCR erreicht.

Beispielhaft wird die Bestimmung für die erste Methode gezeigt (Abb. 11).

Diese erfolgte, indem mehrere PCR-Ansätze der gleichen cDNA nach unterschiedlicher Anzahl von PCR-Zyklen quantifiziert (siehe Abschnitt 19.10.3) und die Konzentration als

Kurve aufgetragen wurden. Hieraus wurde eine Zyklenzahl ausgewählt, die sich im linearen Bereich der Kurve befand.

a)



b)

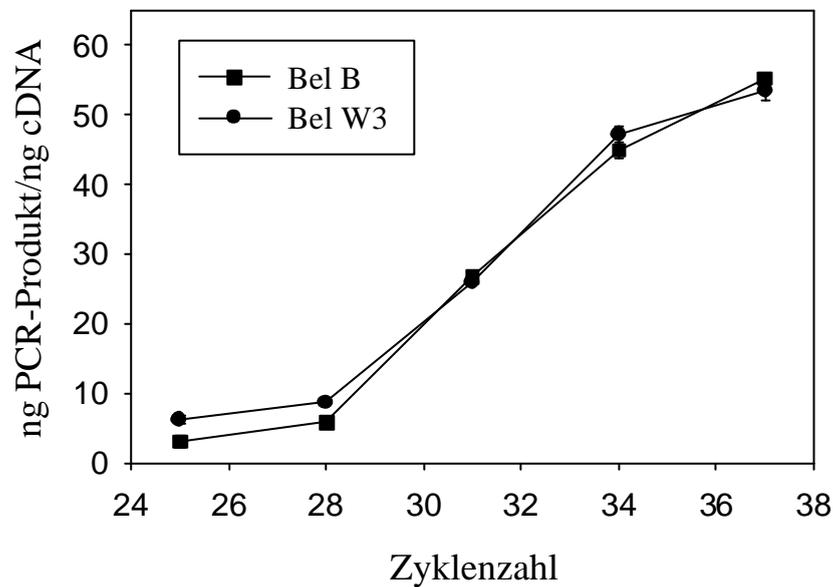


Abb. 11: Bestimmung der optimalen Zyklenzahl für eine quantitative RT-PCR-Analyse, hier am Beispiel der Primer für die F-Isoform der NADPH-Oxidase. Jeweils 10 ng derselben cDNA wurden mit verschiedenen Zyklenzahlen amplifiziert. In a) ist das Ergebnis optisch auf einem Ethidium-Bromid gefärbten Agarose-Gel zu sehen, die Grafik in b) zeigt das Resultat der fluorimetrischen Quantifikation.

19.10.3 Quantifizierung der PCR-Produkte

Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte in Abhängigkeit der verwendeten Methode der quantitativen RT-PCR-Analyse. Beim Einsatz von 10 ng cDNA pro PCR-Ansatz wurden die PCR-Produkte wie die cDNA über einen Fluoreszenzfarbstoff photometrisch vermessen. PicoGreen (Molecular Probes) stellt ein Fluorochrom dar, welches selektiv an doppelsträngige DNA bindet und auch noch geringe DNA-Mengen nachweisen kann. Der Farbstoff wurde 1:200 mit TE-Puffer verdünnt und 100 µl davon mit 100 µl entsprechend verdünnter Probe (1:100-1:500) in einer Microtiterplatte gemischt. Die Vermessung wurde bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission bei 520 nm gegen eine DNA-Standardkurve in einem Fluoreszenz-Photometer durchgeführt.

Beim Einsatz eines artifiziellen Standards wurden 40 µl jedes PCR-Ansatzes auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die relativen Bandenintensitäten mit Hilfe eines Transilluminator (ImageMaster VDS, Amersham Pharmacia Biotech) und der dazugehörigen Software (ImageMaster 1D Elite, Amersham Pharmacia) bestimmt. Zunächst wurde jeweils der Quotient der Bandenintensität des untersuchten Gens durch die Intensität der Bande des artifiziellen Standards einer Probe berechnet. Alle Quotienten wurden schließlich in Relation zu dem der Kontrollprobe gesetzt und dadurch die relativen Induktionen bestimmt.

19.11. Elution von DNA aus Agarose Gelen

Zur Elution von DNA aus Agarose Gelen wurde der Agarose Gel DNA Extraction Kit von Roche verwendet. Die DNA wurde abschließend in 20 µl Wasser eluiert.

19.12. Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

19.12.1 Ligation

Die Ligation der eluierten PCR-Produkte in einen Vektor erfolgte mit Hilfe des pGEM-T Vector Systems (Promega) nach leicht verändertem Protokoll.

Ligationsansatz:

7,5 μ l 2x Rapid Ligation Buffer

1 μ l pGEM-T Vector

5,5 μ l PCR-Produkt

1 μ l T4 DNA Ligase

Die Ligation wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt.

19.12.2 Transformation

Bei der Transformation wurde ebenfalls dem Protokoll von Promega mit nur kleinen Veränderungen gefolgt. So wurden anstelle von 2 μ l des Ligationsansatz die gesamten 15 μ l eingesetzt und nicht nur 100 μ l, sondern auf einer zweiten LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal Platte (Ampicillin 100 μ g ml⁻¹, 20 μ l IPTG 0,1 M, 50 μ l X-Gal 20 mg ml⁻¹ in N,N-dimethylformamid) zusätzlich noch 250 μ l der Transformationskultur ausplattiert. Von den wachsenden Kolonien wurden stets mehrere gepickt und das Vorhandensein des Inserts mit einer PCR-Analyse bestätigt.

19.12.3 Sequenz-Analysen

Von jedem ausgeschnittenen PCR-Produkt wurden wenn möglich drei verschiedene Klone jeweils zum Sequenzieren gegeben. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Toplab, München. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit den Software Programmen DiAlign von Genomatix (<http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>), Blast vom National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Vector NTI (InforMax Inc.) und ExPASy Proteomics tools (<http://www.expasy.ch/tools>).

20. Statistik

Ergebnisse dieser Arbeit, die mit Fehlerbalken angegeben wurden, sind aus Experimenten mit $n = 3$ Parallelen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm Standardfehler (S.E.). Vergleiche von Datengruppen auf signifikante Unterschiede, sowie lineare Regressionen wurden mit dem Programm StatGraphics Version 2.6 nach dem „Least Significant Difference“ (LSD)-Test durchgeführt.

III. Ergebnisse

1. Vergleichende Untersuchungen zur Ozonempfindlichkeit der Tabaksorten Bel B und Bel W3

Zunächst sollte im Rahmen dieser Arbeit die seit 1962 als Bioindikator für erhöhte Ozonwerte verwendete Tabaksorte Bel W3 (Heggestad, 1991) mit der Ozon-toleranten Sorte Bel B bezüglich der Entstehung von Blattschäden, auch als Läsionen bezeichnet, und der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies verglichen werden. Die Analyse phytotoxischer Effekte von Ozon konnte durch Vergleiche zwischen toleranten und empfindlichen Pflanzen in den letzten Jahren deutlich verbessert werden (Moeder et al., 1999; Wellburn & Wellburn, 1996).

Die Zeitangaben beziehen sich bei allen Behandlungen auf den Beginn der Ozonexposition, welcher den Zeitpunkt 0 darstellt.

1.1. Charakterisierung der Blattschäden

Wie aus der Literatur (Heggestad, 1991) bekannt, zeichnen sich die beiden Tabaksorten Bel B und Bel W3 durch unterschiedliche Ozonempfindlichkeiten aus. Schon ambiente Ozonkonzentrationen führen bei der Sorte Bel W3 zu der Entwicklung von Blattschäden, während die Sorte Bel B relativ Ozon-tolerant ist und noch keinerlei Symptome zeigt.

In dieser Arbeit wurden beide Sorten in Kammerversuchen in der Regel für fünf Stunden mit 185 nl l^{-1} ($\pm 8 \text{ nl l}^{-1}$) Ozon behandelt. Zum Zeitpunkt der Behandlung waren die Pflanzen ca. neun Wochen alt und besaßen sechs bis sieben Folgeblätter. Als Blatt 1 wurde das jüngste Blatt mit einer Blattlänge von 8cm oder mehr bezeichnet. Wie in Abb. 12 deutlich zu erkennen, führt eine solche Ozonbehandlung nur bei der Sorte Bel W3 zu der Entstehung von Blattschäden. Diese lassen sich gegen Ende der fünfständigen Behandlung schon als sog. „water-soaked areas“, d.h. etwas dunklere, wie mit Flüssigkeit gefüllt wirkende Stellen, erkennen und entwickeln sich dann im Laufe von weiteren 12 Stunden zu punktförmigen, weißlich-pergamentartigen Stellen.



Abb. 12: Vergleich der Symptomausprägung Ozon-behandelter Blätter der Tabaksorten Bel B und Bel W3. Pflanzen beider Tabaksorten wurden 5 h mit $185 \text{ nl } \Gamma^{-1}$ Ozon behandelt. Die Aufnahmen der Blätter erfolgten 48 h nach Beginn der Ozonbehandlung.

In Abb. 13 ist die Abhängigkeit der Blattschäden der Sorten Bel B und Bel W3 von der Dauer der Ozonexposition dargestellt. Während einer fünfstündigen Ozonbehandlung mit $185 \text{ nl } \Gamma^{-1}$ wurden zu jedem dargestellten Zeitpunkt drei Pflanzen aus der Ozonbehandlung herausgenommen und in Reinluft bis zur Bonitur der Blattschäden 48h nach Beginn der Behandlung weiterkultiviert. Dies bedeutet, dass die Pflanzen zu den Zeitpunkten 5 h, 6 h und 8 h alle 5 h behandelt wurden und anschließend 43 h in Reinluft standen. Die Kontrollpflanzen befanden sich über die gesamte Versuchszeit in Reinluft. Während die Blätter der Kontrollen und auch der ozonbehandelten toleranten Sorte Bel B keine Schäden aufwiesen, zeigte sich bei der Sorte Bel W3 ein kontinuierlicher Anstieg der geschädigten Blattfläche mit zunehmender Dauer der Ozonexposition bis zum Zeitpunkt 4 h, zu dem etwa 8-9 % der gesamten Blattfläche Schäden hatte. Obwohl die Pflanzen vom Zeitpunkt 5 h eine Stunde länger exponiert waren, zeigten sie etwas weniger Blattschäden. Zu erwarten wäre hier ein Wert zwischen 10 und 11 % Schäden, wie bei den gleichbehandelten Pflanzen der Zeitpunkte 6 und 8 h. Dieses weist darauf hin, dass Schwankungen zwischen den Pflanzen bezüglich der Ausbildung von Blattschäden auftreten können. Die Blätter der Sorte Bel W3 sind im Durchschnitt nach einer 5stündigen Ozonbehandlung mit $185 \text{ nl } \Gamma^{-1}$ zu etwa 10 % geschädigt.

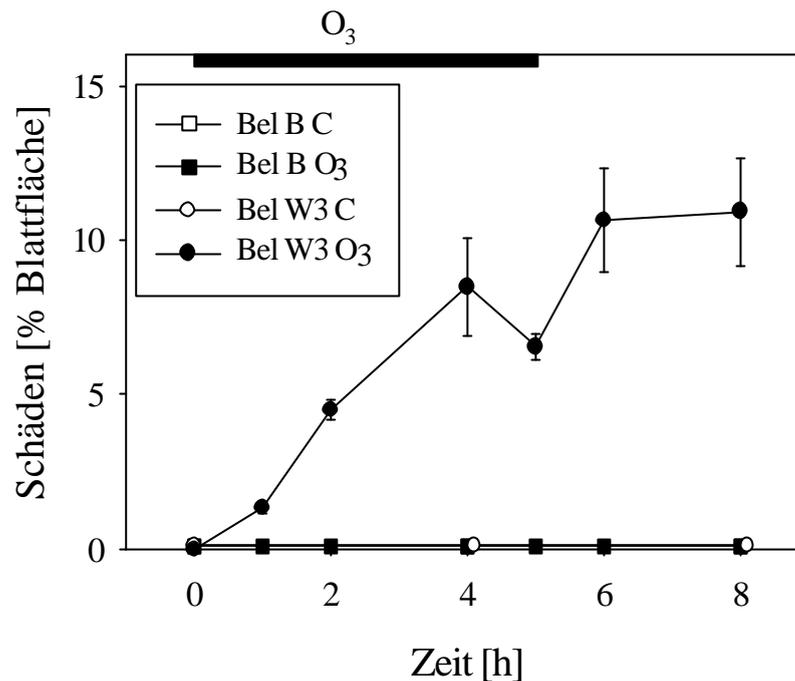


Abb. 13: Abhängigkeit der Blattschäden von der Dauer der Ozonexposition (insgesamt 5 h, 185 nl l^{-1}). Zu jedem dargestellten Zeitpunkt wurden drei Pflanzen aus der Ozonbehandlung genommen und in Reinluft weiterkultiviert. 48 h nach Beginn der Behandlung wurden alle Blätter bonitiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SE ($n=3$).

1.2. Vergleich der Entstehung von Blattschäden mit der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies

In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise, dass reaktive Sauerstoffspezies in engem Zusammenhang mit etwas später auftretendem Zelltod stehen, z.B. bei inkompatiblen Reaktionen von Pflanzen gegenüber eines Pathogens. Die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies während und nach einer Ozonbehandlung im Apoplasten von Tabak wurde schon von Schraudner et al. (1998) gezeigt.

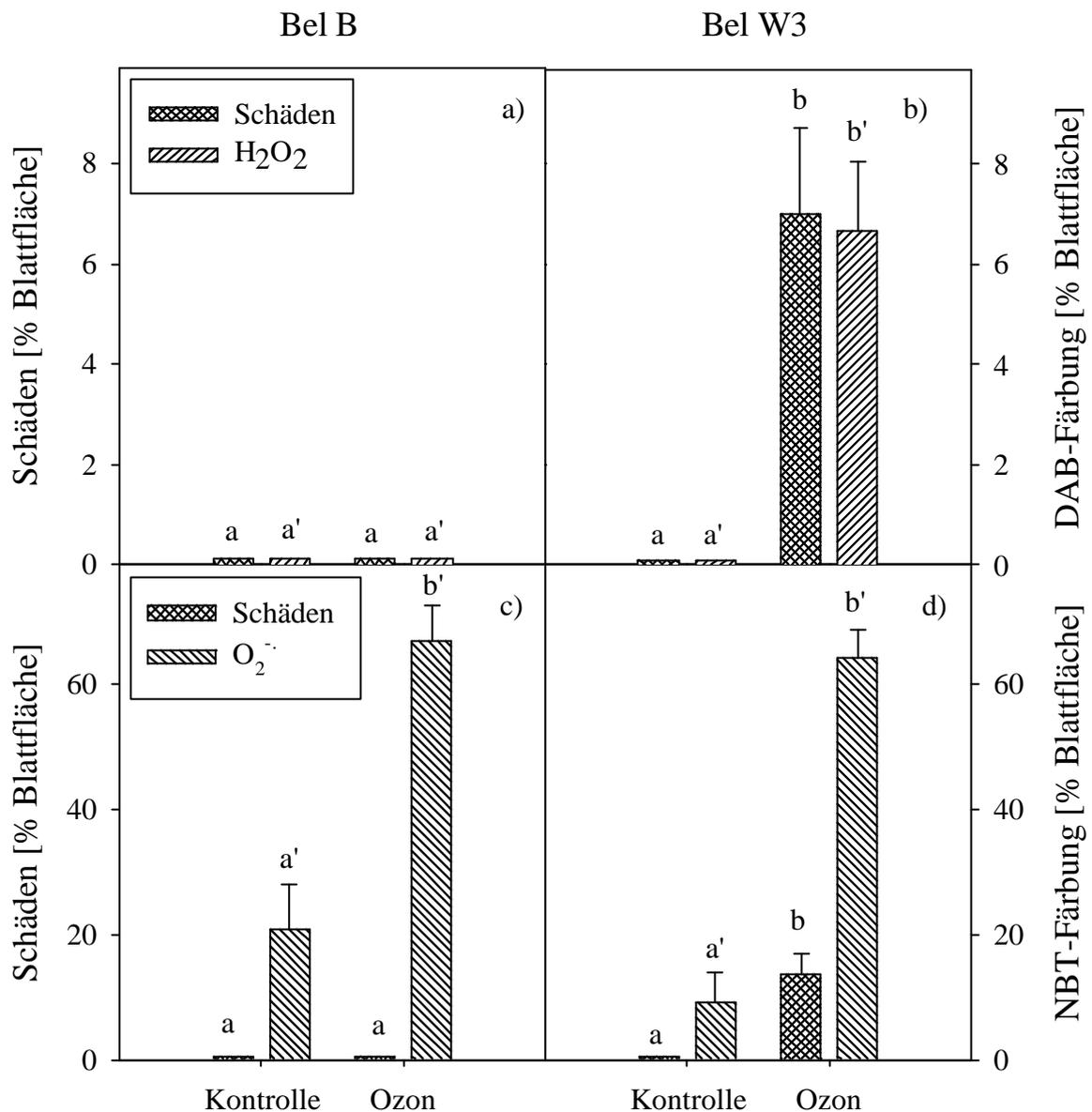


Abb. 14: Quantitativer Vergleich des Auftretens von Blattschäden mit der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies bei den Tabaksorten Bel B und Bel W3. Von Kontroll- und Ozon-behandelten (5 h 185 nl l⁻¹) Pflanzen wurde nach 7 h jeweils eine Blatthälfte mit dem Farbstoff DAB (H₂O₂) bzw. NBT (O₂^{-•}) gefärbt, die andere Blatthälfte bis zur Bonitur der Schäden nach 48 h an der Pflanze stehen gelassen. Gezeigt sind Mittelwerte ± S.E. (n=3). In a) und b) sind vergleichend Blattschäden und DAB-Färbung dargestellt, in c) und d) Blattschäden und NBT-Färbung. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nach dem LSD-Test nicht signifikant verschieden.

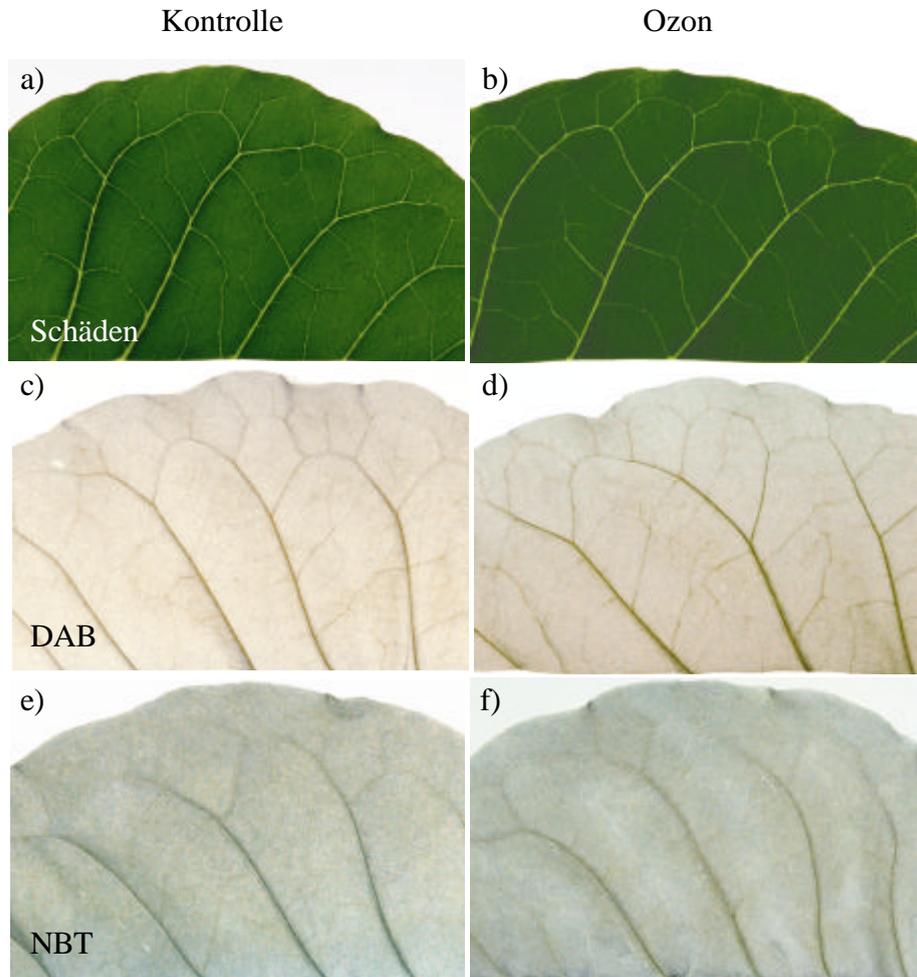


Abb. 15: Darstellung der Blattschäden (a, b), DAB- (c, d) und NBT-Färbung (e, f) von Kontroll- und Ozon-behandelten Blättern der Tabaksorte Bel B. 7 h nach Behandlungsbeginn wurden Blatthälften für den Nachweis der reaktiven Sauerstoffspezies mit den entsprechenden Farbstoffen (DAB für H_2O_2 Nachweis und NBT für $\text{O}_2^{\cdot-}$) infiltriert und zusammen mit den an der Pflanze verbliebenen Blatthälften für die Blattschädenentwicklung nach 48 h fotografiert. DAB nimmt in Gegenwart von H_2O_2 eine braunrote Farbe an, NBT wird durch $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu einem blauen, unlöslichen Präzipitat.

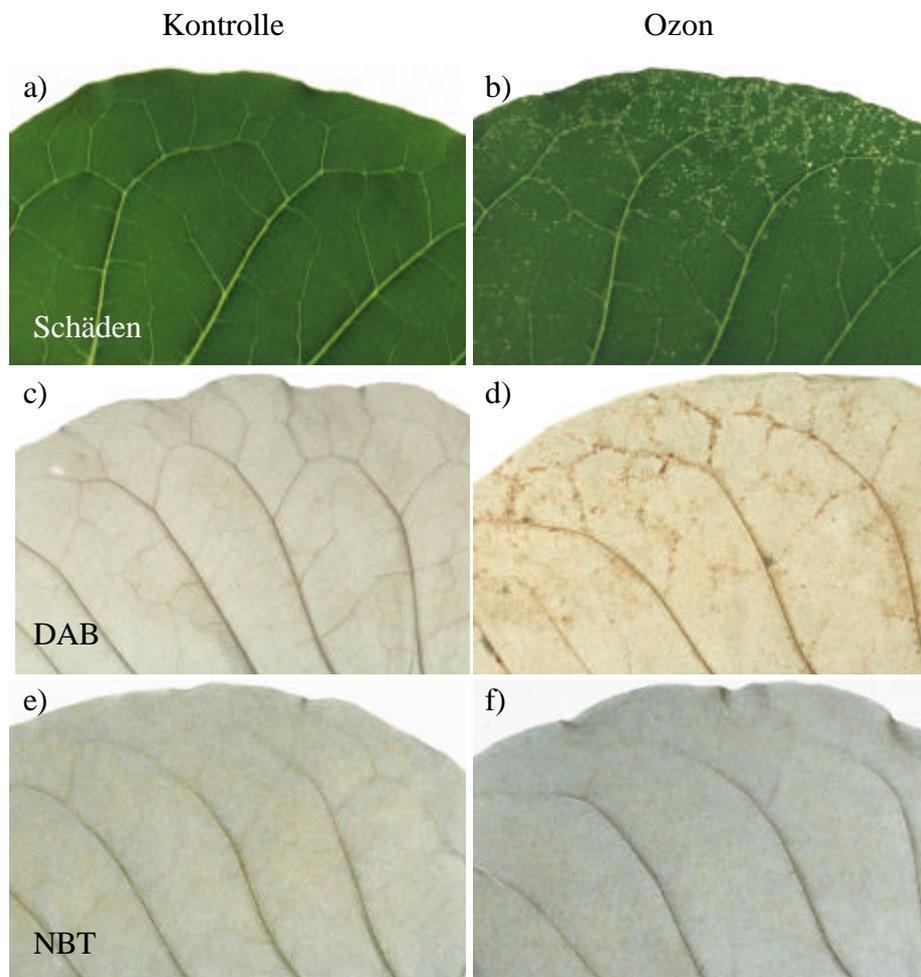


Abb. 16: Blattschäden (a, b), DAB- (c, d) und NBT-Färbung (e, f) von Kontroll- und Ozon-behandelten Blättern der Tabaksorte Bel W3. 7 h nach Beginn der Exposition wurden Blatthälften für den Nachweis der reaktiven Sauerstoffspezies mit den entsprechenden Farbstoffen infiltriert und zusammen mit den an der Pflanze verbliebenen Blatthälften für die Blattschädenentwicklung nach 48 h bonitiert.

Aus diesem Grund wurde die apoplastische Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies in den beiden Tabaksorten Bel B und Bel W3 untersucht und mit den auftretenden Schäden in Quantität und Lokalisation verglichen. Die Akkumulation von H_2O_2 wurde dabei mit dem Farbstoff Diaminobenzidin (DAB, braunrote Farbe), die Akkumulation von $\text{O}_2^{\cdot-}$ mit Hilfe des Farbstoffs Nitroblautetrazolium (NBT, blaue Farbe) nachgewiesen. DAB polymerisiert in Anwesenheit von H_2O_2 und Peroxidase-abhängig zu einem braunroten, unlöslichen Komplex (Thordal-Christensen et al., 1997), wobei eine Limitierung der Färbung durch Peroxidase-Aktivität von Schraudner et al. (1998) ausgeschlossen wurden. NBT bildet mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ blaues, unlösliches Formazan (Jabs et al., 1996). Beide Farbstoffe sind unter normalen Bedingungen, d.h. bei intakten Membranen, nicht membrangängig. Von Kontroll- und Ozon-behandelten Pflanzen ($5 \text{ h } 185 \text{ nl l}^{-1}$) beider Sorten wurde jeweils eine Blatthälfte nach 7 h mit einem der beiden Farbstoffe infiltriert, die andere Hälfte verblieb bis zur Bonitur 48 h nach Beginn der Behandlung an der Pflanze stehen.

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, führte eine 5stündige Ozonbehandlung bei der Ozon-toleranten Sorte Bel B nicht zu Blattschäden (Abb. 14a und c, Abb. 15a und b). An den entsprechenden Blatthälften konnte auch keine DAB-Färbung als Hinweis auf H_2O_2 -Akkumulation festgestellt werden. Im Unterschied dazu konnte sowohl bei Kontroll- als auch behandelten Blättern NBT-Färbung gezeigt werden. Diese war nur sehr schwach hellblau und eher flächig, bei den behandelten Blättern etwas großflächiger zu sehen (Abb. 15).

Ozonbehandelte Blätter der Sorte Bel W3 wiesen wieder etwa 10 % Schäden auf (Abb. 14b und c). Zusätzlich konnte hier nur in den behandelten Blättern braunrote DAB-Färbung (Abb. 16) gefunden werden, in etwa der gleichen Prozentzahl wie die Schäden (Abb. 14). Wie bei Bel B trat auch in Bel W3 eine blassblaue, flächige NBT-Färbung auf, die in den behandelten Pflanzen ebenfalls großflächiger war und bis zu 60 % der Blattfläche umfasste. Ein genauerer Vergleich der Schäden und DAB-Färbung bei Ozon-behandelten Bel W3 ergab nicht nur eine Übereinstimmung der prozentualen Flächenanteile, sondern auch in der Lokalisation: sowohl die Schäden als auch die DAB-Färbung wurden hauptsächlich entlang der Blattadern gefunden (Abb. 17).

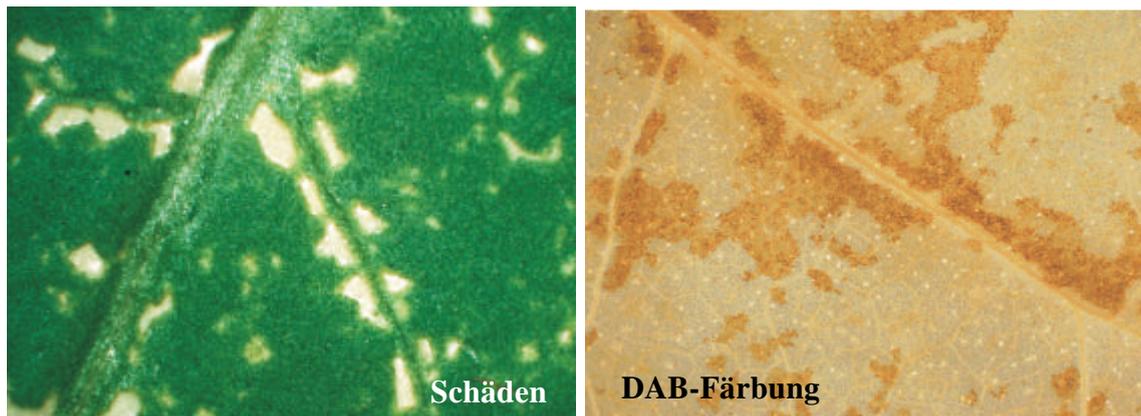


Abb. 17: Lokalisation von Blattschäden und DAB-Färbung entlang der Blattadern bei Ozon-behandelten Blättern der Tabaksorte Bel W3. Die Färbung erfolgte 7 h nach Behandlungsbeginn, die Aufnahmen wurden 48 h später gemacht.

Zusätzlich ließ sich Ozon-unabhängig mit Hilfe von Blattquerschnitten bestätigen, was sich schon bei der Betrachtung DAB-gefärbter Blätter mit dem Auge andeutete: In bestimmten Blattadern, besonders der Blattadern erster und zweiter Ordnung im basalen Bereich mittelalter Blätter, zeigte sich im Bereich des Leitbündels starke DAB-Färbung unabhängig von der Tabaksorte und der Behandlung (Abb. 18).

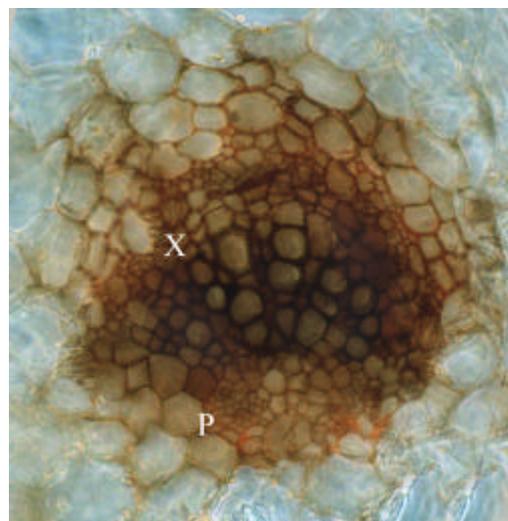


Abb. 18: Querschnitt durch ein Leitbündel eines unbehandelten Blattes der Tabaksorte Bel W3. Die mikroskopische Aufnahme erfolgte 1h nach Infiltration des Farbstoffs DAB. X = Xylem, P = Phloem.

Es ist bekannt, dass Blätter in verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedlich Ozonempfindlich sind. Junge Blätter weisen normal keine oder deutlich weniger Läsionen auf als mittelalte und alte (Guderian, 1985). In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob eine

Ozon-induzierte DAB-Färbung ebenfalls eine Abhängigkeit vom Blattalter zeigt, und ob diese mit dem Muster der Blattschäden übereinstimmt.

Blatt 1 stellte dabei das jüngste Blatt dar, das eine Blattlänge von mindestens 8 cm besaß. Nach einer Standard-Ozonbehandlung von Pflanzen der Tabaksorte Bel W3 wurde zum Zeitpunkt 7 h jeweils eine Blathälfte von Blatt 1-6 mit DAB infiltriert, die andere Hälfte verblieb an der Pflanze bis zur Bonitur der Schäden. Abb. 19 zeigt, dass in der Tat ein deutlicher Unterschied in der Ozonempfindlichkeit der einzelnen Blätter einer Pflanze besteht. So wies Blatt 1 nie Schäden auf, ab Blatt 2 stieg die prozentual geschädigte Blattfläche stetig bis zu Blatt 5 an, welches im Durchschnitt zu etwa 20 % geschädigt war. Bei Blatt 6, also dem ältesten Folgeblatt, gab es große Abweichungen der Schäden zwischen den einzelnen Pflanzen. Bei manchen Pflanzen gab es großflächige Blattschäden, bei anderen nur einzelne kleine Flecken. Relativ ähnlich sah auch die mit DAB-gefärbte Fläche aus: bei Blatt 1 und 2 konnte kaum H_2O_2 -Akkumulation nachgewiesen werden, bei den Blättern 3 – 6 lag sie bei 10 bis 15 % und stieg somit im Mittelwert ähnlich zu den Blattschäden an.

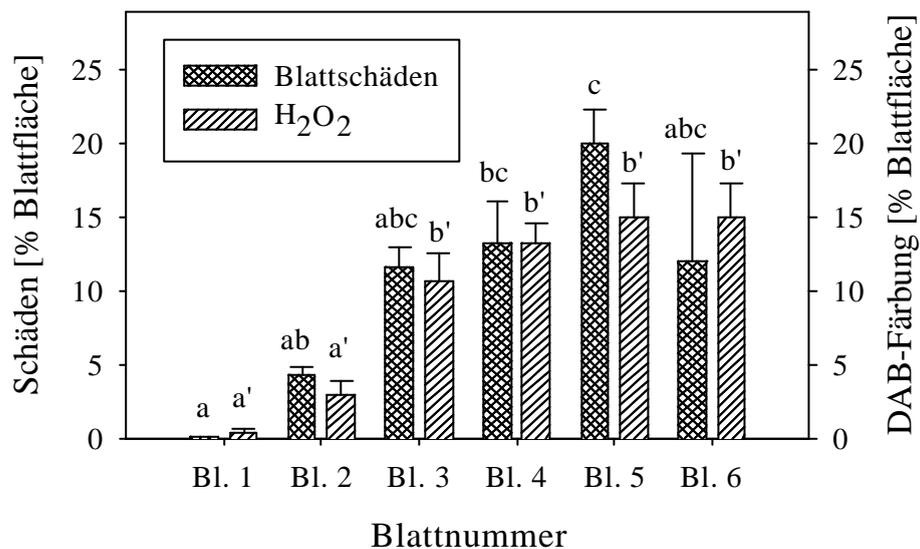


Abb. 19: Abhängigkeit der Ausbildung von Blattschäden und Akkumulation von H_2O_2 vom Blattalter ozonbehandelter Pflanzen der Sorte Bel W3. Blatt 1 stellte das jüngste Blatt mit einer Mindestlänge von 8 cm dar, Blatt 6 war das älteste Blatt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. (n=3). Bl = Blatt. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nach dem LSD-Test nicht signifikant verschieden.

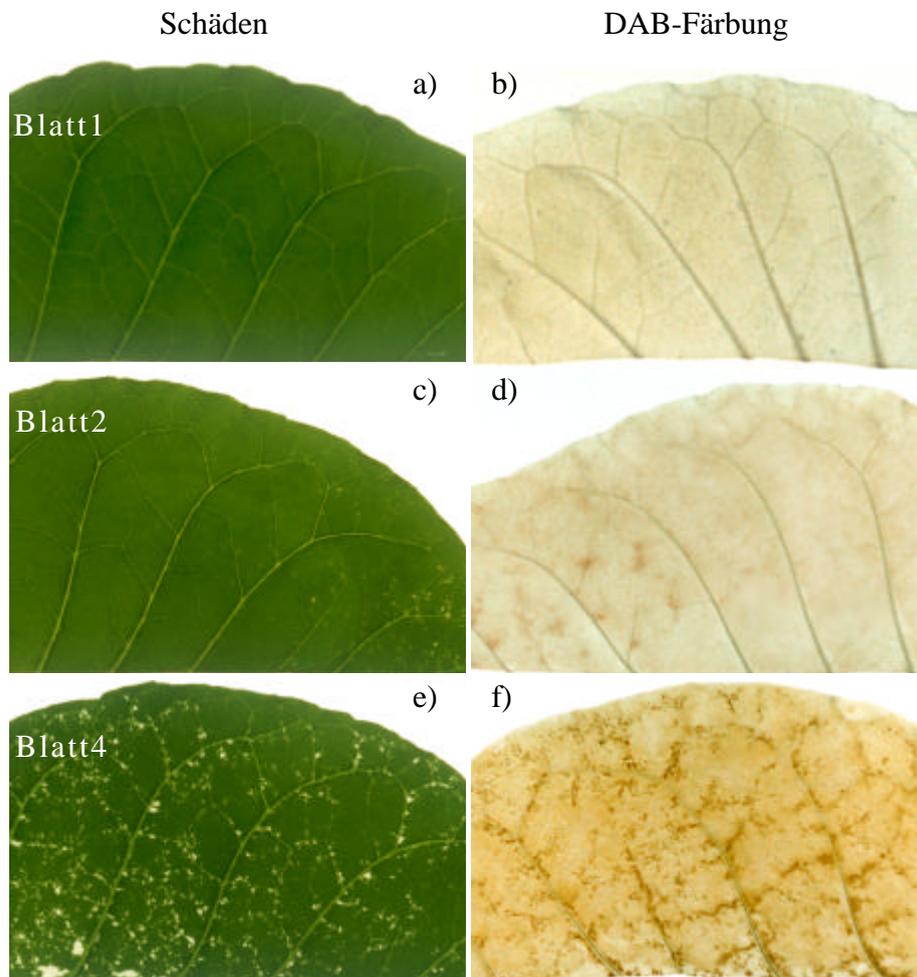


Abb. 20: Abhängigkeit der Ausbildung von Blattschäden (a, c, e) und Akkumulation von H_2O_2 (b, d, f) vom Blatalters ozonbehandelter Pflanzen der Sorte Bel W3. Blatt 1 stellte das jüngste Blatt mit einer Mindestlänge von 8 cm dar. Die Blätter wurden 7 h nach Expositionsbeginn mit DAB infiltriert, die Fotos wurden nach 48 h aufgenommen.

Zusätzlich ergaben sich auch Unterschiede in der Verteilung der Schäden und DAB-Färbung auf der Blattfläche. Bei Blatt 2 zeigten sich die Schäden und DAB-Flecken nur an der Spitze des Blattes (Abb. 20c und d), bei Blatt 3 war fast die gesamte distale Blatthälfte betroffen, ab Blatt 4 breiteten sich die punktförmigen Schäden und H_2O_2 -Akkumulation auf der gesamten Blattfläche (Abb. 20e und f) aus. Bei allen Blättern traten die Schäden und die DAB-Färbung jedoch immer hauptsächlich entlang der Blattadern auf.

Da die Muster der Schadbilder und DAB-Färbungen bei allen Blättern relativ gut übereinstimmten und die mittelalten Blätter die am stärksten und über die Blattfläche am gleichmäßigsten geschädigten Blätter darstellten, wurden für die weiteren Versuche stets die Blätter 4 und 5 ausgewählt.

In einem weiteren Versuch wurde die Abhängigkeit der Blattschäden und H_2O_2 -Akkumulation von der Ozondosis untersucht. Pflanzen der Tabaksorte Bel B und Bel W3 wurden für fünf Stunden mit 0, 100 ± 8 , 200 ± 10 , 300 ± 10 bzw. $400 \pm 10 \text{ nl l}^{-1}$ Ozon behandelt. Abb. 21 und Abb. 22 zeigen die Ergebnisse. Bei der Ozon-toleranten Sorte Bel B traten erst ab 300 nl l^{-1} erste Anzeichen von Schäden in Form vereinzelter, punktförmiger Läsionen auf, die sich dann bei 400 nl l^{-1} auf ca. 8 % der Blattfläche ausweiteten. Sehr ähnlich dazu war wieder die DAB-Färbung. Erst bei 300 nl l^{-1} wurde sie deutlich sichtbar und bei 400 nl l^{-1} signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Pflanzen. Die Sorte Bel W3 zeigte schon bei 100 nl l^{-1} die ersten Anzeichen von DAB-Färbung, was aber nur an einem Blatt zu geringsten Schäden an der Blattspitze führte (Abb. 22c und d). Bei 200 nl l^{-1} ergaben sich etwa 18 % an Blattschäden und 10 % DAB-Färbung. Beide Parameter erhöhten sich bei einer Ozonkonzentration von 300 nl l^{-1} noch einmal, bevor 400 nl l^{-1} eine deutliche Steigerung vor allem der Blattschäden, aber auch der DAB-Färbung bewirkten. Bei dieser Konzentration waren ca. 80 % der Flächen der Blätter 4 und 5 zum Zeitpunkt 48 h nach dem Behandlungsbeginn geschädigt, etwa 40 % der Fläche zeigte nach 7 h H_2O_2 -Akkumulation. Bonitiert wurde hierfür allerdings nur die starke, rotbraune DAB-Färbung und nicht die über die fast gesamte Blattfläche gehende, schwächere (Abb. 22h). Wie schon in den vorigen Versuchen, konnte eine deutliche Korrelation der Blattschäden mit der DAB-Färbung nicht nur in der prozentualen Fläche, sondern auch in der Lokalisation entlang der Blattadern festgestellt werden (Abb. 22). Darüber hinaus scheint es, wie schon erwähnt, besonders bei den höheren Ozonkonzentrationen Unterschiede in der Stärke der DAB-Färbung zu geben, wobei nur die starke Färbung mit dem Auftreten der Läsionen korrelierte. Ein Vergleich der Sorte Bel B mit Bel W3 machte die unterschiedliche Ozontoleranz der beiden Sorten in

diesem Versuch deutlich: Bel B entwickelt bei 400 nl l^{-1} von der prozentual betroffenen Fläche ähnliche Blattschäden und DAB-Färbung wie Bel W3 bei 200 nl l^{-1} .

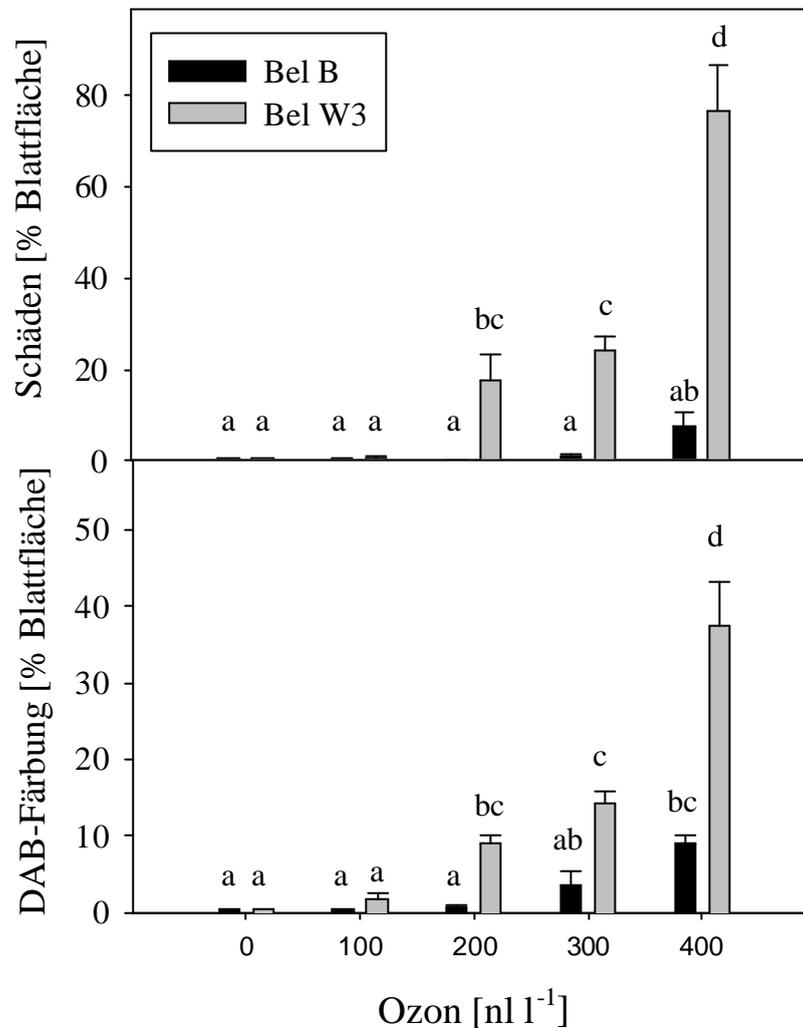


Abb. 21: Abhängigkeit der Blattschäden und DAB-Färbung von der Ozonkonzentration. Tabakpflanzen der Sorte Bel B und Bel W3 wurden 5h mit 0, 100, 200, 300 und 400 nl l^{-1} behandelt. Die Bonitur der Schäden erfolgte nach 48 h, die DAB-Färbung nach 7 h. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n=3$). Nur Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben sind nach dem LSD Multiple Range Test signifikant unterschiedlich.

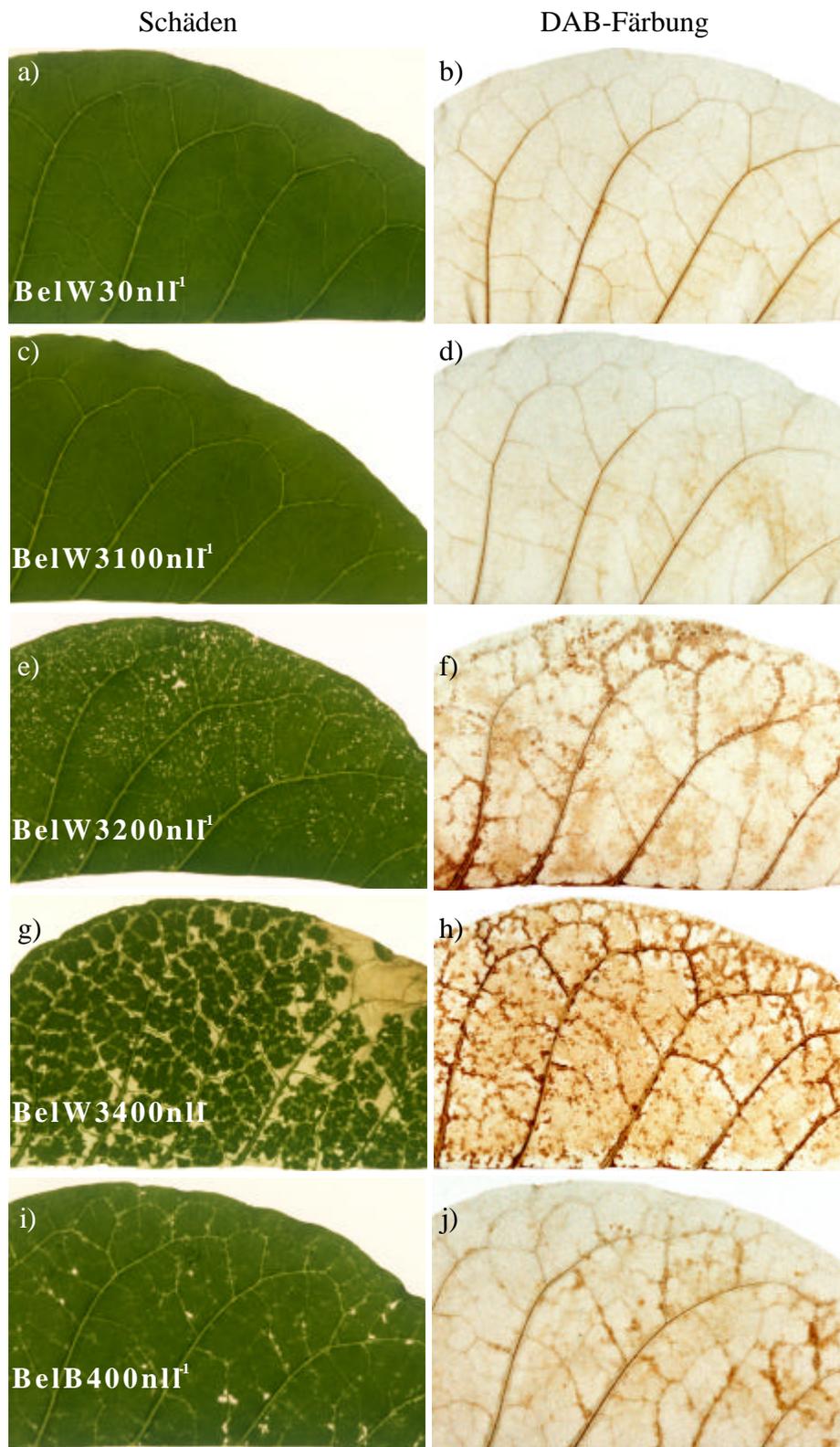


Abb. 22: Verteilung der Blattschäden (a, c, e, g, i) und DAB-Färbung (b, d, f, h, j) auf der Blattfläche von Tabakpflanzen in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration. Pflanzen der Sorte Bel B und Bel W3 wurden 5 h mit 0, 100, 200, 300 und 400 nl l^{-1} Ozon behandelt. Die DAB-Färbelösung wurde 7 h nach Beginn der Behandlung infiltriert. Die Fotos wurden 48 h nach Versuchsbeginn aufgenommen.

1.3. Ozonexposition von Tabakpflanzen der Sorte Bel W3 im Freiland

Mit dem folgenden Versuch sollten die Ergebnisse der Kammerversuche im Freiland bestätigt werden. In den Kammerversuchen wurde stets das 2- bis 3fache heutiger ambienter Ozonkonzentrationen in einem einmaligen Kurzzeitpuls von 5 h verwendet. In der Natur folgen die Ozonkonzentrationen einem Tagesgang mit einem Maximum gegen Mittag und meist nur geringen Konzentrationen in der Nacht. Um das Auftreten von Blattschäden unter ambienten, wiederkehrenden Ozonkonzentrationen zu untersuchen, wurden drei Pflanzen der Sorte Bel W3 für 14 Tage im August unter Beschattung im Freien kultiviert. Die Ozonwerte während dieser Zeit sind in Abb. 23 zu sehen.

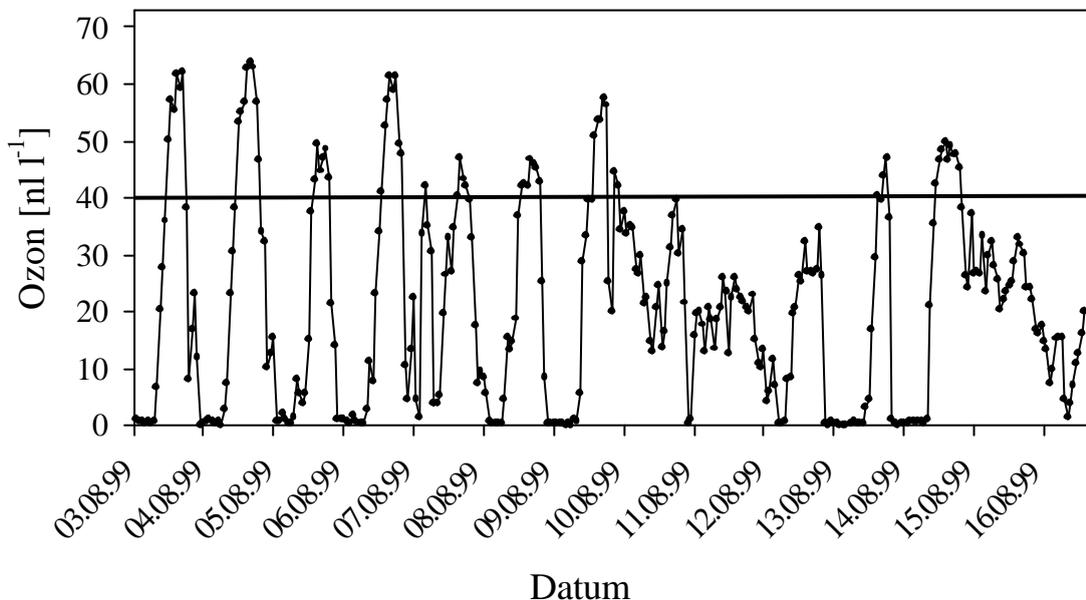


Abb. 23: Verlauf der Ozonkonzentrationen im Zeitraum vom 03.08. bis 16.08.99 auf dem Gelände der GSF. Die Messstelle befand sich unweit des Expositionsortes der Tabakpflanzen. Die eingezeichnete Linie bei 40 nl l^{-1} symbolisiert die Schwelle für die Berechnung der AOT40-Werte.

Schon nach einigen Tagen zeigten sich die ersten Blattschäden. In der folgenden Zeit konnte deutlich beobachtet werden, wie neue Blattschäden dazu kamen, aber hauptsächlich die alten sich ausweiteten. Dies führte zu einem weniger punktförmigen als flächigen Schadbild der Blätter im Vergleich zu den Kurzzeitpulsen in den Kammern. In Abb. 24a kann man erkennen, dass schon gesetzte Blattschäden durch weitere Ozonexposition ineinander überlaufen. Die alten Schäden sind dabei klarer und in ihren Konturen schärfer umrissen als die neu gesetzten, die noch nicht so pergamentartig sind. Im Unterschied zu den Ozon-

induzierten Blattschäden in Kammerversuchen besaßen diese Läsionen häufig eine leicht bräunliche Färbung. Dies könnte auf ein Zusammenwirken von Ozon mit anderen Luftschadstoffen wie z.B. NO zurückgeführt werden (Guderian, 1985). Am letzten Tag der Exposition wurden die Blätter gegen 16 Uhr mit dem Farbstoff DAB gefärbt. Wie in den Kammern konnte damit auch bei den Pflanzen unter ambienten Ozonkonzentrationen H_2O_2 -Akkumulation nachgewiesen werden (Abb. 24b). Neben einzelnen Punkten entlang der Blattadern konzentrierte sich das braunrote Präzipitat jedoch hauptsächlich entlang der weißen, älteren Schäden in Form eines deutlich abgegrenzten Ringes mit dem Durchmesser mehrerer Zellen (Abb. 24c).



Abb. 24: Schäden und H_2O_2 -Akkumulation bei der Tabaksorte Bel W3 im Freiland. Drei Pflanzen der Sorte Bel W3 wurden im August unter Beschattung ambienten Ozonkonzentrationen für 14 Tage ausgesetzt und die Entwicklung der Blattschäden beobachtet. Am letzten Tag wurden die Blätter mit DAB auf H_2O_2 -Akkumulation untersucht. a) zeigt das Schadbild, b) die DAB-Färbung und c) stellt eine Vergrößerung eines DAB-gefärbten Blattes im Bereich einer Läsion dar.

Eine Auszählung der punktförmigen, also nicht um eine schon bestehende Läsion herum liegende DAB-Färbungen ergab auch im Freiland einen deutlichen Aderbezug (Abb. 25). So konnte nur bei knapp 16 % aller Stellen mit H_2O_2 -Akkumulation kein Aderbezug hergestellt werden. Die signifikant häufigste Anordnung (44 % aller Spots) konnte entlang der Blattadern 3. Ordnung gefunden werden.

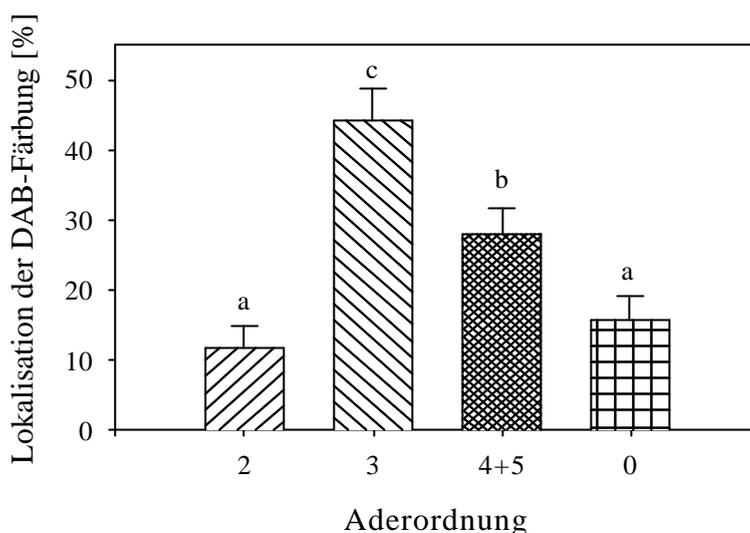


Abb. 25: Verteilung der punktförmigen DAB-Färbung auf der Blattfläche von Bel W3 nach 14tägiger Exposition im Freiland in Bezug zur Ordnung der Blattadern. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. (n=4). Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nach dem LSD-Test nicht signifikant verschieden.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass auch im Freiland unter ambienten Bedingungen bei der Tabaksorte Bel W3 Blattschäden ausgelöst werden, die mit der Akkumulation von H_2O_2 einhergehen. Darüber hinaus führten die immer wiederkehrenden Ozonkonzentrationen innerhalb der 14 Tage neben der Entstehung neuer, punktförmiger Läsionen auch stark zu einer Vergrößerung schon bestehender. Da DAB-Färbung konzentrisch um bestehende Läsionen nachgewiesen wurde, könnte vermutet werden, dass die Akkumulation von H_2O_2 einer Vergrößerung der Läsion vorangeht.

Der kritische Wert für Ozon in Europa basiert auf einer Addition der stündlichen Ozonkonzentrationen über einem Schwellenwert von 40 nl l^{-1} (AOT40) und ein AOT40-Wert von $3000 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$ wurde zum Schutz der Vegetation angenommen (Kärenlampi & Skärby, 1996). Dieser Wert wurde anhand von Ertragsverlusten bei Weizen festgelegt, aber auf natürliche Vegetationen übertragen. Berechnet man den AOT40-Wert dieses Freilandversuches so kommt man auf $600 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$ und bleibt damit deutlich unter dem festgesetzten kritischen Wert.

1.4. Ozonbehandlung in Kammerversuchen über mehrere Tage hinweg

In Kammerversuchen sollte die Ausweitung bestehender Läsionen durch wiederkehrende, fast-ambiente Ozonkonzentrationen bei Bel W3 sowie die konzentrische Akkumulation von

H_2O_2 um bestehende Läsionen herum bestätigt werden. Darüber hinaus sollte auch die Reaktion der Ozon-toleranten Sorte Bel B auf mehrmalige Ozonbehandlungen untersucht werden. Beide Sorten wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen für 5 h mit 100 nl l^{-1} Ozon behandelt. Abb. 26 zeigt die Entwicklung der Blattschäden sowie die Akkumulation von H_2O_2 in diesem Zeitraum.

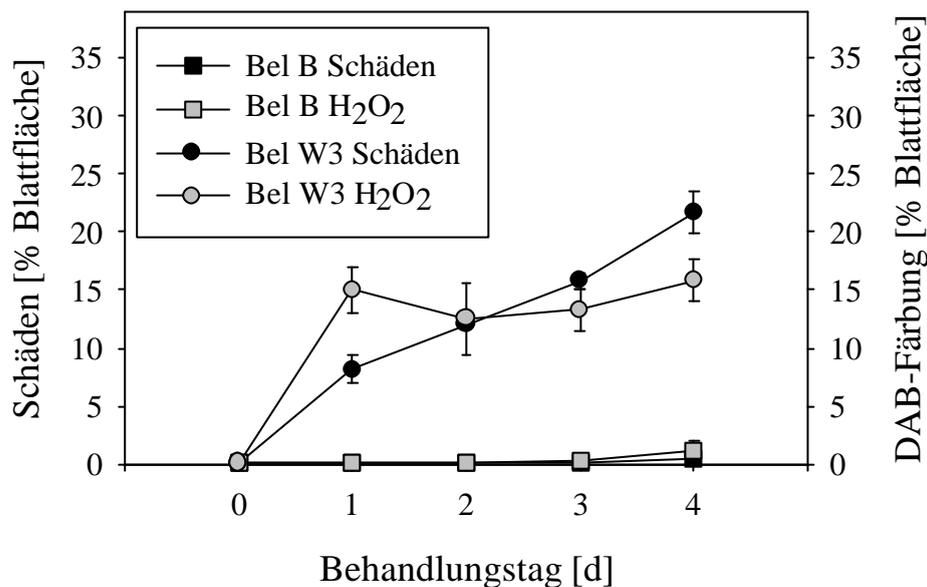


Abb. 26: Entwicklung von Blattschäden und H_2O_2 -Akkumulation bei mehrtägiger Ozonbehandlung. Tabakpflanzen der Sorte Bel B und Bel W3 wurden täglich für 5 h mit 100 nl l^{-1} Ozon behandelt. Nach jedem Behandlungstag wurden drei Pflanzen aus dem Versuch genommen und zum Zeitpunkt 7 h mit DAB gefärbt. Die jeweils andere Blathälfte der Blätter 4 und 5 wurde zur Bonitur der Schäden an der Pflanze belassen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n=3$).

Nach jedem Behandlungstag wurden je drei Pflanzen aus der Behandlung genommen und zu dem Zeitpunkt 7 h mit DAB gefärbt. Die anderen Hälften der Blätter 4 und 5 verblieben an der Pflanze, die in Reिनluft bis zur Bonitur der Schäden weiterkultiviert wurde. Blatt 1 stellte dabei das Blatt dar, das zu Versuchbeginn etwa 8 cm lang war.

Bei der Sorte Bel B zeigte sich während den ersten beiden Behandlungstagen kein Unterschied zwischen den Kontroll- und Ozon-behandelten Pflanzen. Nach dem dritten Tag konnten bei einer Pflanze die ersten Anzeichen von Läsionen gefunden werden, nach Tag 4 bei allen drei Versuchspflanzen. Nach einem zusätzlichen Tag der Exposition waren schließlich ca. 3% der Fläche der Blätter 4 und 5 von Bel B geschädigt. Anders bei der Sorte Bel W3, hier traten schon nach den ersten 5h mit 100 nl l^{-1} etwa 8% an Blattschäden auf, die

sich mit jedem Behandlungstag steigerten. Bei den Pflanzen mit vier Behandlungstagen war schließlich etwa 20 % der Blattfläche geschädigt. Wie schon im Freiland erfolgte die Zunahme an geschädigter Blattfläche nicht nur durch das Auftreten weiterer, punktförmiger Läsionen, sondern vor allem durch eine Vergrößerung bestehender Läsionen (Abb. 27). Weiße, pergamentartige Flächen stellten dabei die alten Läsionen der Vortage dar, leicht unscharf und durchsichtig wirkende Flächen waren die Schäden des aktuellen Behandlungstages (Abb. 27).

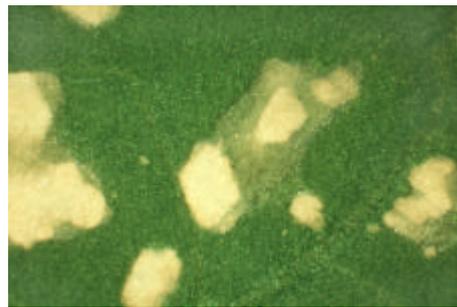


Abb. 27: Blattschäden nach dem zweiten Behandlungstag bei der Tabaksorte Bel W3. Pflanzen wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen täglich für 5 h mit 100 nl l^{-1} Ozon behandelt. Nach jedem Expositionstag wurden drei Pflanzen aus dem Versuch genommen und untersucht.

Interessant war das Verhalten der DAB-Färbung bei Bel W3. Nach dem ersten Behandlungstag waren etwa 15 % der Blattfläche rotbraun gefärbt, was wie schon erwähnt mit 8 % Blattschäden einherging. Dieser Prozentsatz an Blattfläche mit H_2O_2 -Akkumulation blieb an allen Expositionstagen in etwa konstant, die Schäden nahmen aber pro Behandlungstag im Schnitt nur um ca. 4-5 % zu. D.h. prozentual gesehen wurden nicht alle Stellen mit H_2O_2 -Akkumulation in Schäden umgesetzt. Wie schon bei dem Versuch mit der Abhängigkeit von Schäden und H_2O_2 -Akkumulation von der Ozonkonzentration (Abschnitt 1.2) konnten jedoch Stellen mit stärkerer und schwächerer DAB-Färbung ausgemacht werden. Stellen mit schwächerer Färbung resultierten wahrscheinlich auch in diesem Versuch nicht in Läsionen. Die DAB-Färbung an den Expositionstagen 2-4 zeigte das gleiche Muster wie im Freilandversuch: Zum einen konnte punktförmige Färbung entdeckt werden, zum anderen fand sich wieder H_2O_2 konzentrisch um schon bestehende Läsionen (vergleiche Abb. 24b und c).

1.5. Abhängigkeit der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies vom Abstand zur Ozonbehandlung

Tabakpflanzen der Sorte Bel W3 wurden für 5 h mit 250 nl l^{-1} Ozon behandelt. 72 h nach Beginn der Exposition wurden Hälften der Blätter 4 und 5 mit DAB bzw. NBT infiltriert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Schäden der Blätter schon festgelegt und veränderten sich nicht mehr. Während die Blätter 4 und 5 der ozonbehandelten Pflanzen mit ca. 35 % (Abb. 28) geschädigt waren, konnte weder signifikante DAB- noch NBT-Färbung festgestellt werden.

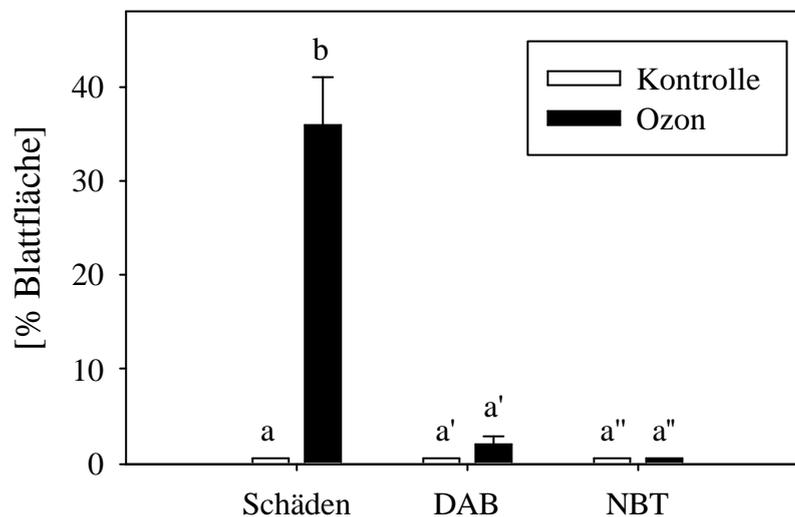


Abb. 28: Blattschäden und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies 72 h nach Beginn der Ozonbehandlung. Pflanzen der Sorte Bel W3 wurden für 5 h mit 250 nl l^{-1} behandelt, zum Zeitpunkt 72 h wurden jeweils Hälften der Blätter 4 und 5 mit DAB bzw. NBT gefärbt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n=3$). Gleiche Buchstaben bedeuten nach den LSD-Test keine signifikanten Unterschiede.

67 h nach Beendigung der Ozonbehandlung wurde folglich kein H_2O_2 mehr, aber auch kein $\text{O}_2^{\cdot-}$ akkumuliert. Die durch eine Ozonbehandlung ausgelöste Akkumulation an reaktiven Sauerstoffspezies dauerte trotz erhöhter Ozonkonzentrationen weniger als 72 h.

Dieser Versuch wies erneut auf den Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Blattschäden und der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies hin. Ohne weitere Akkumulation von H_2O_2 veränderten sich auch die Läsionen nicht mehr.

1.6. Induktion verschiedener Signalmoleküle ausgelöst durch Ozonexposition

Zur Überprüfung einer Beteiligung anderer Signalmoleküle an der Ausbildung der Läsionen wurden die Bildung von Ethylen bzw. dessen Vorläufer 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) und von freier sowie konjugierter Salicylsäure gemessen. In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Läsionen und dem Auftreten dieser Verbindungen (Chamnongpol et al., 1998; Overmyer et al., 2000; Pell et al., 1997; Sandermann et al., 1998).

Die Korrelation zwischen erhöhten Ethylenemissionen und verstärkter Bildung des Vorläufers ACC während einer Ozonbehandlung von Tabak wurde von W. Möder im Rahmen seiner Dissertation gezeigt (Moeder, 1999). Standardmäßig wurden die ACC-Gehalte während der Ozonexposition (nach 2 h) gemessen, da Ethylen ein früher und beständiger Marker für Ozon darstellt (Wellburn & Wellburn, 1996), die Salicylsäurekonzentrationen in der Phase nach der Behandlung (6 bis 8 h). Geerntet wurden dafür die Blätter 4 und 5 von jeweils drei verschiedenen Pflanzen.

In Abb. 29a ist deutlich zu erkennen, dass durch eine Ozonexposition (5 h, 185 nl l^{-1}) die Konzentrationen des Ethylenvorläufers ACC erhöht werden. Während bei Kontrollpflanzen kein oder kaum ACC zu messen war, konnten bei Ozon-behandelten Pflanzen der Sorte Bel B bzw. Bel W3 im Mittel 0,8 bzw. $1,1 \text{ nmol gFG}^{-1}$ verzeichnet werden. Der Unterschied im ACC-Gehalt zwischen den Sorten war dabei jedoch nicht signifikant.

Eine Ozonbehandlung führte 8 h nach Beginn der Exposition ebenfalls zu erhöhten Konzentrationen an freier und konjugierter Salicylsäure gegenüber Kontrollpflanzen (Abb. 29b und c). Allerdings erwies sich die Erhöhung als nicht signifikant, ebenso wie die Unterschiede zwischen der Sorte Bel B und Bel W3.

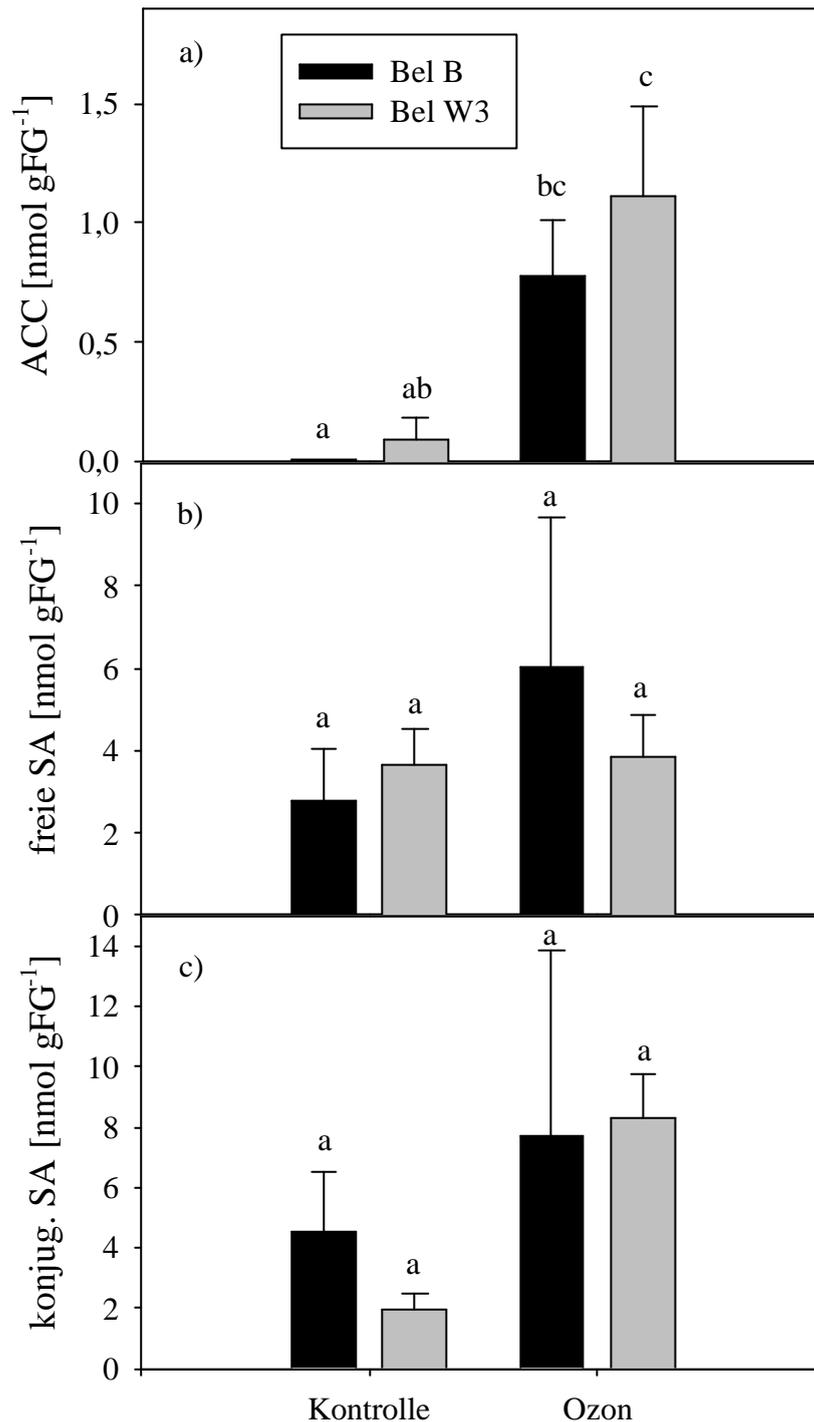


Abb. 29: Vergleich der Konzentrationen von ACC (a) sowie freier (b) und konjugierter (c) Salicylsäure zwischen Kontroll- und Ozon-behandelten Tabakpflanzen der Sorten Bel B und Bel W3. Die Ernte für die ACC-Messungen erfolgte 2 h, die für SA 8 h nach Behandlungsbeginn (185 nl l⁻¹ Ozon). Gezeigt sind Mittelwerte ± S.E. (n=3). Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (LSD Multiple Range Test).

Betrachtet man die ACC- und Salicylsäurekonzentrationen in Abhängigkeit von der Ozondosis, so ergab sich folgendes Bild (Abb. 30): Weder bei ACC noch bei Salicylsäure konnte man signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und mit 100 nl l^{-1} behandelten Pflanzen der Sorte Bel B und Bel W3 erkennen. In beiden Behandlungen ließen sich keine oder nur sehr geringe Konzentrationen der Signalmoleküle messen. Erst die Behandlung mit 200 nl l^{-1} Ozon führte bei ACC zu einer Erhöhung der Gehalte (Abb. 30a). Eine Ozonkonzentration von 300 nl l^{-1} hatte einen weiteren Anstieg der ACC-Konzentrationen zur Folge, allerdings konnten wie schon bei den vorhergehenden Ozonkonzentrationen keine Unterschiede zwischen der Ozon-toleranten und empfindlichen Tabaksorte erkannt werden. Erst bei der höchsten eingesetzten Ozonkonzentration erfolgte bei der Sorte Bel W3 ein sprunghafter Anstieg auf ca. $6 \text{ nmol ACC gFG}^{-1}$, während die Konzentrationen bei Bel B kontinuierlich auf nur $3,6 \text{ nmol}$ kletterten. Zusammenfassend ließ sich für die ACC-Gehalte ab 100 nl l^{-1} also eine Zunahme in Abhängigkeit der Ozonkonzentration erkennen, jedoch kam es erst bei der höchsten Ozonkonzentration zu einem signifikanten Unterschied zwischen Bel B und Bel W3.

Etwas anders stellten sich die Daten der Salicylsäure dar. Hier deuteten sich die Unterschiede zwischen den beiden Tabaksorten schon ab 200 nl l^{-1} an, wenn auch mit dem LSD-Test als nicht signifikant ermittelt. Während bei Bel B die Gehalte an freier Salicylsäure bei $3,4 \text{ nmol gFG}^{-1}$ lagen, betragen sie bei Bel W3 etwa 15 nmol (Abb. 30b). Eine Erhöhung der Ozonkonzentration um weitere 100 nl l^{-1} brachte keine weitere Steigerung der Werte an freier Salicylsäure. Diese stiegen erst wieder bei 400 nl l^{-1} auf 11 bzw. 44 nmol . Wie bei den ACC-Konzentrationen war auch bei der freien Salicylsäure der Unterschied zwischen Bel B und Bel W3 hier zum ersten Mal signifikant. Der Anstieg der Gehalte an freier Salicylsäure scheint zusammengefasst nicht kontinuierlich mit zunehmender Ozonkonzentration zu erfolgen, sondern nach bestimmten Schwellenwerten. Es traten keine Unterschiede zwischen 0 und 100 nl l^{-1} Ozon sowie zwischen 200 und 300 nl l^{-1} auf.

Im Gegensatz zu den Werten der freien Salicylsäure erfolgte die Zunahme der konjugierten Salicylsäure wieder mit steigender Ozonkonzentration (Abb. 30c). Außerdem zeigte sich hier schon ein signifikanter Unterschied bei 300 nl l^{-1} Ozon zwischen Bel B und Bel W3. Sechs Stunden nach Beginn der Ozonexposition mit 400 nl l^{-1} enthielten die Pflanzen der empfindlichen Sorte Bel W3 mit 34 nmol gFG^{-1} immerhin die 4fache Konzentration an konjugierter Salicylsäure gegenüber der Sorte Bel B.

Deutlich ließ sich eine Induktion der Verbindungen ACC und Salicylsäure durch Ozon nachweisen. Unterschiede lagen dabei zum einen in der Art des Anstiegs, zum anderen im

Verhältnis zwischen Bel B und Bel W3. Während die ACC- und Gehalte der konjugierten Salicylsäure kontinuierlich stiegen, steigerten sich die Konzentrationen der freien Salicylsäure in Sprüngen. Unterschiede zwischen den beiden Tabaksorten traten bei den ACC-Werten erst bei der höchsten Ozonkonzentration auf, bei den Salicylsäuredaten schon ab 200 nl l^{-1} .

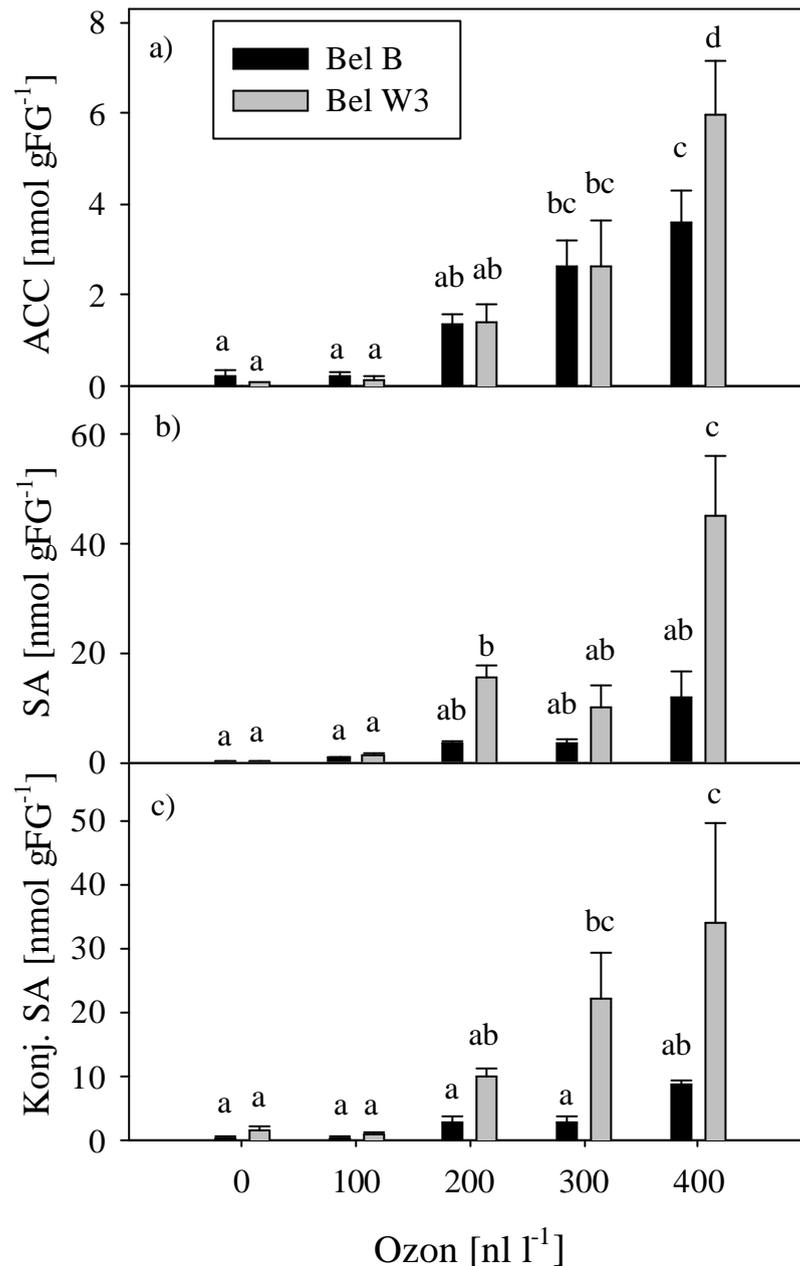


Abb. 30: Abhängigkeit der Gehalte an ACC (a) und an freier (b) sowie konjugierter (c) Salicylsäure von der Ozonkonzentration bei Bel B und Bel W3. Geerntet wurde für ACC 2 h, für Salicylsäure 6 h nach Beginn der Exposition. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 3$). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind nach dem LSD Multiple Range Test signifikant verschieden.

2. Charakterisierung weiterer Nutz- und Wildpflanzen bezüglich ihrer Ozon-Empfindlichkeit

2.1. Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Die wichtige Kulturpflanze Tomate gehört in die gleiche Pflanzenfamilie wie Tabak, nämlich zu den *Solanaceae*. In einem Langzeitexperiment im Rahmen des EU-Vorhabens TOMSTRESS konnte schon gezeigt werden, dass auch bei dieser Pflanzenart Unterschiede in der Reaktion auf erhöhte Ozonkonzentrationen zwischen verschiedenen Sorten bestehen (G. Vogt, unveröffentlicht). Nun sollten neun kommerziell erhältliche Sorten auf ihre Ozonempfindlichkeit in Kurzzeitexperimenten geprüft werden. Wie bei den Tabaksorten Bel B und Bel W3 wurden die Parameter Blattschäden, Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und Ethylenbiosynthese untersucht. Die Ozonbehandlung erfolgte für fünf Stunden mit $200 \pm 10 \text{ nl l}^{-1}$. Betrachtet wurden ebenfalls mittelalte Fiederblätter, da sie die deutlichsten Schäden aufwiesen. Junge Blätter zeigten sich, wie schon bei den Tabakpflanzen der Sorte Bel W3, als Ozon-unempfindlich. Die Pflanzen besaßen zum Zeitpunkt der Behandlung ein Alter von etwa sechs Wochen und befanden sich im vegetativen Stadium.

2.1.1 Ausbildung von Blattschäden und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies nach Ozonexposition

Während bei keiner der Kontrollpflanzen Blattschäden zu verzeichnen waren, entwickelten sich bei allen Ozon-behandelten Pflanzen im Zeitraum von 15-48 h nach Behandlungsbeginn weiße, pergamentartige Symptome. Die Bonitur erfolgte stets 48 h nach Beginn der Exposition. Nach der Größe der geschädigten Blattfläche konnten die neun Sorten in drei Gruppen eingeteilt werden (Abb. 31): Die Tomatensorten Ailsa Craig und DRK 2003 zeigten sich relativ Ozon-tolerant und entwickelten kaum Blattschäden (etwa 5 %). Die Gruppe mit mittlerer Schadausprägung umfasste die Sorten Trust, Piedmont, Moneymaker, Thomas, Nikita und Solairo. Die Schädigung betrug hier etwa 20 % der Blattfläche. Als einzige Sorte erwies sich Roma als stark Ozon-empfindlich. Bei ihr waren 60 % der Blattfläche geschädigt.

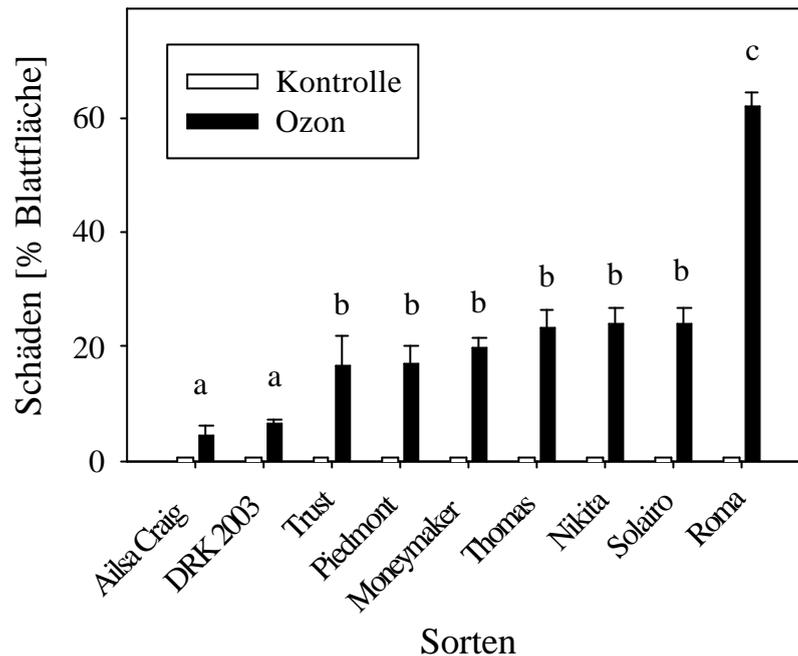


Abb. 31: Ausbildung von Blattschäden bei Kontrollpflanzen und Ozon-behandelten Tomatenpflanzen. Neun Sorten wurden für 5 h mit $200 \pm 10 \text{ nl l}^{-1}$ Ozon behandelt. Die Schäden von mittelalten Fiederblättern wurden 48 h nach Beginn der Exposition bonitiert. Die Anordnung der Sorten erfolgte mit zunehmender Ozon-Empfindlichkeit. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Kontrollen nicht mit dem aus dem LSD-Test ermittelten Buchstaben gekennzeichnet. Ihnen ist jedoch allen der Buchstabe ‚a‘ zuzuordnen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n=6$). Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (LSD Multiple Range Test).

Darüber hinaus unterschieden sich die Tomatensorten auch im Muster der Blattschäden. Der Großteil der Pflanzen zeigte die Läsionen hauptsächlich entlang der Blattadern, bei den Sorten Roma und Piedmont etwas flächiger ausgeprägt (Abb. 32a und e). Dagegen war das Schadbild der Sorten Solairo und Trust eher durch intercostale, punktförmige Läsionen der Blätter geprägt (Abb. 32c).

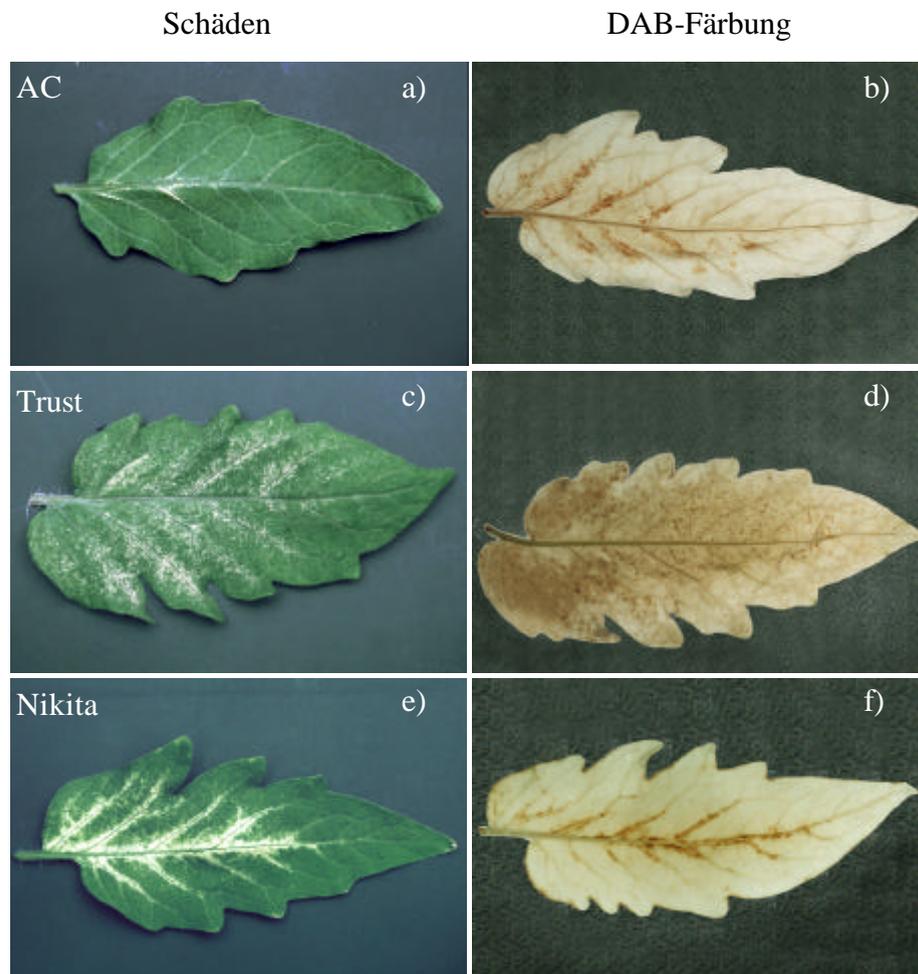


Abb. 32: Lokalisation der Blattschäden (a, c, e) und DAB-Färbung (b, d, f) bei den Ozon-behandelten Tomatensorten Ailsa Craig (AC), Trust und Nikita. Die DAB-Färbung wurde sieben Stunden nach Beginn der 5stündigen Behandlung mit 200 nl l^{-1} Ozon durchgeführt, die Fotos 48 h nach Expositionsbeginn aufgenommen.

Als nächstes wurden die Symptome mit der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies verglichen. Die Färbung mit dem Farbstoff DAB fand wie bei den Tabakpflanzen 7 h nach Beginn der Ozonbehandlung statt. Zunächst konnte bei allen Pflanzen außer der Sorte DRK 2003 bei den Ozon-behandelten Pflanzen erhöhte DAB-Färbung gegenüber Kontrollpflanzen festgestellt werden (Abb. 33). Bei DRK 2003 zeichneten sich schon die Kontrollen durch eine Färbung im Bereich von etwa 10 % aus, so dass hier die H_2O_2 -Akkumulation bei den behandelten Pflanzen nicht auf die Ozonexposition zurückgeführt werden konnte. Nur geringe DAB-Färbung konnte bei den Sorten Moneymaker, Piedmont und Trust mit etwa 5 % gefärbter Blattfläche gefunden werden. Etwas stärker gefärbt waren die Blätter der Sorten Thomas, DRK 2003 und Ailsa Craig mit etwa 8 %. Signifikante, durch die Ozonbehandlung induzierte Akkumulation an H_2O_2 in einem Bereich von etwa 20 % der Blattfläche charakterisierte die Sorten Solairo, Roma und Nikita. Roma stellte auch die empfindlichste Sorte mit den meisten Ozonschäden dar.

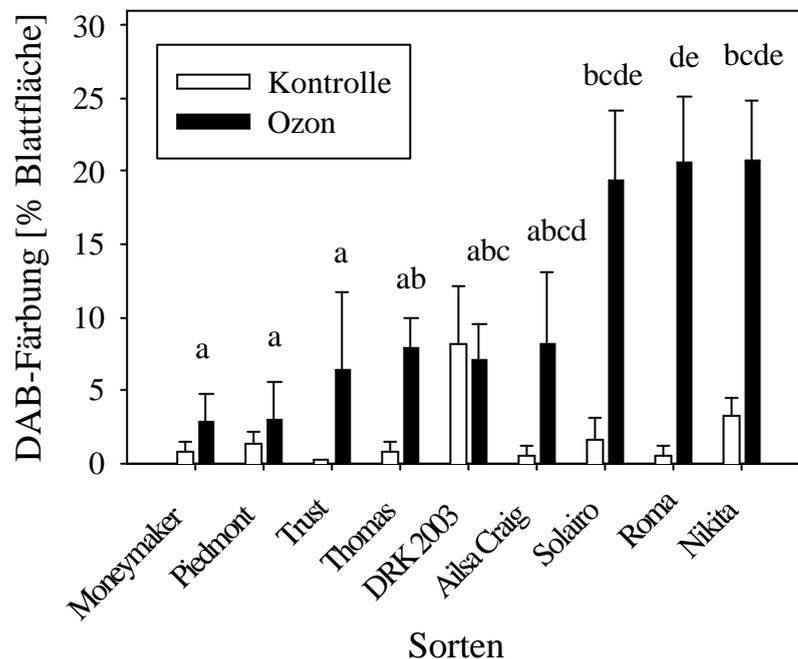


Abb. 33: Darstellung der DAB-gefärbten Blattfläche von Kontroll- und Ozon-behandelten Tomatenpflanzen in Reihenfolge der Blattschädigung. Allen Kontrollen ist der durch den LSD-Test ermittelte Buchstabe ‚a‘ zuzuordnen, bis auf Pflanzen der Sorte DRK 2003 (abc). Die Färbung wurde stets 7 h nach Beginn der 5stündigen Ozonbehandlung (200 nl l^{-1}) durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n=4$). Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (LSD Multiple Range Test).

Betrachtete man die Verteilung der Färbung auf der Blattfläche, so fiel wie bei den Schäden bei den meisten Sorten der starke Aderbezug ins Auge (Abb. 32). Die ozoninduzierte H_2O_2 -Akkumulation konnte hauptsächlich entlang der Adern erster, zweiter und dritter Ordnung gefunden werden. Flächige und punktförmige Färbung nicht nur entlang der Blattadern trat bei der Sorte Trust (Abb. 32d) und der Sorte Solairo auf. Wie in der Abbildung deutlich zu erkennen, korrelierte auch bei den Tomatensorten das Schadbild gut mit der Akkumulation von H_2O_2 .

Deutliche O_2^- -Färbung konnte nur bei der Sorte Thomas erkannt werden. Sie belief sich auf etwa 60 % der Blattfläche. Bei allen anderen Pflanzen war die flächige, über die ganze Fiederblattspreite ausgebreitete Färbung sehr schwach und nur schwer zu bonitieren und darzustellen. Bei der Ozon-empfindlichsten Sorte Roma konnte gar keine O_2^- -Akkumulation festgestellt werden. Somit konnte bei der NBT-Färbung keine Korrelation mit den Schäden hergestellt werden, weder in der Fläche noch im Schadmuster.

2.1.2 Bildung des Pflanzenhormons Ethylen bei Kontroll- und Ozon-behandelten Tomatenpflanzen

Um den Zusammenhang zwischen der Ozonempfindlichkeit, Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und anderen Signalmolekülen besser zu verstehen, wurden Ethylenwerte bei Kontroll- und Ozon-behandelten Tomatenpflanzen gemessen. Die Messung erfolgte wie bei Tabak zwei Stunden nach Beginn der Ozonbehandlung (Langebartels et al., 2000). Abb. 34 stellt die Ergebnisse dar. Eine Induktion der Emission gegenüber den Kontrollen ließ sich bei allen exponierten Pflanzen klar erkennen. Die Gruppe bestehend aus den Sorten Thomas, Ailsa Craig und Trust zeigte geringere Emissionen von etwa $1 \text{ nmol gFG}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Darauf folgten Piedmont, Roma, Moneymaker und Nikita mit einer Ethylenentwicklung von etwa 2-3 $\text{nmol gFG}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die höchste Emission konnte bei Solairo und DRK 2003 gefunden werden. Die Induktionen der Ethylenfreisetzung gegenüber den Kontrollen lagen damit zwischen 5- (Thomas) und 17fach (DRK 2003).

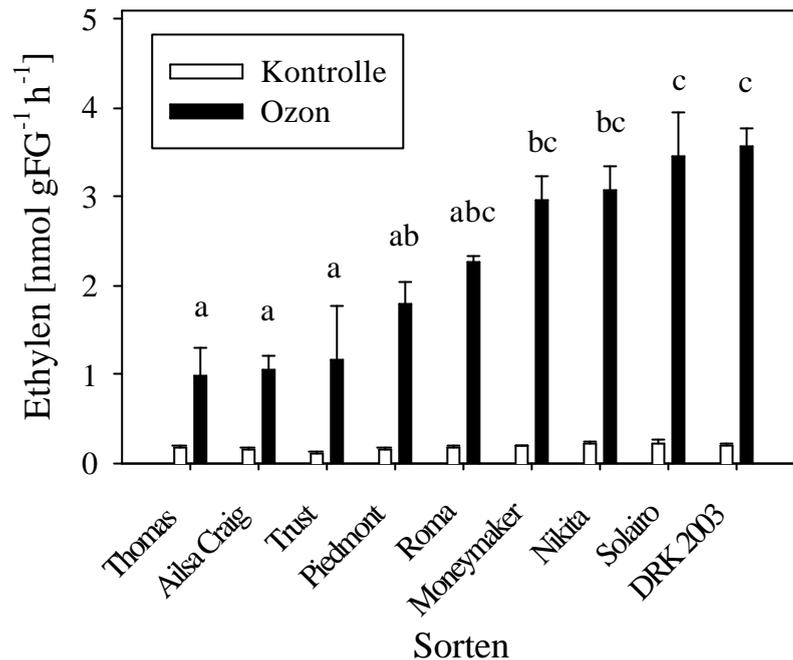


Abb. 34: Ethylenemission bei Kontroll- und Ozon-behandelten Tomatensorten. Das Blattmaterial wurde 2 h nach Beginn der Ozonexposition geerntet und nach einer 1stündigen Inkubation am Gaschromatographen gemessen. Die Kontrollen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n=4$). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind nach dem LSD Multiple Range Test signifikant verschieden.

2.2. *Arabidopsis thaliana* L.

Neben Kulturpflanzen sollten auch Wildpflanzen in die Untersuchungen unterschiedlich ausgeprägter Ozonempfindlichkeit einbezogen werden. So wurden zehn *Arabidopsis*-Ökotypen aus verschiedenen Kontinenten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für fünf Stunden mit $400 \pm 20 \text{ nl l}^{-1}$ bzw. in Folgeversuchen mit $300 \pm 20 \text{ nl l}^{-1}$ Ozon behandelt. Für die Untersuchungen wurden mittelalte und ältere Rosettenblätter herangezogen. Das Alter der Pflanzen betrug zum Zeitpunkt der Exposition etwa vier Wochen.

Die Ökotypen Cape Verde Islands (Cvi-0) und Shokhdara (Sha) erwiesen sich als deutlich empfindlicher als die anderen. Sie wurden aus diesem Grund jeweils nur einen Tag mit Ozon behandelt.

2.2.1 Entstehung von Blattschäden und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies bei Kontroll- und Ozon-exponierten Pflanzen

In allen Versuchen zeigten sich bei dieser Pflanzenart deutliche Unterschiede in der Sensitivität der einzelnen Ökotypen gegenüber Ozon.

Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen werden in Abb. 35 dargestellt. Die Versuchspflanzen der Ökotypen Cvi-0 und Sha waren jeweils nach dem ersten Behandlungstag schon so stark geschädigt, dass eine weitere Ozonbehandlung am folgenden Tag nicht mehr sinnvoll war. Bei dem empfindlichsten Ökotyp Cvi-0 erstreckte sich die geschädigte Blattfläche auf etwa 95 % der Gesamtblattfläche, Ökotyp Sha kam auf mindestens 80 %. Relativ tolerant gegenüber Ozon erwiesen sich bei allen Versuchen die Ökotypen Col-0, Ws-2, Lan-0, LC-0 und Il-1. Die Blätter dieser Ökotypen waren selbst bei 2tägiger Ozonexposition mit 400 nl l^{-1} maximal bis zu 10 % geschädigt. Einen mittleren Schädigungsgrad zeigten die Ökotypen Np-0 und Ler. Der letztgenannte Ökotyp hatte jedoch in einem Vorversuch mit 400 nl l^{-1} kaum Läsionen (nur 5 % der Gesamtblattfläche) ausgebildet. Starke Blattschäden traten bei dem Ökotyp Sap-0 auf. Die geschädigte Blattfläche umfasste hier zwischen 40 und 60 % der Gesamtfläche.

Bei allen Ökotypen waren die durch Ozon hervorgerufenen Läsionen 72 h nach Beginn der Exposition als weiße, pergamentartige Stellen zu erkennen (Abb. 36). Die Läsionen bei den äußerst empfindlichen Sorten Cvi-0 und Sha wurden zuerst an den Blatträndern sichtbar und wanderten dann Richtung Mittelrippe, bis fast die gesamte Blattspreite betroffen war. Auch die Pflanzen des Ökotyps Np-0 zeigten die Schäden hauptsächlich entlang der Blattränder. Punktförmige Läsionen über die gesamte Blattfläche hinweg konnten bei den Ökotypen Il-1 und Sap-0 gefunden werden (Abb. 36c und e). Das in Abb. 36a dargestellte Ozon-behandelte Blatt von Col-0 war im Vergleich mit anderen Blättern dieses Ökotyps überdurchschnittlich stark geschädigt.

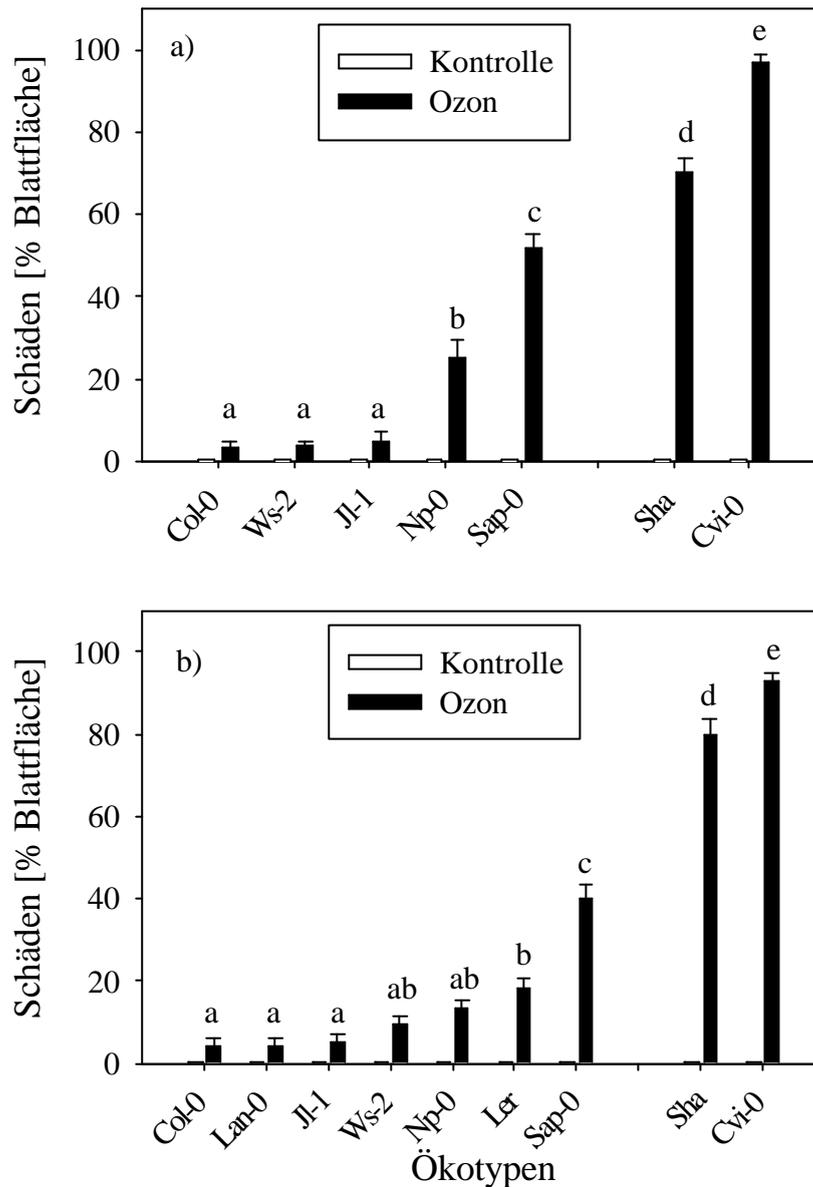


Abb. 35: Durch Ozonexposition induzierte Ausbildung von Blattschäden bei verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis thaliana*. Die Pflanzen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für 5h mit 300 nl l^{-1} Ozon behandelt. Die abgesetzten Ökotypen Sha und Cvi-0 zeigten schon nach einer einmaligen Exposition so starke Schädigung, dass eine weitere Behandlung nicht mehr sinnvoll erschien. Die Abbildungen a) und b) stellen unabhängige Versuche dar. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n=5$). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (LSD Multiple Range Test).

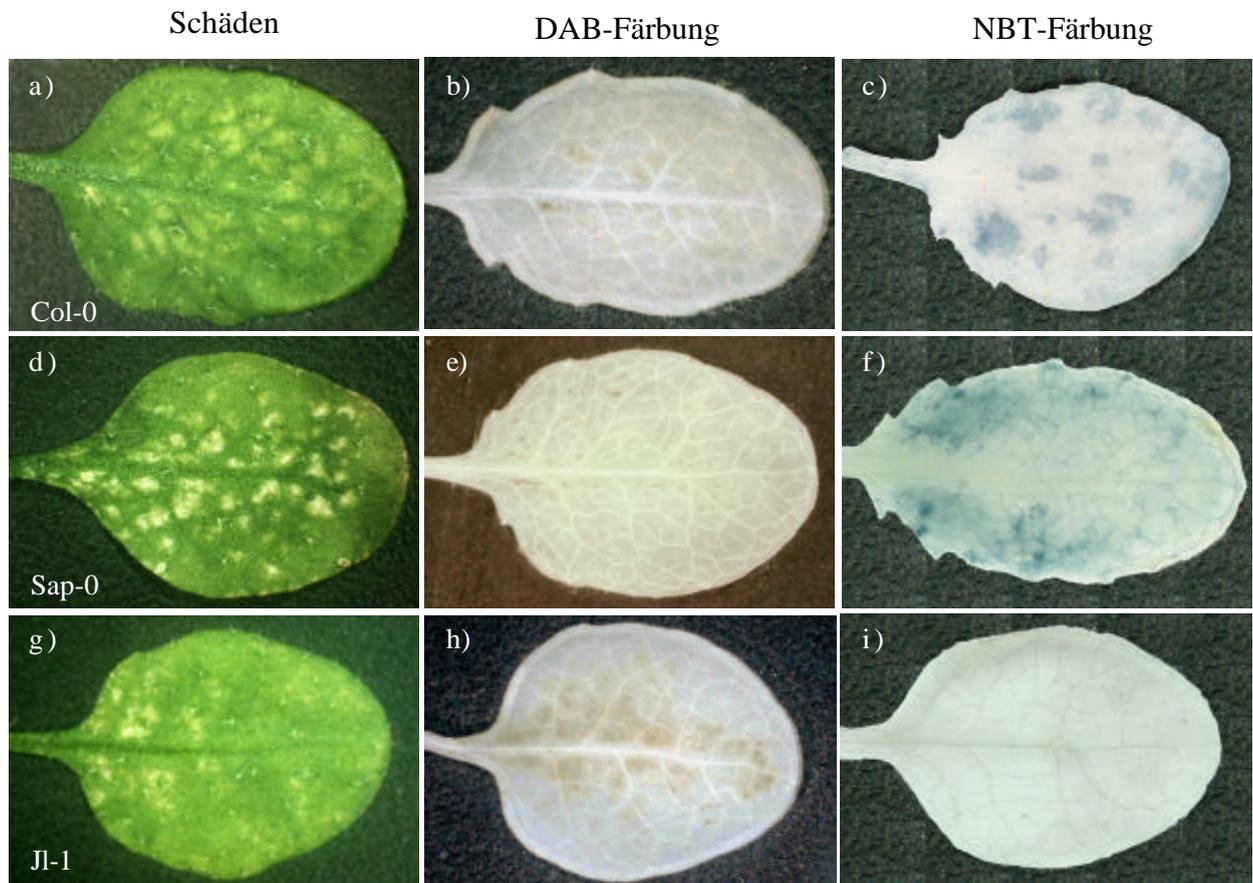


Abb. 36: Schadbilder (a, d, g) und Akkumulation der Sauerstoffspezies (b, c, e, f, h, i) der Ozon-behandelten *Arabidopsis*-Ökotypen Col-0, Sap-0 und Il-1. Die Pflanzen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für 5 h mit $400 \pm 20 \text{ nl l}^{-1}$ Ozon behandelt. Die DAB- und NBT-Färbungen erfolgten nach dem zweiten Behandlungstag. Die Aufnahmen wurden 72 h nach Expositionsbeginn gemacht.

Mit Hilfe der DAB-Färbung konnte bei Pflanzen des Ökotyps Ws-2, Sap-0, LC-0, Ler, Lan-0 und Col-0 gegenüber den Kontrollen nur kaum oder leicht erhöhte H_2O_2 -Akkumulation nachgewiesen werden (Abb. 37a). Sie umfasste nach zweitägiger Behandlung mit 400 nl l^{-1} Ozon nur bis ca. 4 % der Blattfläche. Signifikant mehr gefärbte Blattfläche trat bei den Ökotypen Il-1 und Np-0 auf, bei denen etwa 10 bzw. 15 % der Blattfläche braunrote Farbe zeigten. Die H_2O_2 -Akkumulation bei den sehr empfindlichen Ökotypen Sha und Cvi-0 konnte in diesem Versuch nicht ermittelt werden, da sie 7 h nach Beginn des ersten Expositionstags schon zu sehr geschädigt waren. Bei allen Ökotypen mit H_2O_2 -Akkumulation zeigte sich die Färbung hauptsächlich in der Nähe der Mittelrippe (Abb. 36b und h), meistens am Blattgrund deutlicher ausgeprägt als an den Blattspitzen. Selten war die Färbung flächig, wie bei Ökotyp Il-1 (Abb. 36h), meist zeigte sie ein punktförmiges Muster.

Als Nachweis, dass die braunrote DAB-Färbung tatsächlich aus der Akkumulation von H_2O_2 resultierte, wurde in einem weiteren Versuch nach einer zweitägigen Ozonbehandlung mit 300 nl l^{-1} in einige Pflanzen gleichzeitig mit dem Farbstoff DAB Catalase (Rinderleber) infiltriert. Dieses Enzym sorgt für die Disproportionierung von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff. Abb. 37 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Die beiden Ökotypen Sha und Cvi-0 wurden schon nach dem ersten Behandlungstag infiltriert. In Abb. 37b fällt zunächst auf, dass in diesem Versuch die Ozon-behandelten Blätter des Ökotyps Sap-0 eine stärkere DAB-Färbung aufwiesen als bei der Exposition bei 400 nl l^{-1} . Bezieht man jedoch die ebenfalls verstärkte Färbung der Kontrollblätter in die Auswertung mit ein, so ergab sich durch die Behandlung wieder keine signifikante Akkumulation von H_2O_2 . Die braunrot gefärbte Fläche bei Ozon-behandelten Pflanzen des Ökotyps Il-1 lag nur leicht unter dem Anteil von der Exposition mit 100 nl l^{-1} mehr. Trotz der hohen Empfindlichkeit gegenüber Ozon konnte bei dem Ökotyp Cvi-0 keine H_2O_2 -Akkumulation festgestellt werden, im Gegensatz zu dem Ökotyp Sha, welcher nach nur einem Behandlungstag mit 300 nl l^{-1} eine deutlich gefärbte Blattfläche von etwa 20 % zeigte. Durch die Coinfiltration von DAB und Catalase (Abb. 37c) konnte die gefärbte Blattfläche bei allen Pflanzen außer den Ozon-behandelten Pflanzen des Ökotyps Il-1 deutlich reduziert werden. Bei den Ozon-exponierten Blättern der Ökotypen Sap-0 und Sha betrug die Reduktion der DAB-Färbung über 70 %.

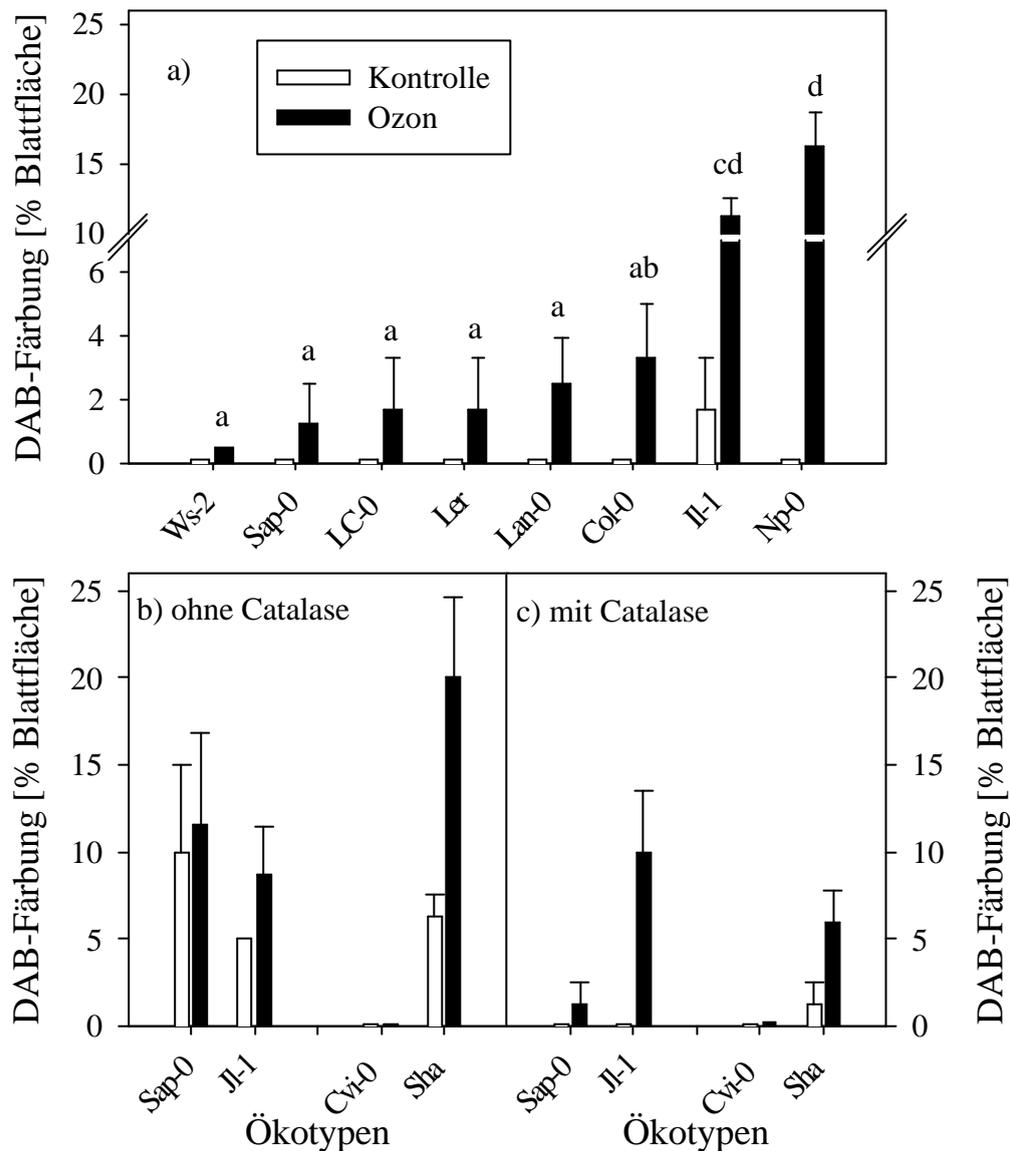


Abb. 37: Prozentuale Akkumulation von H_2O_2 in Kontroll- und Ozon-behandelten Pflanzen verschiedener *Arabidopsis*-Ökotypen. Die Pflanzen in a) wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für 5 h mit 400 nl l^{-1} Ozon behandelt, Pflanzen in b) und c) erhielten 300 nl l^{-1} . Die abgesetzten Ökotypen Cvi-0 und Sha wurden nur einen Tag exponiert. Gleichzeitig mit dem Farbstoff DAB wurde in c) das Enzym Catalase als Nachweis der Spezifität der Färbung 7 h nach Beginn der Exposition infiltriert. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (LSD Multiple Range Test).

Parallel zu den Untersuchungen zur Akkumulation von H_2O_2 wurden NBT-Färbungen durchgeführt. Nach einer zweitägigen Exposition bei 400 nl l^{-1} Ozon zeigten nur die Ökotypen Il-1 und Lan-0 keine signifikanten Unterschiede in der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Akkumulation zwischen unbehandelten und behandelten Pflanzen (Abb. 38a). Im Unterschied zu den untersuchten Vertretern der Familie der *Solanaceae* konnte aber bei den restlichen *Arabidopsis*-Ökotypen signifikante, Ozon-induzierte $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Akkumulation nachgewiesen werden. Während der Ökotyp

Ws-2 nur leicht erhöhte NBT-Färbung (bis zu etwa 10 % der Gesamtblattfläche) hatte, waren bei den Ökotypen Col-0, Np-0, LC-0 und Ler zwischen 15 und 22 % der Blattflächen gefärbt. Die meiste Akkumulation von $O_2^{\cdot-}$ nach der Ozonbehandlung konnte bei dem Ökotyp Sap-0 gefunden werden. Das Muster der NBT-Färbung (Abb. 36) dieses Ökotyps wies dunklere, punktförmige Stellen neben flächiger Färbung auf. Bei den meisten anderen Ökotypen zeigte sich die nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Akkumulation eher flächiger wie z.B. bei Col-0 (Abb. 36c).

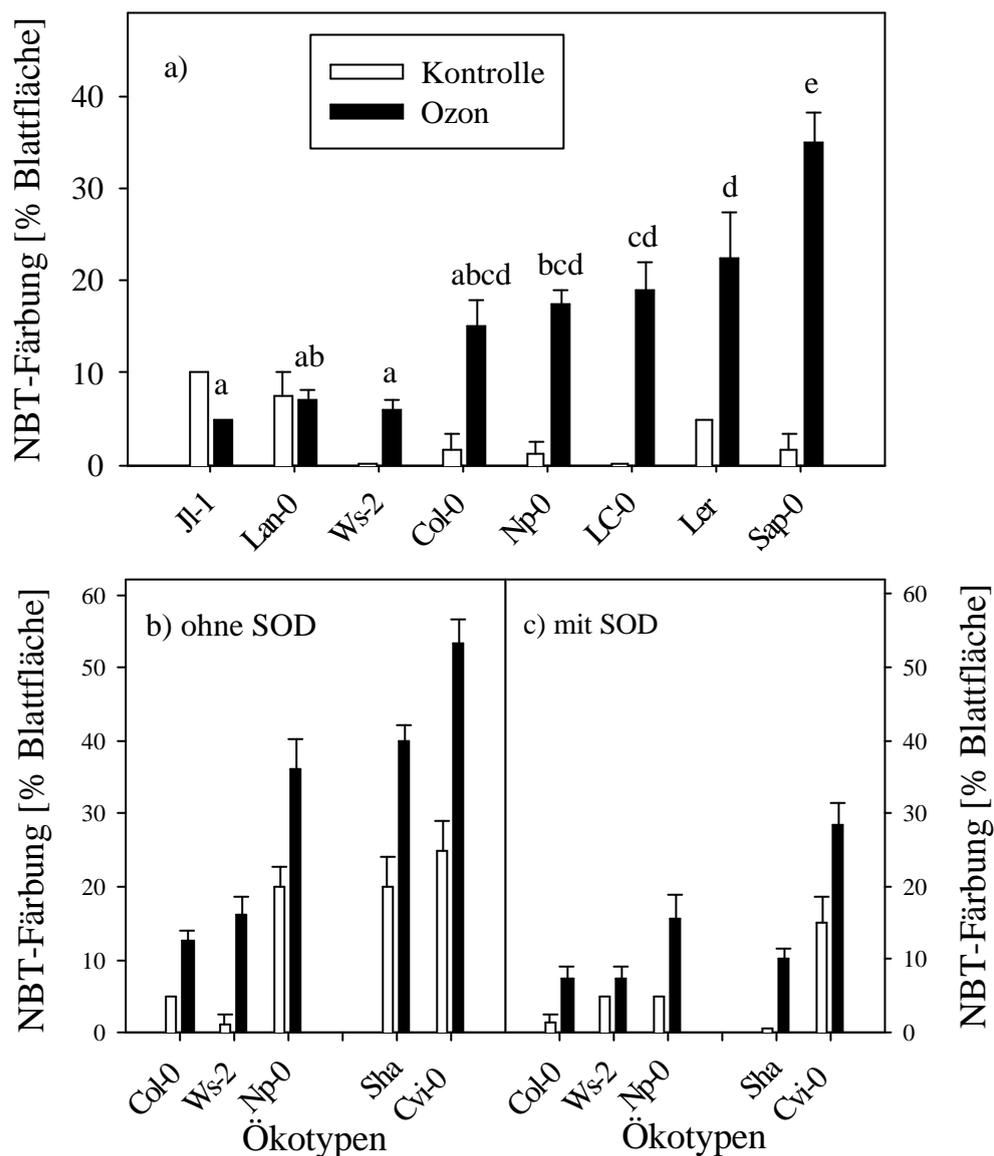


Abb. 38: Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Akkumulation nach zweitägiger Ozonbehandlung mit 400 nl l^{-1} (a) bzw. 300 nl l^{-1} (b und c) bei verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen. In c) wurde gleichzeitig mit dem Farbstoff NBT auch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) infiltriert und dadurch die Spezifität der Färbung auf $O_2^{\cdot-}$ überprüft. Die abgesetzten Pflanzen wurden nur einen Tag behandelt. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind nach dem LSD Multiple Range Test signifikant verschieden.

Wie für die DAB-Färbung wurde auch für die NBT-Färbung die Spezifität überprüft (Baker & Orlandi, 1995). Nach einer Ozonbehandlung mit 300 nl l^{-1} wurden in einen Teil der Pflanzen gleichzeitig mit der Farbstofflösung das Enzym Superoxiddismutase (SOD, Meerrettich) infiltriert. In Abb. 38b und c ist das Ergebnis zu sehen. Die Ökotypen Col-0 und Ws-2 zeigten wieder eine prozentual gefärbte Blattfläche von etwa 10 %, Sap-0 war mit etwa 35 % wieder stärker gefärbt. Deutlich mehr O_2^- akkumulierte in diesem Versuch gegenüber dem ersten der Ökotyp Np-0, nämlich trotz einer um 100 nl l^{-1} verringerten Ozonkonzentration etwa das Doppelte. Die höchste Akkumulation konnte jedoch bei den empfindlichsten Ökotypen Sha und Cvi-0, die nur einen Tag behandelt wurden, nachgewiesen werden. Sie erstreckte sich über 40-50 % der gesamten Blattfläche. Die Coinfiltration mit SOD verringerte bei fast allen Ökotypen die prozentual gefärbte Blattfläche. Die Reduktion lag hierbei zwischen 40 (Col-0) und 80 % (Sha). Eine Ausnahme bildete der Ökotyp Sap-0. Hier hatte die Infiltration von SOD keine Auswirkungen auf die durch NBT gefärbte Blattfläche.

2.2.2 Ozon-induzierte Emission von Ethylen bei verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen

Bei allen bisher untersuchten Pflanzen ging die durch Ozon induzierte Ausbildung von Blattschäden einher mit einer erhöhten Ethylenemission. Dies sollte auch bei den verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen geprüft werden. Die Emission wurde hier für ganze Blattrosetten bestimmt. Die Ernte des Blattmaterials während einer zweitägigen Ozonexposition erfolgte sowohl am ersten als auch zweiten Tag zwei Stunden nach Behandlungsbeginn. Abb. 39 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. Zwei Stunden nach Beginn des Versuchs emittieren alle exponierten Pflanzen mehr Ethylen als die Kontrollen. Die Induktionsfaktoren bewegten sich im Bereich von 1,7 (Col-0) und 7,0 (Sap-0). Gegenüber den unbehandelten Pflanzen waren die Unterschiede bei den behandelten Ökotypen Ler und Col-0 jedoch nicht signifikant. Eine mittlere Ethylenemission konnte bei den Ökotypen Lan-0, Sha, Ws-2 und Jl-1 gemessen werden. Durch eine höhere bis hohe Bildung dieses Signalmoleküls zeichneten sich die Ökotypen Cvi-0, Np-0 und Sap-0 aus. Die letztgenannten Pflanzen erreichten Werte von etwa $2,3 \text{ nmol gFG}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Betrachtet man die Ethylenwerte des folgenden Expositionstags in Abb. 39b, werden sofort die verringerten Emissionen deutlich. Bei kaum einem Ökotyp ließ sich am zweiten Behandlungstag noch eine gegenüber den Kontrollpflanzen erhöhte Abgabe feststellen. Eine Ausnahme stellten in allen

Versuchen lediglich die behandelten Pflanzen des Ökotyps Sap-0 dar. Hier lag der Induktionsfaktor noch bei 2,5.

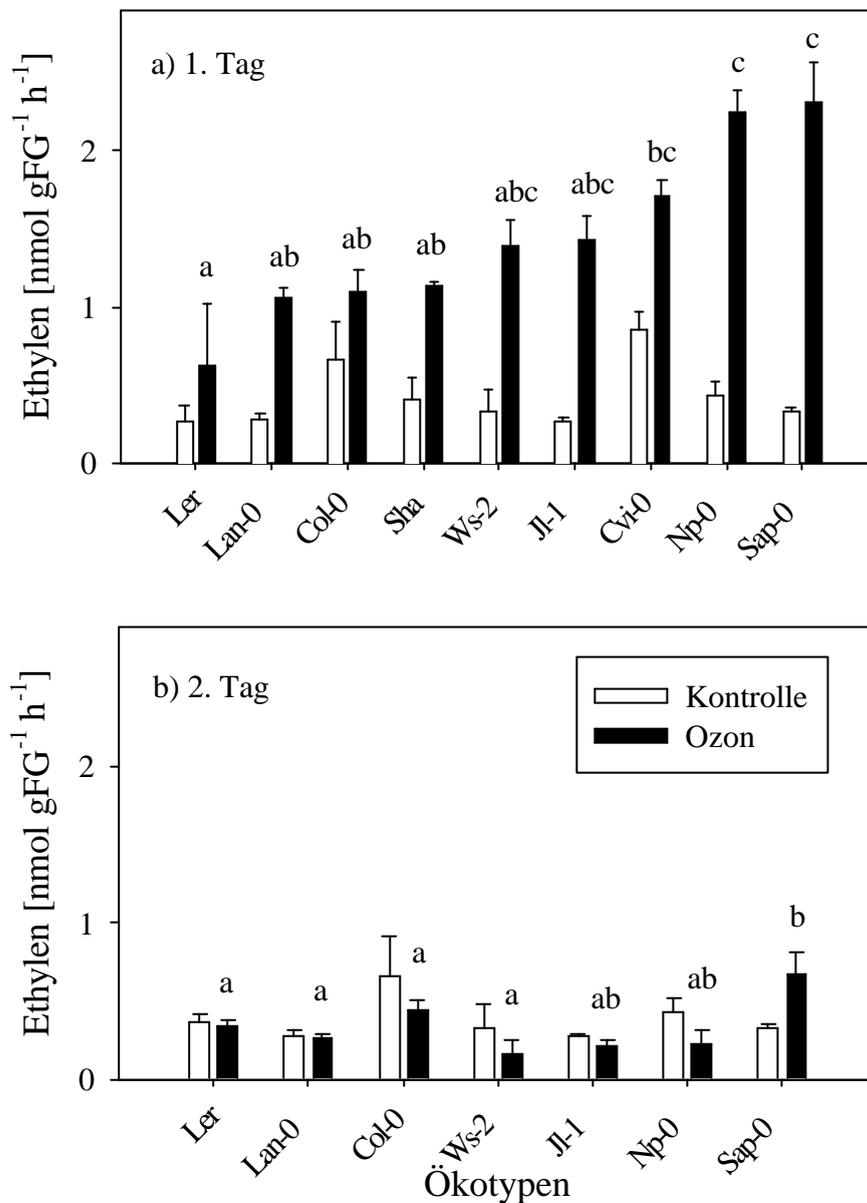


Abb. 39: Ethylenemission von Kontroll- und Ozon-behandelten Pflanzen verschiedener *Arabidopsis*-Ökotypen. In a) ist die Bildung des pflanzlichen Hormons am ersten Behandlungstag zu sehen, in b) am zweiten. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte stets zwei Stunden nach Beginn der Exposition. Die Ökotypen Sha und Cvi-0 konnten aufgrund des hohen Schädigungsgrad nach dem ersten Behandlungstag am zweiten Tag nicht mehr untersucht werden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. (n=3). Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (LSD Multiple Range Test).

2.3. Malve (*Malva sylvestris* L. und *M. moschata* L.)

Die Wildpflanze *M. sylvestris* wurde in der Literatur (Bergmann et al., 1998) im Vergleich zu *M. moschata* als Ozon-empfindlich charakterisiert. Bei diesen beiden Pflanzenarten sollte ebenfalls die Korrelation zwischen der Ausbildung von Blattschäden, Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und der Emission des Signalmoleküls Ethylen untersucht werden.

2.3.1 Korrelation der Blattschäden mit der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies

Beide Malvenarten wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für 5 h mit 150 nl l^{-1} Ozon behandelt. Zu diesem Zeitpunkt besaßen sie ein Alter von etwa sechs Wochen und hatten 5-6 Folgeblätter entwickelt. Nach dem ersten Behandlungstag zeigten sich die behandelten Blätter von *M. sylvestris* im Gegensatz zu *M. moschata* mit deutlicher Epinastie (Abb. 40c und d), bei beiden Arten waren aber keinerlei Läsionen zu erkennen. Diese waren erst nach einer weiteren, 5stündigen Exposition nur bei *M. sylvestris* zu sehen und betrug im Durchschnitt knapp 10 % der Gesamtblattfläche (Abb. 42). Besonders bei den etwas älteren Blättern verliefen die weißen, pergamentartigen Läsionen hauptsächlich entlang der Blattadern (Abb. 40b). Bei den jüngeren Blättern traten zusätzlich noch flächigere Läsionen auf, bei denen kein Aderbezug ermittelt werden konnte. Die jüngsten Blätter zeigten keine Symptome.

Die Färbungen zum Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies erfolgten 7h nach Beginn der Exposition. Weder bei unbehandelten noch bei behandelten Blättern beider Malvenarten konnte eine signifikante H_2O_2 -Akkumulation festgestellt werden. Deutliche NBT-Färbung charakterisierte die Ozon-behandelten mittelalten Blätter von *M. sylvestris*. Auf etwa 25 % der Blattspreite konnte hier $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Akkumulation nachgewiesen werden (Abb. 42f). Abb. 40h zeigt das Muster der NBT-Färbung auf dem Gesamtblatt. Abb. 43a stellt eine vergrößerte Aufnahme eines NBT-gefärbten Blattes dar, um auch bei dieser Färbung die Häufung der Flecken mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Akkumulation in der Nähe von Blattadern aufzuzeigen.

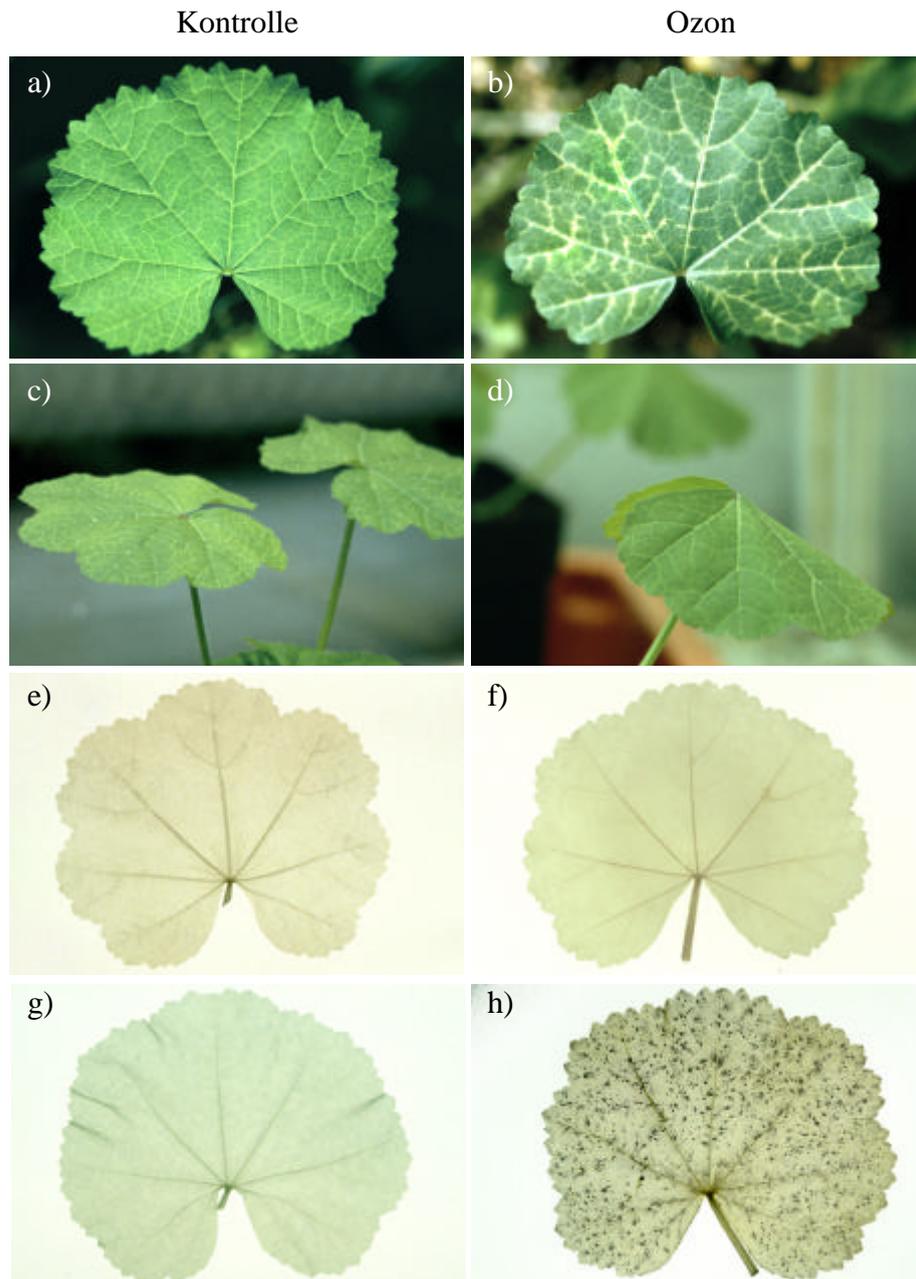


Abb. 40: Symptome (a-d) und Muster der DAB- und NBT-Färbungen (e-h) bei Kontrollen und Ozon-behandelten Pflanzen von *M. sylvestris*. Die Färbungen auf H_2O_2 und O_2^- wurden zwei Stunden nach Beendigung der Exposition durchgeführt. Die Fotos c und d wurden 1 h nach Expositionsende aufgenommen, die anderen 48 h später.

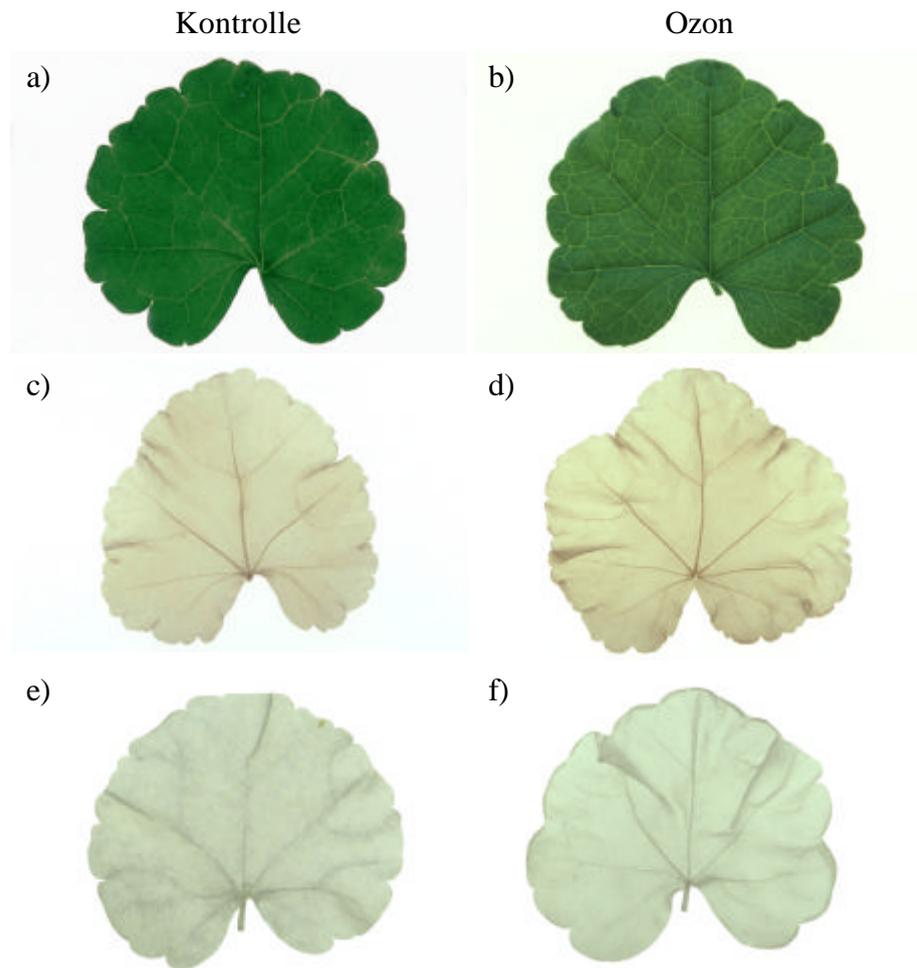


Abb. 41: Blattschäden und Nachweis von H_2O_2 und O_2^- (7 h nach Behandlungsbeginn) bei *M. moschata*. Die Fotos a, c und e zeigen Kontrollpflanzen, in b, d, und f sind Ozonbehandelte ($5 \text{ h}, 150 \text{ nl l}^{-1}$) Blätter zu sehen.

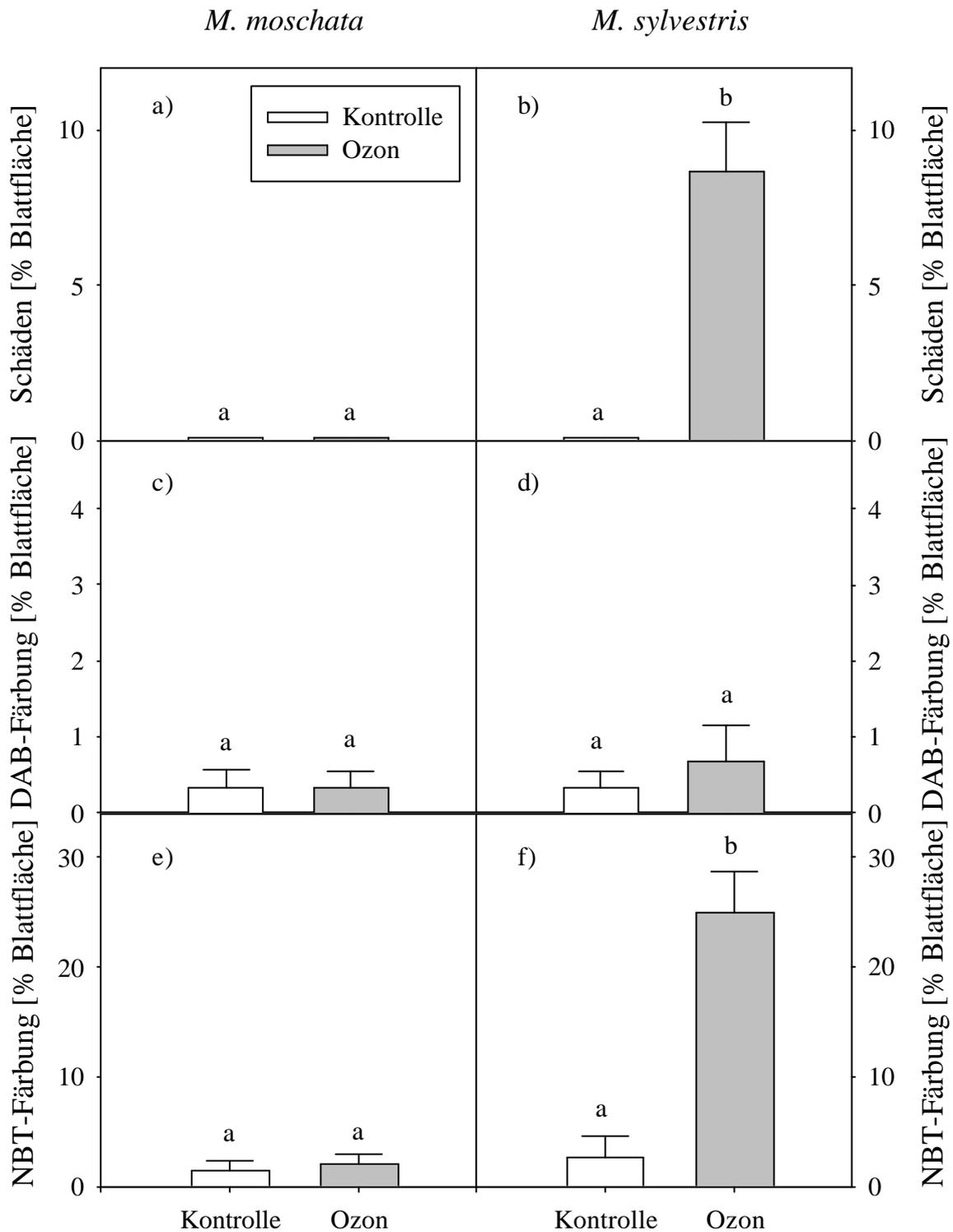


Abb. 42: Quantitative Analysen der geschädigten Blattflächen sowie der mit DAB- und NBT gefärbten Fläche bei den Malvenarten *M. moschata* und *M. sylvestris* nach einer 5stündigen Behandlung mit 150 nl l^{-1} Ozon. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n=6$). Zu beachten sind die unterschiedlichen Ordinaten bei c und d gegenüber e und f. Nur Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (LSD Multiple Range Test).

Mit Hilfe einer gleichzeitigen Infiltration von NBT und dem Enzym SOD (Meerrettich) sollte die Spezifität des Farbstoffs für $O_2^{\cdot-}$ nachgewiesen werden (Baker & Orlandi, 1995). Abb. 43b) und c) zeigen den Vergleich zweier Ozon-behandelter Blätter, wobei das Blatt in b) nur mit der normalen Färbelösung infiltriert wurde, das Blatt c) zusätzlich mit SOD. Sehr deutlich war eine Reduktion der Intensität der Färbung zu erkennen, nur noch eine äußerst schwache $O_2^{\cdot-}$ -Akkumulation konnte wahrgenommen werden. Allerdings konnte unter Aufsicht erkannt werden, dass die prozentual gefärbte Fläche gegenüber Blatt b) etwa gleich blieb.



Abb. 43: NBT-Färbung von *M. sylvestris*-Blättern. Pflanzen wurden für 5 h mit $150 \text{ nl } \Gamma^1$ Ozon behandelt und 2 h später mit NBT infiltriert. a) stellt eine Aufnahme mit dem Binokular dar, b) und c) zeigt den Vergleich zwischen der Infiltration mit der normalen Färbelösung (b) und zusätzlicher SOD-Zugabe (c).

2.3.2 Vergleich der Ozon-induzierten Emission von Ethylen zwischen *M. moschata* und *M. sylvestris*

Vergleichende Messungen der Ethylenemissionen der Blätter 2-5 zwischen Kontroll- und Ozon-behandelten Pflanzen zweier Vertreter der Gattung *Malva* ergaben zunächst für die Art *M. moschata* keine quantitativen Unterschiede (Abb. 44a). Die Emission bei unbehandelten und behandelten Pflanzen lag hier jeweils bei etwa $0,5 \text{ nmol gFG}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Etwa die gleiche Menge an Ethylen setzten auch die Kontrollpflanzen von *M. sylvestris* frei (Abb. 44b). Eine signifikante Induktion der Emission zeigten jedoch die für 2 h mit $150 \text{ nl } \Gamma^1$ Ozon behandelten Pflanzen. Sie emittierten etwa das 6fache gegenüber den Kontrollpflanzen und den Pflanzen beider Behandlungen von *M. moschata*.

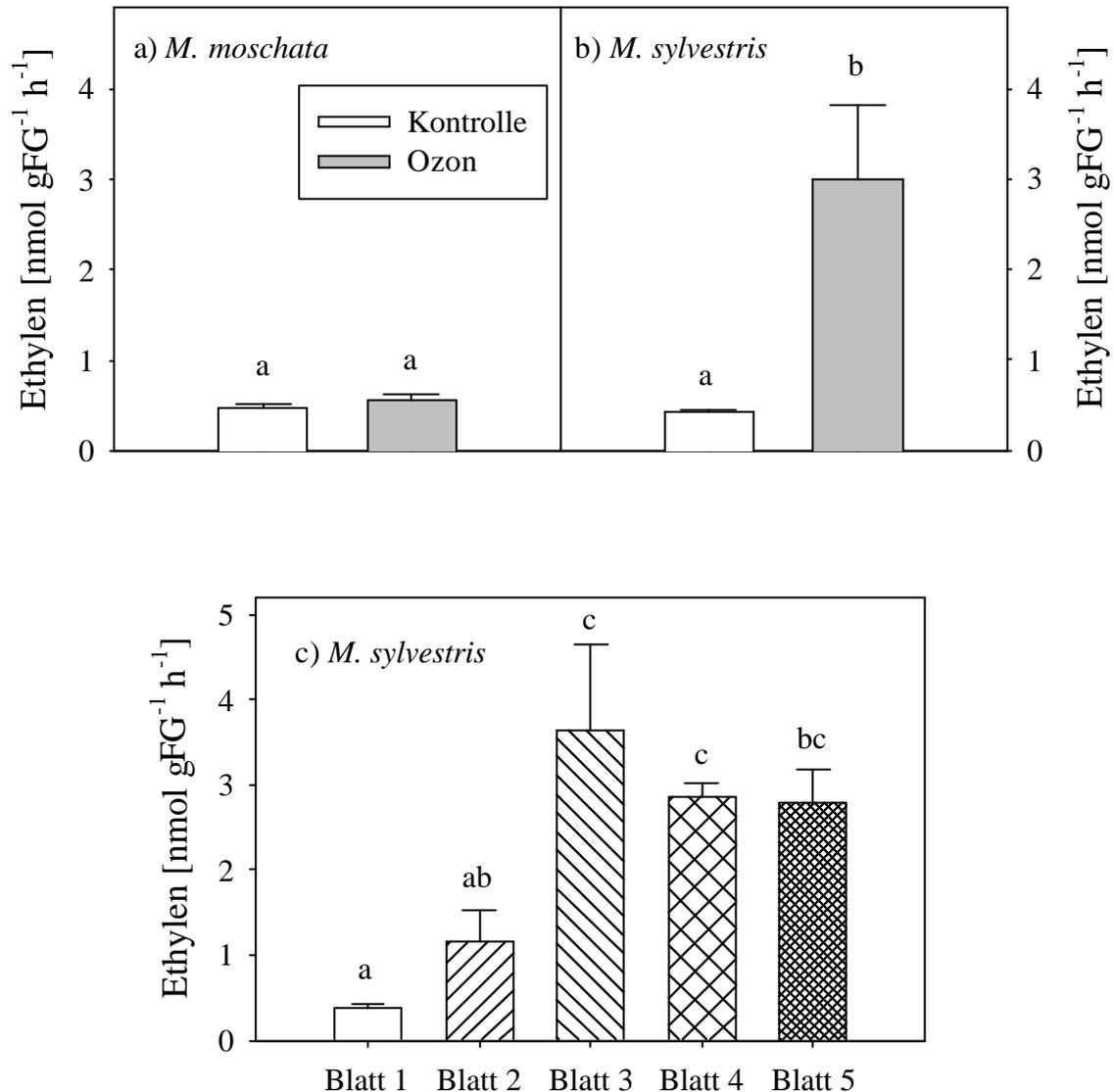


Abb. 44: Vergleich der Ethylenemission zwischen Kontroll- und Ozon-behandelten Pflanzen von *M. moschata* und *M. sylvestris* (a und b). Das Blattmaterial von Blatt 2-5 wurde 2 h nach Beginn einer Exposition mit 150 nl l^{-1} geerntet. c) zeigt die Abhängigkeit der Ethylenemission bei *M. sylvestris* vom Blattalter in einem weiteren Versuch. Blatt 1 stellte das jüngste Blatt dar, Blatt 5 das älteste. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n=4$). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (LSD Multiple Range Test).

Bei einer genaueren Analyse der Ethylenabgabe bei Ozon-behandelten Blättern von *M. sylvestris* ergab sich eine deutliche Abhängigkeit vom Blattalter (Abb. 44). Nach einer 2stündigen Behandlung mit 150 nl l^{-1} Ozon setzten die jüngeren Blätter signifikant weniger des pflanzlichen Hormons frei als die mittelalten und alten Blätter. Die höchste Emission konnte bei Blatt 3 mit $3,6 \text{ nmol gFG}^{-1} \text{ h}^{-1}$ festgestellt werden.

2.3.3 Freilandversuche von *M. sylvestris* und zwei verschiedenen Ampferarten

In Open-top Kammern auf dem Gelände des Instituts für Agrarökologie der FAL Braunschweig wurden neben *M. sylvestris* mit *Rumex crispus* L. und *R. obtusifolius* L. zwei Ampferarten über einen Zeitraum von vier Wochen ambienten und 1,7x ambienten Ozonkonzentrationen ausgesetzt. Von beiden Ampferarten war aus einer früheren Studie (Bergmann et al., 1999) bekannt, dass sie mit Blattverfärbungen auf Ozon reagieren. Die Ozonmaxima der Erntetage lagen bei *M. sylvestris* bei 73 nl l^{-1} , bei den beiden Ampferarten bei 65 nl l^{-1} . Die berechneten AOT40-Werte ergaben für die ambiente Behandlung $3820 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$ für die 1,7x ambiente $11480 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$. In dieser Arbeit sollten erstmalig Wildpflanzen auf das Vorkommen einer Ozon-induzierten Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und die Korrelation mit den Schadsymptomen untersucht werden.

2.3.3.1 Ozoninduzierte Blattschäden und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies

Eine Exposition bei ambienten Ozonkonzentrationen bewirkten bei keiner Pflanzenart die Bildung von Läsionen bzw. eine signifikante Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies. Dagegen konnten Reaktionen der Pflanzen auf die erhöhten Konzentrationen verzeichnet werden (Abb. 45). Bei der Malve traten erste Ozon-induzierte Schäden nach einer Expositionszeit von einer Woche auf. Nach 3wöchiger Exposition zeigten alle Versuchspflanzen dieser Art pergamentartige Läsionen an den älteren Blättern. Diese Schäden waren flächig zwischen den Blattadern über die Blattspreite verteilt (Abb. 45a). Zusätzlich konnten noch schwarze, punktförmige Läsionen entlang der Blattadern entdeckt werden. Nach 4wöchiger Exposition mit 1,7x Ozonwerten waren etwa 60 % der gesamten Blattfläche älterer Blätter geschädigt.

Ozonbehandlungen in Expositions-kammern hatten bei *M. sylvestris* starke O_2^- -Akkumulation (Abschnitt 2.3.1) gezeigt. Dieser Befund wurde im Freiland bestätigt. So konnte bei diesen Pflanzen unter 1,7x ambienten Ozonkonzentrationen ebenfalls keine signifikante DAB-Färbung, dafür aber wieder hauptsächlich entlang der Blattadern starke NBT-Färbung gefunden werden (Abb. 45b und c). Die untersuchten mittelalten Blätter wiesen eine bis zu 50 % der Gesamtblattfläche umfassende Blaufärbung auf, zeigten jedoch noch keine sichtbaren Schadsymptome.

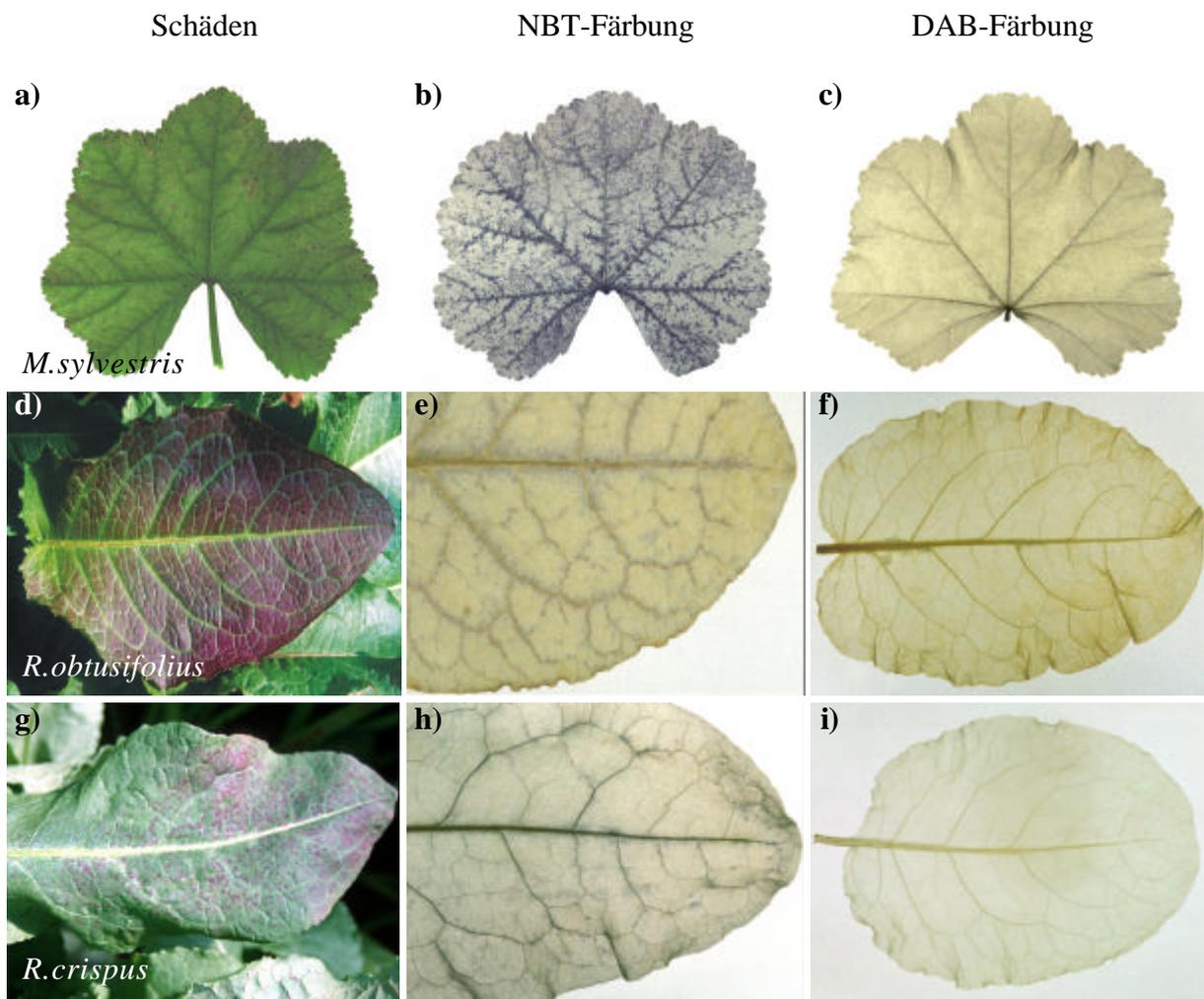


Abb. 45: Blattschäden (a, d, g) und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (b, c, e, f, h, i) bei *M. sylvestris* (a-c), *R. obtusifolius* (d-f) und *R. crispus* (g-i) nach 4wöchiger Ozonexposition unter 1,7x ambienten Konzentrationen in Open-top Kammern.

Wie die Malve reagierten die beiden Ampferarten *R. crispus* und *R. obtusifolius* ebenfalls auf die 1,7x ambienten Ozonkonzentrationen mit den in der Literatur (Bergmann et al., 1998) beschriebenen Symptomen: Nach einer Expositionszeit von vier Wochen zeigten ca. 12 % aller Blätter der sieben Wochen alten Versuchspflanzen von *R. crispus* schwache bis mittlere rote Verfärbung an den älteren Blättern (Abb. 45d). Diese konnte wahrscheinlich auf eine erhöhte Akkumulation von Anthocyanen zurückgeführt werden. Auch bei *R. obtusifolius* führte die Exposition bei 22 % der älteren Blätter zu einer Rotfärbung.

Der Nachweis auf H_2O_2 mit Hilfe von DAB war bei beiden Ampfersorten negativ. Vier Wochen mit 1,7x ambienten Ozonkonzentrationen behandelte Pflanzen von *R. crispus* und *R. obtusifolius* (Abb. 45f und i) zeigten somit keine H_2O_2 -Akkumulation.

Wie bei der Malve konnte allerdings deutliche $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Akkumulation mit Hilfe von NBT-Färbung nachgewiesen werden. Bei *R. obtusifolius* waren bis zu 24 % der gesamten Blattfläche blau gefärbt, bei *R. crispus* nur etwa 11 % (Abb. 45e und h). Die NBT-Färbung erstreckte sich bei beiden Arten punktförmig entlang der Blattadern.

2.3.3.2 Induktion des Gehalts der Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure

Von den vier Wochen in Open-top Kammern exponierten Pflanzen wurde an ihrem Erntetag morgens um 11 Uhr Blattmaterial zur Bestimmung der ACC-Konzentrationen gewonnen. Der direkte Vorläufer von Ethylen sollte Rückschlüsse auf eine eventuell vorhandene erhöhte Emission erlauben. In Abb. 46 sind die Ergebnisse der Messungen zu sehen. Bei den untersuchten Malven konnten signifikante Unterschiede zwischen den Pflanzen der ambienten und 1,7x ambienten Ozonbehandlung festgestellt werden. Sowohl freies als auch konjugiertes ACC war um etwa den Faktor 3 höher bei den Pflanzen mit der höheren Ozonkonzentration.

Die ACC-Werte der beiden Ampfer-Arten unter ambienten Bedingungen lagen mit etwa $0,15 \text{ nmol gFG}^{-1}$ im gleichen Bereich wie die der Malve. Die 1,7fache Erhöhung dieser Ozonkonzentration konnte aber keine Steigerung der ACC-Gehalte bewirken. Dieses galt auch für die Werte der ACC-Konjugate. Diese betragen sowohl bei *R. crispus* und als auch bei *R. obtusifolius* jeweils 3,4-3,8 nmol gFG^{-1} bei beiden Ozonbedingungen.

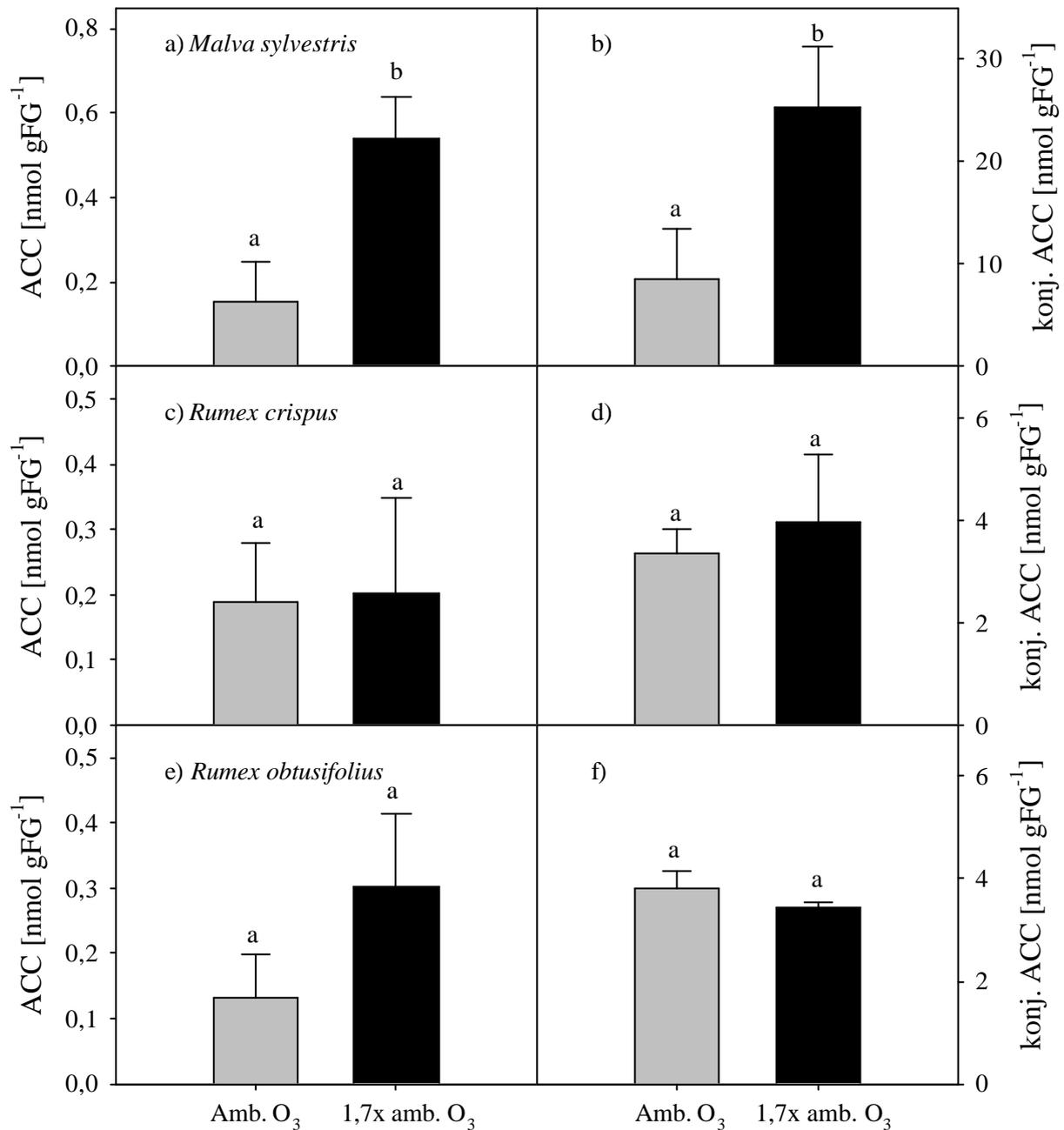
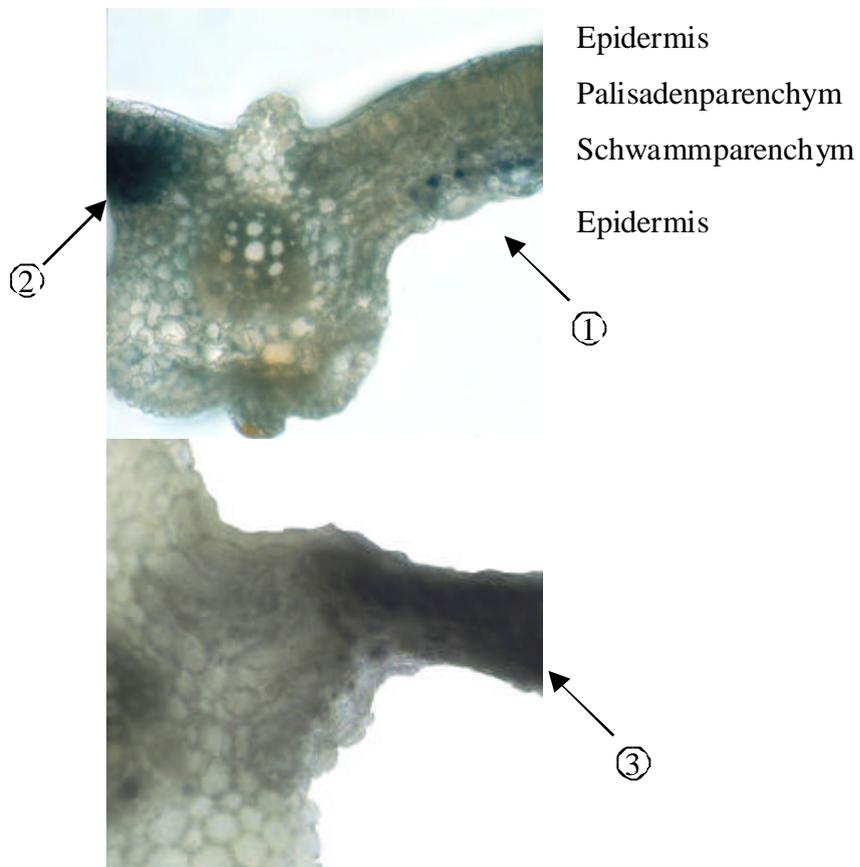


Abb. 46: Darstellung der Gehalte an freiem (a, c, e) und konjugiertem (b, d, f) ACC bei *M. sylvestris* (a, b) und den beiden Ampferarten *R. crispus* (c, d) und *R. obtusifolius* (e, f) unter ambienten und 1,7x ambienten Ozonkonzentrationen. Die Pflanzen wurden vier Wochen lang in Open-top Kammern exponiert, das Pflanzenmaterial für die Messung am Erntetag um 11 Uhr gewonnen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E. (n=4). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind nach dem LSD Multiple Range Test signifikant verschieden.

2.4. Mikroskopische Untersuchungen zur räumlichen und zeitlichen Verteilung der Akkumulation reaktiver Sauerstoffverbindungen bei Tabak und Malve

2.4.1 Malve

Mit Hilfe von histologischen Untersuchungen sollten weitere Aufschlüsse über die Lokalisation der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies gewonnen werden. Dafür wurden Blattquerschnitte angefertigt und mikroskopisch untersucht. 30 min nach Beendigung einer für *M. sylvestris* standardmäßigen Ozonexposition für 5 h mit 150 nl l^{-1} wurden Blätter behandelte und unbehandelte Pflanzen mit einer NBT-Färbelösung infiltriert und für mindestens 30 min inkubiert. Die mit der Hand angefertigten, entfärbten Schnitte wurden anschließend an einem Axioskop (Zeiss) ausgewertet. Während Schnitte von Kontrollpflanzen höchstens leichte, flächigere NBT-Färbung zeigten, konnten bei den Ozon-behandelten Pflanzen dunkelblau gefärbte Stellen von ungefärbten Bereichen unterschieden werden (Abb. 47). Die Größe dieser gefärbten Stellen war stark abhängig vom Stadium der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Akkumulation. Im ersten Stadium konnten einzelne, blau leuchtende Zellen im Schwammparenchym entdeckt werden. In einem zweiten Stadium erstreckte sich die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Akkumulation über alle Zellschichten des Schwammparenchyms und ging auch auf das Palisadenparenchym über. Einzelne Zellen waren meist nicht mehr deutlich in ihren Abgrenzungen zu erkennen. Im extremsten Stadium konnte man schließlich den Kollaps der Zellen des Schwammparenchyms als Einbuchtung im Querschnitt erkennen (Abb. 47 Phase 3). An solchen Stellen wären zu einem späteren Zeitpunkt wohl die pergamentartigen Läsionen zu sehen, die nur noch aus der Cuticula der Blattober- und -unterseite bestehen und keine zellulären Strukturen mehr erkennen lassen. Diese unterschiedlichen Stadien konnten z.T. gleichzeitig an verschiedenen Stellen eines Blattes gefunden werden. Die bevorzugte Akkumulation von $\text{O}_2^{\cdot-}$ entlang der Blattadern konnte auch in diesen Versuchen bestätigt werden. Allerdings zeigte sich in diesen Aufnahmen, dass nicht die direkt an ein Leitbündel grenzenden Zellen die Initiationsorte der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Akkumulation darstellten, sondern diejenigen Zellen, die noch einige Zellschichten davon entfernt lagen. In Abb. 47 ist ein Blattquerschnitt an einer Blattader zu sehen, der zwei der Stadien enthält. Auf der rechten Seite der Blattader sind nur einzelne Zellen mit NBT angefärbt, auf der linken Seite kann man eine größere blaue Fläche, besonders im Bereich des Schwammparenchyms erkennen.



NBT-Färbung

Abb. 47: Querschnitte durch mit 150 nl l^{-1} Ozon behandelte mittelalte Blätter von *M. sylvestris*. Die Infiltration der NBT-Lösung erfolgte 30 min nach Ende der Exposition. Die mit Pfeilen gekennzeichneten, blau gefärbten Stellen zeigen Orte der O_2^- Akkumulation. 1 = punktförmige Färbung, 2 = starke, flächige Färbung, 3 = Kollaps der Zellen.

2.4.2 Tabak

In Blattquerschnitten der Tabaksorte Bel W3 sollte die Lokalisation der DAB-Färbung überprüft werden. Die Tabakpflanzen wurden dafür in einer Ozonexposition mit 190-200 nl l^{-1} behandelt. 30 min nach deren Ende wurden die Blätter geerntet, mit DAB gefärbt und für etwa weitere 30 min inkubiert, bevor die Schnitte angefertigt wurden. Die Anfertigung von Schnitten vor dem Färben auf dem Objektträger resultierte in starker DAB-Färbung an den Wundrändern auch bei Kontrollpflanzen, und eine sichere Unterscheidung zu der Ozon-induzierten H_2O_2 -Akkumulation war unmöglich. Die braunrote Farbe von DAB konnte wieder bevorzugt in der Nähe der Leitbündel gefunden werden. In der Nähe bedeutete jedoch, dass stets noch einige ungefärbte Zellen zwischen der Stelle der H_2O_2 -Akkumulation und der Blattader lagen. Die DAB-Färbung war in frühen Stadien ausschließlich im Palisadenparenchym und z.T. in der oberen Epidermis zu finden (Abb. 48a). Erst in einer etwas späteren Phase erstreckte sie sich auch über die oberen Zellen des Schwammparenchyms, bevor dann der gesamte Querschnitt an dieser Stelle braunrot gefärbt war und die Zellen zwischen den Cuticulae kollabierten.

Zusätzlich zu DAB wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (Dihydro-2', 4, 4', 6, 7, 7'-hexafluorofluorescein BSA OxyBurst Green $\text{H}_2\text{HFF BSA}$) eingesetzt, der ebenfalls H_2O_2 nachwies. Dieser reduzierte, an BSA gekoppelte Farbstoff detektiert aufgrund seines hohen Molekulargewichtes in intakten Zellen nur extrazelluläres H_2O_2 . Wie bei der DAB-Färbung waren auch hier die Zellen des Palisadenparenchyms als Initialisationsort der Akkumulation von H_2O_2 deutlich zu erkennen (Abb. 48b).

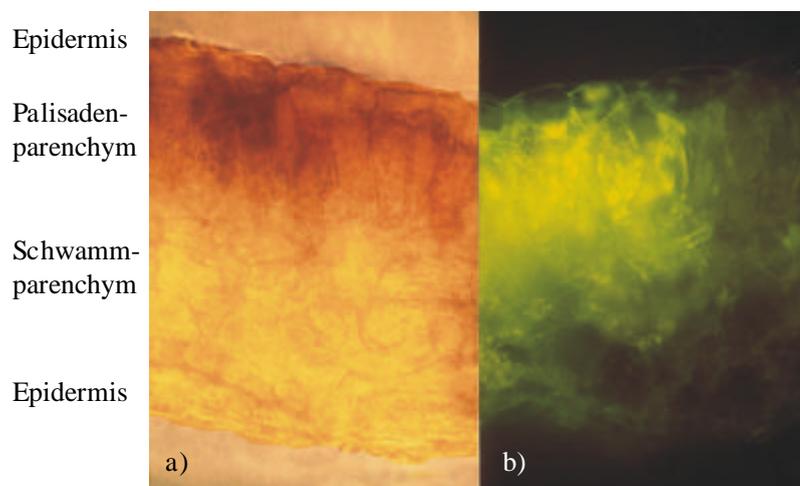


Abb. 48: Querschnitte durch Ozon-behandelte Blätter der Tabaksorte Bel W3. Das Blatt in a) wurde mit DAB gefärbt, das Blatt in b) mit dem Fluoreszenzfarbstoff OxyBurst Green $\text{H}_2\text{HFF BSA}$. Braunrote Färbung bzw. gelbe Fluoreszenz weisen auf H_2O_2 -Akkumulation hin.

Weitere Aufschlüsse wurden durch Arbeiten am Laser Scanning Mikroskop angestrebt. Von der Oberseite kleiner Blattstückchen aus war mit Hilfe des Lasers der basale Teil der Palisadenparenchym-Zellen gerade noch sichtbar. Der große Vorteil dieser Methode stellte die weitgehende Intaktheit der Zellen dar. Wundeffekte konnten in der Mitte eines Blattstückchens ausgeschlossen werden. Als Farbstoff wurde hierfür OxyBurst Green für das Sichtbarmachen der H_2O_2 -Akkumulation verwendet.

Abb. 49 zeigt Aufnahmen von Blättern, die mit OxyBurst gefärbt wurden. Kontrollpflanzen wiesen keine grün-gelbe Fluoreszenz auf. Hier war nur die starke, rote Fluoreszenz des intakten Chlorophylls zu erkennen (Abb. 49c). In einer stärkeren Vergrößerung konnte man die einzelnen, rot leuchtenden Chloroplasten in den Zellen deutlich sehen. Gleichzeitig bestätigte ein leichter Grünschimmer im extrazellulären Raum die gleichmäßige Infiltration der Färbelösung (Abb. 49f). In Blättern Ozon-behandelter Pflanzen leuchteten zwischen gesundem, rot-fluoreszierendem Gewebe immer wieder grünlich-gelbe Stellen heraus. Diese lagen meistens wenige Zellen vom Leitbündel entfernt. So sind auf den Aufnahmen meist auch langgestrecktere Zellen der Leitbahnen zu finden. Abb. 49a zeigt zum einen kleinere Stellen mit extrazellulärer H_2O_2 -Akkumulation in einigen substomatären Höhen und im Apoplasten verschiedener Zellen, darüber hinaus eine zeitlich weiter fortgeschrittene Stelle, wo auch schon in den Zellen grüne Fluoreszenz wahrgenommen werden kann. Einzelne Chloroplasten sind dabei als Punkte zu erkennen. Die in diesem Bereich alles überlagernde Grünfluoreszenz ließ vermuten, dass hier die Chloroplasten schon geschädigt und nicht mehr intakt waren. In Abb. 49b rahmen sich aufspaltende Blattadern H_2O_2 akkumulierende Zellen ein. Dicht an den Adern bzw. im Bild links unten kann man noch rötlich leuchtende, gesunde Zellen sehen. Der Übergang zwischen gesunden und schon geschädigten Zellen war an der gelben Farbe erkennbar. Hier überlagern sich grüne und rote Fluoreszenz. Abb. 49e zeigt vergrößert den Übergang zwischen gesunden und H_2O_2 akkumulierenden Zellen.

Eine gleichzeitige Infiltration des Farbstoffs mit Catalase (Rinderleber) in Ozon-behandelte Blätter führte zur deutlichen Reduktion der Grünfluoreszenz und wies damit die Spezifität des Farbstoffs für H_2O_2 nach. In Abb. 49d ist nur noch an manchen Stellen ein leicht grünlicher Schleier zu erkennen.

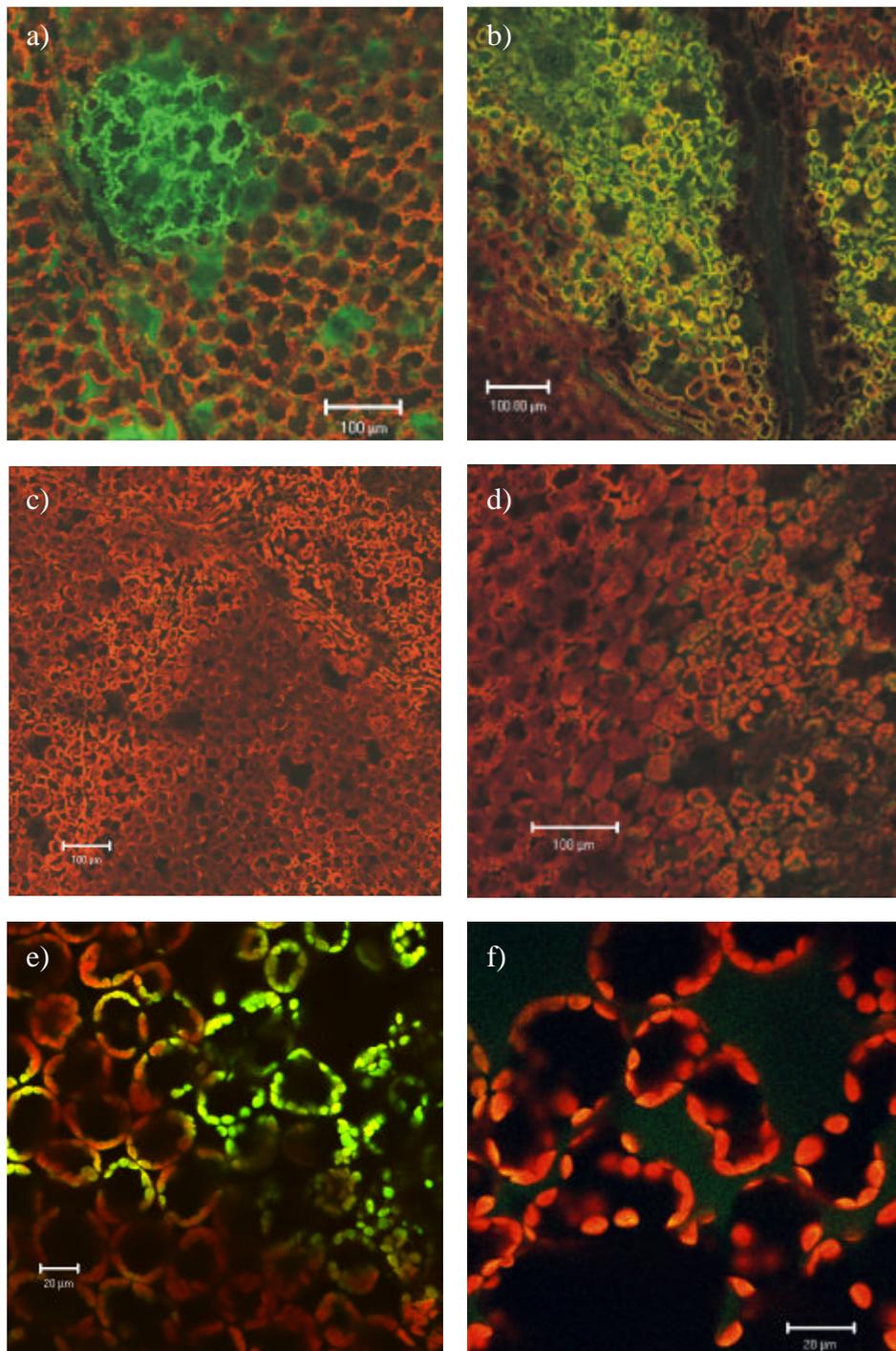


Abb. 49: Confokale Laser Scanning Aufnahmen von Ozon-behandelten (a, b, d, e, f) und Kontroll- (c) Blättern der Tabaksorte Bel W3. Die Blätter wurden 30 min nach Beendigung der Exposition mit dem Fluoreszenzfarbstoff OxyBurst Green H₂HFF BSA infiltriert, der in Anwesenheit von H₂O₂ grün-gelb fluoresziert. Die rote Farbe zeigt die Autofluoreszenz des Chlorophylls. In d) wurde zusammen mit OxyBurst Catalase infiltriert.

In den gleichen Blättern, nur anderen Teilstückchen wie für H_2O_2 , sollte zum ersten Mal in Ozon-behandelten Pflanzen NO mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAF-2DA detektiert werden. Während NO im menschlichen System schon lange als wichtiges Molekül bekannt ist, wird seine Bedeutung bei Pflanzen erst in letzter Zeit ersichtlich. So spielt es in der Pflanze u.a. auch bei Abwehrreaktionen eine wichtige Rolle (Bolwell, 1999; Durner & Klessig, 1999). Die Eignung des Farbstoffes DAF-2DA als *in vivo* Indikator für NO in der Laser Scanning Mikroskopie wurde erst kürzlich an Epidermiszellen von Tabak von Foissner et al. (2000) demonstriert. So konnte die NO-induzierte Fluoreszenz durch Zugabe des NO-Scavenger Carboxy-2-phenyl-4, 4, 5, 5,-tetramethylimidazolinon-3-oxid-1-oxyl (PTIO) und einem Inhibitor der NO-Synthase (L-N^{G} -monomethylarginin monoacetat, L-NMMA) unterdrückt werden.

In unbehandelten Blättern, die mit diesem Farbstoff infiltriert wurden, konnte unter Blaulichtanregung in den Zellen nur die starke Chlorophyll-Fluoreszenz intakter Chloroplasten wahrgenommen werden. Der leichte Grünschimmer der Infiltrationslösung in den substomatären Höhlen bewies eine gleichmäßige Verteilung der Lösung in den untersuchten Blattstückchen (Abb. 50c und f). Bei Ozon-behandelten Blättern konnte ein ähnliches Muster zu der H_2O_2 Färbung erkannt werden. Zwischen normalen Zellen konnten Inseln mit NO-Akkumulation an ihrer hellgrünen Färbung im Palisadenparenchym entdeckt werden. Diese lagen bevorzugt in der Nähe von Leitbündeln (Abb. 50a). In Abb. 50b wird der Übergang von normalen Zellen des Palisadenparenchyms zu grün-leuchtenden und die Unabhängigkeit von der Lage um substomatäre Höhlen herum deutlich: Während auf der rechten Seite der Höhle NO akkumulierende Zellen liegen, zeigen die Zellen der linken Seite nur rote Chlorophyll-Fluoreszenz. Bei einer direkten Transformation von Ozon in reaktive Sauerstoffverbindungen sollte man eher eine gleichmäßige Verteilung des Schadgases ausschließlich um Zellen von substomatäre Höhlen herum erwarten. In das Blattstückchen in Abb. 50d wurde gleichzeitig mit DAF-2DA der NO Scavenger PTIO infiltriert. Durch das Abfangen von NO durch diese Substanz sollte sich die Grünfluoreszenz verringern. Dies war aber nicht so deutlich der Fall wie bei der Coinfiltration von OxyBurst und Catalase. Nur eine leichte Reduktion der Fluoreszenz konnte erkannt werden. Die Abb. 50e und f zeigen NO akkumulierende und Kontrollzellen in einer stärkeren Vergrößerung. Das in e) dargestellte Stadium liegt etwas später als die Bilder in a) und b). Die grün bzw. rot leuchtenden Chloroplasten lassen sich leicht in den Zellen erkennen. Neben den Chloroplasten schimmern auch in einzelnen Zellen noch Bereiche des Cytoplasmas grün.

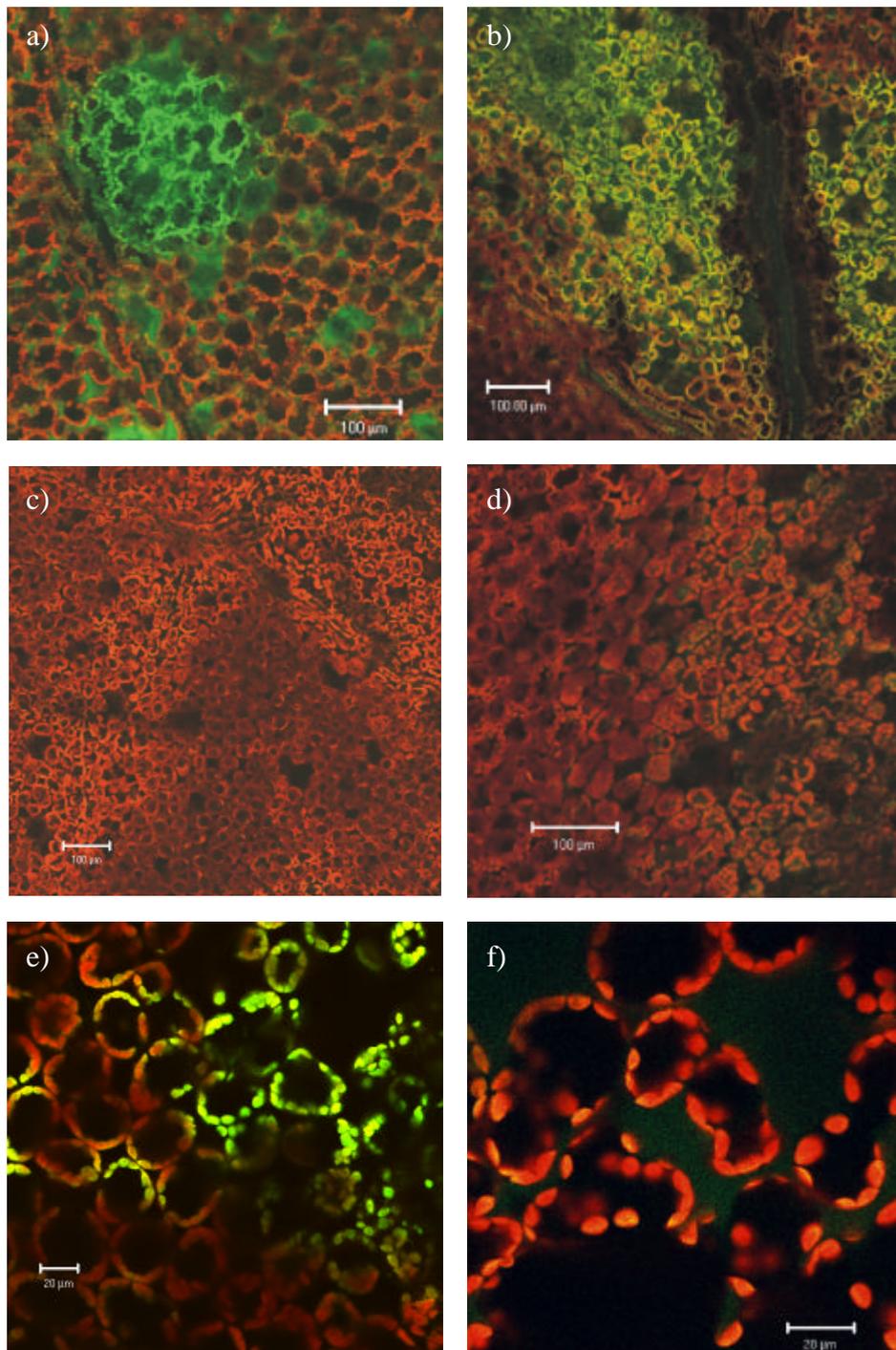


Abb. 49: Confokale Laser Scanning Aufnahmen von Ozon-behandelten (a, b, d, e, f) und Kontroll- (c) Blättern der Tabaksorte Bel W3. Die Blätter wurden 30 min nach Beendigung der Exposition mit dem Fluoreszenzfarbstoff OxyBurst Green H₂HFF BSA infiltriert, der in Anwesenheit von H₂O₂ grün-gelb fluoresziert. Die rote Farbe zeigt die Autofluoreszenz des Chlorophylls. In d) wurde zusammen mit OxyBurst Catalase infiltriert.

Serielle Aufnahmen von H_2O_2 bzw. NO akkumulierenden Zellbereichen zeigten deren zeitliche Veränderung nach Ende der Ozonexposition. Über einen Zeitraum von 1,5 Stunden wurden nach Infiltration der Färbelösungen alle 10 min Aufnahmen von der physiologischen Blattoberseite aus gesehen in 12 und 48 μm Blatttiefe gemacht. Eine Auswahl der Bilder ist in Abb. 51 zu sehen. Dargestellt ist für beide reaktiven Sauerstoffverbindungen sowohl der Bereich der oberen Epidermis (12 μm) und des Palisadenparenchyms (48 μm). Zunächst fällt in jeder Reihe von links nach rechts die Zunahme der grünlich leuchtenden Fläche auf. Während sich in allen Schichten die Grün-Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0 auf einzelne Bereiche beschränkte, leuchteten mit fortschreitender Zeit immer mehr Zellen. Meist begann die Akkumulation von H_2O_2 und NO in einzelnen substomatären Höhlen und breitete sich dann auf angrenzende Zellen aus. Ein Unterschied bei der Akkumulation der beiden reaktiven Sauerstoffspezies lag darin, dass H_2O_2 flächiger in Epidermiszellen nachgewiesen werden konnte als NO. Die durch H_2O_2 gefärbte Fläche erstreckt sich zum Zeitpunkt 80 min wie ein Schleier über fast den gesamten Bildausschnitt. In beiden Fällen befand sich wieder ein Leitbündel in unmittelbarer Nähe.

Folgende Seite:

Abb. 51: Zeitkinetik der Entwicklung der H_2O_2 - bzw. NO-Akkumulation in Ozon-behandelten Blättern, infiltriert mit OxyBurst Green bzw. DAF-2DA 30 min nach Expositionsende. Dargestellt sind von jeder Färbung Bilder der Zeitpunkte 0, 20, 40, 60 und 80 min, wobei Zeitpunkt 0 unmittelbar nach Infiltration der jeweiligen Färbelösung und damit ca. 5h und 30min nach Beginn der Behandlung -lag. Zusätzlich werden zwei verschiedene Zelltypen gezeigt: in einer Blatttiefe von ca. 12 μm sind hauptsächlich Zellen der oberen Epidermis zu sehen, in einer Tiefe von 48 μm liegen die Chloroplasten-reichen Zellen des Palisadenparenchyms.

2.5. Hemmung des „oxidativen Bursts“ durch Inhibitoren verschiedener Enzyme

Vorarbeiten (Schraudner et al., 1998) deuteten schon an, dass die Akkumulation der reaktiven Sauerstoffspezies nicht wie früher angenommen nur auf die Transformation des Schadgases selbst zurückgeführt werden konnte. Ozon wird aufgrund seiner hohen Reaktivität sehr schnell im Apoplasten der Pflanzen abgebaut, und seine Reaktionsprodukte wie H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot-}$ besitzen eine relativ kurze Halbwertszeit (Einleitung Abschnitt 2.1). Damit ist eine Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies 1-2 h nach Beendigung der Ozonbehandlung schlecht durch die direkte Einwirkung des Gases zu erklären. Aus diesem Grund stellte sich die Frage nach der Herkunft der biphasischen Akkumulation der Sauerstoffspezies. Mit Hilfe von Inhibitoren sollten nun Hinweise auf eine enzymatische Bildung dieser Verbindungen gefunden werden. Neben Diphenyliodonium (DPI), einem Hemmstoff für flavinhaltige Oxidasen, wurde K252a, ein Alkaloid des Bodenpilzes *Nocardopsis sp.* und Inhibitor für Protein-Kinasen, eingesetzt. Sowohl bei dem sehr Ozon-empfindlichen *Arabidopsis*-Ökotyp Shokhdara (Sha) als auch bei Tomate reduzierte der Hemmstoff DPI die prozentual geschädigte Fläche deutlich (Abb. 52a und b). Bei Sha von 80 % geschädigter Blattfläche auf 20 %, bei Tomate von knapp 30 auf knapp 10 %. Gleichzeitig mit den Schäden verringerte sich auch die mit NBT- bzw. DAB-gefärbte Blattfläche. Hier war bei dem *Arabidopsis*-Ökotyp eine Abnahme der Fläche von 80 %, bei den Tomatenpflanzen von mehr als 50 % zu verzeichnen.

Sehr ähnliche Ergebnisse wie mit DPI erzielte der Inhibitor K252a bei Tomate (Abb. 52b). Sowohl die Schäden als auch die DAB-Färbung wurden auf knappe 10 % gesenkt.

In Abb. 53a und b sind Blattschäden des Ökotyps Sha zu sehen. Durch eine Ozon-Exposition mit 300 nl l^{-1} wurde fast die gesamte Blattspreite geschädigt, die ganze Fläche ist pergamentartig weiß. Eine Infiltration mit DPI reduzierte die geschädigte Fläche deutlich und resultierte in einzelnen, flächigen Läsionen (Abb. 52, Abb. 53). Eine ebenso offensichtliche Wirkung hatte der Hemmstoff auf die Akkumulation von $\text{O}_2^{\cdot-}$ bei *M. sylvestris*. Das standardmäßig Ozon-behandelte Blatt in Abb. 53c wies das gewohnte Bild der punktförmigen NBT-Färbung auf, während ein zuvor mit DPI behandeltes kaum noch $\text{O}_2^{\cdot-}$ akkumulierte (Abb. 53d).

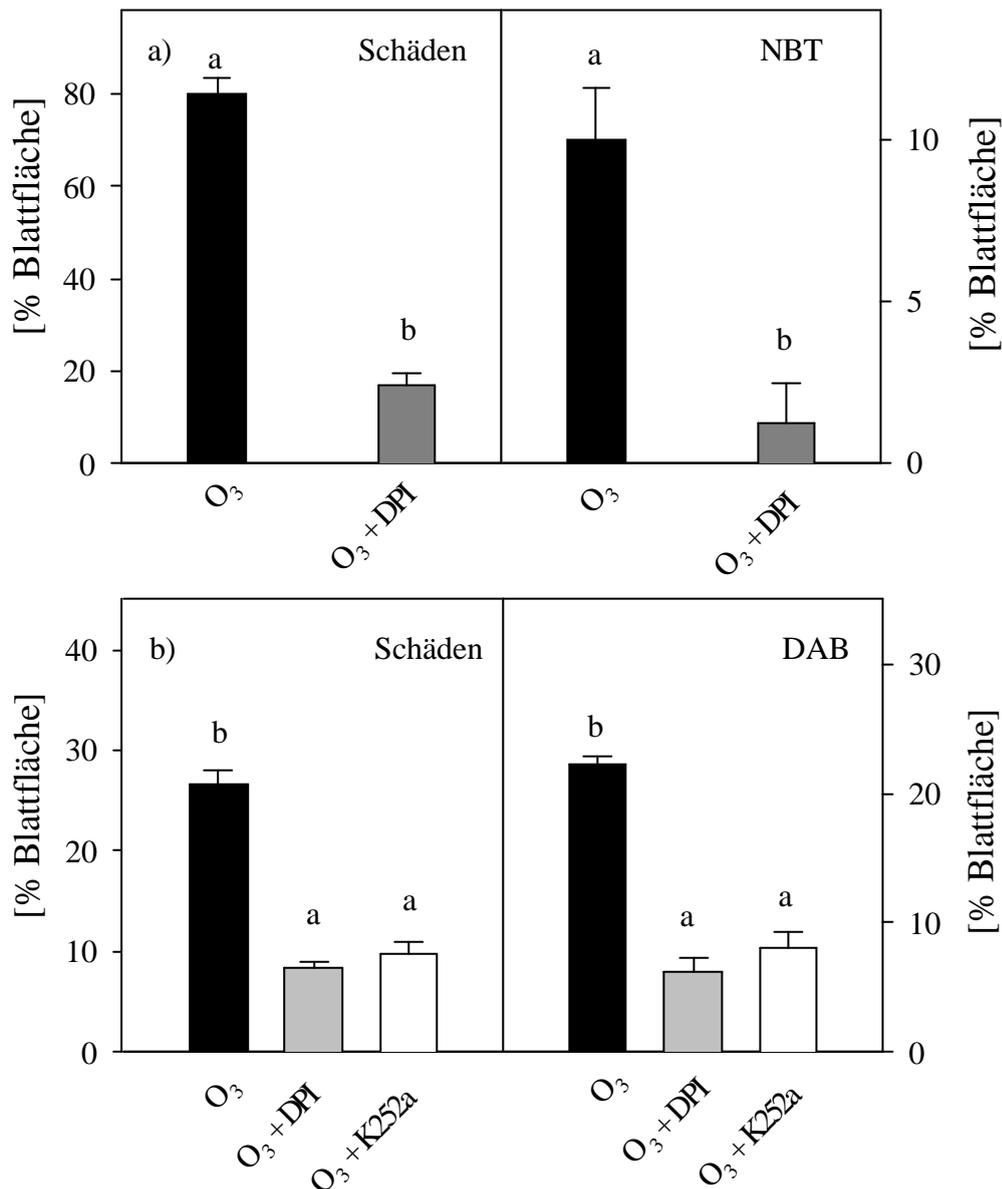


Abb. 52: Effekt der Infiltration eines Inhibitors vor Beginn der Ozonbehandlung auf Blattschäden und O₂⁻- bzw. H₂O₂-Akkumulation. In a) ist die Auswirkung auf die Blattschäden-Entwicklung und die NBT-Färbung zwischen Ozon-behandelten Pflanzen des *Arabidopsis*-Ökotyps Shokhdara mit und ohne vorheriger DPI-Infiltration zu sehen. b) zeigt vergleichend die Wirkung von DPI (10 µM) und K252a (0,5 µM) auf die Schäden und DAB-Färbung bei Tomate (Sorte Roma). Gezeigt sind Mittelwerte ± S.E. (n=3). Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (LSD Multiple Range Test).

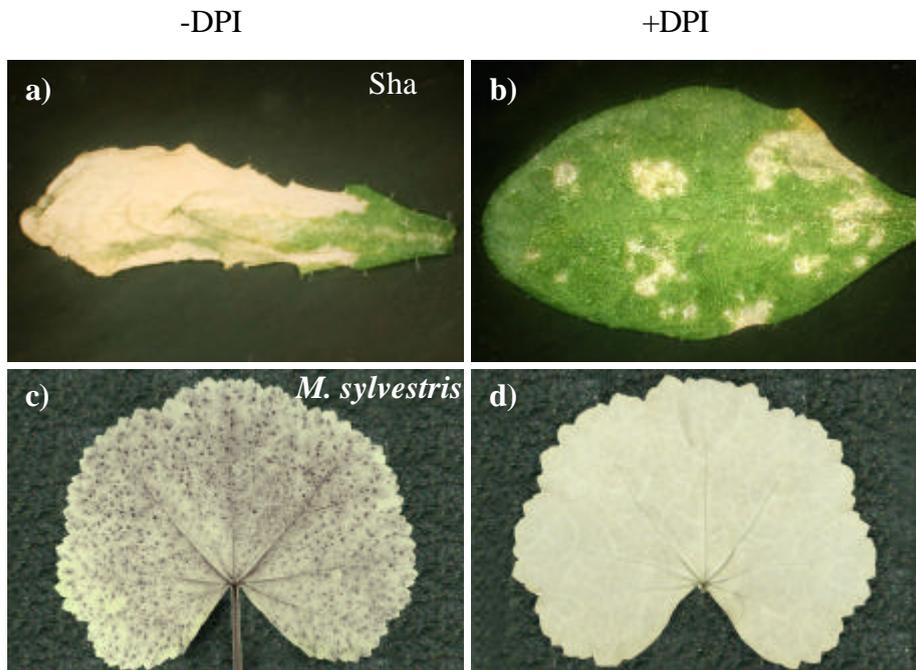


Abb. 53: Darstellung der Effekte einer DPI-Infiltration vor der Behandlung mit Ozon. a) und b) zeigen die Veränderung der geschädigten Blattfläche bei dem *Arabidopsis*-Ökotyp Sha nach einer 5stündigen Ozonbehandlung mit 300 nl l^{-1} . Die eingesetzte DPI-Konzentration betrug $10 \mu\text{M}$. c) und d) demonstrieren die Auswirkung auf die O_2^- Akkumulation nach einer 5stündigen Behandlung mit 150 nl l^{-1} bei *Malva sylvestris*. Hier wurde eine DPI-Konzentration von $7 \mu\text{M}$ verwendet.

Dass die verringerte Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und Läsionenbildung nicht einfach auf einer durch die Hemmstoffe ausgelösten reduzierten Ozon-Aufnahme zurückging, wurde durch Messungen der stomatären Leitfähigkeit, der Transpirations- und Assimilationsrate bei Blättern von *M. sylvestris* nachgewiesen. So gab es keine signifikanten Unterschiede in diesen drei Parametern zwischen DPI-infiltrierten und unbehandelten Blättern kurz vor Beginn der Ozonbehandlung (Abb. 9).

3. Untersuchung möglicher am „oxidativen Burst“ beteiligter Enzyme in Tabak

In Anlehnung an den sog. „respiratorischen Burst“ in neutrophilen Granulocyten zur Abwehr von Pathogenen spricht man in Pflanzen bei der raschen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies vom sog. „oxidativen Burst“. Während im menschlichen System der Enzymkomplex und seine Funktionsweise gut charakterisiert ist, bleibt in der Pflanze die Frage offen, welche(s) Enzym(e) für die Bildung der Sauerstoffspezies verantwortlich ist/sind. In Frage kommen Peroxidasen, Diamin- oder Polyamin-Oxidasen, Oxalatoxidasen und NADPH-Oxidasen (Abb. 2; Einleitung Abschnitt 2.3). In dieser Arbeit sollte zunächst die Beteiligung einer Oxalatoxidase an der Ozon-induzierten Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies überprüft werden, auf deren Existenz in Tabak Hinweise aus Vorarbeiten vorlagen (Thalmair, 1996).

3.1. Potentielle Beteiligung einer Oxalatoxidase am Ozon-induzierten „oxidativen Burst“ in *Nicotiana tabacum* L.

Proteine mit Oxalatoxidase-Aktivität bilden aus Oxalat und Sauerstoff Kohlenstoffdioxid und H_2O_2 . Sie sind besonders bekannt aus Monokotylen. Hier spielen sie z.B. bei der Entwicklung von Gerste und Weizen eine Rolle (Dumas et al., 1995; Lane et al., 1993). Sie gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die nach dem Enzym von Weizen (Germin) Germin-ähnliche Proteine genannt werden. Im Gegensatz zu Germin zeigen aber nicht alle Germin-ähnlichen Proteine Oxalatoxidase-Aktivität. Neben der Rolle bei der Keimung und Entwicklung der Embryos wird auch in adulten Pflanzen von Induktionen der Transkripte und/oder der Aktivität von Oxalatoxidasen durch Pathogenbefall berichtet (Dumas et al., 1995; Gregersen

et al., 1997; Wei et al., 1998). Auch in dikotylen Pflanzen häufen sich die Hinweise auf die Existenz Germin-ähnlicher Proteine (Carter et al., 1999; Membré et al., 1997; Ohmiya et al., 1998).

Ziel dieses Teilabschnittes der Arbeit war, Tabakpflanzen auf die Existenz von Oxalatoxidase-Aktivität und deren möglicher Beteiligung an der Ozon-induzierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu untersuchen. Damit einhergehend sollte die unterschiedliche Ozon-Toleranz der Tabaksorten Bel B und Bel W3 geklärt werden.

3.1.1 Unterschiede im Proteinmuster der apoplastischen Flüssigkeit zwischen Pflanzen der Tabaksorten Bel B und Bel W3

Nachdem die Ozon-induzierte Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies nur im Apoplasten der Tabaksorte Bel W3 detektiert wurde, sollten Unterschiede im Proteinmuster der Apoplastenflüssigkeit zwischen Bel B, der toleranten Sorte, und Bel W3, der empfindlichen Sorte, mit Hilfe von SDS-Polyacrylamidgelen enthüllt werden. Abb. 54 stellt die Auftrennung der apoplastidären Proteine von Bel B und Bel W3 dar. Zusätzlich wurde die Apoplastenflüssigkeit einer ebenfalls Ozon-toleranten Tabaksorte, Samsun NN, auf das 12,5 %ige SDS-PAGE aufgetragen. Als deutlichster Unterschied zwischen den beiden toleranten Sorten und Bel W3 fiel eine Bande im Bereich knapp über 20 kDa auf. Diese 21 kDa-Bande war nur bei Bel B und Samsun NN vorhanden, nicht jedoch bei der Ozonempfindlichen Sorte Bel W3 zu finden.

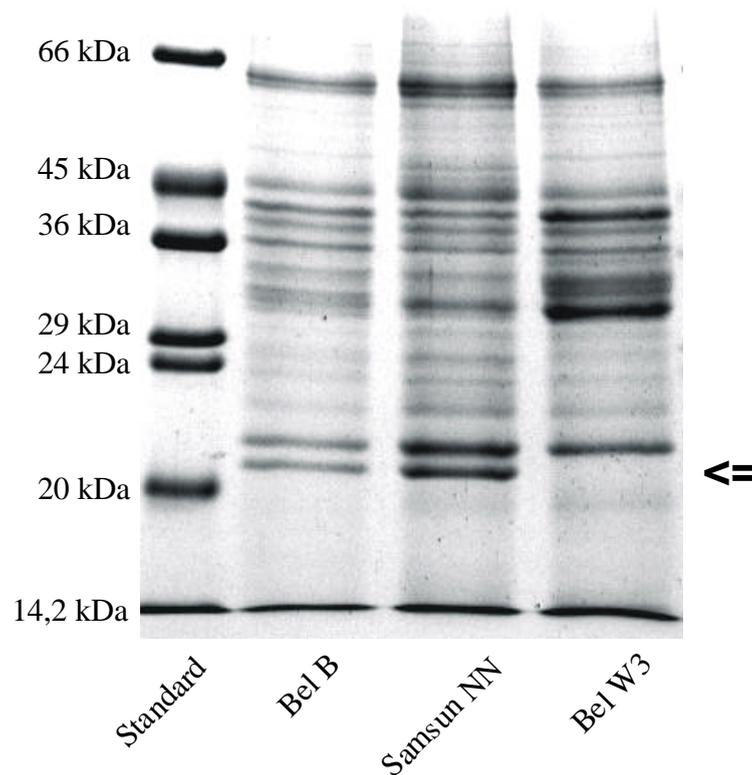


Abb. 54: 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel der Apoplastenflüssigkeit von drei verschiedenen Tabakkultivaren. Die Tabaksorten Bel B und Samsun NN erwiesen sich als deutlich Ozon-toleranter als die Sorte Bel W3. Aufgetragen wurden bei Bel B 16 für Samsun NN und Bel W3 18 μ g Gesamtprotein. Der Pfeil markiert den wichtigen Unterschied zwischen den toleranten und der sensitiven Sorte.

Darüber hinaus wurde auch das Bandenmuster der Apoplastenflüssigkeit beider Tabaksorten mit dem Ozon-behandelten Proben verglichen (Abb. 55). Auch auf diesem Gel bestätigte sich das Fehlen der 21 kDa-Bande bei Bel W3, sowohl bei Kontroll- als auch bei Ozon-behandelten Pflanzen. Diese Bande blieb bei Bel B allerdings unbeeinflusst durch eine Ozonexposition. Dagegen zeigten sich andere Banden bei beiden Tabaksorten in ihrer Stärke durch Ozon verändert. Verschiedene Banden traten durch die Ozonbehandlung bei beiden Sorten stärker hervor als bei den Kontrollen, so z.B. eine Bande im Bereich von 50 kDa. Andere Banden schwächten sich durch die Exposition ab oder verschwanden fast ganz: Eine Bande bei 10 kDa, zwei Banden bei 25 und 26 kDa sowie eine in den Kontrollen stark hervortretende Bande bei etwa 34 kDa.

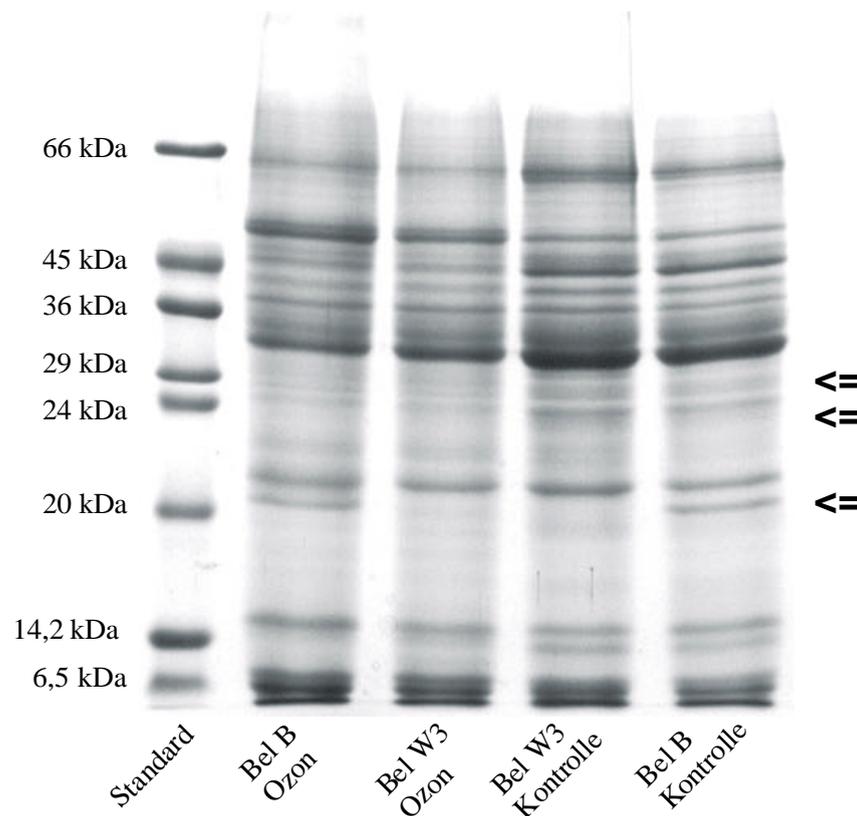


Abb. 55: Vergleich des Bandenmusters der Apoplastenflüssigkeit zwischen Kontroll- und Ozon-behandelten Pflanzen der Tabaksorten Bel B und Bel W3 auf einem 12,5 %igen PAGE. Aufgetragen wurden jeweils ca. 20 µg Gesamtprotein pro Spur. Die Pfeile weisen auf ansequenzierte Proteine hin.

In einer vorangegangenen Doktorarbeit (Thalmair, 1996) wurden sowohl die 21 kDa-Bande als auch die durch Ozon reprimierten Banden von 25 und 26 kDa ansequenziert. Zum damaligen Zeitpunkt konnten zu der Bel B spezifischen 21 kDa-Bande nur teilweise Homologien zu einer Ubiquitin-Protein-Ligase in der Datenbank gefunden werden. Aufgrund der deutlichen Übereinstimmung der sequenzierten Peptide der 25 und 26 kDa-Bande handelt es sich hierbei wohl um Isoformen des gleichen Proteins. Die größten Homologien bestanden zu einem Germin-ähnlichen Protein aus *Sinapis alba* sowie aus *Pharbitis nil*. In der Zwischenzeit weisen Datenbankrecherchen bei allen drei Banden auf Ähnlichkeiten zu Germin-ähnlichen Proteinen auf. Die beste Übereinstimmung zeigte sich dabei zu sog. Auxin-bindenden Proteinen von *Prunus persica* (ABP19 und 20; Ohmiya et al., 1998). Diese gehören ebenfalls zu der Gruppe der Germin-ähnlichen Proteine. In Abb. 56 ist ein Alignment von ABP20 aus *Prunus persica* mit Peptiden der 21 (Bel B), 25 (O₃R-2) und 26 (O₃R-3) kDa Banden aus den beiden Tabaksorten dargestellt. Übereinstimmende bzw. ähnliche Aminosäuren sind grau markiert.

10	20	30	40	50	60
N- MPQATMIFPI LFTFFLLLS SNAAVQDFCV ADLAAPEGPA GFSCCKPASV KVNDFVFSGL					
	Bel B	AVLDF-V	GDLSVPDGP	O3R-2	KPSAV TANX FVFSGL
				O3R-3	KPSAV TANDFVEGGL
70	80	90	100	110	120
GIAGNTSNII KAAVT PAFVA QFPGVNLGI SIARLDLAVG GVVPFHHPG ASEVLIVAQG					
O3R-2	AXVXP	PAFAP	QFPGLN	IAS-DLA	Bel B
	FAP	QFPGLNGLGI	XMA	O3R-3	
130	140	150	160	170	180
TICAGFVASD NTPYLQTLK GDIMVFPQGL LHFQVNGGEA PALAFASFGS ASPGLQILDF					
	Bel B	GNIMTEPQQA	T	FVVTEFA-F	Bel B
190	200	210	220		
ALFKNDLPTE VIAQT TFLDA AQIKKLGVL GGTN -C					
	Bel B	TFLXA	KVS	GVL	GGTN Bel B

Abb. 56: Sequenzvergleich zwischen dem Auxin-bindenden Protein ABP20 aus *Prunus persica* (Ohmiya et al., 1998) mit den durch Sequenzierung erhaltenen Peptiden der 21 (Bel B), 25 (O₃R-2) und 26 (O₃R-3) kDa Banden aus Tabak.

Besonders das C-terminale Peptid GVLGGTN tritt bei einigen Germin-ähnlichen Proteinen sehr konserviert auf.

3.1.2 Detektion von Oxalatoxidase-Aktivität im Apoplasten von Tabak

Nachdem sich Hinweise auf die Existenz von Germin-ähnlichen Proteinen in der Apoplastenflüssigkeit der Tabaksorten Bel B und Bel W3 ergeben hatten, wurde in einem nächsten Schritt die Flüssigkeit auf Oxalatoxidase-Aktivität untersucht. Zunächst wurden die Proteine der Apoplastenflüssigkeit aufkonzentriert und in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt, danach auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und schließlich ein Aktivitätsnachweis mittels einer enzymatischen, Peroxidase-abhängigen Farbreaktion durchgeführt. An einer Stelle mit vorhandener Oxalatoxidase-Aktivität sollte eine violette Bande sichtbar werden. In Abb. 57 wurden Proben von Kontroll- und Ozon-behandelten Pflanzen der Tabaksorten Bel B und Bel W3 sowie eine Oxalatoxidase aus Gerste aufgetragen. Während bei der Gerstenprobe deutlich Aktivität nachgewiesen werden konnte (Pfeil), war dies für die Tabakextrakte nicht möglich.

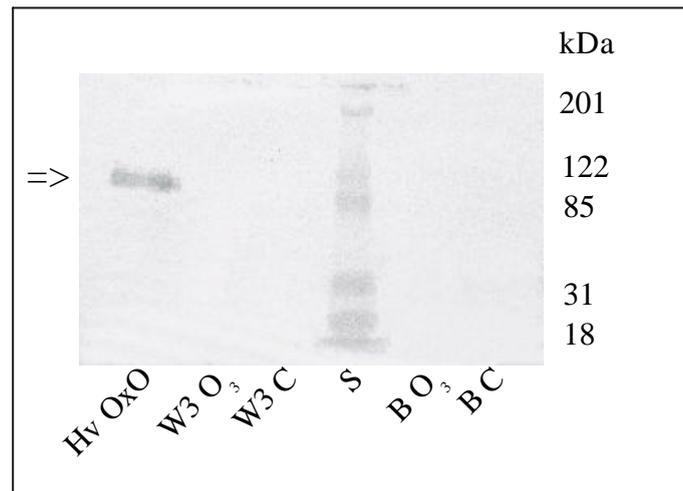


Abb. 57: Oxalatoxidase-Aktivitätsassay auf einer Nitrocellulose-Membran. Die aufkonzentrierten Proteine der Apoplastenflüssigkeit der Tabaksorten Bel B und Bel W3 wurden zunächst elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf die Membran geblottet. Der Aktivitätsnachweis erfolgte mit Hilfe einer Farbreaktion. Aufgetragen wurden 34 μg Gesamtprotein bzw. 5 μg reine Oxalatoxidase aus Gerste. Hv = *Hordeum vulgare*; O_xO = Oxalatoxidase; S = Standard; O₃ = Ozon-behandelte Probe; C = Kontrolle

Auch mit Hilfe eines photometrischen Tests konnte keine Oxalatoxidase-Aktivität in der Apoplastenflüssigkeit der beiden Tabaksorten Bel B und Bel W3 festgestellt werden.

Um zu prüfen, ob Ozon tatsächlich eine vorhandene Oxalatoxidase aktivieren würde, wurden transgene Tabakpflanzen (zur Verfügung gestellt von F. Bernier, Strasbourg, F) mit Ozon behandelt. Diese transgenen Pflanzen enthielten verschiedene Konstrukte der Oxalatoxidase aus Weizen (*gf-2.8*). Zum einen wurde das volle Gen in die Tabaksorte Xanthi gebracht (diese Linie wird im folgenden bezeichnet als *gf-2.8*), zum anderen nur der Promotor an das Glucuronidase-Gen gekoppelt, und schließlich noch der 35S-Promotor mit der codierenden Sequenz der Oxalatoxidase (kurz genannt 35S). Mit diesen transgenen Tabakpflanzen sowie dem Wildtyp Xanthi (X) wurden noch einmal Kontroll- und Ozon-behandelte Proben der Sorten Bel B und Bel W3 auf Aktivität in der Apoplastenflüssigkeit untersucht (Abb. 58). Da die Tabaksorte Xanthi relativ Ozon-tolerant war, wurden diese Pflanzen und die transgenen Linien im Unterschied zu Bel B und Bel W3 mit 380 nl l^{-1} Ozon behandelt. Nach der Exposition konnten auch deutliche Läsionen festgestellt werden. Wie schon im vorigen Versuch zeigte sich weder bei den Kontrollen noch bei den behandelten Pflanzen von Bel B und Bel W3 eine Aktivitätsbande (Abb. 58). Auch bei den Wildtyp-Pflanzen der Sorte Xanthi konnte, wie schon in der Literatur beschrieben (Berna & Bernier, 1997) keine Aktivität nachgewiesen werden. Zu erwarten war ebenfalls nach der Literatur die fehlende Bande bei unbehandelten Tabakpflanzen mit dem Vollängenkonstrukt. Allerdings konnte auch keine

Aktivität in Ozon-behandelten Pflanzen dieser transgenen Linie gefunden werden. Dass der Aktivitätsnachweis an sich sehr gut funktionierte, konnte mit den starken Banden bei etwa 80kDa bei den Proben der 35S-Linie bewiesen werden. So musste die Apoplastenflüssigkeit gegenüber den anderen Proben um das 100fache verdünnt aufgetragen werden, um saubere Banden auf dem Blot zu erhalten. Auch hier traten allerdings keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und Ozon-behandelten Pflanzen auf. Die Bande blieb in ihrer Stärke unbeeinflusst.

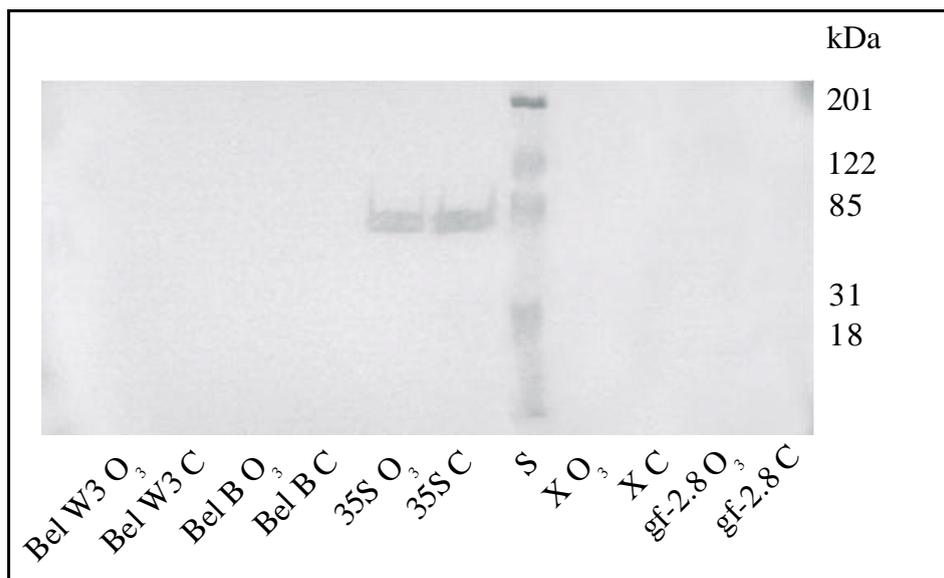


Abb. 58: Nachweis der Oxalatoxidase-Aktivität in der Apoplastenflüssigkeit von Wildtyp- und transgenen Tabakpflanzen. Die transgenen Tabakpflanzen enthielten verschiedene Konstrukte der Oxalatoxidase aus Weizen (gf-2.8 = gesamtes Gen; 35S = codierende Sequenz von gf-2.8 gekoppelt an 35S-Promotor; siehe Material und Methoden Abschnitt 3.1). Von den meisten aufkonzentrierten Proben wurden 27 µg Gesamtprotein aufgetragen nur die Proben der 35S-Pflanzen mussten 1:100 verdünnt werden. C = Kontrolle; O₃ = Ozon-behandelte Probe; X = Xanthi; S = Standard.

Gus-Färbungen der transgenen Linie mit dem an Glucuronidase gekoppelten Promotor der Weizen-Oxalatoxidase bestätigten die Ergebnisse der Aktivitätsassays. Auch in diesen Blättern konnte keine Ozon-induzierte Blaufärbung durch die Aktivierung der Glucuronidase nachgewiesen werden.

Um sicher Oxalatoxidase-Aktivität in den beiden Tabaksorten Bel B und Bel W3 auszuschließen, wurden noch Gesamtblattextrakte getestet. Auch die transgenen Linien und deren Wildtyp Xanthi wurden noch einmal mit untersucht. Das Ergebnis, welches in Abb. 59 dargestellt ist, wiederholte die vorangegangenen. Es konnte keine Aktivität bei den Sorten Bel B, Bel W3, Xanthi und der transgenen Linie gf-2.8 detektiert werden, unabhängig von der

Behandlung. Die Blattextrakte der Linie 35S mussten 1:20 verdünnt werden, um aufgrund ihrer hohen Aktivität schöne, klare Banden zu erhalten.

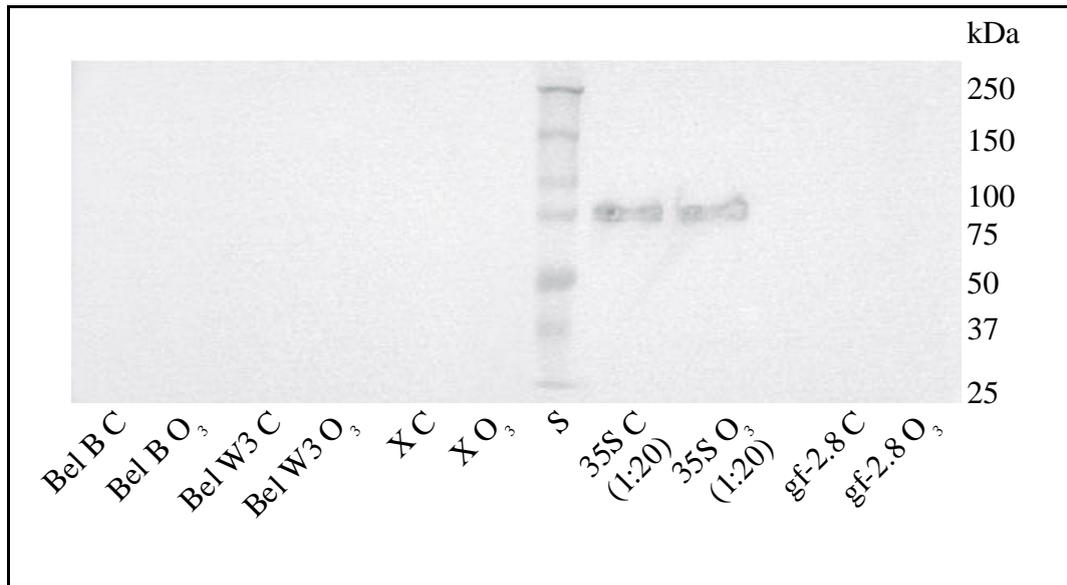


Abb. 59: Überprüfung der Gesamtblattextrakte der Tabaksorten Bel B, Bel W3, Xanthi (X) und der transgenen Linien *gf-2.8* und 35S auf Oxalatoxidase-Aktivität (siehe Abb. 58). Aufgetragen wurden 31 μg Gesamtprotein, bei den Pflanzen der 35S-Linie nur 1,55 μg (Probenextrakte wurden 1:20 verdünnt). S = Standard; C = Kontrolle; O₃ = Ozon-behandelte Probe.

Zusätzlich wurden Northern Blots der transgenen Tabaklinien und des Wildtyps durchgeführt. Als Sonde diente eine 649 Basen lange DIG-markierte DNA-Teilsequenz von *gf-2.8*. Auch auf Transkriptebene konnte keine Induktion der Weizen-Oxalatoxidase gefunden werden (Abb. 60). Eine fehlende Enzym-Aktivität konnte damit nicht mit Problemen des Weizen-Proteins in einem anderen Pflanzensystem begründet werden. Die hohen Transkriptmengen der transgenen Linien 35S spiegelten die hohen Aktivitäten im Enzymtest wieder.

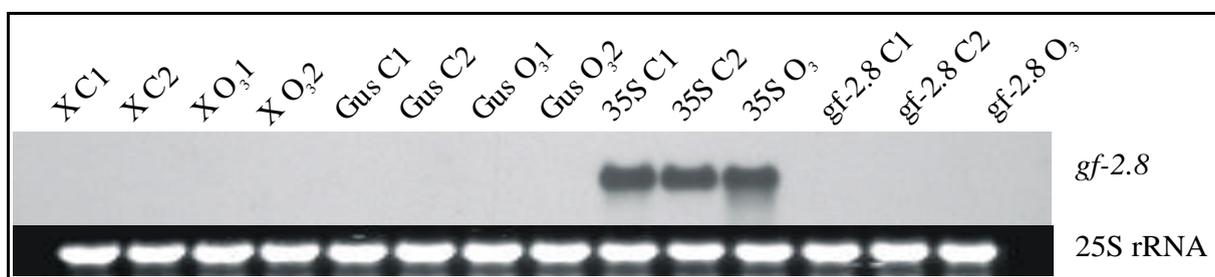


Abb. 60: Northern Blot der transgenen Tabaklinien (Gus = Promotor von *gf-2.8* gekoppelt an β -Glucuronidase, 35S, *gf-2.8*) und des Wildtyps Xanthi (X). Jeweils 10 ng Gesamt-RNA wurden auf eine Membran geblottet und mit einer 649 Basen langen DIG-markierten Sonde (Primer OxOa, OxOb) gegen *gf-2.8* spezifisch hybridisiert. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wird die Bande der 25S rRNA gezeigt. C = Kontrolle; O₃ = Ozon-behandelte Probe.

Abschließend musste eine Beteiligung einer Tabak-eigenen Oxalatoxidase bei der Ozon-induzierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ausgeschlossen werden. In den Sorten Bel B und Bel W3 konnte weder in Kontroll- noch in Ozon-behandelten Pflanzen eine Aktivität detektiert werden. Darüber hinaus erfolgte auch keine Aktivierung einer in Tabak gebrachten Oxalatoxidase aus Weizen durch das Schadgas, weder auf Aktivitäts- noch auf Transkriptebene.

3.1.3 Suche nach den Genen für Germin-ähnliche Proteine in Tabak

Die Suche nach den Genen der potentiellen Germin-ähnlichen Proteine in der Apoplastenflüssigkeit mit Hilfe von degenerierten Primern zu den Peptiden der 21, 25 und 26 kDa Bande blieb erfolglos. Auch die nach konservierten Regionen sämtlicher GLPs entwickelten degenerierten und spezifischen Primer brachten kein positives Ergebnis. Sämtliche amplifizierten DNA-Fragmente zeigten keine Homologien zu Germin-ähnlichen Proteinen, bzw. enthielten keines der Peptide aus Abschnitt (3.1.1).

Als bisher einziges zu GLPs-homologes Protein in Tabak wurde Nectarin I in Nektar nachgewiesen (Carter & Thornburg, 2000). Nectarin I wird ausschließlich in Nektar exprimiert, hat eine molekulare Masse von 29 kDa und besitzt keine Oxalatoxidase-Aktivität. Mit Hilfe von spezifischen Primern (siehe Anhang) gelang es, dieses Gen in genomischer DNA von Blättern zu detektieren (Abb. 61).

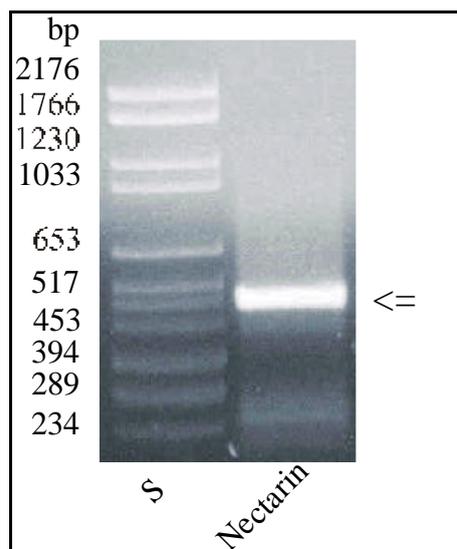


Abb. 61: Nachweis des Germin-ähnlichen Proteins Nectarin (Pfeil) auf genomischer Ebene mit Hilfe einer spezifischen PCR-Analyse. Durchgeführt wurden 38 PCR-Zyklen bei 55°C. Primer:

5'-CACGGCGGCAGATTTCTCG-3' Neca; 5'-GGCACAGTTGGTGAAGCCCC-3' Necn.

Keines der Peptide der 21, 25 und 26 kDa Bande konnte in dieser Sequenz wiedergefunden werden. Neueste Erkenntnisse (Carter & Thornburg, 2000) weisen Nectarin I Superoxiddismutase-Aktivität zu.

3.2. Beteiligung von NADPH-Oxidase homologen Enzymen und Superoxiddismutase an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Tabak

Die NADPH-Oxidase ist besonders aus den menschlichen neutrophilen Granulocyten bekannt (Henderson & Chappell, 1996), wo ein Komplex aus verschiedenen Untereinheiten nach Aktivierung durch Pathogene die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ katalysiert (Abb. 4). Die Elektronenübertragung auf den Sauerstoff erfolgt dabei durch die Untereinheit gp91phox.

In verschiedenen Pflanzenarten wurden zu der Untereinheit gp91phox homologe Gene gefunden: in *Arabidopsis thaliana* (Keller et al., 1998; Torres et al., 1998), in Reis (Groom et al., 1996), in Tomate und *Potamogeton* (Amicucci et al., 1999, AF148534), sowie seit kurzem in Kartoffel (Yoshioka et al., 2001). Diese waren allesamt durch eine Verlängerung des 5'-Endes gegenüber der menschlichen Form charakterisiert und werden als „respiratory burst oxidase homologues (rboh)“ bezeichnet.

3.2.1 Identifikation und Charakterisierung von zwei Isoformen der NADPH-Oxidase in Tabak

Im folgenden sollten die Tabaksorten Bel B und Bel W3 auf das Vorkommen von Isoformen einer NADPH-Oxidase untersucht, sowie deren potentielle Beteiligung an der Ozon-induzierten Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies geprüft werden. Mit Hilfe verschiedener degenerierter Primer, entworfen nach einem Alignment der bekannten pflanzlichen putativen NADPH-Oxidasen, und Primern, die spezifisch zu den Tomatensequenzen entwickelt wurden, konnten zunächst Teilsequenzen (mit den Primern Tom2a und Tom3b, 5a und 7b, 5a und 9b, sowie Tom8a und Tom7b; siehe Anhang) und schließlich der gesamte codierende Bereich von zwei Homologen der menschlicher gp91phox in Tabak-Blättern detektiert werden (Primer D5'full und D3'full, sowie F5'a und F3'b). Sie wurden in Anlehnung an die Ähnlichkeit zu den betreffenden Isoformen in *Arabidopsis Ntrboh D* und *F* genannt (*Ntrboh* = *N. tabacum* respiratory burst oxidase homologue). Die beiden Sequenzen umfassen 2817 (*Ntrboh D*) bzw. 2889 (*Ntrboh F*) Nukleotide einschließlich des Stopp-Codons (siehe Anhang), was

abgeleiteten Sequenzen von 938 bzw. 962 Aminosäuren entspricht. Abb. 62 zeigt einen Vergleich der beiden abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen mit der menschlichen gp91phox.

NtrbohD	1	MQNSENHHPH	HQHHHSDETEI	IGNDRASYSG	PLSGPLNKRK	GKKSARFNIP
NtrbohF	1	MRGLPGHERR	WTSDTVSSDK	DFSGELSP--	-----	-----
gp91phox	1	-----	-----	-----	-----	-----
NtrbohD	51	ESTDIGTSVG	TGGKSNDAY	VEITLDVRED	SVAVHSVKTA	GGDDVEDPEL
NtrbohF	29	-----GADSG	YNSGFASEEF	VEVTLDLQDD	DTIILRSVEP	ATVINIDAPD
gp91phox	1	-----	-----	-----	-----	-----
NtrbohD	101	ALLAKGLEKK	STLGS-----	-----SLVR	NASSRIRQVS	QELRRLASLN
NtrbohF	74	LPAGVGISGV	SIETPTSASV	SESRPTIRR	SSSSKLRQFS	QELKAEAVAK
gp91phox	1	-----	-----	-----	-----	-----
NtrbohD	140	KRPIPTG---	-----	-----	-----	-----
NtrbohF	124	ARQFSQELKA	ELRRFWSHG	HASRAFSPSS	FFQNAVVGTTG	NGVDSALAAR
gp91phox	1	-----	-----	-----	-----	-----
NtrbohD	147	-----RFD	RNKSAAAHAL	KGLKFISKTD	GGAGWAAVEK	RFDEITASTT
NtrbohF	174	ALRRQRAQLD	RTRSSAHRAL	RRLKFISNNK	TN-GWNEVEN	NFSKLAKD--
gp91phox	1	-----	-----	-----	-----	-----
NtrbohD	190	GLLPRAKFGE	CIGMNKESKE	FAVELYDALA	RRRNITTDSTI	NKAQLKEFWD
NtrbohF	221	GYLYRSDFAQ	CIGM-KDSKE	FALELFDALS	RRRRLKVDKI	SKEELYEYWS
gp91phox	1	-----	-----	-----	-----	-----
EF-Hand I						
NtrbohD	240	QVADQSFDSSR	LQTFDFMVDK	DADGRITEEE	VREIIGLSAS	ANRLSTIQKQ
NtrbohF	270	QITDQSFDSSR	LQISDFMVDK	NEDGRIAEED	VKEIIMLSAS	ANKLSRLKEQ
gp91phox	1	-----	-----	-----	-----	-----
EF-Hand II						
NtrbohD	290	ADEYAAMIME	ELDPNNLGYI	MIENLEMLLL	QAPNQSVQRG	GSRNLSQML
NtrbohF	320	AEEYAALIME	ELDPERLGYI	ELWQLETLLL	QKDTYLNYSQ	ALSYT-SQAL
gp91phox	1	-----	-----	-----	-----	-----
TM1						
NtrbohD	340	SQKLNKHTQER	NPIVRWYKSF	MYFLLDNWQR	VWVLLWIGI	MAGLFTWKYI
NtrbohF	369	SQNLHGLRKK	SPIKRMSTKL	VYSLQENWKR	LWVLTWLILI	MIGLFLNWKFY
gp91phox	1	-----	-----MGNWA	VNEGLS----	IFVILVWLGL	NVFLFVWYYR
TM2						
NtrbohD	390	QYKEKAAY--	--KVMGPCVC	FAKGAAETLK	LNMAIILFPV	CRNTITWLRN
NtrbohF	419	QYKNKSAF--	--RVMGYCLV	TAKGAAETLK	FNMALILLPV	CRNTITWLRS
gp91phox	32	VYDIPPKFFY	TRKLLGSALA	LARAPAACLN	FNCLMILLPV	CRNLLSFLRG
TM3						
NtrbohD	436	KTRLGAAVP-	--FDDNLNFH	KVIAVAIALG	VGIHGLS	HLT CDFPRLNAS
NtrbohF	465	TKLSHF-VP-	--FDDNLNFH	KTVAIAIVTG	IILHAGN	HLV CDFPRLIHAD
gp91phox	82	SSACCSTRVR	RQLDRNLTFH	KMVAWMIALH	SAHTIAHLF	NVEWCVNARV
NtrbohD	483	EEYEPMKYY	FGDQPEYWW	F-----	-----I	KGVEGVTGII
NtrbohF	511	DQDYQSFLSN	DFGQSKP--	-----	-----GYIDL	KGVEGVTGII
gp91phox	132	NNSDPYSVAL	SELGDRQNES	YLNFAKRIK	NPEGGLYLAV	TLLAGITGVV
TM4						
NtrbohD	515	MVVLMAIAFT	LATPWFRNR	VSLPKPFHKL	TGFNAFWYSH	HLFVIVYTLF
NtrbohF	544	MVILMAIAFT	LATRWFRSL	IKLKPFDRL	TGFNAFWYSH	HLLVIVYILL
gp91phox	182	ITLCLILIIIT	SSTKTIRRSY	-----	-----FEVFWYTH	HLFVIFFTGL
TM5						
NtrbohD	565	LVHGEKLYIT	KDWKRT---	-----	-----	▼ I6 T
NtrbohF	594	TIHGTFLFLV	HKWYSKT---	-----	-----	-----T
gp91phox	220	AIHGAERIVR	GQTAESLAVH	NITVCEQKIS	EWGKIKECPI	PQFAGNPMT
TM6						
NtrbohD	583	WMYLTIPIIL	YASERLIRAF	RSSIKAVKIL	KVAVYPGNVL	ALHMSKPGQY
NtrbohF	612	WMYLAVPVLL	YAGERTLRFF	RSGLYTVRLL	KVAIYPGNVL	TLQMSKPPQF
gp91phox	270	WKWIVGPMFL	YLCERLVRFW	RSQQKVV-IT	KVVTHPFKTI	ELQMKKGGFK

NtrbohD	633	KYKSGQYMFV	NCAAVSPFEW	FAD HPFSITS	APG	DDYLSVHIRT	LGDWTRQLKT
NtrbohF	662	RYKSGQYMFV	QCPAVSPFEW	HPFSITS	APG	DDYLSVHIRQ	LGDWTQELKR
gp91phox	319	MEV-GQYIFV	KCPKVKLEW	HPFTLTS	APG	EDFFSIHIRI	VGDWTEGLFN
Motif 2							
NtrbohD	683	VFSEVCQPPP	NGKSGLLRAD	YIQGENNPNF	PRVLI	DGPYG	APAQDYKKYE
NtrbohF	712	VFSEACERPE	AGKSGLLRAD	ENTKKS	---	PKLLI	DGPYG
gp91phox	368	ACGCDKQEFQ	DAWK-----	-----L---	PKIAV	DGPFG	TASEDVFSEY
NADPH ribose							
NtrbohD	733	VVLLVGLGIG	ATPM	ISIVKD	-IVNNMKAMD	EEENSLEDGH	NNNMAPNSSP
NtrbohF	759	VVLLVGLGIG	ATPF	ISILKD	LLVNIIVKMEE	QADLASDFSG	NSDMSVATSE
gp91phox	403	VVMLVGAGIG	VTPF	ASILKS	VWYKYCNNAT	-----	-----
*							
NtrbohD	782	NIAKNKGNKS	GSASGGNNFN	TRRAYFYWVT	REQGSFDWFK	GIM----	NEA
NtrbohF	809	QPALNKISLK	RRKSTLRITN	---AYFYWVT	REQGSFDWFK	GVM----	NEV
gp91phox	433	-----	-----NLK	LKKIYFYWLC	RDTHAFEFWA	DLLQLLESQM	
NtrbohD	828	AEMDHKGVIE	MHNYCTSVYE	EGDARSALIT	MLQSLHHAKN	GVDIVSGTRV	
NtrbohF	852	AELDQRGVIE	MHNYLTSVYE	EGDARSALIT	MVQALNHAKN	GVDIVSGTRV	
gp91phox	466	QERNNAGFLS	YNIYLTGWDE	SQANHFAVHH	DEEK-----	--DVI	TGLKQ
*							
NADPH adenine							
NtrbohD	878	KSHFAKPNWR	NVYKRIALNH	PEAKV	GVFYC	GAPALTKELR	QHALDFSHKT
NtrbohF	902	RTHFARPNWK	KVFSKTLTKH	ANARI	GVFYC	GAPVLAKELS	KLCKEYNQKG
gp91phox	508	KTLYGRPNWD	NEFKTIASQH	PNTRI	GVFLC	GPEALAEELS	KQSISNSESG
NtrbohD	928	STK--	FDHFK	ENF			
NtrbohF	952	ATK--	FEFHK	EHF			
gp91phox	558	PRGVHFIENK	ENF				

Abb. 62: Sequenzvergleich der putativen Tabak NADPH-Oxidase Isoformen D und F mit der menschlichen gp91phox (NM_000397). Übereinstimmende Aminosäuren wurden grau markiert. Besondere Domänen (EF-Hand-Motive, FAD-, NADPH Ribose- und NADPH Adenin-Bindungsstellen und Motif 2) wurden durch Rahmen hervorgehoben. Bei gelb hinterlegten Aminosäuren (H) handelt es sich um konservierte Histidinreste. TM steht für Transmembrandomäne, I bedeutet Intron (Torres et al., 1998), die * zeigen konservierte Prolin- und Aspartat-Reste. Striche stellen Lücken der Sequenzen dar, die zum Optimieren des Alignments eingefügt wurden. Das Alignment wurde mit Hilfe des Programms DiAlign von Genomatix erstellt.

Während die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der beiden Tabak-Isoformen eine Identität von 52 % zueinander besitzen, stimmen zwischen der D-Isoform bzw. der F-Isoform und gp91phox jeweils 29 % der Aminosäuren überein (Tab. 1). Stark konserviert sind besonders die für die Funktion des Enzyms wichtigen Bindungsstellen für FAD, NADPH Ribose und NADPH Adenin. Übereinstimmend enthalten die menschliche gp91phox und pflanzliche „respiratory burst oxidase“ Homologe sechs putative Transmembrandomänen (TM1-6). Konservierte Histidine in den Transmembranen 3 und 5 sind in gp91phox für die Häm-Bindung verantwortlich (Finegold et al., 1996; in Abb. 62 markiert). Die in der menschlichen gp91phox für die Funktion wichtigen Aminosäuren Prolin-415 und Aspartat-500 (in Abb. 62 mit * markiert) sind ebenfalls in den pflanzlichen Isoformen vorhanden. Ein Austausch dieser Aminosäuren durch Histidin und Glycin führt zu einer Inaktivierung der menschlichen

NADPH-Oxidase und damit zu der Krankheit Chronische Granulomatose (CGD; Segal et al., 1992).

Ein großer Unterschied zwischen den pflanzlichen, putativen NADPH-Oxidase und der gp91phox liegt vor allem im 5'-Ende. Hier zeigen die pflanzlichen Isoformen eine deutliche Verlängerung, in deren Bereich auch die beiden charakteristischen EF-Hand-Motive (Abb. 63) zu finden sind. EF-Hände besitzen Calcium-bindende Eigenschaften und bestehen aus der Struktur Helix-Loop-Helix. Der Loop umfasst im Normalfall immer ein Glutamat oder Aspartat, die zwei Sauerstoffatome als Ligand für die Ca-Bindung bereitstellen.

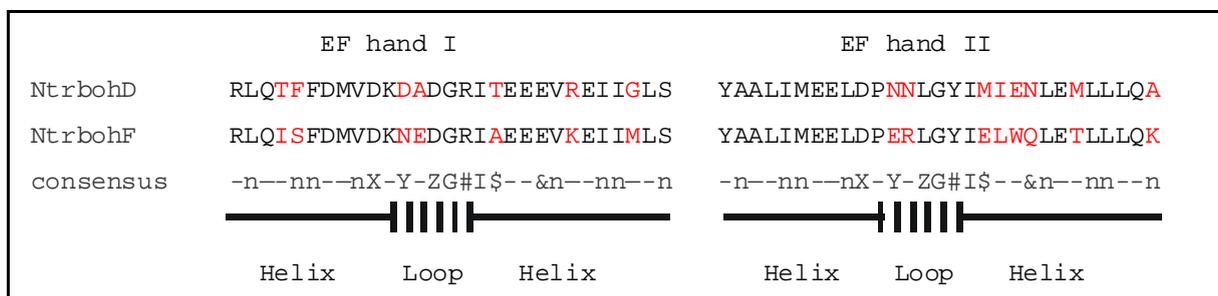


Abb. 63: EF-Hand-Motive der N-terminalen Domäne von Ntrboh D und F und Konsensus-Sequenz. n = hydrophobe Aminosäure-Reste, - = variable (oft hydrophile) Aminosäuren, X, Y, Z = Aminosäurereste mit Sauerstoffatomen in der Seitenkette, G = Gly, # = der Carbonyl-Sauerstoff dieses Aminosäurerestes dient als Ligand, I = Ile, Leu oder Val, Z = meist Glu.

Sehr hohe Homologien besitzen beide Tabakisoformen zu Sequenzen aus Tomate (Tab. 1). Während bei Ntrboh D 90 % aller Aminosäuren identisch mit einer Isoform in der Genbank (AF148534, wfi1) ist, stimmen zwischen der F-Isoform und Lerboh1 (= *L. esculentum* respiratory burst oxidase homologue 1; Amicucci et al., 1999) 84 % der Aminosäuren überein. Im Vergleich mit den entsprechenden, namensgebenden Isoformen aus *Arabidopsis* sind 67 (D-Isoformen) bzw. 72 % (F-Isoformen) aller Aminosäuren identisch. Die genannten Domänen stellen dabei aber hoch konservierte Regionen in allen Isoformen dar.

Mit den putativen pflanzlichen NADPH-Oxidase und der menschlichen gp91phox wurde noch die menschliche Sequenz ThOX 1 aus der Schilddrüse verglichen (Tab. 1). Diese Thyroid-Oxidase stellt ebenfalls ein Homolog zu der gp91phox dar, zeichnet sich aber wie die pflanzlichen Homologe durch den Besitz von EF-Hand-Motiven aus (De Deken et al., 2000). Darüber hinaus ist dieses Enzym im N-terminalen Bereich noch einmal verlängert: hier liegt eine zusätzliche Transmembrandomäne vor, insgesamt gibt es sieben.

Tab. 1: Verwandtschaft von Ntrboh D und F zu bekannten pflanzlichen und humanen NADPH-Oxidase. Lewfi 1 und LerBOH 1 stammen aus *L. esculentum*, Atrboh D und F aus *Arabidopsis thaliana*, gp91phox und ThOX 1 aus dem Menschen, Fe-Reductase aus *Saccharomyces cerevisiae*.

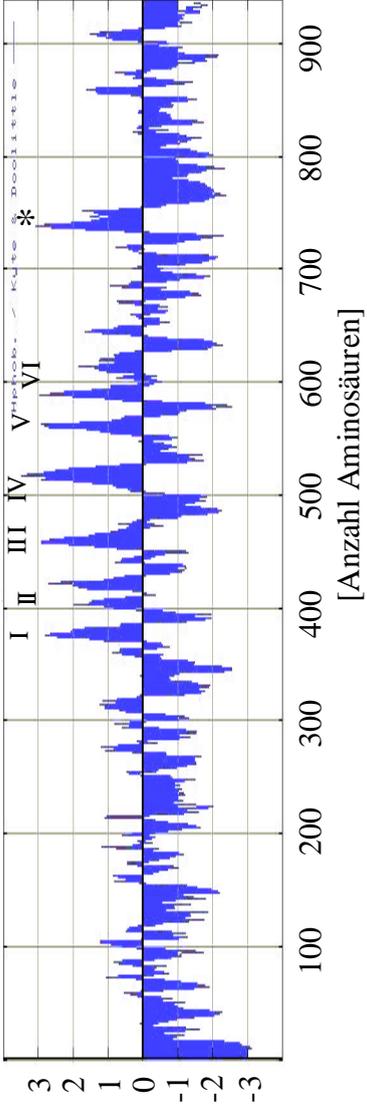
	Acc.-Nr.	Ntrboh D 938 AS		Ntrboh F 962 AS	
		ähnliche AS	identische AS	ähnliche AS	identische AS
Lewfi 1 938 AS	AF148534	92 %	90 %	71 %	58 %
Lerboh 11 989 AS	AF088276	64 %	51 %	86 %	84 %
Atrboh D 921 AS	AF055357	79 %	67 %	71 %	57 %
Atrboh F 944 AS	AB008111	67 %	53 %	78 %	72 %
gp91phox 570 AS	NM_000397	45 %	29 %	44 %	29 %
ThOX 1 1551 AS	AF230495	46 %	27 %	46 %	29 %
Fe-Reductase 686 AS	M86908	40 %	21 %	-	-

Abb. 64 zeigt vergleichend Hydropathie-Blots der putativen NADPH-Oxidase Ntrboh D und F, sowie von gp91phox und ThOX1. Deutlich sind die verschiedenen Größenverhältnisse der Enzyme: Während die pflanzlichen Enzyme über 900 Aminosäuren lang sind, kommt die menschliche gp91phox auf knapp 600. Die längste Sequenz besitzt ThOX1 mit knapp 1600 Aminosäuren. Hydropathie-Blots zeigen hydrophobe und hydrophile Bereiche der Sequenzen an und ermöglichen damit eine Voraussage der hydrophoben Transmembrandomänen. Diese sind mit römischen Zahlen durchnummeriert. Dabei ist die Ähnlichkeit der Anordnung der putativen Transmembrandomänen zwischen Ntrboh D und F, gp91phox und ThOX1 sehr hoch. Zusätzlich kann sehr gut die ebenfalls hydrophobe NADPH-Bindungsstelle herausgelesen werden. Sie ist mit einem * in Abb. 64 gekennzeichnet.

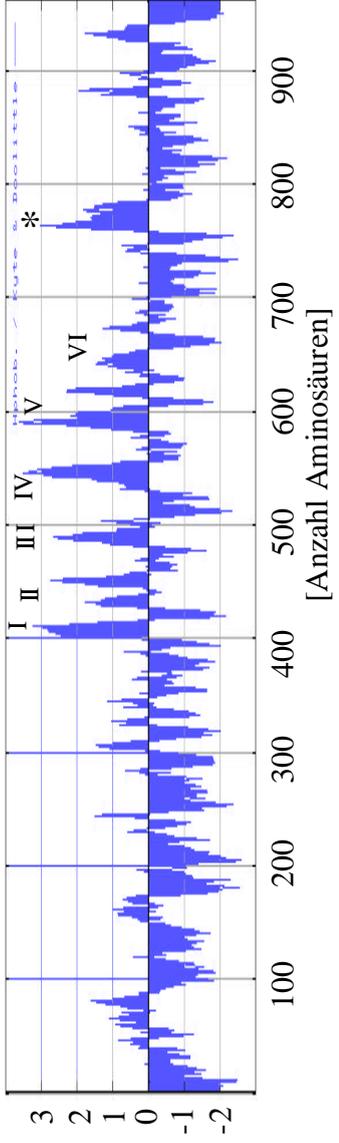
Folgende Seite:

Abb. 64: Hydropathie-Blots der Oxidase Ntrboh D und F aus Tabak sowie gp91phox und ThOX1 nach Kyle and Doolittle zur Bestimmung der Transmembrandomänen. Unterschieden wird in diesem Programm nach hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren. Die Nummern I-VII stehen für Transmembrandomänen, * markiert die NADPH-Bindungsstelle. Negative Zahlen zeigen Hydrophilie, positive Zahlen Hydrophobie an. Erstellt mit dem Programm TMPred (ExpASY Proteomics tools), verändert.

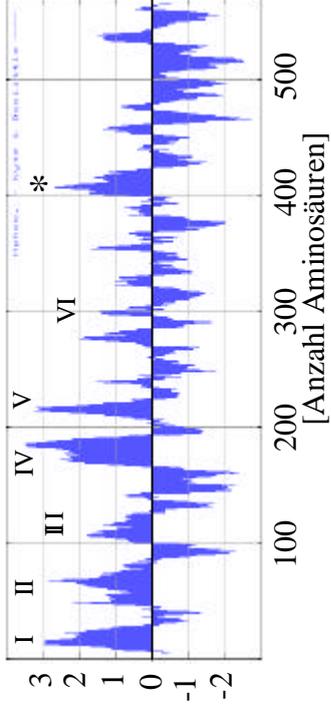
Ntrboh D



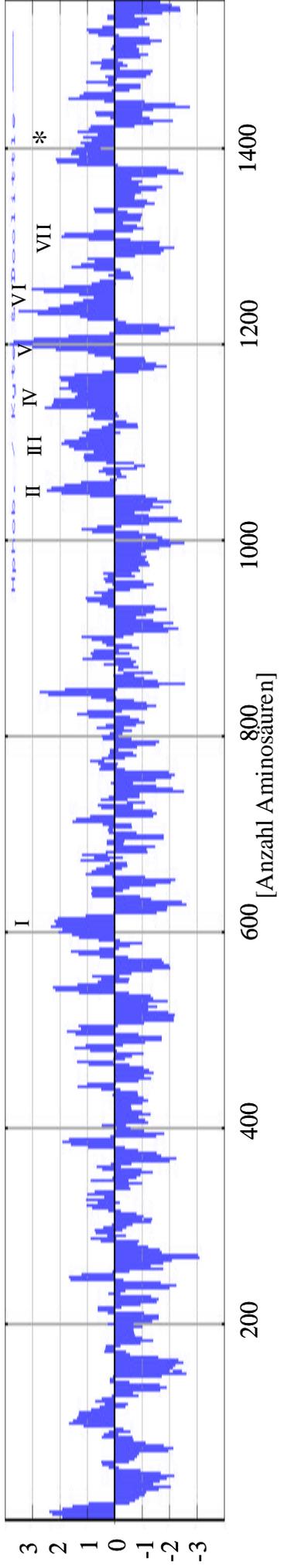
Ntrboh F



gp91phox



ThOX 1



3.2.2 Nachweis von Superoxiddismutase-Aktivität in der Apoplastenflüssigkeit von Tabak Bel B und Bel W3

In Abschnitt 3.2.1 konnte die Existenz von zwei putativen Isoformen einer NADPH-Oxidase in Tabak nachgewiesen werden. Nachdem dieses Enzym die NADPH-abhängige Reaktion von Sauerstoff zu Superoxid katalysiert und in Tabak aber hauptsächlich H_2O_2 während und nach der Ozon-Behandlung detektiert wurde, muss Superoxid noch in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Dies kann entweder über spontane Dismutation oder aber durch die Katalyse von SOD geschehen. Aufgrund verschiedener Hinweise auf die Existenz von Superoxiddismutase-Isoformen im Apoplasten, z.B. in *Pinus sylvestris* (Karpinska et al., 2001; Streller & Wingsle, 1994) und Spinat (Ogawa et al., 1996), wurden Aktivitätstest mit Kontroll- und Ozon-behandelten Proben der Tabaksorten Bel B und Bel W3 durchgeführt. Diese erfolgten leicht verändert nach Beauchamp & Fridovich (1971) als Farbreaktionen in einem nativen Polyacrylamid-Gel. Abb. 65a weist nach, dass sowohl im Apoplasten von Kontrollen als auch Ozon-exponierter Pflanzen beider Tabaksorten Aktivität von Superoxiddismutase-Isoformen vorhanden ist. Die Aktivität in den Ozon-behandelten Proben zeigte sich dabei zum Zeitpunkt 7 h nach Beginn der Ozonexposition, also zu dem Zeitpunkt der H_2O_2 Detektion, gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht. Versuche mit den Inhibitoren KCN (Abb. 65b) und H_2O_2 (Abb. 65c) für spezifische Isoformen ergaben, dass es sich bei den detektierten Enzymen um Cu/Zn-Isoformen handelte. Nach Sandalio & Rio (1987) hemmt KCN die Aktivität von Cu/Zn-SOD, H_2O_2 hemmt sowohl Cu/Zn-SODs als auch Fe-SODs, während Mn-Superoxiddismutase durch keinen der beiden Inhibitoren beeinflusst wird.

Um auszuschließen, dass die Zunahme der SOD-Aktivität in den Ozon-behandelten Pflanzen auf eine Verunreinigung durch Cytosol beruhte, wurde die Apoplastenflüssigkeit auf das Vorhandensein von Chlorogensäuren als cytosolische Marker untersucht (Moeder, 1999). Diese lagen im Bereich von etwa 2 % (Abb. 10).

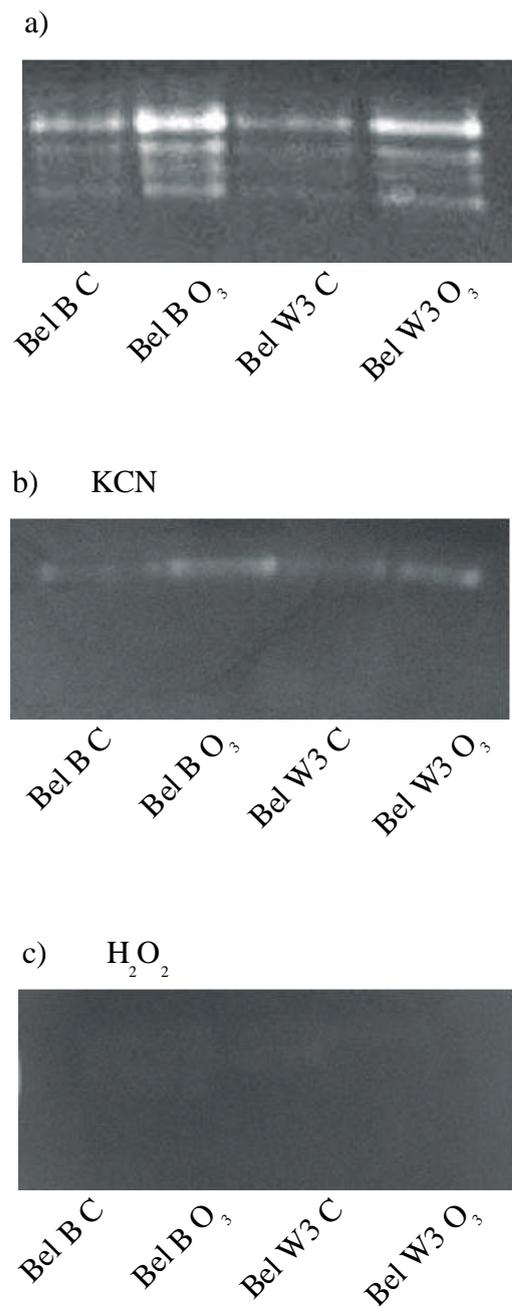


Abb. 65: Nachweis von Superoxiddismutase-Aktivität in der Apoplastenflüssigkeit von Kontroll- und Ozon-behandelten Blättern der Tabaksorten Bel B und Bel W3. Die Apoplastenflüssigkeit wurde 7h nach Beginn der Exposition gewonnen. b) und c) zeigen die Ergebnisse der Inkubation mit den Hemmstoffen KCN und H₂O₂. C = Kontrolle, O₃ = Ozon-behandelte Pflanzen.

3.2.3 Expressionsstudien der beiden putativen NADPH-Oxidase Isoformen in Tabak

Zur Charakterisierung der Transkriptakkumulation von *Ntrboh D* und *F* wurden verschiedene Northern- und RT-PCR-Experimente durchgeführt.

3.2.3.1 Expression der Gene *Ntrboh D* und *F* in verschiedenen Geweben

Mit Hilfe von Northern-Analysen wurden zunächst verschiedene Gewebe von Tabakpflanzen auf die Expression der beiden Isoformen D und F untersucht. Das entsprechende Pflanzenmaterial wurde morgens gegen neun Uhr geerntet. Die Detektion der beiden mRNAs erfolgte jeweils über eine spezifische, DIG-markierte, 415 Basen (Basen 977-1391) bzw. 459 Basen (Basen 1663-2121) lange Sonde. Weder bei der Sorte Bel B noch bei der Sorte Bel W3 konnte in unbehandelten Blättern eine signifikante Menge an Transkripten der Isoform D nachgewiesen werden (Abb. 66). Ebenso konnte die Sonde auch in den Blütenhüllblättern keine Transkripte detektieren. Eine starke Expression der *Ntrboh D* erfolgte in den Wurzeln. Auch hier erschien die Expression in Bel B etwas stärker als in Bel W3. Bei der Sorte Bel W3 wies eine der beiden Proben eine hohe und mit Bel B vergleichbare Bandenstärke auf, die Bande bei der anderen Pflanze dagegen war nur schwach. Auffällig bei den Proben mit starker Expression war das Auftreten von Doppelbanden. Zu der erwarteten oberen Bande mit einer Größe von ca. 3000 Basen kam noch eine kleinere mit etwa 1900 Basen hinzu. Auch in den Sprossachsen beider Tabaksorten konnten Transkripte der D-Isoform detektiert werden. Allerdings zeigte sich die Menge der Transkripte abhängig von der Probennahme. So konnte in Abb. 66a jeweils in einer von zwei Proben eine deutliche Bande erkannt werden, in der anderen Probe jedoch kaum. Dabei stammten die Proben mit kräftigerer Bande jeweils von näher an der Wurzel gelegenen Sprossachsenabschnitten. In Abb. 66b wurde pro Gewebe das Material von drei verschiedenen Pflanzen gemischt. Hier zeigte sich bei beiden Tabaksorten eine schwache Bande, bei der Sorte Bel B etwas stärker als bei Bel W3.

Bei der Detektion der *Ntrboh F* zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben und den beiden Tabaksorten (Abb. 66b). Die Expression dieses Gens erfolgte gleichmäßig schwach und war damit nur mit langen Expositionszeiten des Films nachzuweisen. Als Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung wurde unter den Blots die Bande der 25S rRNA abgebildet. Ribosomale RNA zeichnet sich durch eine konstitutive

Expression aus und sollte damit in allen Proben unabhängig von der Behandlung in ähnlicher Konzentration vorhanden sein.

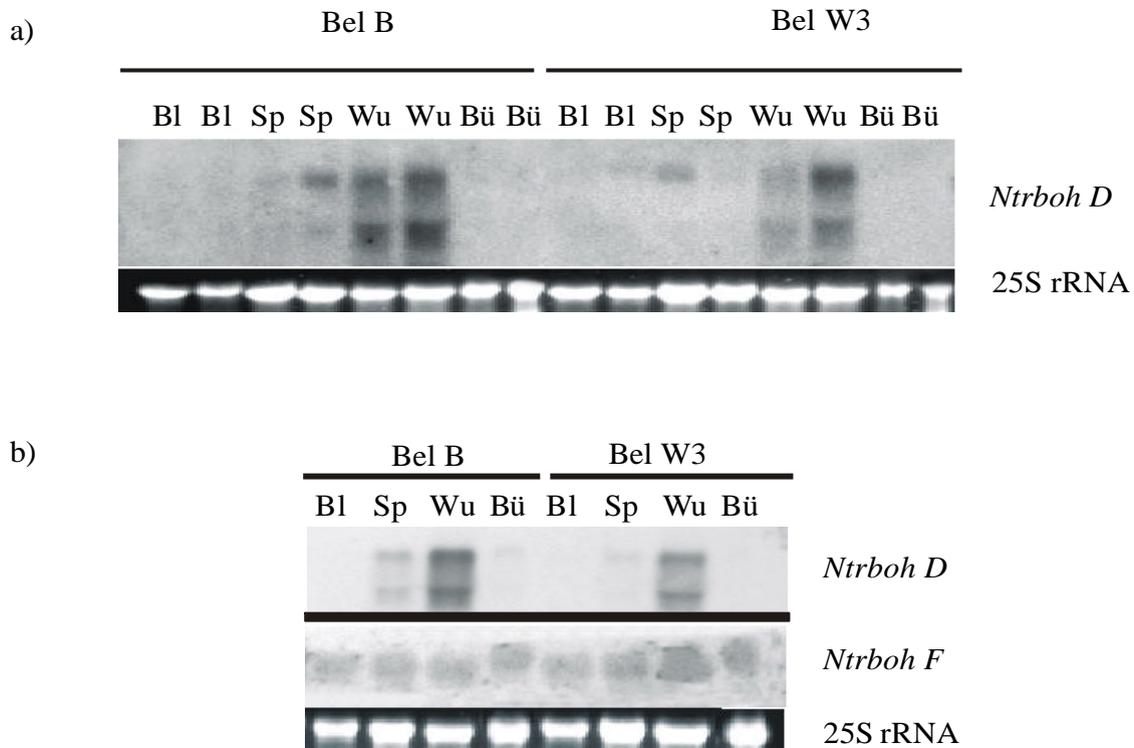
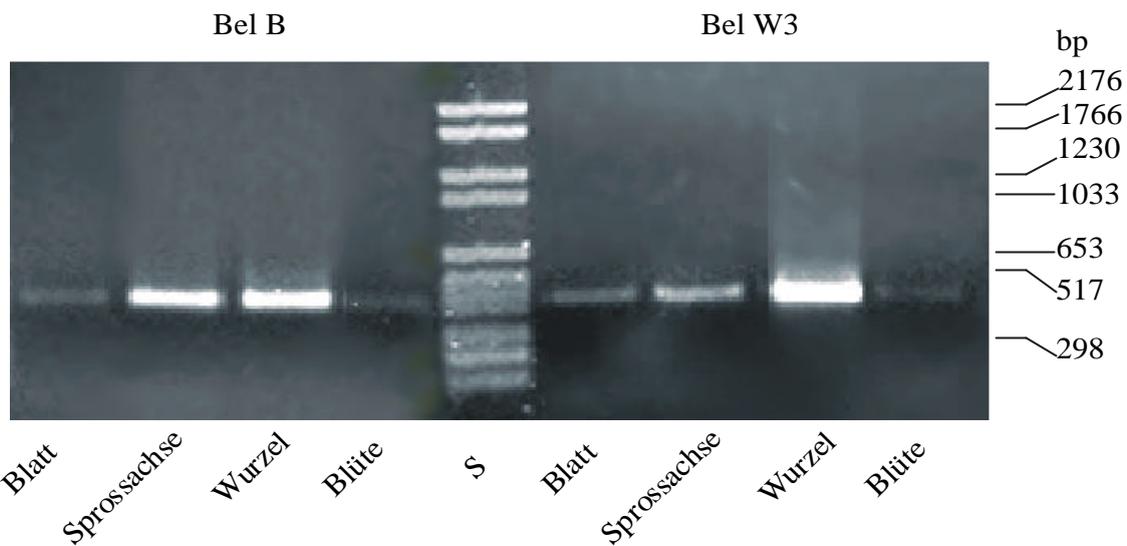


Abb. 66: Expressionsmuster der beiden *Ntrboh*-Isoformen in verschiedenen Pflanzengeweben der Tabaksorten Bel B und Bel W3. Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Gelbeladung wird die Bande der 25S rRNA gezeigt. Detektiert wurden die Transkripte mit Hilfe einer DIG-markierten Sonde, die bei der D-Isoform 415 Basen, bei der F-Isoform 459 Basen groß war. Bl = Blatt, Sp = Sprossachse, Wu = Wurzel, Bü = Blütenhülle. In a) wurde pro Spur das Probenmaterial von nur einer Pflanze aufgetragen, in Versuch b) wurde das Material von drei Pflanzen gemischt.

Neben Northern-Blots eignen sich quantitative RT-PCR-Experimente zur vergleichenden Analyse der Transkriptmengen eines Genes zwischen verschiedenen Pflanzengeweben oder Behandlungen. Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR bestätigten die Resultate der Northern-Blots der D-Isoform. Diese wurden mit spezifischen Primern (15a + 16b, siehe Anhang) durchgeführt, die ein 415 Basen großes Teilstück der cDNAs amplifizierten. Für das Primerpaar wurde zunächst die optimale Temperatur und Zyklenzahl (Material und Methoden Abschnitt 19.10.2; Abb. 11) bestimmt. Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde schließlich auf ein Agarose-Gel aufgetragen (Abb. 67a), mit dem Rest wurden quantitative Analysen durchgeführt (Abb. 67b).

a)



b)

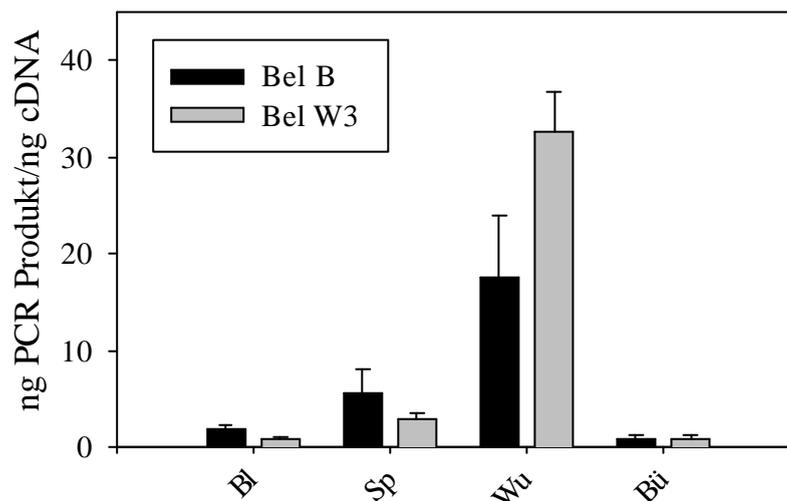


Abb. 67: Quantitative Expressionsanalysen der *Ntrboh D* mit Hilfe von RT-PCR. Pro PCR-Ansatz wurden jeweils 10 ng cDNA eingesetzt und bei 69°C 36 Zyklen durchgeführt. Die Proben bestanden aus Material von drei verschiedenen Pflanzen. In a) ist ein Foto eines Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gels zu sehen, in b) die quantitative, fluorometrische Auswertung. Die Standardfehler stellen die Unterschiede zwischen vier verschiedenen PCR-Experimenten einer cDNA-Synthese dar. Bl = Blatt, Sp = Sprossachse, Wu = Wurzel, Bü = Blüte. Primer: 15a und 16b (siehe Anhang).

Wie bei den Northern-Blots zeigten die Organe Blatt und Blüte beider Tabaksorten nur sehr geringe Transkriptmengen (Abb. 67a). In den Sprossachsen konnte eine größere Menge detektiert werden. Hier waren es bei Bel B ca. 5, bei Bel W3 etwas weniger mit ca. 3 ng pro ng cDNA (Abb. 67a und b). Wiederum konnte in den Wurzeln die höchste Konzentration der Transkripte nachgewiesen werden. Der relativ hohe Standardfehler bei den Wurzel-Proben

von Bel B weist aber auf die starken Schwankungen zwischen verschiedenen PCR-Experimenten hin. Der Standard auf den Gelbild zeigt, dass die richtige Bande in der erwarteten Größe amplifiziert wurde.

3.2.3.2 Transkript-Analyse für *Ntrboh D* und *F* während und nach einer Ozonbehandlung

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss einer Ozonbehandlung auf die Genexpression der beiden NADPH-Oxidase-Homologe in Tabak geprüft. Dafür wurden Pflanzen der Sorte Bel W3 für 1,5 h mit 185 nl l^{-1} Ozon behandelt. In Abb. 68 wurde RNA von Kontrollpflanzen und behandelten Pflanzen mit den Sonden für *Ntrboh D* und *F* hybridisiert. Während bei Blattmaterial von Kontrollpflanzen kein Signal bei der D-Isoform detektiert werden konnte, zeigte sich eine deutliche Bande in Probenmaterial von Ozon-exponierten Pflanzen. Der mit Hilfe des ImageMaster (Amersham Pharmacia) berechnete Induktionsfaktor betrug 15. Bei der F-Isoform waren weder in unbehandeltem noch in behandeltem Blattmaterial Banden zu erkennen.

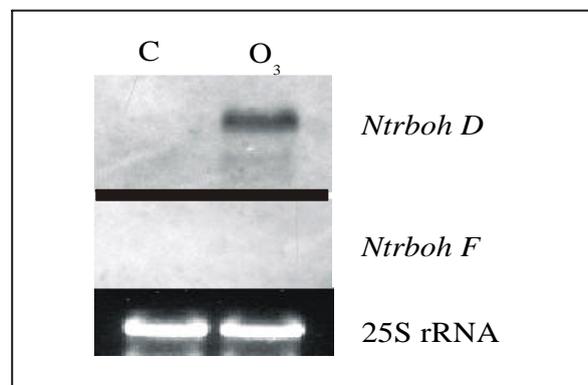


Abb. 68: Vergleichende Northern-Analyse der NADPH-Oxidase-Isoformen D und F zwischen unbehandelten (C) und Ozon-behandelten (O_3) Pflanzen der Tabaksorte Bel W3. Das Pflanzenmaterial dafür wurde 1,5 h nach Beginn der Exposition geerntet. Jeweils 10 ng Gesamt-RNA wurden auf ein Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt und die gleichmäßige Beladung fotografisch mit Hilfe der 25S rRNA dokumentiert. Die Hybridisierung erfolgte mit den gleichen Sonden wie in Abb. 66.

In verschiedenen Zeitintervallen wurde während und nach einer 5stündigen Ozonbehandlung mit 185 nl l^{-1} Blattmaterial analysiert. In Abb. 69 sind Northern-Analysen der D- und F-Isoform von zwei verschiedenen Ernten zu sehen. In dem Versuch in Abb. 69a konnten auf den ersten Blick deutliche Unterschiede der Bandenintensitäten über den Versuchszeitraum

hinweg bei der D-Isoform erkannt werden. Wie im vorigen Versuch ließ sich bei den Kontrollen der Tabaksorte Bel W3 höchstens ein schwaches Signal detektieren. Dagegen zeigten die Bandenintensitäten der behandelten Proben deutliche Ozon-Induktionen, wobei ein biphasischer Verlauf mit einem Maximum zum Zeitpunkt 1,5h und einem zweiten nach 6h auftrat. Wie in den Untersuchungen zur Gewebeexpression (Abb. 66) konnten besonders in stark induzierten Proben deutlich zwei Banden identifiziert werden. Die obere, stärkere Bande besaß mit ca. 3 kb ungefähr das für *Ntrboh D* erwartete Molekulargewicht, die zweite Bande umfasste etwa 1,9 kb. Die Induktionsfaktoren wurden für die obere, im Molekulargewicht passende und stärkere Bande ermittelt.

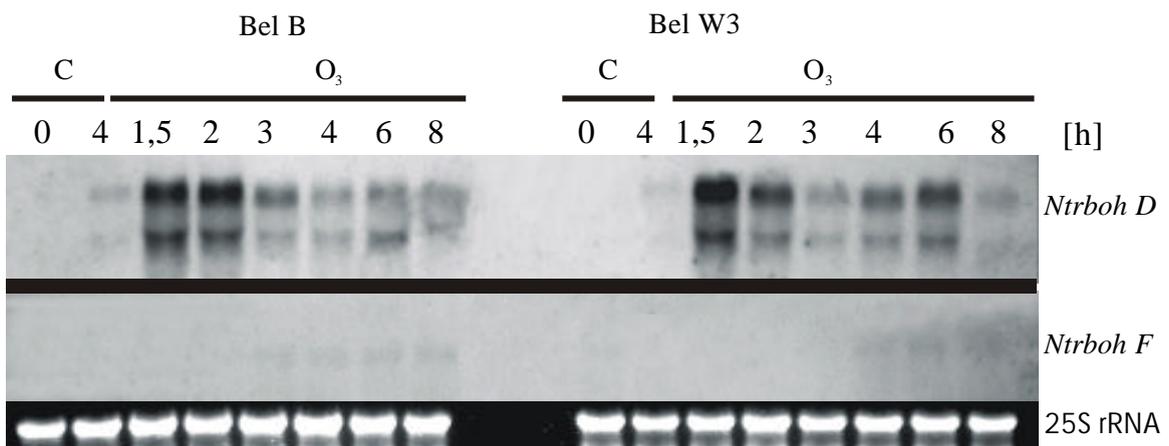
Keine herausragenden Unterschiede konnten zwischen den Sorten Bel B und Bel W3 erkannt werden. Auch bei Bel B trat ein biphasischer Verlauf der Transkriptmengen auf, bei dem die Maxima zeitlich etwas nach hinten verschoben lagen. Zum Zeitpunkt 0 h ließ sich die Isoform D weder in Bel B noch in Bel W3 nachweisen. In Blattmaterial der Kontrollen 4 h nach Beginn der Behandlung war eine schwache obere, bei Bel B besser sichtbare Bande als bei der Sorte Bel W3, zu erkennen. Gegenüber dem ersten Zeitpunkt trat bei Bel B eine Verdreifachung, bei Bel W3 eine Verdopplung der Bandenintensität auf (Folgende Seite:

Abb. 69b). Für die sehr starken Banden zum Zeitpunkt 1,5 h wurden für die Sorte Bel B eine 38fache Induktion, für Bel W3 eine 46fache gegenüber dem Zeitpunkt 0h ermittelt. Während die Transkriptmenge bei Bel B 2 h nach Beginn der Behandlung noch etwas anstieg, konnte bei Bel W3 schon wieder ein Rückgang verzeichnet werden. Dieser setzte sich bis zum Zeitpunkt 3 h fort, zu dem nur noch die 5fache Transkriptmenge gegenüber dem Start der Exposition gemessen werden konnte. Nach 6 h fand sich ein zweites, geringeres Maximum. Die Induktion betrug hier das 18fache. Bei der Ozon-toleranten Sorte verzögerte sich der Zeitverlauf etwas und ergab mit einer 12fachen Induktion das zweite Maximum erst gegen 8 h. Der Verlauf bei Bel B war nicht so deutlich in seiner Zweigipfligkeit. Der zweite Peak fiel flacher aus.

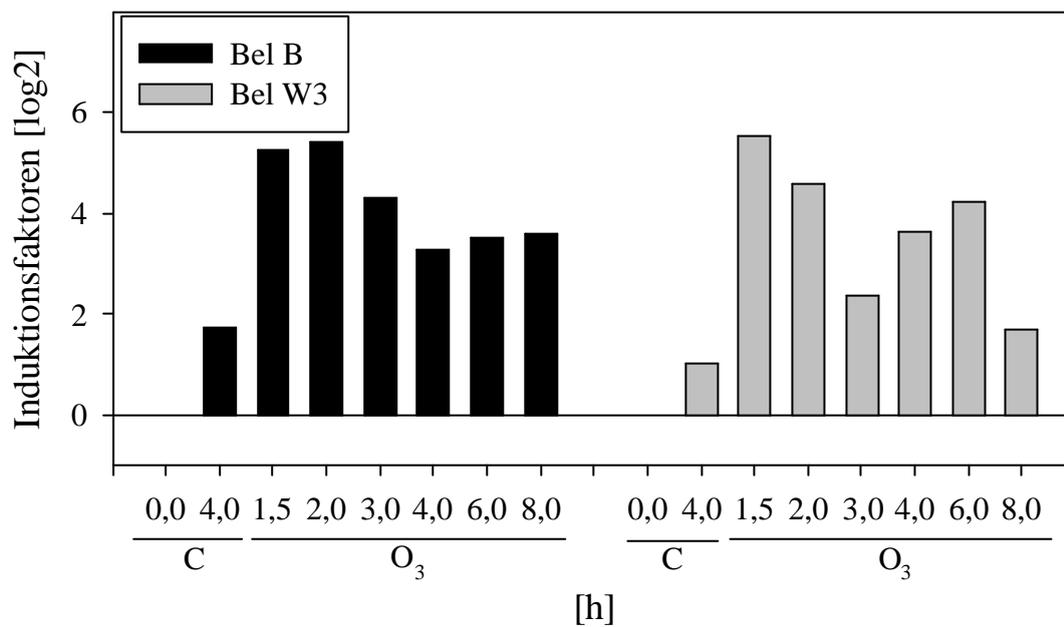
Folgende Seite:

Abb. 69: Northern-Analysen der Gene *Ntrboh D* und *F* von behandelten Proben während und nach einer Ozonexposition. Für jeden Zeitpunkt wurde das Blattmaterial von drei Pflanzen gemischt. Pro Spur wurden jeweils 10 (a) bzw. 9 µg (c) Gesamt-RNA aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit spezifischen, DIG-markierten Sonden. Als Nachweis eines gleichmäßigen Probenauftrags wird die 25S rRNA gezeigt. a) und c) stellen verschiedene Ernten dar, b) veranschaulicht die Induktionsfaktoren von a).

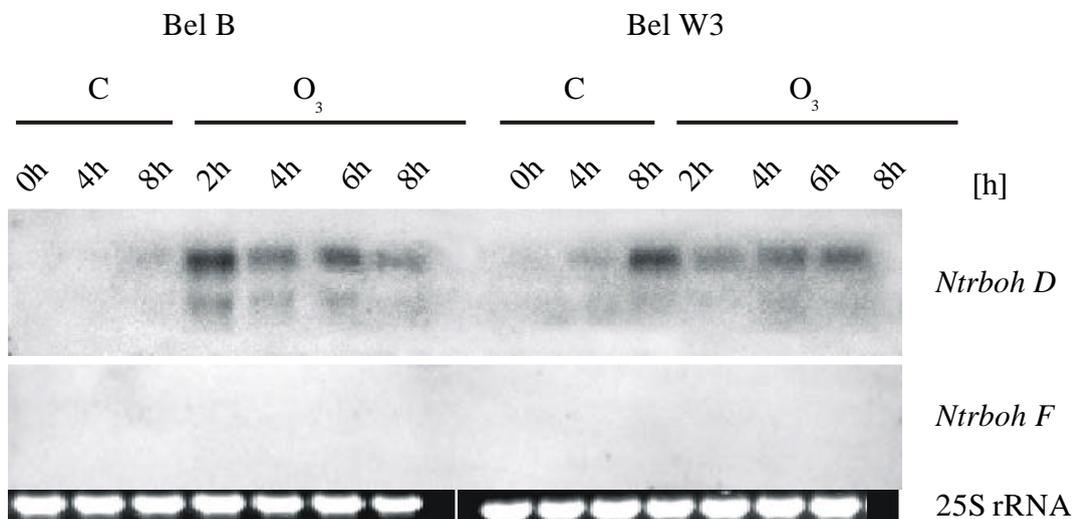
a)



b)



c)



In einem weiteren Versuch (Abb. 69c) wurde das absolute Maximum der Transkripte ebenfalls zum Zeitpunkt 2 h detektiert. Es ergaben sich für beide Tabaksorten wieder Induktionen über 30. Bei Kontrollpflanzen konnte erst bei der 8 h Kontrolle eine Bande erkannt werden. Die Intensität dieser Bande war sowohl bei Bel B als auch Bel W3 um etwa das 7fache stärker als jene zum Zeitpunkt 0 h. Wie schon im ersten Versuch nahm nach den ersten Maximum die Transkriptmenge wieder ab, bevor dieses Mal das zweite Maximum zuerst bei Bel B nach 6 h erreicht wurde (23fache Induktion), bei Bel W3 erst nach 8 h (25fache Induktion). In diesem Versuch zeigte sich ein für Bel W3 etwas verzögerter biphasischer Verlauf.

Ntrboh F konnte in diesen Versuchen mit der DIG-Sonde sehr schwach detektiert werden. Während bei dem Experiment in Abb. 69a schwache Banden ab etwa dem Zeitpunkt 3-4 h nach Beginn der Exposition erkannt werden konnten, war dies in dem zweiten dargestellten Versuch (Abb. 69c) nicht möglich. Eventuell ließ sich gleichermaßen eine leichte Induktion dieser Isoform bei Bel B und Bel W3 gegen Ende und nach einer Ozonbehandlung verzeichnen.

Um die Ergebnisse der Northern-Analysen abzusichern, wurden quantitative RT-PCR-Experimente durchgeführt. Die RT-PCR-Untersuchungen wurden in zwei verschiedenen Varianten getestet (Material und Methoden Abschnitt 19.10). In der ersten Version erfolgte die Quantifizierung der Bandenintensität relativ zu einem internen Standard (Wang et al., 1989). Da es sich dabei um artifizielle, vor der cDNA-Synthese in definierter Menge zugegebene RNA handelte, konnte eine Induktion durch Ozon ausgeschlossen werden. Darüber hinaus unterschied sich das Amplifikat (Primer DM151 und DM152 siehe Anhang) in seiner Größe nicht allzu sehr von der Bande der D- und F-Isoform, so dass auch eine vergleichbare Amplifikation der entsprechenden cDNAs sicher gestellt sein sollte. Wie für die Herstellung der DIG-Sonde wurden in diesen Analysen ebenfalls die Primer 15a und 16b für *Ntrboh D* sowie 19a und 20b für *Ntrboh F* verwendet (siehe Anhang). Die Intensitäten der Banden, erhalten aus dem Einsatz von 1 µl cDNA, wurden am ImageMaster ermittelt.

Abb. 70 zeigt das Ergebnis quantitativer RT-PCR-Analyse für *Ntrboh D*. Blattmaterial von Kontrollen und Ozon-behandelten Pflanzen wurde im Abstand von jeweils 2 h geerntet. In Abb. 70a ist das Bandenmuster, in b die dazugehörige quantitative Auswertung dargestellt.

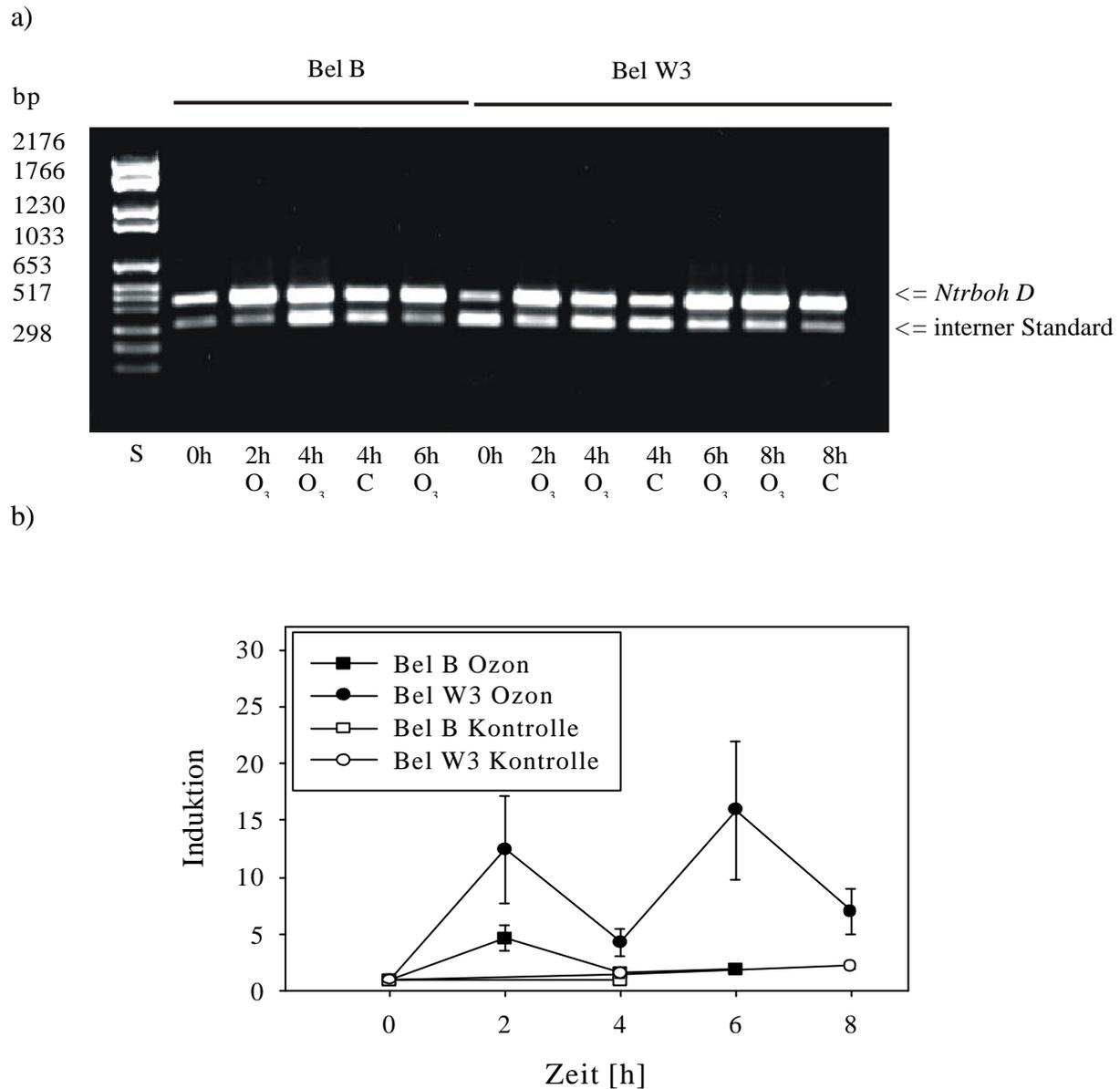
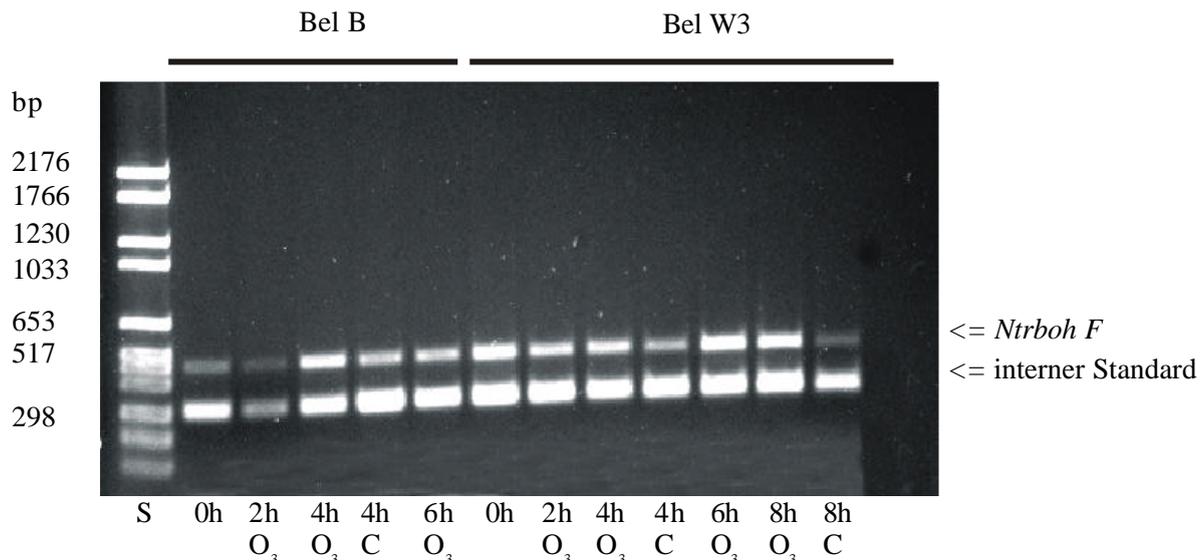


Abb. 70: Analysen der Transkripte der *Ntrboh D* mittels quantitativer RT-PCR während und nach Ozonexposition (185 nl l^{-1}). Vor der cDNA-Synthese erfolgte die Zugabe von artifizieller RNA, deren Amplifikation mit einem zusätzlichen Primerpaar als interner Standard diente. Pro Reaktion wurde $1 \mu\text{l}$ cDNA eingesetzt, die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 59°C für 33 Zyklen durchgeführt. a) zeigt das Bandenmuster, b) die Mittelwerte der Induktionen aus sechs verschiedenen PCR-Untersuchungen von derselben cDNA. Als Primer dienten die Sequenzen 15a + 16b, sowie DM151 + DM152 (siehe Anhang).

Zunächst fiel auf dem Gelbild auf, dass die zu der artifiziellen RNA gehörige, untere Bande nicht, wie im Idealfall erwartet, überall die gleiche Intensität besaß. Dies könnte auf eine zwischen den Proben unterschiedlich gute cDNA-Synthese deuten und beweist, dass ohne einen internen Standard nicht einfach nur ein gewisses Volumen pro PCR-Reaktion eingesetzt werden kann. Die Auswertung der Bandenintensitäten ergab für die Kontrollpflanzen beider Sorten keine Induktionen. Bei Bel B konnte nur eine knapp 5fache Induktion der D-Isoform

zum Zeitpunkt 2 h festgestellt werden. Bei der Ozon-empfindlichen Sorte Bel W3 ergab sich ein ähnliches Bild zu den Northern Analysen. Ein biphasischer Verlauf der Transkripte mit Maxima nach 2 (12fache Induktion) und 6 h (16fach) konnte erkannt werden. Ein Erntezeitpunkt 1 bzw. 1,5 h nach Beginn der Ozon-Exposition wäre hier unter Umständen für die exakte Zeitpunktbestimmung des ersten Maximums interessant gewesen.

a)



b)

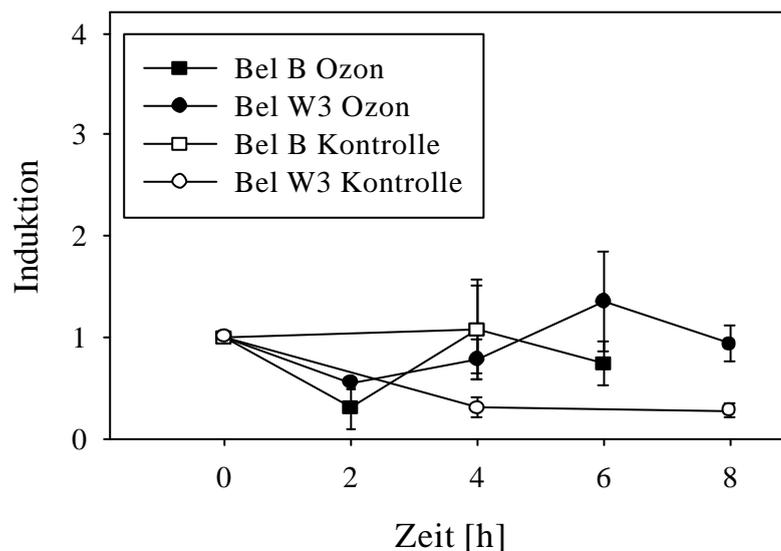


Abb. 71: Quantitative RT-PCR-Analyse für die Isoform *Ntrboh F*. Wie in Abb. 70 wurde 1 μ l cDNA eingesetzt und 33 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 59°C durchgeführt (Primer 19a + 20b). Als interner Standard diente die Amplifikation einer artifiziiellen RNA (Primer DM151 + DM152). a) zeigt das Bandenmuster, b) die quantitative Auswertung sechs verschiedener PCR-Experimente der gleichen cDNA.

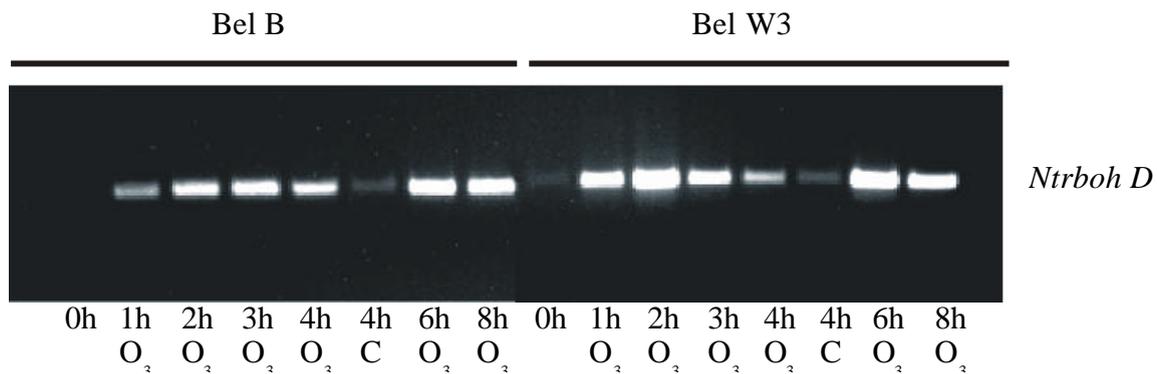
Nach der gleichen Methode wurden auch die Transkripte von *Ntrboh F* untersucht. Hier zeigte sich die Bande der artifiziellen RNA bis auf den Zeitpunkt 2 h Ozon relativ gleichmäßig, so dass ein Vergleich der Banden der F-Isoform anhand des Gelbildes möglich war (Abb. 71a). Die quantitative Auswertung ergab keine deutlichen Induktionen dieser Isoform sowohl bei Bel B als auch bei Bel W3 (Abb. 71b).

In der zweiten Variante wurde auf die Amplifikation eines internen Standards verzichtet, dafür aber die cDNA-Konzentration nach der Synthese fluoresszenzphotometrisch vermessen. Pro PCR-Ansatz wurde nicht mehr ein bestimmtes Volumen cDNA, sondern definiert jeweils 10 ng eingesetzt.

Vor Beginn der Ozonbehandlung, also morgens um 9 Uhr, konnten bei beiden Tabaksorten kaum Transkripte der D-Isoform nachgewiesen werden (Abb. 72). Vier Stunden später war bei den unbehandelten Pflanzen eine schwache Bande sichtbar. Diese erwies sich gegenüber dem Zeitpunkt 0 um ca. das 9fache stärker (Abb. 72b). Bei der Sorte Bel W3 ergaben die Messungen zwei deutliche Peak-Maxima nach 2 und 6 h mit Induktionen von 30 bzw. 42fach, was sich auch in den Bandenintensitäten widerspiegelte.

Dagegen zeigten die Transkripte in den Blättern von Bel B zwar infolge der Ozonbehandlung einen deutlichen Anstieg bis zum Zeitpunkt 3 h, was einer Induktion um das 16fache entsprach, anschließend blieb die Bandenintensität und damit auch die Transkriptmenge bis zum Versuchsende in etwa auf diesem Niveau. Zum Zeitpunkt 8 h konnte schließlich die maximale Induktion mit 19fach verzeichnet werden.

a)



b)

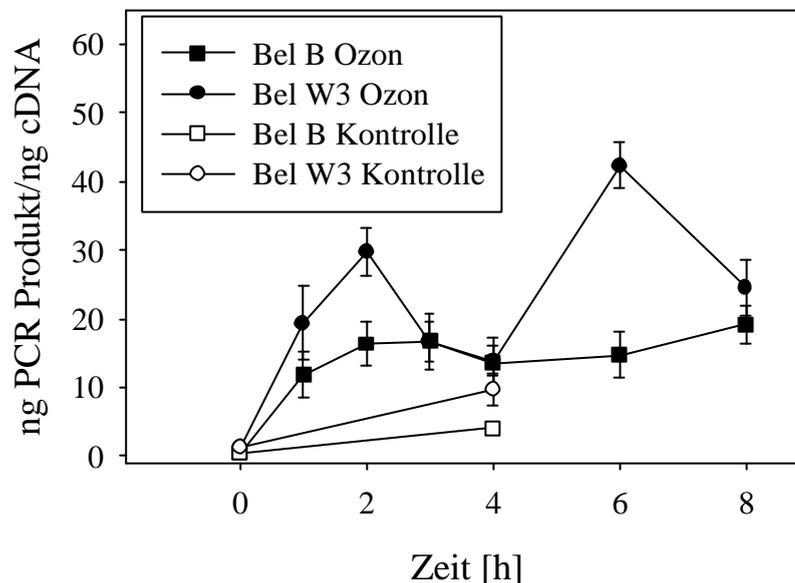
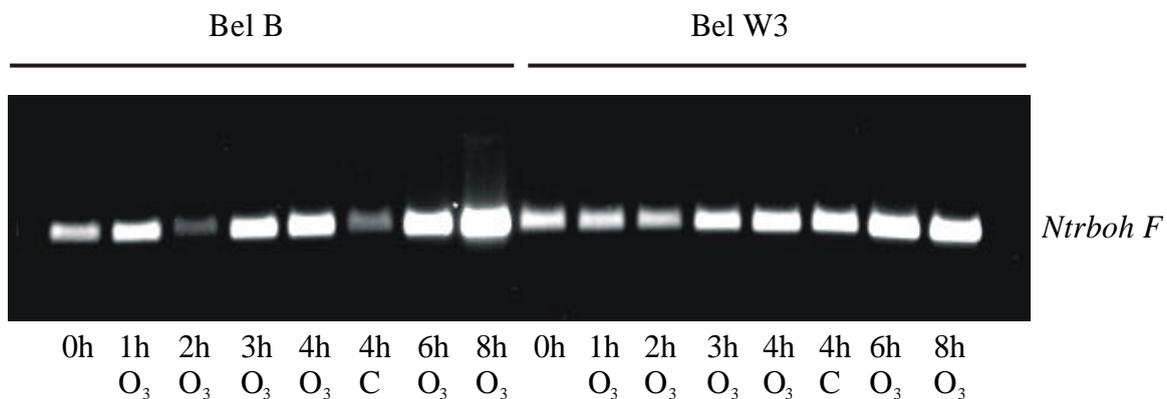


Abb. 72: Transkriptanalysen der D-Isoform während und nach einer Ozonbehandlung (5h, 185 nl l^{-1}). In a) ist das Ethidiumbromid-gefärbte Agarose-Gel, in b) die quantitative Auswertung der verschiedenen Proben zu sehen. Pro Ansatz wurden 10 ng cDNA eingesetzt, es wurden 34 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 69°C durchgeführt. Die Vermessung der DNA-Konzentration erfolgte fluorometrisch nach Zugabe des Farbstoffs RiboGreen. Verwendete Primer: 15a +16b (siehe Anhang).

Nachdem für die Untersuchung von *Ntrboh F* dieselbe cDNA und die gleiche Zyklenzahl wie bei der D-Isoform verwendet wurden, bestätigte sich hier das Ergebnis aus den Versuchen zur Gewebelokalisation bezüglich der Blätter (Abb. 66). So scheint die F-Isoform in unbehandelten Blättern höher exprimiert zu sein als die D-Isoform. Während in Kontrollblättern zum Zeitpunkt 0 h nach 34 PCR-Zyklen nur etwa 1 ng DNA gemessen werden konnten, waren es bei der F-Isoform 7 (Bel B) bzw. 12 ng (Bel W3), und die PCR-Bande war gut sichtbar (Abb. 73). Im Verlauf der Ozon-Behandlung schwankten die

Transkripte etwa um 10 ng bei beiden Sorten, mit Ausnahme des Zeitpunkts 2 h, wo die Bande deutlich schwächer und die Transkriptmenge niedriger war. Gegen Ende der Exposition gab es sowohl bei Bel B als auch Bel W3 eine Erhöhung der Transkriptgehalte, bis zu einer Konzentration von 66 bzw. 36 ng DNA pro ng eingesetzter cDNA. Auf eine potentielle, wenn auch im Vergleich mit der D-Isoform geringere Reaktion der *Ntrboh F* auf Ozon in und nach der zweiten Behandlungshälfte hatte schon die Northern Analyse dieser Proben hingewiesen.

a)



b)

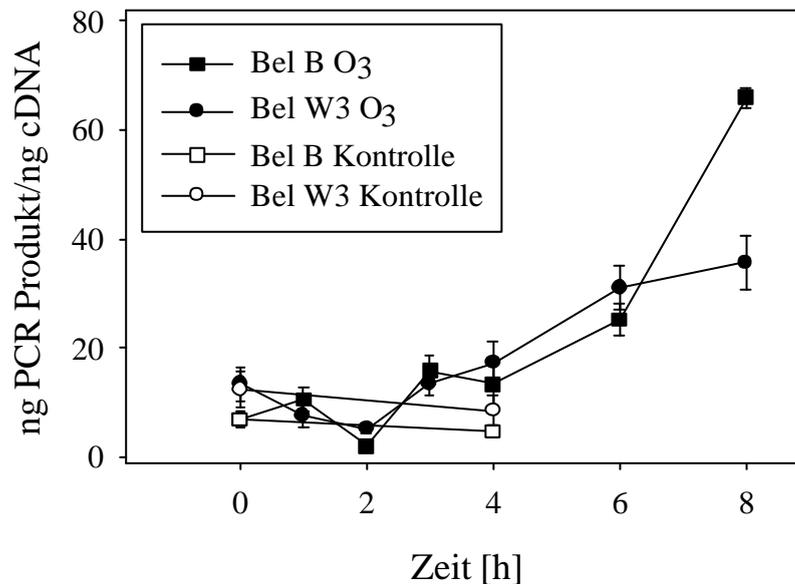


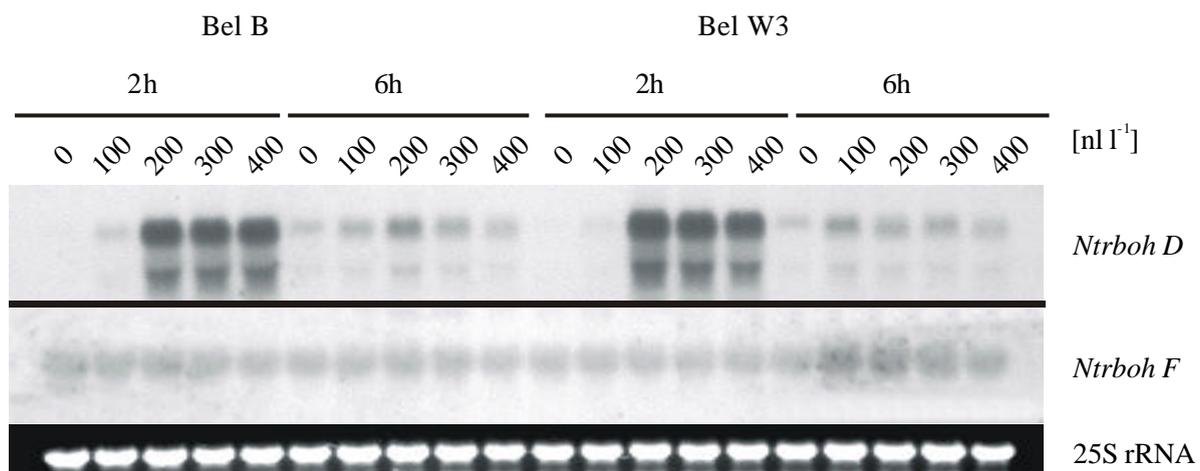
Abb. 73: Quantitative RT-PCR-Analyse der Isoform *Ntrboh F* von Kontroll- und Ozonbehandelten Pflanzen im Zeitverlauf. Die Amplifikation der eingesetzten 10 ng an cDNA erfolgte in 34 Zyklen bei 61°C. In a) ist das Bandenmuster zu sehen, in b) die DNA-Konzentration. Verwendete Primer waren 19a +20b (siehe Anhang).

Zusammenfassend scheint die Transkriptmenge der D-Isoform schon in unbehandelten Blättern über den Tagesverlauf hinweg leicht zu variieren. In beiden Tabaksorten hatte eine Ozonbehandlung eine deutliche Induktion dieser Isoform zur Folge. Diese zeigte bei Bel W3 in allen Versuchen einen biphasischen Verlauf mit maximalen Induktionen um die Zeitpunkte 1,5 bis 2 h und 6 bis 8 h nach Expositionsbeginn zwischen 20 und 40fach. Während in den quantitativen RT-PCR-Experimenten bei der Sorte Bel B kein deutlicher biphasischer Verlauf der Transkripte erhalten wurde, zeigten sich in den Northern Analysen keine Unterschiede zwischen Bel B und Bel W3.

3.2.3.3 Induktion der Genexpression von *Ntrboh D* und *F* in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration

Im vorigen Kapitel wurden die Induktionen der beiden in Tabak gefundenen, zu NADPH-Oxidasen homologen Gene im Verlauf einer Standardozonbehandlung untersucht. Nun sollte die Abhängigkeit von der Ozonkonzentration zu den ermittelten Maxima geprüft werden. Die eingesetzten Ozonkonzentrationen betragen 0, 100, 200, 300 und 400 nl l^{-1} . Zwei Stunden nach Beginn der Exposition konnten in unbehandelten Blättern sehr geringe Transkriptgehalte der D-Isoform detektiert werden (Abb. 74a). Die Berechnung der Induktionsfaktoren erfolgte in Beziehung zu dieser Bande (Abb. 74b). Bei einer Konzentration von 100 nl l^{-1} war eine schwache Bande bei der Tabaksorte Bel W3 erkennbar. Sehr intensive Banden zeigten sich zu diesem Zeitpunkt nach einer Behandlung mit 200 nl l^{-1} . Eine weitere Steigerung der Ozonkonzentration hatte schließlich keine Verstärkung der Bande mehr zur Folge. Die Bandenintensitäten bei 200 bis 400 nl l^{-1} resultierten in etwa den gleichen Induktionsfaktoren, die sich bei der Tabaksorte Bel W3 um etwa das 20fache beliefen. Vier Stunden später war auch eine Bande bei unbehandeltem Blattmaterial sichtbar. Der Verstärkungsfaktor der Bande gegenüber dem Zeitpunkt 2 h betrug etwa 2. Die zum Zeitpunkt 6 h nach Beginn der Ozonbehandlung erzielten Induktionsfaktoren der Ozon-exponierten Blätter fielen deutlich geringer aus (3fache Induktion), und es wurden keine großen Unterschiede in den Bandenintensitäten zwischen den einzelnen Ozonkonzentrationen sichtbar. Ein direkter Vergleich der Bandenintensitäten zwischen unbehandelten und behandelten Proben des Erntezeitpunktes 6 h ergab darüber hinaus nur einen Induktionsfaktor von etwa 1,3.

a)



b)

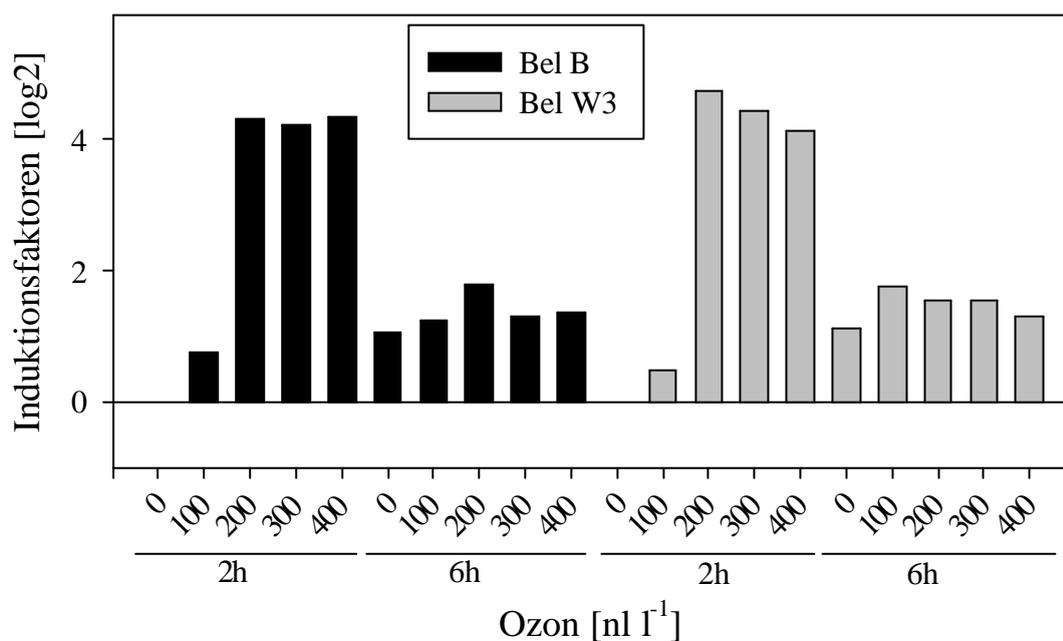


Abb. 74: Abhängigkeit der Expression von *Ntrboh D* und *F* von der Ozonkonzentration. In einer 5stündigen Exposition wurden Pflanzen der Sorte Bel B und Bel W3 mit 0, 100, 200, 300 oder 400 nl l^{-1} Ozon behandelt. Blattmaterial von jeweils drei Pflanzen wurde für jede Behandlung gemischt und davon 10 μg Gesamt-RNA auf die Membran gebracht. Die Hybridisierung erfolgte mit DIG-markierten, für jede Isoform spezifischen Sonden (siehe Abb. 66). Als Ladungskontrolle wird die 25S rRNA gezeigt. a) Northern Blot, b) Induktionsfaktoren.

Sehr ähnlich zeigten sich die Ergebnisse bei der Sorte Bel B. Auch hier ergab sich nach 2h Exposition mit 200, 300 und 400 nl l^{-1} Ozon ein Induktionsfaktor von ca. 20 (Abb. 74b). Die Banden zum Zeitpunkt 6h fielen bei den Ozon-behandelten Pflanzen mit Ausnahme des

200 nl l^{-1} Wertes im Vergleich zu Bel W3 etwas schwächer aus (Abb. 74a). Besonders in den durch Ozon stark induzierten Proben wurde neben der erwarteten Bande von *Ntrboh D* wieder eine zweite Bande geringeren Molekulargewichtes sichtbar. Diese könnte das Resultat eines alternativen Splicing von *Ntrboh D* oder aber eines definierten Abbaus darstellen.

Keine deutlichen Veränderungen der Bandenintensitäten waren bei der F-Isoform erkennbar. Sowohl in unbehandeltem als auch Ozon-behandeltem Blattmaterial zeigten sich schwache Banden.

3.2.3.4 Einfluss einer Infektion der Tabaksorte Bel W3 mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* auf die Expression von *Ntrboh D* und *F*

Nachdem pflanzliche Abwehrreaktionen gegen Pathogene und durch Ozon-ausgelöste Reaktionen viele Ähnlichkeiten wie z.B. die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zeigen (Sandermann et al., 1998), sollte die Induzierbarkeit der beiden Isoformen durch eine bakterielle Infektion getestet werden. Ausgewählt wurde dafür *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, dessen Infektion als für Tabak avirulentes Pathogen in den typischen Läsionen der hypersensitiven Antwort resultierte (Abb. 75). Das Blattmaterial für diesen Versuch wurde acht Stunden nach Pathogen-Infiltration in den Blattapoplasten geerntet.



Abb. 75: Infiltration des avirulenten, HR-auslösenden Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (10^7 cfu ml^{-1} ; linke Blattseite) sowie 10 mM MgSO_4 als Kontrolle (rechte Blattseite) in Blatt 4 der Tabaksorte Bel W3. Die kreisförmigen Schäden auf beiden Blathälften stellen den Abdruck der Infiltrationsspritze dar.

In einer Northern Analyse zeigte sich, dass die Expression von *Ntrboh D* sehr stark durch *Pseudomonas syringae* induziert wurde (Abb. 76). Im direkten Vergleich mit einer Ozon-behandelten Probe (2 h nach Beginn einer Exposition mit 185 nl l^{-1}) ergab sich eine sehr ähnliche Bandenintensität. Um eine Induktion der D-Isoform allein durch das Infiltrieren der Blätter auszuschließen, wurde parallel mit der Pathogenlösung auch MgSO_4 (10 mM) in

Blätter injiziert. Die bei dieser Behandlung kaum sichtbare Bande wies die Pathogen-bedingte Induktion nach.

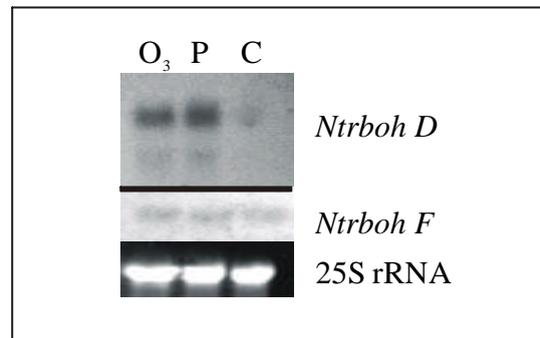
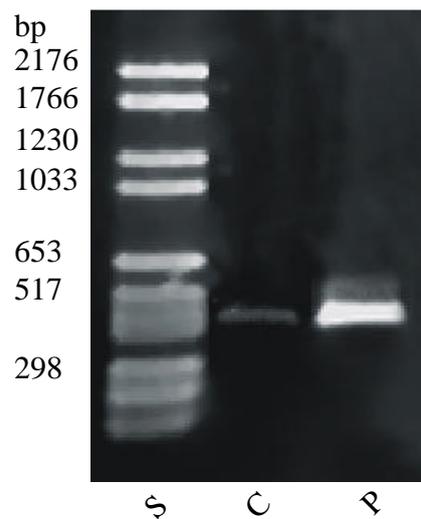


Abb. 76: Vergleichende Northern Analyse der Transkriptgehalte für *Ntrboh D* und *F* bei Ozon-behandeltem und mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* infiltriertem Blattmaterial der Tabaksorte Bel W3. Die Ozon-behandelten Blätter wurden 2 h nach Beginn der Exposition mit 185 nl l^{-1} geerntet, die mit dem Pathogen sowie die als Kontrolle mit MgSO_4 (10 mM) infiltrierten Blätter 8 h nach der Infiltration. O₃ = Ozon-behandeltes Pflanzenmaterial, P = *Pseudomonas*-infiltrierte Blätter, C = Kontrolle

Mit dem gleichen Blattmaterial wurden zusätzlich quantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt. Jeweils 10 ng cDNA wurden in 34 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 69°C spezifisch amplifiziert. Nach der Auftrennung in einem Agarose-Gel konnte in der Kontrollinfiltration nur eine sehr schwache Bande detektiert werden. Deutlich stärker und fiel die Bande in der mit *Pseudomonas*-infiltrierten Probe aus (Abb. 77a). Die Quantifizierung der amplifizierten DNA ergab eine 4fach höhere Expression der D-Isoform in der Pathogen-behandelten Probe (Abb. 77b).

a)



b)

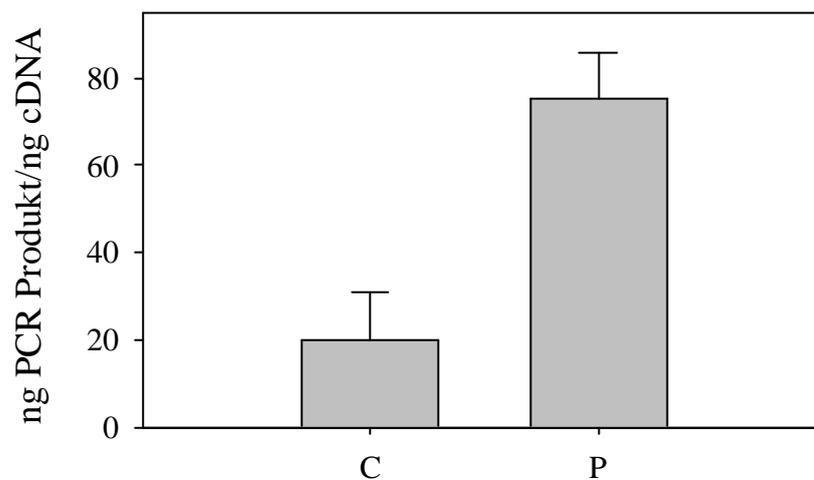


Abb. 77: Quantitative RT-PCR-Analyse der *Ntrboh D* von infiltrierten Blättern. In Kontrollpflanzen wurde MgSO_4 (10 mM) infiltriert, in andere Pflanzen das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in einer Konzentration von 1×10^8 cfu ml^{-1} . Die Ernte beider Behandlungen erfolgte 8 h nach der Infiltration. In a) ist das mit Ethidiumbromid-gefärbte Agarose-Gel zu sehen, in b) die quantitative Auswertung; die Standardfehler stellen die Unterschiede zwischen vier verschiedenen PCR-Experimenten einer cDNA dar. C = Kontrolle, P = *Pseudomonas*-infiltriertes Blattmaterial. Verwendete Primer: 15a + 16b (siehe Anhang).

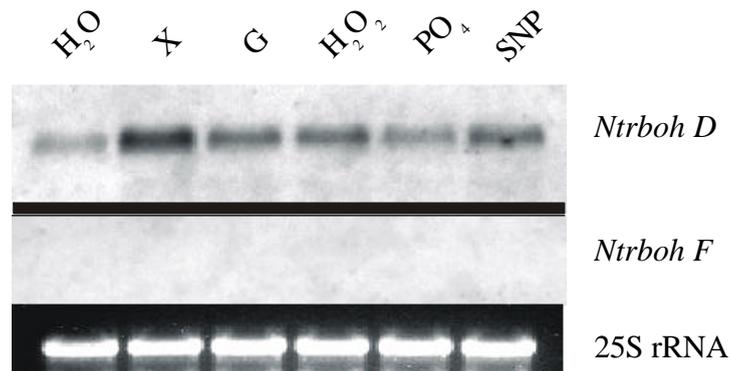
3.2.3.5 Infiltration potentieller Induktoren der *Ntrboh D* und *F*

Durch die Infiltration verschiedener Substanzen in den Apoplasten von Pflanzen der Tabaksorte Bel W3 sollten Hinweise auf potentielle Regulatoren der Genexpression der beiden Isoformen erlangt werden.

Neben einer Wasserinfiltration als Kontrolle wurde ein Superoxid-generierendes System (Xanthin und Xanthin-Oxidase), H_2O_2 , das Wasserstoffperoxid-generierende System Glucose und Glucose-Oxidase und ein Natriumphosphat-Puffer verwendet. Zusätzlich wurde in einem ersten Versuch der NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP) infiltriert. Alle Lösungen besaßen einen pH-Wert von 6,5, die Ernte erfolgte zwei Stunden nach der Infiltration. Deutliche Hybridisierungssignale waren bei der Northern Analyse der D-Isoform zu sehen (Abb. 78). Es zeigte sich, dass hier schon die Infiltration von Wasser (pH 6,5) in den Blatt-Apoplasten zur Induktion der Genexpression genügte und eine gut erkennbare Bande sichtbar war. Gegenüber der Wasserprobe stärkere Induktionen konnten durch das Superoxid- und das Wasserstoffperoxid-generierende System, sowie durch H_2O_2 selbst erzielt werden. Der Induktionsfaktor bei Xanthin/Xanthin-Oxidase war mit etwa 3 der höchste, bei Glucose/Glucose-Oxidase und H_2O_2 gab es eine 2fache Induktion gegenüber der Wasserkontrolle. Infiltration mit Phosphatpuffer resultierte in etwa der gleichen Bandenintensität wie nach Behandlung mit Wasser. Die Induktion durch den NO-Donor SNP lag im gleichen Bereich wie für Glucose/Glucose-Oxidase und H_2O_2 .

Die Expression der F-Isoform zeigte sich durch alle infiltrierten Lösungen unbeeinflusst, es konnte kein positives Hybridisierungssignal erhalten werden.

a)



b)

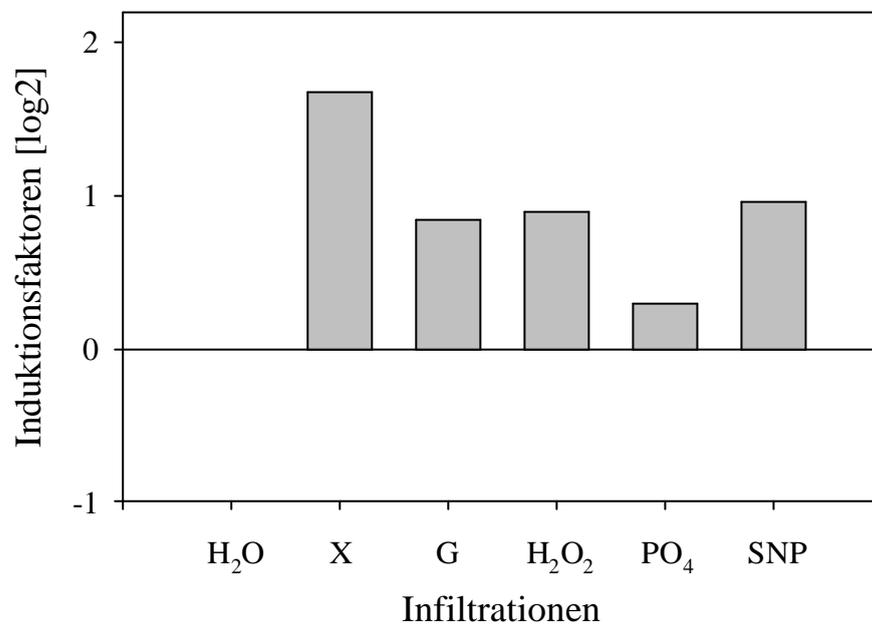


Abb. 78: Northern Analyse der Genexpression von *Ntrboh D* und *F* nach Infiltration verschiedener Substanzen in den Apoplasten mittelalter Blätter der Tabaksorte Bel W3. Die Ernte erfolgte 2h nach der Infiltration. Pro Behandlung wurde das Blattmaterial von 3 Pflanzen gemischt. Alle Lösungen waren auf pH 6,5 eingestellt. a) Northern Analyse, b) berechnete Induktionsfaktoren gegenüber der Wasserinfiltration. X = 1 mM Xanthin + 0,2 U ml⁻¹ Xanthin-Oxidase, G = 10 mM Glucose + 25 U ml⁻¹ Glucose-Oxidase, 50 mM H₂O₂, PO₄ = 10 mM Natriumphosphat-Puffer, SNP = 0,5 mM.

IV. Diskussion

1. Korrelation der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies mit Ozon-induziertem Zelltod

1.1. Auftreten von Symptomen und reaktiven Sauerstoffspezies in Ozon-behandelten Nutz- und Wildpflanzen

Die in dieser Arbeit analysierten Pflanzen umfassten sowohl Kultur- als auch Wildpflanzenarten. Da besonders Vergleiche zwischen unterschiedlich empfindlichen Pflanzen das Verständnis der phytotoxischen Effekte von Ozon verbessern können, wurde z.T. auf schon bezüglich ihrer Ozon-Sensitivität charakterisierte Pflanzen zurückgegriffen. Der Grund für die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Pflanzen gegenüber Ozon ist jedoch bisher unbekannt.

In den Pflanzenarten *Nicotiana tabacum* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Arabidopsis thaliana* L. und *Malva sylvestris* L. zeigten sich infolge einer Ozonexposition weiße, nekrotische Blattschäden in unterschiedlich starker Ausprägung. Solche Symptome sind besonders von Tabakpflanzen seit den 50er Jahren bekannt. 1959 konnte das Auftreten der „Wetterflecken“ mit erhöhten Konzentrationen von Ozon korreliert werden (Heggestad & Middleton, 1959). Seit 1962 findet die in dieser Arbeit als Hauptversuchspflanze eingesetzte Tabaksorte Bel W3 aufgrund ihrer Empfindlichkeit als Indikator für phytotoxische Ozonkonzentrationen Verwendung (Heggestad, 1991). Untersuchungen dieser Sorte in der vorliegenden Arbeit zeigen den Einsatz als Bioindikator gegenüber Ozon gerechtfertigt. So entwickelte sie auch nach einer Kurzzeitexposition mit 185 nl l^{-1} deutliche nekrotische Schäden. Demgegenüber erwies sich die Tabaksorte Bel B sowohl in dieser Arbeit als auch in früheren Arbeiten als Ozon-tolerant in dem Sinn, dass signifikant weniger oder keine Schäden sichtbar wurden (Heggestad, 1991; Langebartels et al., 1991; Langebartels & Sandermann, 1999).

Die zur gleichen Familie wie Tabak gehörenden Tomatenpflanzen wurden nach einer Langzeitstudie mit chronischen Konzentrationen im Rahmen des EU-Projektes TOMSTRESS ausgewählt. Auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Kurzzeitversuchen zeigten die

verschiedenen Sorten eine unterschiedlich starke Ausbildung an Blattschäden und damit eine unterschiedliche Ozon-Sensitivität.

Bei *A. thaliana* kamen vor allem die in der molekularbiologischen Forschung häufig verwendete Ökotypen Columbia, Wassilewskija, Landsberg erecta und Cape Verde Island in die Auswahl (Jabs et al., 1996; Overmyer et al., 2000; Rao & Davis, 1999; Torres et al., 2002). Zusätzlich wurde darauf geachtet, Vertreter verschiedener Kontinente zu analysieren.

Die Wildpflanzen *M. sylvestris* und *M. moschata* L., sowie *Rumex obtusifolius* L. und *R. crispus* L. wurden nach Ergebnissen von Langzeitexpositionen mit chronischen Ozonkonzentrationen ausgewählt (Bergmann et al., 1999). Bei *M. moschata* traten bei den applizierten Ozonkonzentrationen keine Symptome auf. Diese Pflanzenart zeigte sich in Langzeitversuchen gegenüber *M. sylvestris* schon relativ tolerant (Bergmann et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Korrelation der Ozon-Sensitivität mit der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies in den ausgewählten Pflanzen demonstriert werden.

Je sensitiver eine Pflanze war, desto stärker erwies sich die ROS-Akkumulation. Dabei korrelierte nicht nur die Quantität der nekrotischen Schäden mit der für H_2O_2 oder O_2^- gefärbten Blattfläche sondern auch das Muster.

Während allen sensitiven Pflanzen das Ozon-induzierte Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies gemein ist, scheint es Unterschiede in der Art der akkumulierten Sauerstoffspezies zu geben. Einen Überblick über die untersuchten Pflanzenarten bezüglich des Auftretens von Zelltod und der Akkumulation von ROS bietet Tab. 2. Die Anordnung der Pflanzen erfolgte innerhalb einer Art oder Gattung in Reihenfolge zunehmender Ozon-Toleranz.

Tab. 2: Zusammenfassende Darstellung der Ozon-Behandlungen, nekrotischen Blattschäden, Ethylenemission sowie H₂O₂- und O₂⁻-Akkumulation in Nutz- und Wildpflanzen. Die Anordnung der Pflanzen innerhalb einer Art oder Gattung erfolgte nach der relativen Ozon-Sensitivität. * Rotfärbung der Blätter, keine Blattschäden; ** Blattrosetten sehr stark geschädigt; # nicht Ethylen, sondern die Gehalte des Vorläufers 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) wurde gemessen; n.d. = nicht bestimmt.

Pflanzenart	Kultivar/ Ökotyp	Ozonbehand- lung [nl l ⁻¹]	Läsionen	Ethylen	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cvi-0	400 (2x5h)	+++++	+++	(-)**	(+++)**
	Sha	400 (2x5h)	+++++	+	++++	+++
	Sap-0	400 (2x5h)	++++	+++	+	++++
	Np-0	400 (2x5h)	+++	+++	++++	++
	Jl-1	400 (2x5h)	++	++	+++	-
	LC-0	400 (2x5h)	++	++	+	++
	Lan-0	400 (2x5h)	++	+	+	-
	Ws-2	400 (2x5h)	+	+	-	+
	Col-0	400 (2x5h)	+	-	+	+++
	Ler	400 (2x5h)	+	++	+	++
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Roma	200 (1x5h)	++++	+++	++++	-
	Nikita	200 (1x5h)	+++	++++	++++	+
	Solairo	200 (1x5h)	+++	++++	++++	+
	Thomas	200 (1x5h)	+++	+	++	++++
	Money Maker	200 (1x5h)	++	+++	-	+
	Piedmont	200 (1x5h)	++	+++	-	+
	Trust	200 (1x5h)	++	+	++	+
	DRK 2003	200 (1x5h)	+	++++	-	+
	Ailsa Craig	200 (1x5h)	+	+	++	+
<i>Malva sylvestris</i>		150 (2x5h)	++	+++	-	+++
		1,7x ambient	+++	n.d.	-	+++
<i>M. moschata</i>		150 (2x5h)	-	-	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	Bel W3	180 (1x5h)	+++	++ [#]	+++	+
	Bel B	180 (1x5h)	-	+ [#]	-	+
<i>Rumex obtusifolius</i>		1,7x ambient	(++)*	n.d.	-	+++
<i>Rumex crispus</i>		1,7x ambient	(+)*	n.d.	-	++

Besonders deutlich wurde die Korrelation von reaktiven Sauerstoffspezies und Zelltod in der Tabaksorte Bel W3. Seit längerem ist bekannt, dass die typischen Läsionen hauptsächlich an mittelalten Blättern zu finden sind (Guderian, 1985; Heggestad, 1991). An diesen Blättern konnte in dieser Arbeit die maximale ROS-Akkumulation detektiert werden (Abb. 19; Abb. 20). Die jüngsten Blätter zeigten keine Schäden, hier konnte mit dem Farbstoff Diaminobenzidin (DAB; Thordal-Christensen et al., 1997) auch keine H₂O₂-Akkumulation

sichtbar gemacht werden. Alte Blätter wiesen eine relativ große Varianz in der Größe der geschädigten Fläche auf: Einzelne Blätter besaßen großflächige Schäden, bei anderen konnten nur wenige Läsionen bemerkt werden. Die physiologische Ursache dafür ist unbekannt und könnte mit auftretender Seneszenz zusammenhängen. Gleichzeitig ergaben sich bei Tabak auch Unterschiede in der Lokalisation der Blattschäden auf der Blattspreite. Jüngere Blätter bekamen die Läsionen hauptsächlich an der Blattspitze, bei den mittelalten Blättern war die gesamte Blattspreite mit punktförmigen Läsionen überzogen, bei den älteren Blättern eher die Blattbasis. Dieses Schadmuster wurde von Guderian (1985) für einen Großteil der dikotylen Pflanzen beschrieben und auf den physiologischen Zustand der Blätter zurückgeführt. So korreliert die Zone der maximalen Sensitivität mit der Bildung der interzellulären Räume und der Funktionstüchtigkeit der Stomata, also mit dem Übergang von *sink* nach *source*. H_2O_2 konnte jeweils nur in den Blattbereichen einer Pflanze detektiert werden, wo auch Zelltod auftrat (Abb. 20).

Außerdem stieg mit den Blattschäden gleichzeitig die mit DAB gefärbte Blattfläche in Abhängigkeit der applizierten Ozonkonzentration. Im Vergleich zu Bel W3 ließen sich erste Blattschäden und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies bei der toleranteren Sorte Bel B erst bei dreimal so hohen Konzentrationen erkennen. Anscheinend besitzt diese Sorte einen höheren Schwellenwert, ab dem die toxischen Effekte von Ozon auftreten. Die Korrelation der Blattschäden mit der DAB-Färbung (in % der Blattfläche) ist für diesen Versuch graphisch in Abb. 79 dargestellt.

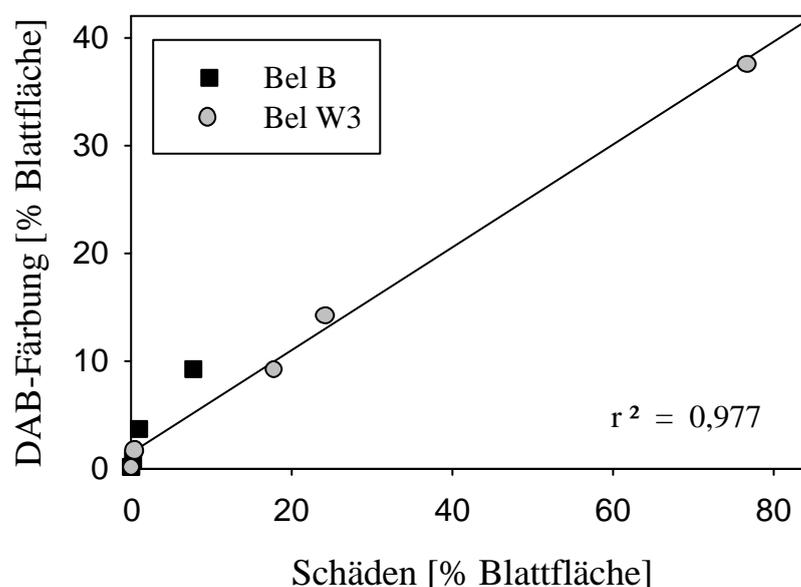


Abb. 79: Korrelation der Blattschäden mit der DAB-Färbung bei Ozon-behandelten Pflanzen der Tabaksorten Bel B und Bel W3 unter steigenden Ozonkonzentrationen.

Die NBT-Färbung, die spezifisch $O_2^{\cdot-}$ nachweist (Jabs et al., 1996), zeigte sich bei Tabak sehr schwach und eher flächig über das ganze Blatt verteilt. Diese war oft auch in Kontrollpflanzen zu finden, so dass nicht von einer Ozon-induzierten $O_2^{\cdot-}$ -Akkumulation gesprochen werden kann. Auch Rossetti & Bonatti (2001) kamen zu dem Schluss, dass nur die DAB-Färbung mit den Ozon-induzierten Schäden in Tabak korreliert werden kann. Sie konnten ebenfalls sowohl in der Sorte Bel B als auch Bel W3 $O_2^{\cdot-}$ detektieren, aber nur in der sensitiven Sorte Bel W3 trat eine Ozon-induzierte H_2O_2 -Akkumulation auf.

Bei den Tomatensorten korrelierte ebenfalls eindeutig die DAB-Färbung mit dem Zelltod. So ließ sich bei den empfindlichsten Sorten Roma, Nikita und Solairo die höchste H_2O_2 -Akkumulation detektieren (Tab. 2). Auch in dieser Pflanzenart war die NBT-Färbung nur sehr schwach und im Gegensatz zu den Schäden flächig über die Blattspreite verteilt. Die einzige Ausnahme machte die Sorte Thomas. Hier trat signifikante $O_2^{\cdot-}$ -Akkumulation auf.

Bei den *Arabidopsis*-Ökotypen korrelierte meist die $O_2^{\cdot-}$ -Akkumulation besser mit dem Auftreten und der Lokalisation des Zelltodes, so z.B. bei dem Ozon-empfindlichsten Ökotyp Cvi-0, aber auch bei Sap-0, LC-0, Ws-2 und Col-0. Bei dem ebenfalls sehr sensitiven Ökotyp Sha konnten beide Sauerstoffspezies verstärkt nachgewiesen werden (Tab. 2). Kein $O_2^{\cdot-}$ konnte in den Ökotypen Il-1 und Lan-0 detektiert werden, obwohl beide Läsionen zeigten. Hier passte die Akkumulation von H_2O_2 mit dem Zelltod zusammen. Das gleichzeitige, Ozon-induzierte Vorkommen von H_2O_2 und $O_2^{\cdot-}$ in Col-0 stimmt mit Ergebnissen von Rao & Davis (1999) überein. Allerdings konnten diese Autoren in Cvi-0 neben $O_2^{\cdot-}$ auch H_2O_2 nachweisen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Blätter in der vorliegenden Arbeit auch nach einer eintägigen Behandlung mit verringerter Ozonkonzentration zu stark geschädigt waren. Zusätzlich wurden andere Systeme zum Nachweis von H_2O_2 verwendet. Zusammenfassend kann aber gesagt werden, dass die empfindlichsten Pflanzen wieder durch starke Akkumulation an reaktiven Sauerstoffspezies gekennzeichnet waren. Die am stärksten geschädigten Ökotypen Cvi-0 und Sha zeigten entweder die stärkste NBT-Färbung oder aber eine sehr starke NBT- und die stärkste DAB-Färbung.

Auch bei dem oxidativen Burst während der Pathogenabwehr stellt sich die Frage, welche der Sauerstoffspezies die Hauptkomponente darstellt (Wojtaszek, 1997). Die meisten Daten geben H_2O_2 als Hauptkomponente an, da es deutlich stabiler ist als $O_2^{\cdot-}$ (Allan & Fluhr, 1997). Keine Detektion von $O_2^{\cdot-}$ kann entweder auf Abwesenheit oder aber auf einer extrem schnellen Dismutation zu H_2O_2 beruhen (Wojtaszek, 1997). Für Tabak konnte in dieser Arbeit eine verstärkte Aktivität von Superoxiddismutase im Apoplasten festgestellt werden (Abb.

65). In diesem Zusammenhang wären vergleichende Messungen der Superoxiddismutase-Aktivität zwischen den O_2^- akkumulierenden Pflanzen *M. sylvestris* und den beiden *Rumex*-Arten gegenüber Tabak oder Tomate interessant.

Wojtaszek (1997) gibt einen Überblick über die Akkumulation der reaktiven Sauerstoffspezies bei Pathogen/Elicitor-Behandlung oder mechanischem Stress. Ein Großteil der Daten basiert jedoch auf Ergebnissen mit Zellkulturen. Hier tauchen ebenfalls H_2O_2 und O_2^- gemeinsam, aber auch getrennt voneinander auf. Dies könnte zunächst ganz einfach darauf zurückgeführt werden, dass nicht beide Sauerstoffspezies gemessen wurden, aber gleichzeitig ein Hinweis auf verschiedene „Akkumulierer“ (H_2O_2 oder O_2^-) im Pflanzenreich sein.

Nach den Erkenntnissen in der vorliegenden Arbeit muss jedoch gefragt werden, welche reaktiven Sauerstoffspezies tatsächlich mit dem Auftreten von Zelltod korrelieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es innerhalb einer Pflanzenart deutliche Unterschiede zwischen den Sorten oder Ökotypen geben kann. In der vorliegenden Arbeit korrelierte in den Tabaksorten Bel B und Bel W3 sowie in den Tomatensorten H_2O_2 mit den Ozon-induzierten Blattschäden. Die Akkumulation von O_2^- entsprach dem Muster der Läsionen in *M. sylvestris* und den beiden Ampferarten *R. crispus* und *R. obtusifolius*. Die meisten *Arabidopsis*-Ökotypen zeigten eine Übereinstimmung von O_2^- -Akkumulation mit Zelltod, als Ausnahmen erwiesen sich die Ökotypen Il-1 und Lan-0. Hier korrelierte die DAB-Färbung mit den Ozon-induzierten Läsionen.

1.2. Zelluläre Lokalisation und Verlauf der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies

Die mikroskopischen Untersuchungen machten nicht nur einen Unterschied zwischen dem Typ der akkumulierten Sauerstoffspezies, sondern auch in der Lokalisation deutlich. Bei Tabak zeigten DAB und der an BSA gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff OxyBurst Green H_2HFF Zellen des Palisadenparenchyms als erste Orte der H_2O_2 -Akkumulation, bei *M. sylvestris* konnte mit Hilfe von NBT die O_2^- -Akkumulation zunächst in Zellen des Schwammparenchyms in der Nähe von Blattadern sichtbar gemacht werden (Abb. 47; Abb. 48). In beiden Fällen sind die Blätter amphistomatär und besitzen pro Fläche etwa doppelt so viele Spaltöffnungen auf der Blattunterseite, wie auf der Oberseite. Auszählungen der Stomata der Blattober- und -unterseite ergaben für beide Pflanzen ein ähnliches Verhältnis:

Für Malve 0,47, für Tabak 0,57. Guderian (1985) sieht den Ausgangspunkt des Ozon-induzierten Zelltodes im Palisadenparenchym, kann aber keine Aussagen zur Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies machen. Tuomainen et al. (1996) zeigten, dass die Ozonschäden bei Birke verstärkt in Zellen des Palisadenparenchyms auftreten, machten aber ebenfalls keine Angaben über den zeitlichen Verlauf der Akkumulation der reaktiven Sauerstoffspezies. Im Gegensatz dazu beobachteten Günthardt-Goerg et al. (1997) die ersten Reaktionen auf chronische Ozonkonzentrationen in den Zellen des Schwammparenchyms von Birke und Pappeln in Form der Bildung von Zellwand-Exudaten gleichzeitig mit dem Auftreten von Schäden. Allen Untersuchungen ist gemein, dass die entsprechenden Symptome asymmetrisch über den Blattquerschnitt verteilt im Mesophyll der Blätter beginnen. Ob der Ausgangspunkt eher das Palisaden- oder das Schwammparenchym darstellt, könnte nach diesen Befunden von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich sein.

Was den Verlauf der H_2O_2 -Akkumulation betrifft, so konnte diese Sauerstoffspezies in Tabakpflanzen der vorliegenden Arbeit zunächst im extrazellulären Raum gezeigt werden. Kurze Zeit später wurde die Akkumulation im Cytoplasma der Zellen induziert, bevor schließlich auch in den Chloroplasten H_2O_2 nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu ließ sich trotz eines längeren Untersuchungszeitraumes keine H_2O_2 -Akkumulation in Chloroplasten von Birkenblättern nachweisen (Pellinen et al., 1999). Dafür war es diesen Autoren aufgrund der Verwendung eines Elektronenmikroskops möglich, H_2O_2 in Mitochondrien und Peroxisomen zu detektieren und den Zelltod mit dem intrazellulären Auftreten von H_2O_2 zu korrelieren.

In der Tabaksorte Bel W3 zeigten serielle Laser Scanning Mikroskopie-Aufnahmen, dass nicht nur verschiedene Phasen der H_2O_2 -Akkumulation innerhalb einer Zelle unterschieden werden können, sondern auch eine Dynamik den Zellverband betreffend auftritt. Kurz nach Beendigung der Exposition reagierten nur einzelne Zellen entlang von Blattadern positiv auf einen H_2O_2 Nachweis. Diese befanden sich häufig auch an substomatären Höhlen. Allerdings reagierten meistens nicht alle Zellen um eine Atemhöhle herum auf Ozon sondern nur einzelne. Mit zunehmender Zeit breitete sich die Akkumulation der Sauerstoffspezies auch auf Nachbarzellen aus, bis im Durchschnitt Cluster von etwa 50-100 Zellen davon betroffen waren. Hiermit stellt sich die Frage, ob es prädisponierte Zellen in der Nähe von Blattadern gibt, die zuerst auf Ozon reagieren und ihre Nachbarzellen, z.B. durch die reaktiven Sauerstoffspezies selbst beeinflussen. So schlugen z.B. schon Levine et al. (1994) während des oxidativen Bursts bei Pathogenabwehr für H_2O_2 eine Rolle als Signalmolekül zu Nachbarzellen vor. Darüber hinaus gilt zu klären, was eine weitere Ausdehnung und damit

Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und Zelltod über die gesamte Blattfläche hinweg verhindert.

1.3. Auftreten von Ozon-induzierten reaktiven Sauerstoffspezies und Zelltod im Freiland

Neben Kammerversuchen mit akuten Ozonkonzentrationen wurden auch Expositionen verschiedener Pflanzen im Freiland unter ambienten oder 1,7x ambienten Bedingungen durchgeführt. Dabei konnte in dieser Arbeit in verschiedenen Pflanzen erstmalig die Ozon-induzierte Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies im Freiland gezeigt werden.

Der Tabaksorte Bel W3 genügten schon wenige Expositionstage unter ambienten Bedingungen, um das aus den Kammern bekannte typische Schadbild zu entwickeln. In den folgenden Expositionstagen weiteten sich die punktförmigen, von Zelltod betroffenen Stellen deutlich aus und wurden flächig (Abb. 24). Eine Berechnung des AOT40-Wertes dieses Freilandversuchs ergab $600 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$. Damit liegt die Ozon-Sensitivität von Bel W3 deutlich unterhalb dem festgelegten AOT40-Wert von $3000 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$, der basierend auf Studien bezüglich Ertragsverlusten bei Weizen für den Schutz sämtlicher krautiger Pflanzen übernommen wurde.

Der Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies ergab, dass wie in den Klimakammern, die Akkumulation von H_2O_2 detektiert werden konnte. Hier trat neben punktförmiger DAB-Färbung die Akkumulation von H_2O_2 besonders ringförmig um schon bestehende Läsionen herum auf (Abb. 24c). Sowohl die Ausweitung bestehender nekrotischer Schäden als auch die Akkumulation von H_2O_2 konnte in Kammerversuchen unter kontrollierten Bedingungen bei wiederkehrenden, chronischen Ozonkonzentrationen (100 nl l^{-1} für 5h pro Tag) nachgestellt werden. Hier betragen die AOT40-Werte 500 bis $2000 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$ und blieben damit ebenfalls deutlich unterhalb von $3000 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$, zumal die ersten Schäden schon nach dem ersten Behandlungstag mit einem AOT-Wert von $500 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$ sichtbar wurden.

Auch in den Wildpflanzen *M. sylvestris* sowie *R. crispus* und *R. obtusifolius* konnte das Ozon-induzierte Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies im Freiland nachgewiesen werden (Abb. 45; Tab. 2). Alle drei Pflanzenarten akkumulierten O_2^- und zwar verstärkt entlang der Blattadern. Damit stimmte auch für die Malve nicht nur der Typ der reaktiven Sauerstoffspezies sondern auch das Muster perfekt mit den Kammerexperimenten überein. In diesem Open-top Kammer-Versuch führten ambiente Ozonkonzentrationen mit einem

AOT40-Wert von $3820 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$ nicht zu einer signifikanten Ausprägung von Blattsymptomen. Erst erhöhte Ozon-Konzentrationen ($1,7x$ ambient) und ein AOT40-Wert von $11480 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$ resultierten hier in Schäden. Der bestehende kritische AOT40-Wert für Ozon reicht damit zum Schutz dieser Pflanzen aus.

Neben den beschriebenen, nekrotischen Schäden, die als spezifische Symptome betrachtet werden (Davison & Barnes, 1998), können unspezifische Ozon-induzierte Schäden wie Chlorosen, Bronzing, Pigmentierung und verfrühte Seneszenz auftreten. Während die unspezifischen Symptome eher bei chronischen Expositionen, d.h. längeren Expositionen mit geringeren Ozonkonzentrationen auftreten, führen akute Expositionen mit kurzzeitig höheren Konzentrationen vermehrt zu der Ausbildung von Nekrosen und damit zu Zelltod (Rao et al., 2000). Die in dieser Arbeit durch $1,7x$ ambienten Konzentrationen über vier Wochen hinweg hervorgerufen Rotfärbung der Ampfer-Blätter, die schon von Bergmann et al. (1999) beschrieben wurde, zählt zu den unspezifischen Symptomen. Die Rotfärbung könnte auf einer verstärkten Synthese von Anthocyanen beruhen (Koukol & Dugger, 1967). Eine Kurzzeitbehandlung mit 150 nl l^{-1} in Klimakammern resultierte hier in Zelltod in Form von weißen Läsionen entlang der Blattadern (Mittelstrass, 2000).

1.4. Zusammenhang von reaktiven Sauerstoffspezies und Zelltod

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von Zelltod sehr gut mit der Quantität und dem Muster der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies korreliert. Darüber hinaus geht die Akkumulation der Sauerstoffspezies dem Zelltod voran. So werden H_2O_2 und O_2^- relativ kurz nach Ende einer Ozonexposition nachgewiesen, zu einem Zeitpunkt, wo noch keine nekrotischen Schäden, dafür aber die sogenannten „water-soaked areas“ an genau den Stellen der positiven Detektion der Sauerstoffspezies sichtbar sind. Bei der Tabaksorte Bel W3 fand während mehrtägiger Ozonbehandlung eine Ausweitung bestehender Läsionen statt. H_2O_2 akkumulierte hier in Ringen um die nekrotischen Schäden und entsprach in etwa der neu absterbenden Fläche. In Blattquerschnitten konnte deutlich beobachtet werden, dass genau an den Stellen des verstärkten Auftretens von reaktiven Sauerstoffspezies die Zellen kollabierten, und zwar sowohl bei Bel W3 als auch bei *M. sylvestris*.

Der Einsatz der Inhibitoren Diphenyliodonium (DPI), ein Hemmstoff für flavin-haltige Oxidasen wie NADPH-Oxidase (Jabs et al., 1997; Rao & Davis, 1999) und K252a, ein Alkaloid und Hemmstoff für Protein-Kinasen (Desikan et al., 1996; Levine et al., 1994) legte

darüber hinaus den Schluss nahe, dass ohne verstärkte Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies kein Zelltod auftritt. So resultierte die Verwendung der beiden Substanzen bei der Tomatensorte Roma und dem *Arabidopsis*-Ökotyp Sha nicht nur in einer signifikanten Reduktion der ROS-akkumulierenden Blattfläche, sondern auch in gleichem Maße im verringerten Auftreten von Zelltod (Abb. 52; Abb. 53). Zu diesem Ergebnis gelangten z.B. auch Overmyer et al. (2000): In der Ozon-sensitiven *Arabidopsis*-Mutante *rcd1* führte die Behandlung mit DPI zu einem Rückgang des Zelltodes und der NBT-gefärbten Fläche um ca. 45 %.

In der Wildpflanze *M. sylvestris* konnte mit Hilfe von Blattquerschnitten folgender Ablauf ermittelt werden: Zunächst zeigen einzelne Schwammparenchym-Zellen $O_2^{\cdot-}$ -Akkumulation, dann ein Zellcluster, darauf hin weitet sich die Akkumulation auf das Palisadenparenchym aus, während die ersten Zellen vom Schwammparenchym und schließlich der ganze Blattquerschnitt in diesem Bereich kollabieren.

Die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei Zelltod wird zur Zeit kontrovers diskutiert. In manchen Fälle scheinen reaktive Sauerstoffspezies sowohl nötig als auch ausreichend zur Induktion von Zelltod. So reichte bei Houot et al. (2001) die Zugabe von H_2O_2 in Tabakzellkulturen aus, um in bestimmten Phasen des Zellzyklus programmierten Zelltod auszulösen. Ebenso berichten Jabs et al. (1996) davon, dass $O_2^{\cdot-}$ nötig und hinreichend ist, in der *Arabidopsis*-Mutante *lsd1* Zelltod zu initiieren. Dies war nicht möglich mit H_2O_2 . Sehr ähnliche Ergebnisse erhielten Overmyer et al. (2000). Hier zeigte sich auch die Infiltration von $O_2^{\cdot-}$ in Blätter der *Arabidopsis*-Mutante *rcd1* ausreichend, um Zelltod zu induzieren, während H_2O_2 keine Reaktionen auslöste. Bringt man sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Erinnerung, so korreliert bei *Arabidopsis*-Pflanzen eher die $O_2^{\cdot-}$ -Akkumulation mit dem Auftreten von Zelltod, besonders in den beiden hier verwendeten Ökotypen Ws-2 und Col-0. Bei beiden Mutanten dieser Ökotypen lief die $O_2^{\cdot-}$ -Akkumulation wie eine Lauffront vor dem Zelltod voraus. Jabs et al. (1996) erwähnen aber auch, dass die Infiltration des $O_2^{\cdot-}$ -generierenden Systems Xanthin/Xanthin-Oxidase keinen Zelltod in dem parentalen Ökotyp Ws selbst induzierte. Dagegen konnten Dorey et al. (1999) und Ichinose et al. (2001) an Elicitor-behandelten Tabak-Zellkulturen zeigen, dass der oxidative Burst den Zelltod nicht beeinflusst. So hemmte die Zugabe von DPI und Catalase zwar die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, aber nicht das Auftreten von Zelltod.

Insgesamt bringen jedoch viele Veröffentlichungen das Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies mit Zelltod bei Stress in Verbindung (Beers & McDowell, 2001; Jabs, 1999; Rao & Davis, 2001; Rao et al., 2000; Shirasu & Schulze-Lefert, 2000). Darüber hinaus

scheinen reaktive Sauerstoffspezies auch bei entwicklungsbedingtem Zelltod, wie dem Hormon-regulierten Absterben der Aleuron-Zellen in Gerste, eine wichtige Komponente zu sein (Bethke & Jones, 2001; Fath et al., 2001). Rao & Davis (2001) sehen die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Regulation von Ozon-induziertem Zelltod Konzentrations-abhängig: In geringen Konzentrationen fungieren ROS als Signal und aktivieren verschiedene Abwehrgene, in hohen Konzentrationen führen sie aufgrund ihrer Toxizität zum Zelltod. Wahrscheinlich reichen H_2O_2 und/oder O_2^- jedoch in den meisten Fällen nicht aus, um die Gesamtheit der Abwehrwege zu aktivieren und Zelltod zu induzieren (Rao et al., 2000). Für den letzten Punkt würden auch die Ergebnisse der Infiltrationen von Xanthin/Xanthin-Oxidase und Glucose/Glucose-Oxidase bzw. H_2O_2 in Blätter der Tabaksorte Bel W3 in dieser Arbeit sprechen. So war keines der Systeme in der Lage, alleine größere nekrotische Schäden zu induzieren, die Schäden lagen im Bereich von 1 %.

Zusammenfassend besteht eine enge Verbindung von reaktiven Sauerstoffspezies und Zelltod. Allerdings scheinen reaktive Sauerstoffspezies allein nur in seltenen Fällen Zelltod auszulösen, es werden darüber hinaus weitere, verstärkende Signalmoleküle benötigt.

2. Weitere Ozon-induzierte Signalmoleküle sowie Lokalisation verschiedener Stress-Antworten

Neben reaktiven Sauerstoffspezies werden häufig die Moleküle Ethylen, Salicylsäure, NO und Jasmonsäure als Mitspieler bei dem Auftreten von Zelltod und bei der Abwehr gegen biotischen und abiotischen Stress vermutet (Rao & Davis, 2001; Sandermann et al., 1998; Shirasu & Schulze-Lefert, 2000; Van Breusegem et al., 2001).

2.1. Ethylen

Eine Verbindung zwischen der Emission des gasförmigen Hormons Ethylen und Ozon-Empfindlichkeit wurde schon 1976 von Tingey et al. (1976) gezogen. In einer vergleichenden Untersuchung von 29 Pflanzenarten erwies sich die Produktion von Ethylen als zuverlässiger Indikator, um Ozonstress in Pflanzen zu messen. Ethylen bzw. die Vorläuferverbindung ACC wurde in dieser Arbeit als frühestes Signalmolekül zwei Stunden nach Beginn der Ozon-Exposition detektiert. Verschiedene Autoren berichten von Ethylen als eine auf Ozon schnell-reagierende Verbindung (Bae et al., 1996; Langebartels et al., 1991; Nakajima et al., 2001;

Tuomainen et al., 1997). So werden die Maxima der Emissionen bei Tabak und Tomate häufig schon ein bis zwei Stunden nach Beginn der Behandlung gemessen. Eine enge Korrelation der Akkumulation von ACC mit der Freisetzung des gasförmigen Pflanzenhormons wurde u.a. von Langebartels et al. (1991) und Tuomainen et al. (1997) nachgewiesen.

ACC wurde in der vorliegenden Arbeit vergleichend in den beiden Tabaksorten Bel B und Bel W3 bestimmt. In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Langebartels et al. (1991) konnten bei beiden Tabaksorten in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration erhöhte ACC-Werte gemessen werden. Diese zeigten sich in der Ozon-empfindlichen Tabaksorte Bel W3 höher als in Bel B, wenn auch signifikante Unterschiede erst bei einer Ozonkonzentration von 400 nl l^{-1} auftraten.

In fast allen Tomatensorten und Ökotypen von *Arabidopsis* mit Ausnahme von Col-0 führte eine Ozon-Behandlung zwei Stunden nach Expositionsbeginn ebenfalls zu erhöhter Ethylenemission gegenüber Kontrollpflanzen. Darüber hinaus traten die höchsten Ethylenemissionen im Vergleich verschiedener Ökotypen oder Sorten häufig bei relativ empfindlichen Pflanzen auf (Tab. 2): Bei *Arabidopsis* z.B. bei den Ökotypen Sap-0, Np-0 und Cvi-0, bei Tomate bei den Sorten Solairo und Nikita. Auch Wellburn & Wellburn (1996) berichten von Ethylen als einem Marker für die Ozon-Empfindlichkeit beim Vergleich von sechs Pflanzenpaaren mit unterschiedlicher Ozon-Sensitivität.

Dies konnte in der vorliegenden Arbeit auch in Abhängigkeit des Blattalters am Beispiel von *M. sylvestris* gezeigt werden: Während die jüngsten Blätter ohne Blattschäden nur wenig Ethylen freisetzen, lag die Emission bei mittelalten und alten Blättern etwa sechs- bis achtmal so hoch. Diese Beobachtung stimmt überein mit Messungen von Ethylen und Blattschäden in Abhängigkeit des Blattalters bei Tomate (Tuomainen et al., 1997). Allerdings weist z.B. die relativ unempfindliche Tomatensorte DRK 2003 im Vergleich mit den anderen Sorten die höchste Ethylenabgabe auf, und die sensitive Sorte Roma, sowie der zweitempfindlichste Ökotyp Sha der *Arabidopsis*-Pflanzen kommen nur auf mittlere Werte. Die im Verhältnis niedrigeren Emissionen bei Roma und Sha könnten eventuell darauf zurückgeführt werden, dass die Biosynthese des gasförmigen Hormones schon durch die toxische Wirkung von Ozon gestört war. Auf der anderen Seite könnte es aber zusammen mit der starken Ethylenbildung bei DRK 2003 dafür sprechen, dass zusätzlich noch andere Faktoren wie eben die Akkumulation von ROS wichtig für die Ozon-Empfindlichkeit und das Auftreten von Zelltod sind. Eine Behandlung mit Ethylen war bei Tomate nicht in der Lage, Zelltod zu induzieren (Bae et al., 1996). Auf der anderen Seite weisen viele Studien darauf

hin, dass Ethylen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Blattschäden spielt. So konnte der Ozon-induzierte Zelltod durch verschiedene Inhibitoren der Ethylenbiosynthese und Perzeption signifikant verringert werden (Bae et al., 1996; Tuomainen et al., 1997). In der *Arabidopsis*-Mutante *rcd1* konnte nachgewiesen werden, dass das Pflanzenhormon als „promoting factor“ während der Ausbreitungsphase der sich entwickelnden, Sauerstoffradikal-abhängigen Läsionen wichtig zu sein scheint (Overmyer et al., 2000). Die Hemmung der Ethylenperzeption mit Norbornadien nach einer Ozonbehandlung führte zu einem verringerten Auftreten von Zelltod, aber auch zur Verminderung der ROS-Akkumulation. Im Gegensatz dazu bewirkte eine Ethylenbehandlung in Anschluss an die Ozon-Exposition eine signifikante Ausweitung der Läsionen (Overmyer et al., 2000).

Zusammengefasst zeigen sich Ozon-sensitive gegenüber Ozon-toleranten Pflanzen charakterisiert durch erhöhte Ethylenemissionen, dabei korreliert die Empfindlichkeit jedoch nicht linear mit der Abgabe des gasförmigen Hormons, sondern zusätzliche Faktoren dürften neben Ethylen die Ausprägung der Blattschäden bestimmen.

2.2. Salicylsäure

Salicylsäure ist als wesentlicher Auslöser von Krankheitsresistenz in verschiedenen Pflanzenarten bekannt und induziert PR-Gene sowie systemisch-erworbene Resistenz (SAR; Alvarez, 2000; Shirasu & Schulze-Lefert, 2000). Weniger intensiv untersucht ist die Rolle von Salicylsäure bei abiotischem Stress (Rao et al., 2000). Yalpani et al. (1994) gaben erste Hinweise darauf, dass Salicylsäure und ihre Konjugate durch Ozon und UV-C Strahlung beeinflusst werden.

Konzentrationen von freier und konjugierter Salicylsäure wurden in dieser Arbeit in Tabak bestimmt. Dies erfolgte einmal sechs und einmal acht Stunden nach Beginn der Ozonexposition. Für die Messungen 6 h nach Expositionsbeginn konnten deutliche Korrelationen zu dem Auftreten von Zelltod nachgewiesen werden. Sie sind in Abb. 80a dargestellt. Mit steigenden Ozon-Konzentrationen konnten höhere Gehalte an freier und konjugierter Salicylsäure gegenüber Kontrollpflanzen gemessen werden (Abb. 30).

Die Induktionen fielen bei Bel W3 jeweils deutlicher aus als bei der Ozon-toleranten Sorte Bel B. Bei der höchsten eingesetzten Ozon-Konzentration von 400 nl l^{-1} ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Sorten Bel B und Bel W3 messen. Nachdem auch die DAB-gefärbte Blattfläche mit zunehmender Ozonkonzentration anstieg, zeigte sich nicht nur

eine sehr gute Korrelation zwischen freier Salicylsäure und der geschädigten Blattfläche, sondern auch zwischen Salicylsäure und H_2O_2 -Akkumulation (Abb. 80b).

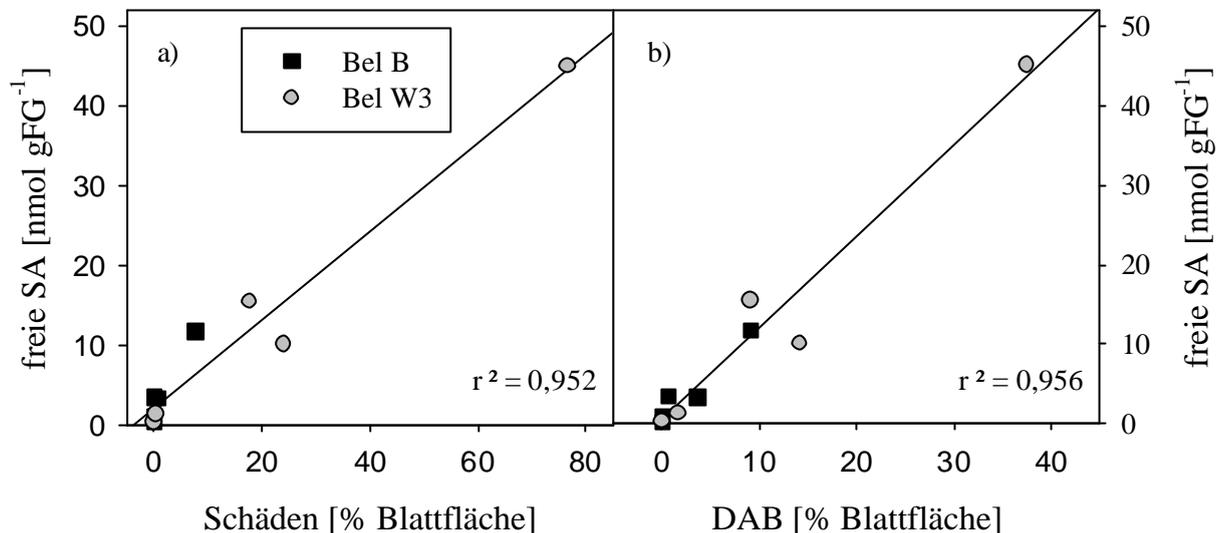


Abb. 80: Graphische Darstellung der Korrelationen der Gehalte an freier Salicylsäure (SA) mit Schäden (a) bzw. DAB-Färbung (b) bei Pflanzen der Tabaksorten Bel B und Bel W3, die mit unterschiedlichen Ozonkonzentrationen behandelt wurden.

Das gemeinsame Auftreten von Zelltod und erhöhten Spiegel von Salicylsäure konnte sowohl bei Ozonstress als auch nach Pathogenbefall nachgewiesen werden (Draper, 1997; Durner et al., 1997; O'Donnell et al., 2001; Rao & Davis, 1999; Rao et al., 1997). Allerdings scheint dabei der Konzentration der Salicylsäure eine wichtige Rolle zuzukommen: Während starke Induktionen der Gehalte zu Zelltod führen, induzieren leicht erhöhte Konzentrationen Abwehrantworten (Alvarez, 2000; Rao & Davis, 1999). Rao & Davis (1999) führen die große Ozon-Empfindlichkeit des *Arabidopsis*-Ökotyps Cvi-0 u.a. auf die hohe, Ozon-induzierte Akkumulation an Salicylsäure zurück; hier erfolgt eine Potenzierung des Zelltodmechanismus.

Die gute Korrelation der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies mit freier Salicylsäure erscheint bei der engen Verflechtung dieser Signalmoleküle verständlich. So wird durch erhöhte Spiegel von ROS die Akkumulation von Salicylsäure induziert (Wu et al., 1997), auf der anderen Seite führen Salicylsäure-Applikationen zu der Akkumulation von $\text{O}_2^{\cdot -}$ bzw. H_2O_2 (Kawano et al., 1998; Rao et al., 1997). Letzteres kann u. a. durch eine Hemmung der H_2O_2 -abbauenden Enzyme Catalase und Ascorbat-Peroxidase durch Salicylsäure erfolgen (Chen et al., 1993; Rao et al., 1997). Diese wird jedoch nur bei relativ hohen

Salicylsäurekonzentrationen erreicht und dürfte damit physiologisch nicht relevant sein (Bi et al., 1995; Neuenschwander et al., 1995). Auf der anderen Seite kann H_2O_2 zwei wichtige Enzyme des Salicylsäure-Biosyntheseweges induzieren: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), das Schlüsselenzym des Syntheseweges für Polyphenole, aber auch Benzoessäure-2-hydroxylase, die direkt die Bildung von Salicylsäure katalysiert (Apostol et al., 1989; León et al., 1995). Hier wurde allerdings kürzlich gezeigt, dass neben der Bildung von Salicylsäure über PAL und Benzoessäure-2-hydroxylase in *Arabidopsis* noch ein zweiter Weg ausgehend von Chorismat existiert (Wildermuth et al., 2001). Ob reaktive Sauerstoffspezies auch diesen Syntheseweg beeinflussen, ist noch nicht bekannt. Insgesamt ergibt sich ein „feed-back“-Verstärkungskreislauf von reaktiven Sauerstoffspezies und Salicylsäure, der letztendlich in Zelltod resultiert.

2.3. Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) agiert im menschlichen Immun-, Nerven- und Blutssystem als Signalmolekül (Delledonne et al., 1998). Seit kurzem mehren sich die Anhaltspunkte, dass NO auch als Effektor bei Wachstum, Entwicklung und Abwehr in Pflanzen fungiert (Beligni & Lamattina, 2001; Durner et al., 1998). Keine Befunde liegen bisher zu einer Bildung von NO als Reaktion auf abiotischen Stress vor. In dieser Arbeit konnte erstmalig eine Ozon-induzierte Akkumulation von NO in Tabakpflanzen der Sorte Bel W3 nachgewiesen werden. Dies erfolgte mittels des NO-spezifischen Farbstoffs Diaminofluorescein-diacetat (DAF-2DA), dessen sehr gute Eignung dieses Farbstoffes für „real-time Imaging“ von NO in lebenden Zellen mit Hilfe der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie kürzlich von Foissner et al. (2000) in elicitierten Epidermiszellen gezeigt wurde.

Deutlich konnten infolge von NO-Akkumulation grün leuchtende Zellcluster erkannt werden (Abb. 50). Eine Co-Infiltration mit dem NO-Scavenger Carboxy-PTIO (Foissner et al., 2000) resultierte in einer verringerten NO-Akkumulation. Um eine stärkere Reduktion der Akkumulation zu erreichen, müsste wohl eine höhere Scavenger-Konzentration eingesetzt werden. NO-Akkumulation konnte zunächst in einzelnen Zellen des Palisadenparenchyms und der oberen Epidermis nachgewiesen werden. Mit fortlaufender Dauer des Experimentes konnte über serielle Laser Scanning Aufnahmen die Ausbreitung der NO-Akkumulation auf Nachbarzellen verfolgt werden, bis etwa 50-100 benachbarte Zellen betroffen waren (Abb. 51). NO konnte in Epidermis- und Palisadenparenchymzellen im Cytoplasma und in Chloroplasten sowie in der Epidermis auch entlang der Plasmamembran detektiert werden.

Eine ähnliche Lokalisation wurde für die Cryptogein-induzierte NO-Akkumulation in abgezogenen Epidermiszellen von Tabak beschrieben (Foissner et al., 2000). Auffällig war, dass sich die NO-akkumulierenden Zellcluster hauptsächlich entlang von Blattadern befanden. Damit erinnert die NO-Akkumulation in der Lokalisation, aber auch im zeitlichen Ablauf sehr stark an die H₂O₂-Akkumulation und später auftretenden Zelltod. Nachdem die histochemischen Untersuchungen für NO und H₂O₂ an den gleichen Blättern durchgeführt wurden, ist ein gemeinsames Auftreten der beiden Sauerstoffverbindungen in denselben Zellen damit sehr gut möglich.

Eine Korrelation von ROS- und NO-Akkumulation wurde ebenfalls bei Behandlung von Soja-Zellkulturen mit avirulenten Stämmen von *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Delledonne et al., 1998) und Cryptogein-Behandlung von Tabak-Epidermisschnitten diskutiert (Foissner et al., 2000). Verschiedene Autoren beschrieben, dass weder reaktive Sauerstoffspezies noch NO alleine in der Lage sind, Zelltod in Pflanzen zu induzieren (Delledonne et al., 1998; Delledonne et al., 2001; Jabs et al., 1996; Rao et al., 2000; Schraudner et al., 1998). Dies zeigte sich z.B. auch bei der Infiltration des NO-Donors Natriumnitroprussid (SNP). Hier traten entweder kaum oder keine Blattschäden auf. Eine gemeinsame Infiltration von SNP mit einem der beiden reaktiven Sauerstoffspezies generierenden Systeme resultierte dagegen in eine deutlichen Ausbildung von Zelltod (Delledonne et al., 1998).

In Tieren kooperieren reaktive Sauerstoffspezies mit NO beim Abtöten von Tumorzellen und von Pathogenen durch Makrophagen. Aus NO und O₂⁻ entsteht Peroxynitrit (ONOO⁻), eine langlebige und hoch reaktive Stickstoffverbindung (Marla et al., 1997). Diese Verbindung kann Apoptose induzieren sowie direkt cytotoxisch wirken. Kürzlich gelang es jedoch Delledonne et al. (2001) in Soja-Zellkulturen zu zeigen, dass ONOO⁻ in Pflanzen kein Vermittler der hypersensitiven Antwort ist. Hier scheint nicht die Interaktion von NO mit O₂⁻, sondern mit H₂O₂ der Auslöser von Zelltod zu sein. Die Auslösung des Zelltodes wird hierbei bestimmt durch ein entsprechendes Gleichgewicht, in dem sich H₂O₂ und NO zueinander befinden müssen. Dieses Gleichgewicht wird wiederum durch die Produktions- und Dismutationsraten von O₂⁻ zu H₂O₂ vermittelt. Nachdem das zeitliche und räumliche Aufeinandertreffen von H₂O₂ und NO in Ozon-behandelten Blättern der Tabaksorte Bel W3 möglich ist, könnten die beiden Komponenten zusammen die direkt wirksamen Agenzien als Auslöser des Zelltodes darstellen.

2.4. Vernetzung der verschiedenen, zu oxidativem Zelltod-führenden Signalwege

Van Camp et al. (1998) entwarfen zur Darstellung der Vernetzung und des Zusammenwirkens von reaktiven Sauerstoffspezies, Salicylsäure, Ethylen und NO während einer Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen das Modell des „oxidativen Zelltodzyklus“. Hier zeigen sich H₂O₂, Salicylsäure und Zelltod verbunden durch einen selbstverstärkenden Prozess, der durch Ethylen und NO potentiell weiter verstärkt werden kann.

Abb. 81 versucht eine vereinfachte Übersicht über das Zusammenwirken der verschiedenen Signalmoleküle bei Ozon-induziertem Zelltod zu geben. Das Schadgas gelangt durch die Stomata in den Blattapoplasten, wo durch Reaktionen mit verschiedenen Komponenten und der Zellmembran u.a. reaktive Sauerstoffspezies entstehen (Heath & Taylor 1997; siehe Einleitung Abschnitt 1.3). Gleichzeitig führt Ozon zu einer Induktion der NO- und Ethylenkonzentration in sensitiven Pflanzen. Die aus der Ozon-Transformation stammenden reaktiven Sauerstoffspezies induzieren darüber hinaus eine pflanzeigene Produktion von ROS (siehe Ergebnisse). NO verstärkt die Akkumulation von ROS zum einen durch erhöhte Transkription von putativen NADPH-Oxidase Homologen (Abb. 78), zum anderen berichten Clark et al. (2000) von einer reversiblen Inhibition der Catalase und Ascorbat-Peroxidase in Tabak durch NO. Zusätzlich induziert NO Ca²⁺-abhängig die Expression von PAL und damit auch die Akkumulation von Salicylsäure (Durner et al., 1998). Die enge, verstärkende Verflechtung von ROS und Salicylsäure wurde bereits in Abschnitt 2.2 der Diskussion beschrieben. Darüber hinaus konnte mit Hilfe von genetisch veränderten Pflanzen die Ethylen-abhängige Akkumulation von Salicylsäure gezeigt werden (O'Donnell et al., 2001). Gemeinsam führen die pflanzeigene ROS-Produktion, NO, Salicylsäure und Ethylen zum kontrollieren Absterben von Zellen.

Eine weitere, oft im Zusammenhang mit Abwehr und Zelltod gebrachte Verbindung stellt Jasmonsäure (JA) dar (Rao & Davis, 2001; Rao et al., 2000). So wurde demonstriert, dass sich die H₂O₂- und NO-Akkumulation von einzelnen Zellen auf ganze Zellcluster ausbreitet (Abb. 51). Trotzdem kommen beide Sauerstoffverbindungen und damit einhergehend auch der Zelltod zum Stoppen, und es erfolgt keine Ausbreitung auf die gesamte Blattfläche. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass daran Jasmonsäure beteiligt sein könnte (Berger, 2002). Durch Verwundung vor einer Exposition mit Ozon konnten sowohl die Ozon-induzierten Schäden als auch die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in der

Tabaksorte Bel W3 signifikant gegenüber Pflanzen ohne Vorbehandlung reduziert werden (Örvar et al., 1997; Schraudner et al., 1998). Verwundung führt über die Aktivierung von Phospholipidperoxidasen zu einer verstärkten Bildung von Jasmonsäure. Darüber hinaus konnten Ozon-Schäden in sehr empfindlichen Pflanzen auch direkt durch Vorbehandlung mit Methyljasmonat verringert werden, wie in dem *Arabidopsis*-Ökotyp Cvi-0 (Rao et al., 2000) und in der *rcd1*-Mutante von *Arabidopsis* (Overmyer et al., 2000). Anscheinend ist Jasmonat in der Lage, den Verstärkungskreislauf von reaktiven Sauerstoffspezies und Salicylsäure zu unterbrechen und die Ausbreitung von Zelltod zu stoppen (Abb. 81).

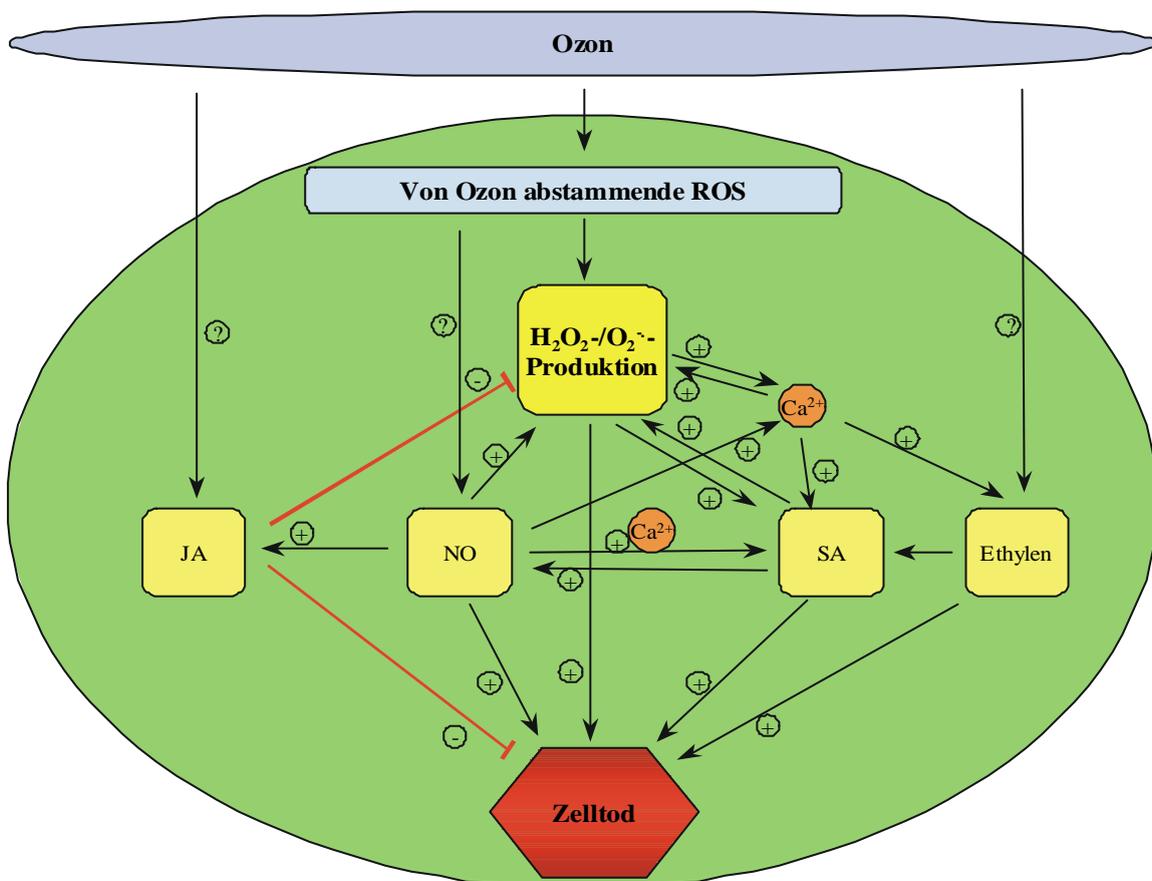


Abb. 81: Vereinfachte Darstellung der Verflechtung verschiedener Signalmoleküle bei Ozon-induziertem Zelltod. ROS = reaktive Sauerstoffspezies; JA = Jasmonsäure; NO = Stickstoffmonoxid; SA = Salicylsäure. + bedeutet Aktivierung, - bedeutet Hemmung, ? Mechanismus nicht geklärt.

Sichtbare Schäden in Form von Zelltod entstehen nach dieser Hypothese nicht direkt aus Ozon oder den davon abstammenden ROS, sondern indirekt aus der Induktion eines Zelltod-Programmes, welches durch ROS, Salicylsäure, Ethylen, NO und Jasmonsäure kontrolliert wird. Frühere Studien vermuteten, dass die Signalwege linear und unabhängig voneinander ablaufen. In der Zwischenzeit wird aber immer deutlicher, dass eine starke Verflechtung und

damit auch Regulation der einzelnen Signalmoleküle untereinander herrscht (Rao & Davis, 2001; Sandermann et al., 1998). Der Ozon-induzierte HR-ähnliche Zelltod ist damit das Resultat von einem extensiven „Crosstalk“ zwischen den verschiedenen Signalwegen.

2.5. Auftreten von Abwehrreaktionen und Signalmolekülen entlang der Blattadern

Sowohl die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies als auch das Auftreten von Zelltod zeigte sich bei vielen der Versuchspflanzen verstärkt entlang der Blattadern, so in Tabak, den meisten Sorten von Tomate, *M. sylvestris* und *Rumex*. Dies ist aus früheren Befunden nur für das Auftreten von Blattschäden bei Tabak bekannt (Hill et al., 1961; Lucas, 1975; Schraudner et al., 1998). Nur bei den *Arabidopsis*-Pflanzen ließ sich kein deutlicher Zusammenhang erkennen. Auch die Infiltration des avirulenten Pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Blätter der Tabaksorte Bel W3 resultierte bei einer entsprechenden Konzentration in einer hypersensitiven Antwort verstärkt entlang der Blattadern (Abb. 75). Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass nicht die Zellen direkt an der Blattader, sondern wenige Zellen davon entfernte die Orte der ersten Akkumulation von ROS waren (Abb. 49).

Der Bezug zwischen Blattadern und pflanzeigenen Abwehrreaktionen ist bekannt aus der Pathogenabwehr. Neben der Akkumulation von ROS und Zelltod konnte z.B. auch für die Expression von Catalase 2 bei *Nicotiana plumbaginifolia* ein Bezug zu den Blattadern hergestellt werden (Willekens et al., 1994). Auch die Aktivität der ACC-Oxidase scheint durch Stress nicht gleichmäßig auf der gesamten Blattspreite induziert zu werden. Mit Hilfe von transgenen Tomaten-Pflanzen der Sorte Ailsa Craig, die ein Fusionsprodukt aus dem *Le-ACOI*-Promotor und dem Reportergen β -Glucuronidase enthielten, konnte verstärkte, Ozon-induzierte GUS-Aktivität entlang der Blattadern in einem ähnlichen Muster wie Zelltod und H_2O_2 -Akkumulation demonstriert werden (W. Moeder und C. Langebartels, in Vorbereitung). Von Bowles (1992) wurde verstärkte Genexpression der ACC-Oxidase nach Verwundung entlang der Blattadern nachgewiesen. Die Akkumulation basischer PR-Proteine nach einer Ethylenbehandlung hauptsächlich in der Nähe zu Leitbündeln zeigten Mauch et al. (1992). Infiltrationen von ^{14}C -markierter Salicylsäure in den Blattapoplasten von Tabak ergaben in Autoradiographien eine entlang der Blattadern erhöhte Radioaktivität (Moeder, 1999).

Alle diese Befunde deuten darauf hin, dass Signalmoleküle wie reaktive Sauerstoffspezies und ACC primär von speziellen Zellen entlang der Leitbahnen gebildet werden. Alvarez et al.

(1998) konnten infolge der systemischen Resistenz bei *Arabidopsis* sogenannte „microbursts“ in Sekundärblättern in der Nähe zu Blattadern nachweisen. Offensichtlich zeigen sich Zellen entlang der Blattadern prädisponiert zu Abwehrreaktionen. Zelltod und die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in der Nähe von Blattadern könnte besonders vorteilhaft bei der Abwehr von Pathogenen sein, die die Leitbahnen zur Ausbreitung in der Pflanze benutzen (Schraudner et al., 1998).

3. Potentielle Enzyme des Ozon-induzierten „oxidativen Bursts“

Verschiedene Befunde weisen darauf hin, dass die Ozon-induzierte Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in sensitiven Pflanzen nur z.T. auf das Schadgas direkt zurückzuführen ist. Obwohl Ozon in biologischen Geweben sehr kurzlebig ist (Halbwertszeit von 70×10^{-9} s; Heath & Taylor, 1997) und 15 min nach Beendigung einer Exposition kein aus Ozon entstandenes Signal mehr nachzuweisen war (Runeckles & Vaartnou, 1997), konnte deutlich nach Behandlungsende in sensitiven Pflanzen die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies detektiert werden. Darüber hinaus lässt sich die Akkumulation der Sauerstoffspezies durch verschiedene Inhibitoren hemmen. In dieser Arbeit wurde DPI, ein Hemmstoff von flavin-haltigen Oxidasen wie der NADPH-Oxidase, sowie K252a, ein Inhibitor von Proteinkinasen, verwendet. Eine erfolgreiche Unterdrückung der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies mit DPI bei *Arabidopsis* wird auch von Overmyer et al. (2000) gezeigt. Eine Reduktion der DAB-Färbung durch Infiltration von relativ geringen Konzentrationen an DPI konnten auch von Schraudner et al. (1998) erreicht werden, höhere Konzentrationen wirkten jedoch auf die Tabaksorte Bel W3 toxisch.

Dies legt den Schluss einer aktiven, enzymatischen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Ozon-empfindlichen Pflanzen nahe. Hierfür kommen verschiedene, auch schon beim Pathogen-induzierten oxidativen Burst diskutierte Enzyme in Frage: Diamin- bzw. Polyaminoxidasen (Allan & Fluhr, 1997), Oxalatoxidase (Zhang et al., 1995), Peroxidasen (Blee et al., 2001) und NADPH-Oxidase (Doke, 1985; Lamb & Dixon, 1997; Sagi & Fluhr, 2001).

Die Beteiligung von Diamin- bzw. Polyaminoxidasen bei der Ozon-induzierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies konnte durch Peters et al. (1989) und Reupold (1991) jedoch ausgeschlossen werden.

3.1. Oxalatoxidase

Befunde aus Vorarbeiten deuteten auf Oxalatoxidase-Aktivität in Tabak hin (Thalmair, 1996). Zusätzlich konnten in SDS-PAGE auftretenden Banden Homologien zu Germin-ähnlichen Proteinen nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um ein ca. 21 kDa großes, nur in der Tabaksorte Bel B vorkommendes Protein, sowie um Proteine mit etwa 25 und 26 kDa, die sowohl bei Bel B als auch Bel W3 durch Ozon reprimiert wurden. Wahrscheinlich gehören dabei die 25 und 26 kDa große Bande zu demselben Protein. Die sequenzierten Peptide wiesen in den überlappenden Aminosäuren eine sehr hohe Identität auf und die meisten, auf biochemischer Ebene untersuchten Germin-ähnlichen Proteine existieren in zwei Isoformen, die sich nur in ihrer Glykosylierung unterscheiden (Bernier & Berna, 2001). Neben den Sequenzhomologien sprach auch die Proteingröße für Germin-ähnliche Proteine. Die meisten Monomere von Germin-ähnlichen Proteinen besitzen ein Molekulargewicht zwischen 20 und 30 kDa. Germin-ähnliche Proteine sind benannt nach ihrem ersten entdeckten Vertreter, dem Germin, welches in keimendem Weizen gefunden wurde (Bernier & Berna, 2001).

Im Moment können einem Teil der Germin-ähnlichen Proteine drei mögliche Funktionen zugeordnet werden: Enzyme, Strukturproteine und Rezeptoren (Bernier & Berna, 2001).

Als Enzymfunktion besitzen Germin-ähnliche Proteine Oxalatoxidase-Aktivität, so hauptsächlich die Vertreter in den Monokotylen, aber auch ein Protein aus *Silene vulgaris* ssp. *humilis* Schubert (Bringezu et al., 1999). Sowohl Zhang et al. (1995) als auch Dumas et al. (1995) konnten eine erhöhte Oxalatoxidase-Aktivität in Gerste nach Infektion mit *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* messen. Darüber hinaus konnten kürzlich drei Vertretern Superoxiddismutase-Aktivität nachgewiesen werden: Einem Protein aus dem Moos *Barbula unguiculata* (Yamahara et al., 1999), Nectarin I aus Tabaknektar (Carter & Thornburg, 2000), aber auch dem Weizen Germin selbst (Woo et al., 2000).

Unter Strukturproteine fallen diejenigen, die nach Stressbehandlung mit der Zellwand fest verbunden, und dadurch unlöslich werden. Vallélian-Bindschedler et al. (1998) konnten zeigen, dass ein Germin-ähnliches Protein in gestressten Gerstenblättern insolubilisiert wird.

In Erbse führte die Suche nach einem Rezeptor für Rhicadhesin zu der Reinigung und Bestimmung einer Teilsequenz eines Germin-ähnlichen Proteins (Swart et al., 1994). Rhicadhesin ist ein wichtiges Protein auf der Zelloberfläche von verschiedenen Bakterien, das für die ersten Schritte der Anheftung an Wurzelhaare verantwortlich ist. Die Germin-ähnlichen Proteine ABP19 und 20 in *Prunus persica* Batsch. wurden als schwache Auxin-Rezeptoren entdeckt (Ohmiya et al., 1998).

Einige Vertreter reagieren auf Stress, insbesondere Pathogenbefall. In Gerste akkumulieren Transkripte eines Oxalatoxidase-ähnlichen Proteins (*HvOxOLP*) nach Inokulation mit *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (Wei et al., 1998) und in *Lupinus albus* L. wurde ein Germin-ähnliches Protein in der extrazellulären Flüssigkeit nach Behandlung mit verschiedenen Elicitoren detektiert (Wojtaszek et al., 1997). Die Funktion dieser Proteine ist jedoch nicht klar, eine Oxalatoxidase-Aktivität konnte ihnen nicht zugewiesen werden.

Trotz verschiedener Versuchsansätze und der Verwendung von zwei unterschiedlichen Methoden konnte in der vorliegenden Arbeit keine Oxalatoxidase-Aktivität in Tabak detektiert werden. Damit ist die Beteiligung einer Oxalatoxidase an der Ozon-induzierten Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies in Tabak unwahrscheinlich.

Abb. 82 zeigt eine Übersicht über verschiedene Germin-ähnliche Proteine und ihre verwandtschaftlichen Beziehungen. Proteine mit Enzym-Aktivität wurden farbig markiert. Hierbei wird deutlich, dass die beiden Auxin-bindenden Proteine, die die größte Homologie zu den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen der 21, 25 und 26 kDa Bande hatten, relativ weit von den Proteinen mit nachgewiesener Enzym-Aktivität stehen. Die Funktion von ABP (für „Auxin-binding protein“) 19 und 20 aus Pfirsich ist unbekannt (Ohmiya et al., 1998). Eventuell lässt die Homologie der 21, 25 und 26 kDa-Proteine zu ABP19 und ABP20 auf eine Funktion als Rezeptoren in Tabak schließen. Die Abnahme der Bandenintensität der 25 und 26 kDa Proteine durch eine Ozon-Behandlung erinnert allerdings an die Befunde von Vallélian-Bindschedler et al. (1998), also eine Insolubilisierung der Proteine nach Stress. Interessant wäre aber auch, einen Test auf Superoxiddismutase-Aktivität für diese drei Proteine durchzuführen. Nachdem diese Proteine der einzige deutliche Unterschied zwischen der Tabaksorte Bel B und Bel W3 in der Apoplastenflüssigkeit sind, wäre eine weitere Funktionsanalyse sehr interessant. Verschiedene transgene Ansätze zeigen klar, dass die Expression Germin-ähnlicher Proteine verstärkte Resistenz gegen bestimmte Pathogene bieten kann (Liang et al., 2001; Schweizer et al., 1999). Interessant ist darüber hinaus, dass Desikan et al. (2001) bei der Untersuchung von H₂O₂-induzierten Proteinen mit Hilfe der cDNA-Microarray-Technologie in *Arabidopsis* auch ein Germin-ähnliches Protein identifizierten.

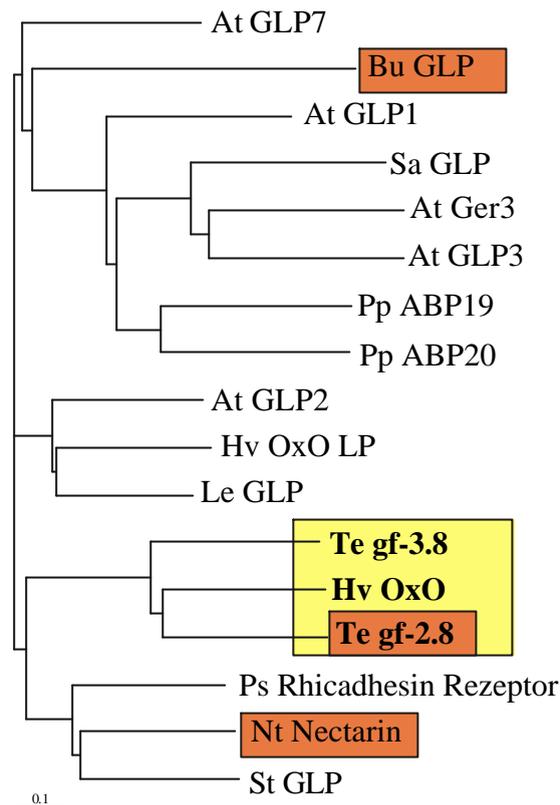


Abb. 82: Phylogenetischer Baum verschiedener Germin-ähnlicher Proteine. At = *A. thaliana* (GLP1 U95035, GLP2 X91957, GLP3 Y12673, GLP7 AF170550, Ger3 AJ132237); Hv *Hordeum vulgare* L. (OxO Y14203, OxOLP X93171); Le *L. esculentum* (AW035078); Bu *Barbula unguiculata* (AB028460); Sa *Sinapis alba* L. (X84786); Pp *Prunus persica* Batsch (ABP19 U81163, ABP20 U81162); Te *Triticum aestivum* L. (gf-2.8 M63223, gf-3.8 M63224), Ps *Pisum sativum* Rhicadhesin Rezeptor (Q6S8P4); Nt *N. tabacum* (AF132671); St *Solanum tuberosum* L. (AF067731). Gelb hinterlegt sind Proteine mit Oxalatoxidase-Aktivität, rot markierte Proteine besitzen Superoxiddismutase-Aktivität. Der Baum wurde mit dem Programm Vector NTI6 von InforMax, Bethesda, USA, basierend auf dem Neighbor Joining (NJ) Algorithmus erstellt.

3.2. NADPH-Oxidase

3.2.1 Isolierung und Sequenzvergleich mit putativen NADPH-Oxidasen

Nachdem eine Ozon-induzierte Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies in Tabak durch Oxalatoxidase-Aktivität nicht nachgewiesen werden konnte, sollte als nächstes eine potentielle Beteiligung einer NADPH-Oxidase untersucht werden. Dieses Enzym katalysiert in menschlichen Leukozyten die Bildung von O_2^- zur Abwehr von Krankheitserregern (Henderson & Chappell, 1996). Vor Beginn dieser Arbeit waren in Pflanzen Homologe zu

NADPH-Oxidasen in Reis (Groom et al., 1996) und *Arabidopsis* (Keller et al., 1998; Torres et al., 1998) isoliert worden. Im Laufe der vorliegenden Doktorarbeit kamen Isoformen aus Tomate (Amicucci et al., 1999; Puthoff und Walling, unveröffentlicht, AC AF148534), *Potamogeton crispus* L. (Amicucci et al., 1999) und seit kurzem aus Kartoffel (Yoshioka et al., 2001) dazu.

In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals mit Hilfe degenerierter und spezifischer Primer, entwickelt nach *Arabidopsis*- und Tomatensequenzen, zwei putative homologe Isoformen von gp91phox, der wichtigsten Untereinheit der menschlichen NADPH-Oxidase, in Tabak zu identifizieren und zu klonieren. Die codierenden Sequenzbereiche umfassten 2817 bzw. 2889 Nukleotide einschließlich Stopp-Codon, was abgeleiteten Aminosäuresequenzen von 938 bzw. 962 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 106 bzw. 108 kDa entsprach. In Anlehnung an die zu den Tabak-Isoformen ähnlichsten Sequenzen aus *Arabidopsis* wurden sie als Ntrboh D und F bezeichnet (Abb. 83; Torres et al. 1998). Die größte Sequenzübereinstimmung konnte jedoch zu zwei Isoformen aus Tomate festgestellt werden. Ntrboh D zeigt eine 90 %ige Übereinstimmung mit einer in der Datenbank veröffentlichten Isoform namens Wfi1 (Puthoff und Walling, AC AF148534), Ntrboh F wies eine Identität von 84 % zu der Tomaten-Isoform Lerboh1 (Amicucci et al., 1999) auf (Tab. 1). Abb. 83 zeigt einen phylogenetischen Baum aller zur Zeit bekannten pflanzlichen Isoformen der NADPH-Oxidase (grün), sowie verschiedene menschliche NADPH-Oxidasen (rot) und damit verwandte Proteine.

Die Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen pflanzlicher und menschlicher NADPH-Oxidasen sowie dazu verwandter Proteine zeigt deutlich, dass sich die menschlichen NADPH-Oxidase-Verwandten zu einer Untergruppe formieren (Abb. 83). Am nächsten steht dieser Untergruppe die Isoform E aus *Arabidopsis*. Daran schließt sich eine Einheit von fünf pflanzlichen NADPH-Oxidasen, wozu auch Ntrboh F gehört. Die restlichen pflanzlichen Enzyme spalten sich noch einmal in zwei Untergruppen auf, eine kleine bestehend aus Atrboh B und Strboh B, und eine größere aus fünf Vertretern, darunter Ntrboh D. Beide Tabak-Isoformen weisen insgesamt 29 % identische und 44 bzw. 45 % ähnliche Aminosäuren zu der menschlichen gp91phox auf.

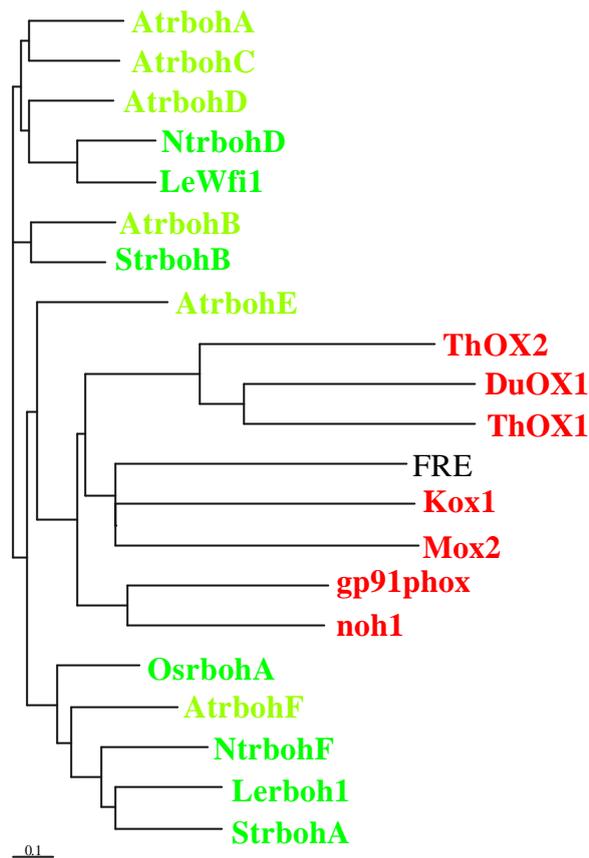


Abb. 83: Phylogenetischer Baum putativer NADPH-Oxidasen aus Pflanzen (grün) und Menschen (rot) sowie einer Eisenreduktase aus Hefe (FRE, schwarz), der die verwandtschaftlichen Beziehungen der verschiedenen Enzyme untereinander demonstriert. At *A. thaliana* (Atrboh A AF055353, Atrboh B AF055354, Atrboh C AF055355, Atrboh D AF055357, Atrboh E AF055356, Atrboh F AB008111); Nt *N. tabacum* (Ntrboh F AJ320505), Le *L. esculentum* (Lerboh 1 AF088276, LeWfi1 AF148534); St *S. tuberosum* (Strboh A AB050660, Strboh B AB050661); Os *Oryza sativa* L. (Osrboh A X93301); ThOX Thyroid-Oxidase (ThOX1 AF230495, ThOX2 AF230496); DuOX, Duale Oxidase (XM_007654); FRE Eisenreduktase (FRE1 M86908); Mox, Mitogenic Oxidase (Mox2 NM_005944); Noh1 (NM_013955); Kox1, Kidney-Oxidase (XM_031850); gp91phox (NM_000397). Der Baum wurde mit dem Programm Vector NTI6 von InforMax, Bethesda, USA, basierend auf dem Neighbor Joining (NJ) Algorithmus erstellt.

Obwohl die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch diese Proteine in Pflanzen noch nicht nachgewiesen wurde, erlauben mehrere konservierte Domänen und Vergleiche mit NADPH-Oxidase-Aktivitäten aus tierischen und menschlichen Geweben eine Vorhersage, dass diese tatsächlich NADPH-Oxidase-Aktivitäten besitzen (Abb. 84). So konnte mittels Vergleichen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von Ntrboh D und F mit gp91phox und pflanzlichen Vertretern von NADPH-Oxidase am C-Terminus putative NADPH-Adenin-, NADPH-Ribose- und FAD-Bindungsstellen identifiziert werden. Darüber hinaus konnten auch die für die Funktion der menschlichen NADPH-Oxidase essentiellen Aminosäurereste Pro-415 und Asp-500 in den beiden abgeleiteten Tabak-Sequenzen wiedergefunden werden (Abb. 62, mit

einem Stern markiert). Auch die sechs putativen Transmembrandomänen des N-Terminus der gp91phox ließen sich in den Tabak-Sequenzen erkennen (Abb. 62; Abb. 84). Konserviert sind auch in beiden Tabak-Isoformen die Histidin-Reste in den Transmembrandomänen 3 und 5. Diese sind für die Funktion des Enzyms essentiell wichtig, hier findet wie für die Eisenreduktase aus Hefe und gp91phox gezeigt die Häm-Bindung statt (Finegold et al., 1996). An die Transmembrandomänen schließt sich bei allen bisher publizierten pflanzlichen NADPH-Oxidasen, so auch in Ntrboh D und F, eine N-terminale, hydrophile Verlängerung an, die u. a. durch den Besitz von sogenannten EF-Hand-Motiven charakterisiert ist.

	EF-Hand I		EF-Hand II
NtrbohD	RLQTF [*] FD [*] MVDK [*] DADGRIT [*] EEEE [*] VREI [*] IIGLS		YAAMIMEELDPNN [*] LG [*] YIM [*] ENLE [*] M [*] LL [*] LL [*] LQA
NtrbohF	RLQIS [*] FD [*] MVDK [*] NEDGR [*] IA [*] EEEE [*] VKEI [*] IIMLS		YAALIMEELDPER [*] LG [*] YIEL [*] WQ [*] LETLL [*] LLOK
Lewfil	RLQTF [*] FD [*] MVDK [*] DADGRIT [*] EEEE [*] VREI [*] IIGLS		YAAMIMEELDPNN [*] LG [*] YIM [*] ENLE [*] M [*] LL [*] LL [*] LQA
Lerboh1	RLQIF [*] FD [*] MVDK [*] NEDGR [*] IG [*] EEEE [*] VKEI [*] IIMLS		YAALIMEELDPER [*] LG [*] YIEL [*] WQ [*] LETLL [*] LLOK
AtrbohD	KLQV [*] FD [*] MVDK [*] DEDGR [*] VTE [*] EEV [*] AEI [*] ISLS		YAALIMEELDPN [*] AG [*] FIM [*] ENLE [*] M [*] LL [*] LL [*] LQA
AtrbohF	RLQIF [*] FD [*] IVDK [*] NEDGRIT [*] EEEE [*] VKEI [*] IIMLS		YAALIMEELDPER [*] LG [*] YIEL [*] WQ [*] LETLL [*] LLOK
ThOX1	FVES [*] MF [*] SLADK [*] DGNG [*] YLS [*] FR [*] EFL [*] DIL [*] VV [*] F		YDFDGNGLISK [*] DEFIR [*] ML [*] RS [*] FS [*] IEIS [*] NNCL
	TM3/4		TM5/6
NtrbohD	LN [*] F [*] H [*] K [*] VI [*] AVA [*] I [*] AL [*] GV [*] GI [*] H [*] GLS		FW [*] YS [*] H [*] LF [*] V [*] IV [*] Y [*] TL [*] F [*] IV [*] H [*] G [*] EK
NtrbohF	IN [*] F [*] H [*] K [*] TV [*] AAA [*] IV [*] TGI [*] IL [*] H [*] AGN		FW [*] YS [*] H [*] LL [*] V [*] IV [*] Y [*] ILL [*] II [*] H [*] GT [*] F
Lewfil	LN [*] F [*] H [*] K [*] VI [*] AVA [*] VAL [*] GV [*] AI [*] H [*] GLA		FW [*] YS [*] H [*] LF [*] II [*] V [*] Y [*] TLL [*] LIV [*] H [*] G [*] EK
Lerboh1	IN [*] F [*] H [*] K [*] TV [*] AAA [*] IV [*] TGI [*] IL [*] H [*] AGN		FW [*] YS [*] H [*] LL [*] II [*] V [*] Y [*] IV [*] LI [*] II [*] H [*] GT [*] F
AtrbohD	LN [*] F [*] H [*] K [*] VI [*] AS [*] GIV [*] VGV [*] LL [*] H [*] AGA		FW [*] YT [*] H [*] LF [*] II [*] V [*] Y [*] ALL [*] LIV [*] H [*] G [*] IK
AtrbohF	IN [*] F [*] H [*] K [*] TI [*] AG [*] IV [*] VAV [*] IL [*] H [*] IGD		FW [*] YS [*] H [*] LF [*] V [*] IV [*] Y [*] ILL [*] LIL [*] H [*] GI [*] F
gp91phox	LTF [*] H [*] K [*] M [*] V [*] AW [*] MIAL [*] HS [*] AI [*] HT [*] IA		FW [*] YT [*] H [*] LF [*] V [*] IV [*] FF [*] IG [*] LAI [*] H [*] GAE
ThOX1	VDF [*] H [*] R [*] L [*] I [*] AST [*] AIV [*] LV [*] TL [*] V [*] LS [*] VG		FW [*] LT [*] H [*] LY [*] ILL [*] V [*] LL [*] II [*] H [*] GS [*] F
	FAD	Motif 2	NADPH Ribose
NtrbohD	HPFSITS	DGPY [*] G	LLVGLGIGAT [*] PM
NtrbohF	HPFSITS	DGPY [*] G	LLVGLGIGAT [*] PF
Lewfil	HPFSITS	DGPY [*] G	LLVGLGIGAT [*] PM
Lerboh1	HPFSITS	DGPY [*] G	LLVGLGIGAT [*] PF
AtrbohD	HPFSITS	DGPY [*] G	LLVGLGIGAT [*] PM
AtrbohF	HPFSITS	DGPY [*] G	LLVGLGIGAT [*] PF
gp91phox	HPFTLTS	DGP [*] FG	MLVGAGIGV [*] TPF
ThOX1	HPFTLTS	DGP [*] FG	VLVGGGIGV [*] TPF
			NADPH Adenin
			GVFY [*] CG
			GVFL [*] CG
			GVFS [*] CG

Abb. 84: Vergleich stark konservierter Domänen pflanzlicher und menschlicher Homologe von NADPH-Oxidasen. Neben den beiden Tabak-Isoformen Ntrboh D und F sind zwei Tomaten- (Lewfil, AF148534 und Lerboh1, AF088276), zwei *Arabidopsis*-Sequenzen (Atrboh D, AF055353 und F, AB008111), gp91phox (NM_000397) sowie eine menschliche Thyroid-Oxidase (ThOX1, AF230498) gezeigt. Identische Aminosäuren wurden grau hinterlegt, konservierte Histidin-Reste in den Transmembrandomänen 3 und 5 wurden mit weißen Buchstaben markiert. Nachdem die ThOX1 noch eine zusätzliche Transmembrandomäne im N-terminalen Ende besitzt, lauten hier die entsprechenden Bezeichnungen TM4 und TM6. Das Alignment wurde mit dem Programm DiAlign von Genomatix Software GmbH, München, erstellt.

EF-Hand-Motive sind Domänen, die sehr häufig Ca^{2+} -bindende Eigenschaften aufweisen. Sie setzen sich aus den Motiven „Helix-Loop-Helix“ zusammen, wobei im Bereich des „Loops“ die koordinative Bindung des Ca^{2+} -Ions meist durch Aminosäurereste mit Sauerstoff-haltigen Seitenketten stattfindet. Die kanonische Sequenz von EF-Händen ist im Ergebnisteil dargestellt (Abb. 63). Dass an den EF-Hand-Motiven der pflanzlichen NADPH-Oxidasen

tatsächlich eine Calcium-Bindung stattfinden kann, zeigten Keller et al. (1998) für die Isoform Atrboh F von *Arabidopsis*. Dabei erfolgte die Bindung durch die EF-Hand I stärker als durch EF-Hand II. Aufgrund der großen Sequenz-Übereinstimmung mit Ausnahme von zwei relativ variablen Aminosäuren sollte auch in Ntrboh F Calcium gebunden werden können. In der Tabak-Isoform D erfolgte gegenüber F in beiden Motiven ein Austausch von Aminosäuren an für die Calcium-Bindung wichtigen Stellen. In EF-Hand-Motiv I wird ein Asparagin- durch einen Aspartat-Rest ersetzt. Die veränderte Sequenz der Isoform D steht dabei sogar besser in Einklang mit dem kanonischen EF-Hand Motiv (Abb. 63). In EF-Hand-Motiv II wird ein Glutamat- gegen einen Asparagin-Rest ausgetauscht. Hier kann nur eine Calcium-Bindung angenommen werden. Eine Überprüfung der Ca^{2+} -Bindung muss jedoch für beide Tabak-Isoformen erfolgen.

Neben der NADPH-Oxidase in Leukozyten existieren in Säugern noch weitere NADPH-Oxidasen. In nicht-phagocytotischen Zellen wurde Mox (Mox = mitogenic oxidase) als O_2^- -generierende, zu der gleichen Familie wie gp91phox gehörende NADPH-Oxidase entdeckt (Suh et al., 1999). Durch alternatives Splicing kann aus Mox ein Protein mit der potentiellen Funktion eines Protonenkanals hervorgehen, Noh1 (Banfi et al., 2000).

Exklusiv in Schilddrüsenzellen wurden die NADPH-Oxidasen ThOX 1 und ThOX2 (ThOX = Thyroid-Oxidase) entdeckt (De Deken et al., 2000; Dupuy et al., 1999). In diesen Zellen ist zur Synthese des Schilddrüsenhormons H_2O_2 für die Oxidation von Iodid nötig. Die beiden ThOX-Isoformen enthalten alle funktionellen Domänen wie gp91phox (Abb. 84). Zusätzlich besitzen sie wie die pflanzlichen NADPH-Oxidasen zwei EF-Hand-Motive. Darüber hinaus ist dieses Enzym im N-terminalen Bereich noch einmal verlängert: hier liegt eine zusätzliche Transmembrandomäne, insgesamt gibt es also 7, und eine Peroxidase-homologe Sequenz, wobei sich dieser Teil sehr wahrscheinlich im extrazellulären Bereich befindet (Abb. 85). Insgesamt besitzen die beiden ThOX-Isoformen damit eine Sequenzlänge von 1551 bzw. 1548 Aminosäuren. Diese Oxidase bildet auch im Gegensatz zu den anderen Enzymen kein O_2^- , sondern H_2O_2 . De Deken et al. (2000) vermuten, dass dieses Enzym durch eine Genfusion einer „normalen“ NADPH-Oxidase mit einer Peroxidase entstanden sein könnte. Sehr ähnlich zu den beiden ThOX-Isoformen zeigt sich die nur in der Datenbank zugängliche Sequenz einer Dualen Oxidase (DuOX; XM_007654; Abb. 83).

Abb. 85 demonstriert schematisch die übereinstimmenden Domänen von gp91phox, den pflanzlichen NADPH-Oxidasen und von ThOX, sowie ihre unterschiedliche Größe.

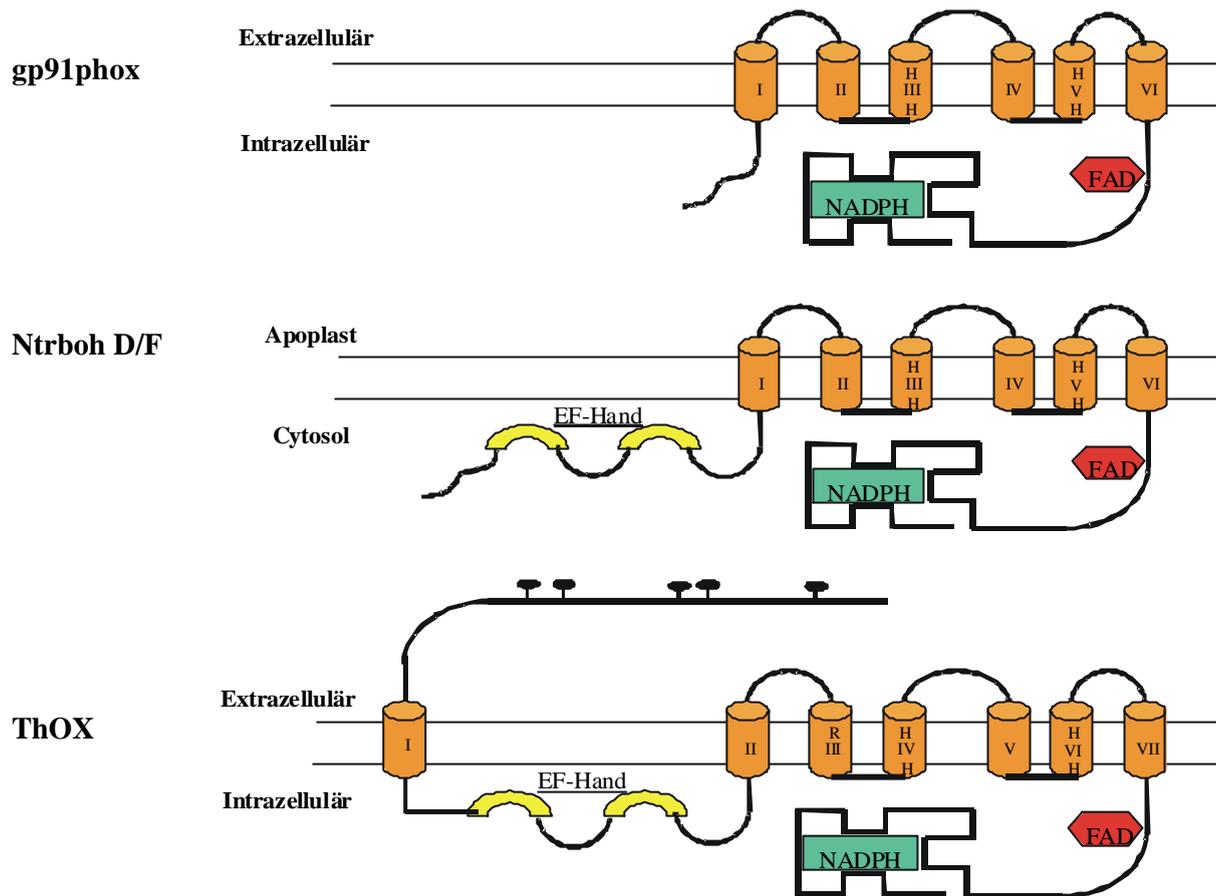


Abb. 85: Struktur-Modelle der verschiedenen NADPH-Oxidasen. gp91phox stellt die wichtigste Untereinheit der NADPH-Oxidase in Leukozyten dar, Ntrboh D und F ist die Abkürzung für *N. tabacum* respiratory burst oxidase homologue, ThOX steht für die Oxidase in Schilddrüsenzellen. Zu erkennen sind die Membran-Lokalisation und potentielle funktionelle Domänen. I-VII = Transmembrandomänen; H = Histidinreste für die Häm-Bindung; R = konservierter Argininrest; 5 potentielle Glykosylierungsstellen im extrazellulären Teil von ThOX. Thyroid Oxidase (ThOX1 AF230495, ThOX2 AF230496); gp91phox (NM_000397).

gp91phox stellt in Tieren die zentrale Untereinheit in einem Multikomponentenkomplex dar (Henderson & Chappell, 1996). Für eine funktionsfähige NADPH-Oxidase in Leukozyten werden zusätzlich andere Untereinheiten benötigt. Neben der ebenfalls in der Plasmamembran lokalisierten p22phox existieren noch cytosolische Untereinheiten. Eine Aktivierung des Enzymkomplexes findet nach Phosphorylierungsprozessen durch Wanderung der cytosolischen Proteine zu den membranständigen Untereinheiten statt (Babior, 1999; Abb. 4). Die genauen Funktionen der meisten Untereinheiten sind dabei nicht bekannt. Fest steht, dass als zentrale Funktion die Elektronenübertragung von NADPH auf Sauerstoff an gp91phox stattfindet, und die cytosolische Untereinheit p47phox wohl nur als Adaptorprotein zwischen den Membranproteinen und den beiden anderen cytosolischen Untereinheiten dient (Freeman & Lambeth, 1996). Mox benötigt ebenfalls für eine Funktionsfähigkeit die Anwesenheit von

p22phox, und auch die NADPH-Oxidase aus Schilddrüsen-Zellen scheint nur in Anwesenheit einer weiteren Komponente zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies befähigt (Dupuy et al., 1999).

Versuche von Desikan et al. (1996) ließen Übereinstimmungen, aber auch Unterschiede in der Funktionsweise der pflanzlichen Enzyme erkennen. Wie der menschliche Enzymkomplex wurde auch die O_2^- -Bildung in Pflanzen durch DPI gehemmt. Darüber hinaus konnte bei der Kombination einer Membranfraktion von *Arabidopsis* mit einer cytosolischen Fraktion aus Neutrophilen nach Elicitorbehandlung eine deutliche O_2^- -Bildung detektiert werden, im umgekehrten Fall jedoch nicht. In pflanzlichen Extrakten konnten mittels Antikörpern gegen die Untereinheiten p22phox, p47phox und p67phox immunreaktive Signale erkannt werden (Desikan et al., 1996; Xing et al., 1997), diese erwiesen sich jedoch nach Klonierung und Sequenzierung als völlig andere Proteine (Tenhaken & Rübeler, 1999). Außerdem sind im gesamten *Arabidopsis*-Genom keine pflanzlichen p40phox, p47phox und p67phox-Homologe zu finden (Sagi & Fluhr, 2001). Nur Homologe zu dem GTP-bindenden Protein Rac konnten detektiert werden (Kawasaki et al., 1999; Kieffer et al., 1997; Park et al., 2000; Schiene et al., 2000). Kürzlich gelang es Sagi & Fluhr (2001) in nativen Polyacrylamid-Gelen, sowie nach Protein-Auftrennung in denaturierenden Gelen mit anschließender Renaturierung, die NADPH-abhängige Bildung von O_2^- in Tomate und Tabak zu demonstrieren. Die Bestätigung, dass es sich bei dem betreffenden Enzym tatsächlich um ein NADPH-Oxidase-homologes Protein handelte, lieferte die positive Reaktion mit Antikörpern gegen eine in allen bisher veröffentlichten pflanzlichen NADPH-Oxidasen hoch konservierte Region im C-terminalen Bereich. Diese Versuche legten die Vermutung nahe, dass für die Funktionsfähigkeit in Pflanzen keine weiteren Untereinheiten nötig sind. In bisher unveröffentlichten Daten (H. Zinecker und D. Scheel, Halle) gelang außerdem kürzlich die heterologe Expression eines NADPH-Oxidase-homologen Proteins aus Petersilie in Hefe. Hier konnte ebenfalls die Produktion von O_2^- demonstriert werden.

3.2.2 Expressionsanalysen der putativen NADPH-Oxidase Homologe *Ntrboh D* und *F* in Tabak

Expressionsstudien von *Ntrboh D* und *F* in unbehandelten Geweben zeigten, dass beide Isoformen in allen getesteten Geweben exprimiert werden. Transkripte der *D*-Isoform sind am stärksten in der Wurzel und deutlich in der Sprossachse zu detektieren. In den Proben von Sprossachsen scheint jedoch die Nähe zur Wurzel entscheidend zu sein: So konnten in

Sprossachsenabschnitten in unmittelbarer Nähe zur Wurzel höhere Transkriptmengen gefunden werden als in den weiter entfernten Abschnitten. Nur eine geringe Expression findet für diese Isoform in Blättern und Blüten statt. Diese konnte nur mittels RT-PCR-Untersuchung detektiert werden (Abb. 67). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Torres et al. (1998): Auch für die D-Isoform in *Arabidopsis* konnte die mit Abstand höchste Transkriptmenge in Wurzeln festgestellt werden.

Die F-Isoform der NADPH-Oxidase aus Tabak wird dagegen konstitutiv gering exprimiert. Die zu der *Ntrboh F* ähnlichste Isoform *Lerboh 1* aus Tomate konnte mittels RT-PCR-Analyse nachgewiesen werden, und zeigte etwas intensivere Banden in Wurzeln und Blüten (Amicucci et al., 1999). Ähnliche Befunde erhielten Keller et al. (1998) und Torres et al. (1998) für die F-Isoform aus *Arabidopsis*. (Keller et al., 1998) vermuten, dass die verstärkte Expression der pflanzlichen NADPH-Oxidase und anderer an der pflanzlichen Abwehr beteiligten Enzyme in Wurzeln einen Schutz gegen ständige Verwundung und Pathogen-Bedrohung während des Wachstums im Boden darstellt.

In dieser Arbeit erwies sich die D-Isoform von Tabak als deutlich induzierbar, sowohl durch Ozon als auch durch Pathogenbehandlung. Bei einer 5stündigen Ozonbehandlung mit 185 nl l^{-1} beliefen sich die maximalen Induktionsfaktoren auf 15-20fach. Interessant ist das Ergebnis der Dosisabhängigkeit: So zeigt diese Isoform nur zwischen 100 und 200 nl l^{-1} eine Induktion der Expression in Abhängigkeit der Ozonkonzentration (Abb. 74). Dies stellt genau den Bereich dar, in dem auch die Ausbildung von Blattschäden in der Tabaksorte Bel W3 induziert wird (Abb. 21). Obwohl mit zunehmender Ozonkonzentration das Auftreten von Zelltod weiter verstärkt wird, zeigten sich keine Unterschiede auf Transkriptebene zwischen 200, 300 und 400 nl l^{-1} . Als ebenfalls induzierbar erwies sich *Atrboh D* nach Harpin-Behandlung (Desikan et al., 1998). In Kartoffel zeigte sich die mit *Ntrboh D* noch relativ nah verwandte Isoform *Strboh B* induzierbar durch einen Elicitor aus *Phytophthora infestans* (Yoshioka et al., 2001).

Ozonbehandlung führt in Tabak zu einer biphasischen Akkumulation von Transkripten mit einem Maximum nach ca. 1,5-2 h und einem zweiten ca. 6-8 h nach Expositionsbeginn (Abb. 69; Abb. 70; Abb. 72). Dieser biphasische Verlauf erinnert stark an die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies im Apoplasten der Ozon-empfindlichen Tabaksorte Bel W3 (Schraudner et al., 1998). Abb. 86 zeigt schematisch den zeitlichen Verlauf der *Ntrboh D*-Transkripte und der Akkumulation von H_2O_2 während und nach einer Ozon-Exposition. Auffällig ist, dass die Maxima der Transkripte dem Verlauf der H_2O_2 -Akkumulation um etwa

30-60 min (1. Peak) bzw. 5 h (2. Peak) vorausgehen. Da jedoch von Sagi & Fluhr (2001) nachgewiesen werden konnte, dass die pflanzlichen NADPH-Oxidasen $O_2^{\cdot -}$ und nicht H_2O_2 produzieren, fehlt noch ein Bindeglied in der Kette, welches $O_2^{\cdot -}$ in H_2O_2 überführt. Dies könnte durch apoplastidäre Isoformen von Superoxiddismutase, wie z.B. für *Arabidopsis* gezeigt (Desikan et al., 1996), geschehen. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl die Existenz als auch die Induktion durch Ozon von Cu/Zn-Superoxiddismutase-Isoformen im Apoplasten von Tabak demonstriert werden (siehe Ergebnisse). Zusammengefasst erscheint es gut möglich, dass die D-Isoform der NADPH-Oxidase aus Tabak zusammen mit Superoxiddismutase-Aktivität für die Ozon-induzierte, biphasische Bildung von H_2O_2 verantwortlich ist.

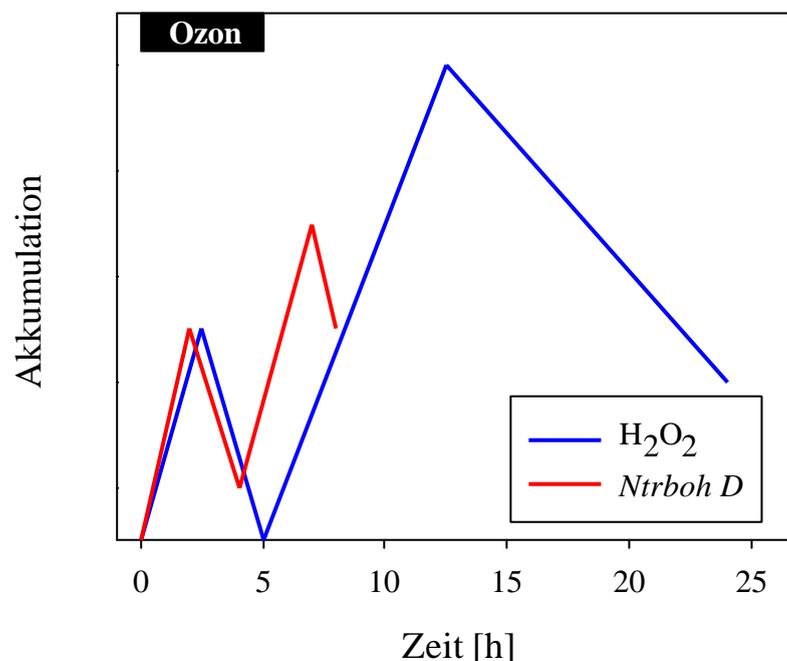


Abb. 86: Schematischer Zeitverlauf der Ozon-induzierten Akkumulation von H_2O_2 (Schraudner et al., 1998) sowie der *Ntrboh D*-Transkripte. Der schwarze Balken symbolisiert die Dauer der Ozonbehandlung.

Ein biphasischer Verlauf von NADPH-Oxidase Transkripten konnte hier erstmals nachgewiesen werden. Sowohl *Strboh B* als auch *Atrboh D* erscheinen nach Elicitorbehandlung monophasisch induziert (Desikan et al., 1998; Yoshioka et al., 2001). In diesem Zusammenhang wäre es allerdings interessant, die Transkriptmengen dieser beiden Isoformen zu zusätzlichen Zeitpunkten nach der Behandlung zu bestimmen. *Atrboh D* ist wie *Ntrboh D* schnell induzierbar und erreicht in Zellkulturen eine maximale Induktion schon ca.

1 h nach Harpin-Behandlung. Im Gegensatz dazu zeigt *Strboh B* eine relativ langsame Induktion. Eine Stunde nach Behandlung mit einem *Phytophthora infestans*-Elicitor zeigten sich nur geringe Effekte, erst zwei Stunden später konnte die maximale Transkriptmenge gemessen werden. Dagegen hatte die Elicitor-induzierte H_2O_2 -Bildung schon nach einer Stunde das erste Maximum erreicht. Unter der Voraussetzung, dass keine Induktion zwischen 0 und 1h nach der Behandlung stattfand, schließt sich damit eine Beteiligung von *Strboh B* anscheinend aus. Darüber hinaus weist in diesem System der Einsatz des Protein-Synthese-Inhibitors Cycloheximid darauf hin, dass für den ersten oxidativen Burst keine Neu-Synthese von Proteinen nötig ist: nur der zweite Peak von H_2O_2 wurde dadurch unterdrückt (Yoshioka et al., 2001). Hier könnte entweder eine konstitutiv exprimierte Isoform einer NADPH-Oxidase oder ein anderes Enzym wie z.B. eine Peroxidase (Blee et al., 2001) für den ersten Burst verantwortlich sein. Inhibitorenstudien in Elicitor-behandelten Soja-Zellkulturen zeigten, dass hier der „oxidative Burst“ völlig unabhängig von Transkription und Translation zu sein scheint (Mithöfer et al., 1997).

Bei den Northern-Analysen der *Ntrboh D* traten trotz spezifischer Hybridisierung in Proben mit höherer Expression Doppelbanden auf, so in Wurzeln und durch Ozon stark induzierten Proben. Die zweite, kleinere Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 1,9 kb könnte zum einen das Resultat eines spezifischen Abbaus der *Ntrboh D*-Transkripte sein oder aber auf ein alternatives Splicing der mRNA hinweisen. Alternatives Splicing tritt bei *Mox* (*Mox* = mitogenic oxidase), der NADPH-Oxidase in tierischen, nicht-phagocytotischen Zellen, auf und resultiert hier in einem Protein mit putativer Protonenkanal-Funktion. In *Petersilie* unterschieden sich zwei zu NADPH-Oxidasen homologe Isoformen nur in der Existenz des N-terminalen Endes mit den EF-Hand-Motiven (H. Zinecker und D. Scheel, Halle). Das kleinere Protein ohne EF-Hand-Motive könnte ebenfalls ein Splicing-Produkt der längeren Sequenz darstellen. Neueste Ergebnisse mit einer zweiten Sonde gegen *Ntrboh D* könnten auf ähnliche Befunde in Tabak hinweisen. So detektierte die im 5'-Bereich vor die EF-Hände gelegte Sonde 2 nur die etwa 3 kb große Bande, nicht die kleinere (Kscheschan und Langebartels, unveröffentlicht). Interessanterweise detektierten Sagi & Fluhr (2001) in nativen Polyacrylamidgelen für Tabak ebenfalls zwei O_2^- -produzierende Proteinbanden, während in Tomatenproben nur eine Bande nachzuweisen war.

Überraschenderweise konnte der biphasische Verlauf der Transkripte nicht nur in der Ozonempfindlichen Sorte Bel W3, sondern auch in Bel B detektiert werden. Im Gegensatz zu Bel W3 fehlt in Bel B aber der zweite Peak der H_2O_2 -Akkumulation. Möglich wäre also, dass

entweder die Transkripte der zweiten Phase nicht translatiert werden, oder aber dass das gebildete Enzym nicht aktiviert wird.

Im Gegensatz zu der D-Isoform wird *Ntrboh F* unabhängig von Ozon oder Pathogenbehandlung konstitutiv, auf geringem Niveau exprimiert oder höchstens leicht gegen Ende der Ozonexposition induziert. Damit passt sich diese Isoform gut in die Gruppe um *Lerboh 1* und *Strboh A*. Keines dieser Gene konnte signifikant in seiner Expression durch einen Elicitor aktiviert werden (Amicucci et al., 1999; Yoshioka et al., 2001).

Unlängst veröffentlichte Ergebnisse lieferten erste direkte Nachweise für die Beteiligung einer NADPH-Oxidase beim oxidativen Burst in Pflanzen. Torres et al. (2002) schalteten die beiden in *Arabidopsis* am höchsten exprimierten Isoformen der NADPH-Oxidase, *Atrboh D* und *F*, durch Insertion aus. Nach Behandlung mit avirulenten Stämmen von *Pseudomonas syringae* und *Peronospora parasitica* konnte zwar in der *atrboh F*-Mutante keine signifikante Reduktion der H_2O_2 -Bildung detektiert werden, dafür aber in der *atrbohD*-Mutante und in der *atrbohD/F*-Doppelmutante. Hier wurde die H_2O_2 -Bildung auf das Niveau von Kontrollpflanzen gesenkt. Die Autoren postulieren schlussfolgernd, dass *Atrboh D* für den größten Teil der während des oxidativen Bursts produzierten reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich ist, während *Atrboh F* nur einen geringen Teil dazu beiträgt. Erstaunlicherweise hatte das Ausschalten von *Atrboh D*, gleichbedeutend mit einer drastischen Reduktion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, keinen signifikanten Einfluss auf den Zelltod in den *atrbohD*-Mutanten. Dagegen zeigte die *atrbohF*-Mutante ein von dem infizierenden Pathogen abhängiges Auftreten von Zelltod. Während bei der Doppelmutante *atrbohD/F* nach *Pseudomonas*-Infektion der Zelltod verringert wurde, resultierte die Behandlung von *atrbohF* und *atrbohD/F* mit dem schwach avirulentem Pathogen *Peronospora parasitica* Emco5 in verstärkter HR. Die Autoren vermuten, dass die trotz Reduktion der H_2O_2 -Bildung verstärkte HR auf das von Delledonne et al. (2001) beschriebene Zusammenspiel von H_2O_2 mit NO zurückzuführen ist, wonach ein bestimmtes Gleichgewicht zwischen den beiden Sauerstoffverbindungen herrschen muss, um Zelltod zu induzieren (Diskussion Abschnitt 2.3). Es bleibt zu überprüfen, ob in Ozon-behandelten Tabakpflanzen mit ausgeschalteter *Ntrboh D* bzw. *F* ähnliche Ergebnisse auftreten.

Die Expression der Isoform *Ntrboh D* in Tabak kann nicht nur durch Ozon- und Pathogen-Stress, sondern auch durch reaktive Sauerstoffspezies wie O_2^- und H_2O_2 induziert werden. Dies zeigte sich in Versuchen nach Infiltration von Xanthin/Xanthin-Oxidase, Glucose/Glucose-Oxidase und einer 10mM H_2O_2 -Lösung (Abb. 78). Die Induktionsfaktoren betragen hier jedoch nur 2 und 3, wobei die stärkste Induktion durch das Enzymprodukt O_2^-

erfolgte. Eine schwache Induktion durch H_2O_2 erhielten Desikan et al. (1998) ebenfalls für *Ntrboh D*. Dies zeigt, dass auch auf Transkriptebene reaktive Sauerstoffspezies in einem selbstamplifizierenden Mechanismus arbeiten können. Im Gegensatz dazu berichten Yoshioka et al. (2001), dass eine H_2O_2 -Infiltration keinen Einfluss auf die Genexpression von *Strboh B* hatte. Eventuell kann dies, zusammen mit der zu den beiden D-Isoformen aus Tabak und *Arabidopsis* unterschiedlichen Induktionskinetik nach Stressbehandlung, auf eine unterschiedliche Regulation deuten.

Zum ersten Mal konnte in der vorliegenden Arbeit die Induzierbarkeit der Genexpression einer pflanzlichen NADPH-Oxidase durch NO demonstriert werden. So führte die Infiltration des NO-Donors Natriumnitroprussid in Tabak zu einer Verdopplung der Transkriptmenge der Isoform D. Damit könnte sich ein neuer Bereich im Netz der Signalmoleküle offenbaren. NO aktiviert nicht nur die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies auf Enzymebene über Hemmung der Catalase und über Calcium, sondern induziert ebenfalls die Expression der ROS-bildenden Enzyme.

Bei den Infiltrationsversuchen wurde die Induktion der Genexpression jeweils auf mit Wasser infiltrierte Kontrollpflanzen bezogen. Reproduzierbar führte jedoch schon die Kontrollinfiltration gegenüber unbehandelten Pflanzen zu einer verstärkten Akkumulation der *Ntrboh D*-Transkripte. Damit handelt es sich bei *Ntrboh D* um eine eventuell schon durch mechanischen Einfluss sehr leicht induzierbare Isoform.

Eine Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms war nicht in der Lage, die Elicitor-induzierte Akkumulation von *Strboh B* zu hemmen (Yoshioka et al., 2001). Dagegen zeigen zahlreiche Arbeiten, dass eine Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies abhängig von Ca^{2+} und Protein-Kinasen bzw. ATP ist (Desikan et al., 1996; Doke & Miura, 1995; Jabs et al., 1997). Ca^{2+} scheint bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase Enzym-Aktivität eine Rolle zu spielen. Dieses Kation könnte die Aktivität der Oxidase durch Bindung an die EF-Hand-Motive beeinflussen. An einer Regulation der Enzymaktivität könnte auch das G-Protein Rac beteiligt sein. Mit Hilfe von Antikörpern konnte die Elicitor-induzierte Translokation von Rac zu Membranen während des oxidativen Bursts gezeigt werden (Park et al., 2000). In der gleichen Arbeit wird auch beschrieben, dass die transiente Transformation von Soja-Zellkulturen mit einer dominant-negativen oder dominant-positiven Form von Rac nach verschiedenen Stimuli zu einer verringerten bzw. verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt.

Zusammengefasst erscheint in Pflanzen die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch ein zu der menschlichen Untereinheit gp91phox homologes Protein nach Aktivierung durch Pathogen-

/Elicitorbehandlung oder Ozonexposition auch ohne cytosolische Komponenten wahrscheinlich (Abb. 4). Darauf weisen die mittels Polyacrylamidgelen in pflanzlichen Mikrosomen und Membranpräparationen detektierten NADPH-Oxidase-Aktivitäten von Sagi & Fluhr (2001) sowie von S. Kschieschan und C. Langebartels (GSF Neuherberg, unveröffentlicht) hin. Darüber hinaus genügte die heterologe Expression in Hefe eines zu gp91phox homologen Proteins aus Petersilie zur Bildung von $O_2^{\cdot-}$ (H. Zinecker und D. Scheel, unveröffentlicht). Abb. 87 zeigt potentielle Aktivierungsmechanismen der putativen NADPH-Oxidase. Sowohl eine Pathogen- oder Elicitorbehandlung (Ebel & Mithöfer, 1998) als auch eine Ozonexposition führen zu verstärktem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Dieses kann direkt oder indirekt über Proteinkinasen die Aktivierung von putativen NADPH-Oxidasen bewirken.

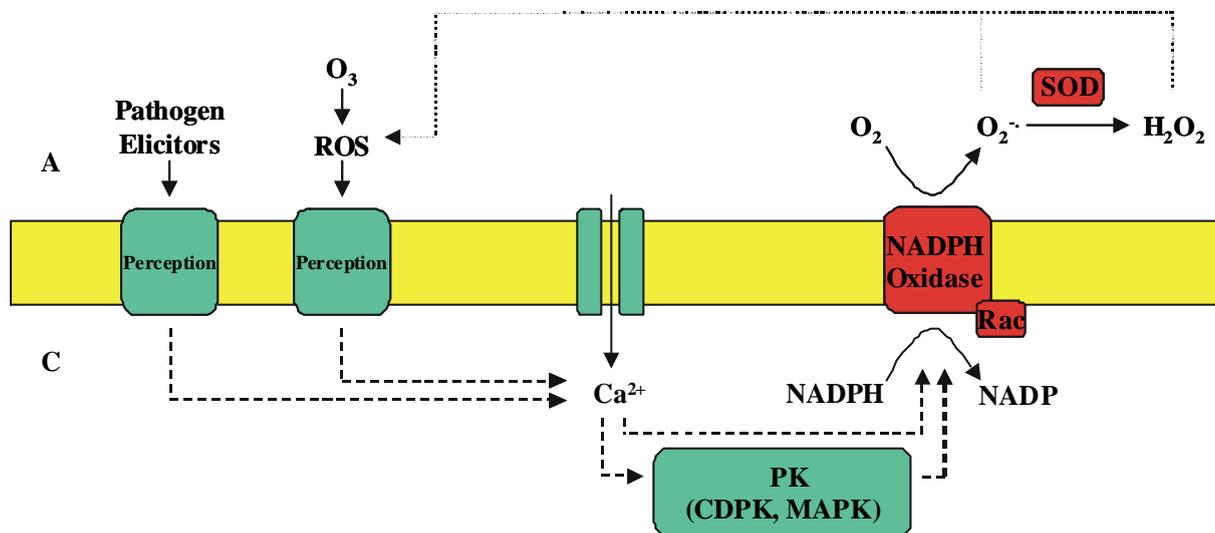


Abb. 87: Schematisches Modell der Aktivierung einer putativen NADPH-Oxidase zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Pathogen-/Elicitorbehandlung und Ozonexposition in Pflanzen. A = Apoplast, C = Cytosol, PK = Proteinkinase, CDPK = Calcium-abhängige Proteinkinase, MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase.

Eine Ozon-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch eine NADPH-Oxidase, insbesondere der Isoform Ntrboh D, in Tabak, gefolgt von einer Dismutation von $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 durch Cu/Zn-Superoxiddismutase, scheint die Effekte einer Ozonexposition zu amplifizieren (Abb. 87). Daten zu Enzymaktivitäten müssen jedoch weitere Erkenntnisse liefern, unter anderem darüber, ob der erste Peak der ROS-Akkumulation enzymatischen Ursprungs oder aus der Transformation von Ozon stammt. Native Polyacrylamid-Gele zeigen die Existenz von zwei Aktivitätsbanden in mikrosomalen Fraktionen Ozon-behandelter Tabakpflanzen (S. Kschieschan und C. Langebartels, unveröffentlicht). Die Beteiligung anderer, reaktive Sauerstoffspezies-bildender Enzyme am oxidativen Burst kann jedoch nicht ausgeschlossen

werden. So vermuten z.B. Mithöfer et al. (1997), dass die nur teilweise Unterdrückung des oxidativen Bursts in Soja-Zellkulturen durch DPI mit der Existenz weiterer Enzyme zusammenhängt. Auch könnten Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzenarten oder aber zwischen verschiedenen Behandlungen einer Pflanze in der ROS-Bildung bestehen und damit erklären, weshalb hauptsächlich H_2O_2 , O_2^- oder aber beides detektiert werden kann. Von zwei unterschiedlichen Quellen der ROS-Produktion in Abhängigkeit des Elicitors in Epidermis-Zellen von Tabak berichten Allan & Fluhr (1997). In Birke sprechen Experimente mit Inhibitoren für die Beteiligung einer NADPH-Oxidase sowie von Zellwand-Peroxidasen an der Ozon-induzierten H_2O_2 -Bildung (Pellinen et al., 1999).

Vor allem bleibt im Moment die Frage offen, was letztendlich den Unterschied zwischen der Ozon-toleranten Sorte Bel B und der empfindlichen Sorte Bel W3 ausmacht. Hier gilt es besonders, die Regulation der Enzym-Aktivität zu untersuchen. Eventuell unterbleibt in der Tabaksorte Bel B der Enzym-aktivierende Einstrom von Ca^{2+} oder es finden keine Phosphorylierungsprozesse durch spezifische Kinasen statt (Abb. 87). In Frage kämen hierfür z.B. Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPK, Romeis et al., 2000) oder Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK; Samuel et al., 2000). Auch eine potentielle Rolle der Signalmoleküle Ethylen, NO und Salicylsäure bei der enzymatischen Aktivierung einer NADPH-Oxidase muss unbedingt geprüft werden. So waren Ozon-sensitive Pflanzen gegenüber toleranten Sorten u. a. durch die verstärkte Akkumulation dieser Signalsubstanzen gekennzeichnet.

Weitere Arbeiten sollten die Analyse der Ozonempfindlichkeit transgener Pflanzen umfassen. Heterologe Expression der Isoformen *Ntrboh D* und *F* könnten den Nachweis erbringen, dass diese Proteine tatsächlich reaktive Sauerstoffspezies bilden. Untersuchungen zur Lokalisation der Genexpression, z.B. durch *in situ* RT-PCR-Experimente in Gewebe-Schnitten (Koltai & Bird, 2000), und der Proteinakkumulation im Gewebe könnten eventuell das Muster der ROS-Akkumulation erklären.

Durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde aber auch deutlich, dass reaktive Sauerstoffspezies alleine nicht zu Zelltod führen, sondern in einem Netzwerk mit anderen Signalmolekülen wie NO, Salicylsäure und Ethylen wirken. Dabei herrschen vor allem zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und NO bzw. ROS und Salicylsäure amplifizierende Rückkopplungsschleifen, für deren Unterbrechung Jasmonsäure zuständig sein könnte.

Nach den Befunden der vorliegenden Arbeit werden Ozoneffekte in empfindlichen Pflanzen durch pflanzeigene Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies verstärkt. Die Bildung und Akkumulation dieser Sauerstoffspezies geht dabei dem Zelltod voraus und ist an der Induktion eines Zelltodprogramms beteiligt. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche

Mechanismen zur Auslösung der Amplifikation von reaktiven Sauerstoffspezies und zur Induktion von Zelltod bei Ozon-sensitiven im Gegensatz zu toleranten Pflanzen führen.

V. Zusammenfassung

1.) Die weltweit als Bioindikator für den Luftschadstoff Ozon eingesetzte **Tabaksorte Bel W3** reagiert mit typischen pergamentartigen Läsionen auf sommerliche Ozonwerte in Mitteleuropa. Es konnte demonstriert werden, dass eine Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vor allem H_2O_2 , der Ozoninduktion von Zelltod vorausgeht, wobei die Orte der H_2O_2 -Akkumulation („Burst initiation sites“) mit denen der späteren Läsionen sehr gut korrelierten. Histologische Untersuchungen zeigten, dass dieser „oxidative Burst“ zunächst in den Zellen des Palisadenparenchyms, und zwar in Clustern in der Nähe von Blattadern, erfolgte.

2.) Bei einem **Vergleich Ozon-empfindlicher Arten, Sorten und Ökotypen von Nutz- und Wildpflanzen** zeigten sich deutliche Unterschiede in der Art der vorwiegend akkumulierten ROS. In neun Tomatensorten wurde H_2O_2 -Akkumulation detektiert, wobei die Intensität mit der Ozonempfindlichkeit der Sorten korrelierte. In zehn Ökotypen von *Arabidopsis thaliana* L. ließ sich neben H_2O_2 vor allem O_2^- detektieren, wobei O_2^- mit dem Muster und der Quantität der Schäden korrelierte. Bei den Ozon-empfindlichen Wildpflanzen *Rumex crispus* L., *R. obtusifolius* L. und *Malva sylvestris* L. konnte ausschließlich O_2^- nachgewiesen werden. Blattquerschnitte der letztgenannten Pflanzenart erbrachten deutliche Unterschiede zu der Tabaksorte Bel W3: Obwohl beide Pflanzenarten amphistomatäre Blätter besitzen, konnte O_2^- zuerst in den Zellen des Schwammparenchyms detektiert werden. In allen Fällen erfolgte das Auftreten von Ozon-induziertem Zelltod verstärkt entlang der Blattadern; Bereiche des Zelltodes korrelierten jeweils mit vorheriger Akkumulation von ROS.

3.) In **Freilandversuchen** konnte zum ersten Mal die Ozon-induzierte Akkumulation von ROS vor dem Auftreten von Blattsymptomen in Wild- und Kulturpflanzen gezeigt werden. Berechnungen der kritischen Grenzwerte für Ozon (AOT40) ergaben, dass der zur Zeit für Kulturpflanzen und natürliche Vegetationen vorgegebene Wert von $3000 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}$ für empfindliche Pflanzen wie die Tabaksorte Bel W3 zu hoch angesetzt ist.

4.) Täglich **wiederkehrende Ozonexposition** in Freiland- und Kammerversuchen führten in der Tabaksorte Bel W3 zu einer Akkumulation von H_2O_2 um schon bestehende Läsionen herum und daraus resultierend zu deren Vergrößerung. Es ist anzunehmen, dass existierende Bereiche pflanzlichen Zelltods die Nachbarzellen für ROS-Akkumulation und Zelltod

empfindlicher machen. Als Verstärkungsfaktoren kommen erhöhte Produktionsraten von Ethylen, NO und Salicylsäure in Betracht. Entsprechend korrelierten die Gehalte der Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure und Salicylsäure mit Ozon-induziertem Zelltod. Erstmals konnte eine Ozon-induzierte Akkumulation des pflanzlichen Signalstoffs NO nachgewiesen werden. Dessen Produktion erfolgte in Ozon-behandelten Blättern der Tabaksorte Bel W3 zum gleichen Zeitpunkt und mit sehr ähnlichem Muster, nämlich besonders in Palisadenparenchymzellen entlang Blattadern, wie H_2O_2 , so dass beide Signalmoleküle bei der Ausprägung pflanzlichen Zelltods kooperieren könnten.

5.) Das Auftreten erhöhter ROS-Gehalte nach Ende der Ozonexposition sowie die Hemmung der ROS-Akkumulation und Ozon-induzierten Zelltods durch Enzym-Inhibitoren weisen auf eine **aktive *in planta* Bildung von ROS** in Ozon-empfindlichen Pflanzen hin. Als ROS-produzierende Enzyme kommen dabei verschiedene Oxidasen und Peroxidasen in Betracht. Zunächst wurde eine Beteiligung von Oxalatoxidase-Aktivität an dem Ozon-induzierten „oxidativen Burst“ für Tabak ausgeschlossen.

6.) Erstmals gelang der **Nachweis zweier homologer Gene in Tabak zu der $O_2^{\cdot-}$ -produzierenden NADPH-Oxidase** (gp91phox) aus Makrophagen von Säugern. Beide Isoformen wurden kloniert; sie wurden in Anlehnung an die entsprechenden Isoformen in *A. thaliana* als *Ntrboh* (*N. tabacum* respiratory burst oxidase homologue) *D* und *F* bezeichnet. Die Sequenzen enthielten die für die Aktivität der NADPH-Oxidase wichtigen FAD-, NADPH Adenin- und NADPH Ribose-Bindungsstellen sowie konservierte Histidin-Reste für die Häm-Bindung. Wie die bisher veröffentlichten pflanzlichen NADPH-Oxidasen fanden sich in *Ntrboh D* und *F* N-terminale Verlängerungen mit zwei EF-Hand-Motiven, die als putative Ca^{2+} -Bindungsstellen gelten.

7.) Während *Ntrboh F* in allen Geweben konstitutiv exprimiert wurde, zeigte sich die Isoform *Ntrboh D* in ihrer Expression abhängig vom Gewebe. Ozonbehandlung führte zu einer biphasischen **Induktion der Expression von *Ntrboh D*** in Blättern der Sorte Bel W3 mit Maxima nach 2 und 6 h nach Beginn der Exposition. Maximale Transkriptgehalte wurden durch einmalige Exposition mit 200 nl l^{-1} Ozon induziert, höhere Ozondosen brachten keine weitere Steigerung. Auch in der Ozon-toleranten Sorte Bel B ergab sich ein zu Bel W3 sehr ähnlicher biphasischer Verlauf der Transkript-Akkumulation. Die Isoform *Ntrboh F* zeigte in einigen Versuchen eine leicht erhöhte Expression gegen Ende und nach der Ozonexposition,

also zeitlich zusammen mit dem Auftreten des zweiten Peaks der ROS-Bildung. Infiltration mit einem avirulenten Pathogen-Stamm (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) bewirkte eine der Ozoninduktion vergleichbare Transkriptakkumulation von *Ntrboh D*.

In der Apoplastenflüssigkeit von Tabakblättern fanden sich Isoformen von **Superoxiddismutase (SOD)**, die durch Ozon in ihrer Aktivität induziert waren.

8.) Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Ozoneffekte in empfindlichen Pflanzen durch die pflanzeigene Produktion von ROS verstärkt werden. ROS sind dabei an der Induktion eines Zelltodprogramms beteiligt. Es wird postuliert, dass die Ozoninduktion von Homologen der NADPH-Oxidase aus Säugern zusammen mit SOD für die Ozon-induzierte H₂O₂-Akkumulation und die extrem hohe Empfindlichkeit der Tabaksorte Bel W3 verantwortlich ist. Weitere Untersuchungen auf Protein- und Enzymaktivitätsebene müssen zeigen, welche Mechanismen für die Auslösung dieser Induktion in Bel W3, nicht aber in Ozon-toleranten Nutz- und Wildpflanzen, verantwortlich sind.

VI. Literaturverzeichnis

- Allan, A. C. & Fluhr, R. (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, **9**, 1559-1572.
- Allen, R. D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol*, **107**, 1049-1054.
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. & Ecker, J. R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, **284**, 2148-2152.
- Alvarez, M. E. (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol*, **44**, 429-442.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, **92**, 773-784.
- Amicucci, E., Gaschler, K. & Ward, J. M. (1999). NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and curly-leaf pondweed (*Potamogeton crispus*). *Plant Biol*, **1**, 524-528.
- Apostol, I., Heinstein, P. F. & Low, P. S. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol*, **90**, 109-116.
- Asada, K. (1997). The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. In *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, ed. J. G. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, pp. 715-735.
- Babior, B. M. (1999). Protein phosphorylation and the activation of the leukocyte NADPH oxidase. In *Different pathways through life*, eds. A. Denke, K. Dornisch, F. Fleischmann & e. al., Lincom. München, pp. 72-82.
- Bae, G. Y., Nakajima, N., Ishizuka, K. & Kondo, N. (1996). The role in ozone phytotoxicity of the evolution of ethylene upon induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by ozone fumigation in tomato plants. *Plant Cell Physiol*, **37**, 129-134.
- Baker, C. & Orlandi, E. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol*, **33**, 299-321.
- Banfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demarex, N. & Krause, K. H. (2000). A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science*, **287**, 138-142.
- Barnes, J., Bender, J., Lyons, T. & Borland, A. (1999). Natural and man-made selection for air pollution resistance. *J Exp Bot*, **50**, 1423-1435.
- Barroso, J. B., Corpas, F. J., Carreras, A., Sandalio, L. M., Valderrama, R., Palma, J. M., Lupiáñez, J. A. & del Rio, L. A. (1999). Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem*, **274**, 36729-36733.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287.
- Beers, E. P. & McDowell, J. M. (2001). Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 561-567.
- Beligni, M. V. & Lamattina, L. (2001). Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends in Plant Science*, **6**, 508-509.
- Bellés, J. M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J. & Conejero, V. (1999). Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol Plant Microbe Interact*, **12**, 227-235.

- Berger, S. (2002). Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta*, **214**, 497-504.
- Bergmann, E., Bender, J. & Weigel, H. J. (1999). Ozone threshold doses and exposure-response relationships for the development of ozone injury symptoms in wild plant species. *New Phytol*, **144**, 423-435.
- Bergmann, E., Bender, J. & Weigel, H. J. (1998). *Zur Ozonempfindlichkeit von Wildpflanzen*. Verlag Agrarökologie, Bern.
- Berna, A. & Bernier, F. (1997). Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein. *Plant Mol Biol*, **33**, 417-429.
- Berna, A. & Bernier, F. (1999). Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme. *Plant Mol Biol*, **39**, 539-549.
- Bernier, F. & Berna, A. (2001). Germins and germin-like proteins: Plants do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiol Biochem*, **39**, 545-554.
- Bethke, P. C. & Jones, R. L. (2001). Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant J*, **25**, 19-29.
- Bi, Y.-M., Kenton, P., Mur, L., Darby, R. & Draper, J. (1995). Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J*, **8**, 235-245.
- Blee, K. A., Jupe, S. C., Richard, G., Zimmerlin, A., Davies, D. R. & Bolwell, G. P. (2001). Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Mol Biol*, **47**, 607-620.
- Bolwell, G. P. (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 287-294.
- Bolwell, G. P., Butt, V. S., Davies, D. R. & Zimmerlin, A. (1995). The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research*, **23**, 517-532.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. & Saran, M. (1992). Structural principles of flavonoid antioxidants. In *Free Radicals and the Liver*, eds. G. Csomó & J. Fehér, Springer. Berlin, pp. 77-95.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. & Stettmaier, K. (1996). Flavonoids and polyphenols: Chemistry and biology. In *Handbook of Antioxidants*, eds. E. Cadenas & L. Packer, Marcel Dekker. New York, pp. 409-466.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. & Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Science*, **140**, 103-125.
- Bowles, D. (1992). Signals in the wounded plant. In *Pests and pathogens - Plant responses to foliar attack*, ed. P. G. Ayres, BIOS. Oxford, pp. 33-38.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bringezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I. & Neumann, D. (1999). Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *J Plant Physiol*, **154**, 536-546.
- Carter, C., Graham, R. A. & Thornburg, R. W. (1999). Nectarin I is a novel, soluble germin-like protein expressed in the nectar of *Nicotiana* sp. *Plant Mol Biol*, **41**, 207-216.
- Carter, C. & Thornburg, R. W. (2000). Tobacco Nectarin I. Purification and characterization as a germin-like, manganese superoxide dismutase implicated in the defense of floral reproductive tissues. *J Biol Chem*, **275**, 36726-36733.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Camp, W. (1998). Defense activation and enhanced

- pathogen tolerance induced by H_2O_2 in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5818-5823.
- Chang, C. & Shockey, J. A. (1999). The ethylene-response pathway: Signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 352-358.
- Chen, Z., Silva, H. & Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, **262**, 1883-1886.
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D. A. & Klessig, D. F. (2000). Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 1380-1384.
- Conklin, P. L., Saracco, S. A., Norris, S. R. & Last, R. L. (2000). Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics*, **154**, 847-856.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B. & del Rio, L. A. (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science*, **6**, 145-150.
- Dat, J., Vandenameele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 779-795.
- Dat, J. F., Foyer, C. H. & Scott, I. M. (1998). Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol*, **118**, 1455-1461.
- Davison, A. W. & Barnes, J. D. (1998). Effects of ozone on wild plants. *New Phytol*, **139**, 135-151.
- De Deken, X., Wang, D., Many, M. C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J. E. & Miot, F. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*, **275**, 23227-23233.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, **394**, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. & Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 13454-13459.
- Desikan, R., A-H-Mackerness, S., Hancock, J. T. & Neill, S. J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiol*, **127**, 159-172.
- Desikan, R., Burnett, E. C., Hancock, J. T. & Neill, S. J. (1998). Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91-phox in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J Exp Bot*, **49**, 1767-1771.
- Desikan, R., Hancock, J. T., Coffey, M. J. & Neill, S. J. (1996). Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett*, **382**, 213-217.
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J. T. & Neill, S. J. (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J*, **330**, 115-120.
- Dierkesmann, R. & Sandermann, H. (2000). Wirkung von Ozon auf Menschen und Pflanzen. *Promet*, **26**, 151-161.
- Doke, N. (1983). Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol Plant Pathol*, **23**, 345-357.
- Doke, N. (1985). NADPH-dependent oxygen generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol*, **27**, 311-322.
- Doke, N. & Miura, Y. (1995). *In vitro* activation of NADPH-dependent O_2^- generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an

- elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiol Mol Plant Pathol*, **46**, 17-28.
- Doke, N. & Ohashi, Y. (1988). Involvement of a superoxide anion generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol Mol Plant Pathol*, **32**, 163-175.
- Dollard, G., Fowler, D., Smith, R. I., Hejllbrekke, A. G., Uhse, K. & Wallasch, M. (1995). Ozone measurements in Europe. *Water Air Soil Pollut*, **85**, 1949 - 1954.
- Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B. & Kauffmann, S. (1999). Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiol*, **121**, 163-172.
- Draper, J. (1997). Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant Sci*, **2**, 162-166.
- Drew, M. C., He, C.-J. & Morgan, P. W. (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science*, **5**, 123-127.
- Dumas, B., Freyssinet, G. & Pallett, K. E. (1995). Tissue-Specific Expression of Germin-Like Oxalate Oxidase during Development and Fungal Infection of Barley Seedlings. *Plant Physiol*, **107**, 1091-1096.
- Dunwell, J. M., Khuri, S. & Gane, P. J. (2000). Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: Conservation of structure and diversification of function during evolution of the Cupin superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 153-179.
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M.-S., Dème, D. & Virion, A. (1999). Purification of a Novel Flavoprotein Involved in the Thyroid NADPH Oxidase. *J Biol Chem*, **274**, 37265-37269.
- Durner, J. & Klessig, D. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 11312-11316.
- Durner, J. & Klessig, D. F. (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 369-374.
- Durner, J., Shah, J. & Klessig, D. F. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci*, **2**, 266-274.
- Durner, J., Wendehenne, D. & Klessig, D. F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 10328-10333.
- Ebel, J. & Mithöfer, A. (1998). Early events in the elicitation of plant defense responses. *Planta*, **206**, 335-348.
- Elstner, E. F. (1990). *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. B I Wissenschaftsverlag, Mannheim/Wien/Zürich.
- Elstner, E. F., Osswald, W. & Youngman, R. J. (1985). Basic mechanisms of pigment bleaching and loss of structural resistance in spruce (*Picea abies*) needles: advances in phytomedical diagnostics. *Experientia*, **41**, 591-597.
- Enquete Kommission "Schutz der Erdatmosphäre" des deutschen Bundestages (1995). *Mehr Zukunft für die Erde. Nachhaltige Energiepolitik für dauerhaften Klimaschutz*. Economica Verlag, Bonn.
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z. & Ben-Hayyim, G. (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant*, **100**, 234-240.
- Fath, A., Bethke, P. C., Belligni, M. V., Spiegel, Y. N. & Jones, R. L. (2001). Signalling in the cereal aleurone: Hormones, reactive oxygen and cell death. *New Phytol*, **151**, 99-107.

- Federico, R., Leone, L., Botta, M., Binda, C., Angelini, R., Venturini, G. & Ascenzi, P. (2001). Inhibition of pig liver and *Zea mays* L. polyamine oxidase: a comparative study. *J Enzyme Inhib*, **16**, 147-155.
- Finegold, A. A., Shatwell, K. P., Segal, A. w., Klausner, R. D. & Dancis, A. (1996). Intramembrane bis-hem motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH-Oxidase. *J Biol Chem*, **271**, 31021-31024.
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C. & Durner, J. (2000). *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J*, **23**, 817-824.
- Foyer, C. H., Lelandais, M. & Kunert, K. J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant*, **92**, 696-717.
- Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F. & Scott, I. M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant*, **100**, 241-254.
- Freeman, J. L. & Lambeth, J. D. (1996). NADPH oxidase activity is independent of p47^{phox} *in vitro*. *J Biol Chem*, **271**, 22578-22582.
- Fuhrer, J. & Achermann, B. (1994). Critical levels for ozone - a UN-ECE workshop report. *FAC Schriftenreihe (Eidgenössische Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene, Bern)*, **16**, 1-328.
- Fuhrer, J. & Achermann, B. (1999). Critical levels for ozone - Level II, Swiss Agency for the Environment, Forests and Landscape. Bern.
- Gabig, T. G., Crean, C. D., Mantel, P. L. & Rosli, R. (1995). Function of Wild-Type or Mutant Rac2 and Rap1a GTPases in Differentiated HL60 Cell NADPH Oxidase Activation. *Blood*, **85**, 804-811.
- Goyal, L., Thakur, M. & Pundir, C. S. (1999). Purification and properties of a membrane bound oxalate oxidase from *Amaranthus* leaves. *Plant Science*, **142**, 21-28.
- Grant, J. J. & Loake, G. J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol*, **124**, 21-29.
- Gregersen, P. L., Thordal-Christensen, H., Förster, H. & Collinge, D. B. (1997). Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (syn. *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Physiol Mol Plant Pathol*, **51**, 85-97.
- Groom, Q. J., Torres, M. A., Fordham-Skelton, A. P., Hammond-Kosack, K. E., Robinson, N. J. & Jones, J. D. G. (1996). *rbohA*, a rice homologue of the mammalian *gp91phox* respiratory burst oxidase gene. *Plant J*, **10**, 515-522.
- Guderian, R. (1985). Air pollution by photochemical oxidants. Formation, transport, control and effects on plants. In *Ecological Studies*, Vol. 52, Springer. Berlin.
- Günthardt-Goerg, M., McQuattie, C., Scheidegger, C., Rhiner, C. & Matyssek, R. (1997). Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell walls. *Can J For Res*, **27**, 453-463.
- Heath, R. L. & Taylor, G. E. (1997). Physiological processes and plant responses to ozone exposure. In *Forest decline and ozone: A comparison of controlled chamber and field experiments. Ecol. Studies Vol. 127*, eds. H. Sandermann, A. R. Wellburn & R. L. Heath, Springer. Berlin, pp. 317-368.
- Heggestad, H. E. (1991). Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environ Pollut*, **74**, 264-291.
- Heggestad, H. E. & Middleton, J. T. (1959). Ozone in high concentrations as cause of tobacco leaf injury. *Science*, **129**, 208-210.
- Heiden, A. C., Hoffmann, T., Kahl, J., Kley, D., Klockow, D., Langebartels, C., Mehlhorn, H., Sandermann, H., Schraudner, M., Schuh, G. & Wildt, J. (1999). Emission of volatile organic compounds from ozone-exposed plants. *Ecol Appl*, **9**, 1160-1167.

- Heintzen, C., Fischer, R., Melzer, S., Kappeler, S., Apel, K. & Staiger, D. (1994). Circadian oscillations of a transcript encoding a germin-like protein that is associated with cell walls in young leaves of the long-day plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiol*, **106**, 905-915.
- Henderson, L. & Chappell, J. (1996). NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta*, **1273**, 87-107.
- Herbert, R. J., Vilhar, B., Evett, C., Orchard, C. B., Rogers, H. J., Davies, M. S. & Francis, D. (2001). Ethylene induces cell death at particular phases of the cell cycle in the tobacco TBY-2 cell line. *J Exp Bot*, **52**, 1615-1623.
- Hill, A. C., Pack, M. R., Treshow, M., Downs, R. J. & Transtrum, L. G. (1961). Plant injury induced by ozone. *Phytopathology*, **51**, 356-363.
- Hippeli, S. & Elstner, E. F. (1996). Mechanisms of oxygen activation during plant stress: Biochemical effects of air pollutants. *J Plant Physiol*, **148**, 249-257.
- Hippeli, S., Heiser, I. & Elstner, E. F. (1999). Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiol Biochem*, **37**, 167-178.
- Hock, B. & Elstner, E. F. (1995). *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum, Heidelberg.
- Hoigné, J. & Bader, H. (1983). Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water. II. Dissociating organic compounds. *Water Res*, **17**, 185-194.
- Horemans, N., Foyer, C. & Asard, H. (1999). The functions of ascorbate and ascorbate transport systems in plant membranes. In *Different pathways through life*, eds. A. Denke, K. Dornisch, F. Fleischmann & e. al., Lincom. München, pp. 217-238.
- Houot, V., Etienne, P., Petitot, A. S., Barbier, S., Blein, J. P. & Suty, L. (2001). Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *J Exp Bot*, **52**, 1721-1730.
- Hutzler, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T. P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, M., Weissenböck, G. & Schnitzler, J. P. (1998). Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot*, **49**, 953-965.
- Ichinose, Y., Andi, S., Doi, R., Tanaka, R., Taguchi, F., Sasabe, M., Toyoda, K., Shiraishi, T. & Yamada, T. (2001). Generation of hydrogen peroxide is not required for harpin-induced apoptotic cell death in tobacco BY-2 cell suspension culture. *Plant Physiol Biochem*, **39**, 771-776.
- Jabs, T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol*, **57**, 231-245.
- Jabs, T., Dietrich, R. A. & Dangel, J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, **273**, 1853-1856.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 4800-4805.
- Johnson, P. R. & Ecker, J. R. (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu Rev Genet*, **32**, 227-254.
- Kärenlampi, L. & Skärby, L. (1996). Critical levels for ozone in Europe: Testing and finalizing the concepts. UN-ECE workshop report, University of Kuopio. Kuopio.
- Karpinska, B., Karlsson, M., Schinkel, H., Streller, S., Süß, K.-H., Melzer, M. & Wingsle, G. (2001). A Novel Superoxide Dismutase with a High Isoelectric Point in Higher Plants. Expression, Regulation, and Protein Localization. *Plant Physiol*, **126**, 1668-1677.
- Kawano, T., Sahashi, N., Takahashi, K., Uozumi, N. & Muto, S. (1998). Salicylic Acid Induces Extracellular Superoxide Generation Followed by an Increase in Cytosolic

- Calcium Ion in Tobacco Suspension Culture: The Earliest Events in Salicylic Acid Signal Transduction. *Plant Cell Physiol*, **39**, 721-730.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H. & Shimamoto, K. (1999). The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 10922-10926.
- Keller, T., Damude, H. G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell*, **10**, 255-266.
- Kieber, J. J. (1997). The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**, 277-296.
- Kiefer, E., Heller, W. & Ernst, D. (2000). A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol Biol Rep*, **18**, 33-39.
- Kieffer, F., Simon-Plas, F., Maume, B. F. & Blein, J. P. (1997). Tobacco cells contain a protein, immunologically related to the neutrophil small G protein Rac2 and involved in elicitor-induced oxidative burst. *FEBS Lett*, **403**, 149-153.
- Kley, D., Kleinman, M., Sandermann, H. & Krupa, S. (1999). Photochemical oxidants: State of the science. *Environ Pollut*, **100**, 19-42.
- Kliebenstein, D. J., Monde, R. A. & Last, R. L. (1998). Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol*, **118**, 637-650.
- Knoester, M., Van Loon, L. C., Van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J. F. & Linthorst, H. J. M. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 1933-1937.
- Koltai, H. & Bird, D. M. (2000). High Throughput Cellular Localization of Specific Plant mRNAs by Liquid-Phase in Situ Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction of Tissue Sections. *Plant Physiol*, **123**, 1203-1212.
- Koukol, J. & Dugger, W. M. (1967). Anthocyanin formation as a response to ozone and smog treatment in *Rumex crispus* L. *Plant Physiol*, **42**, 1023-1024.
- Krupa, S., Nosal, M. & Legge, A. (1994). Ambient ozone and crop loss: Establishing a cause-effect relationship. *Environ Pollut*, **83**, 269-276.
- Lacomme, C. & Santa Cruz, S. (1999). Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 7956-7968.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lam, E. & del Pozo, O. (2000). Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol*, **44**, 417-428.
- Lamb, C. & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**, 251-275.
- Lane, B., Cuming, A., Frégeau, J., Carpita, N., Hurkman, W., Bernier, F., Dratewka-Kos, E. & Kennedy, T. (1992). Germin isoforms are discrete temporal markers of wheat development. *Eur J Biochem*, **209**, 961-969.
- Lane, B. G. (1994). Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *Faseb J*, **8**, 294-301.
- Lane, B. G., Dunwell, J. M., Ray, J. A., Schmitt, M. R. & Cuming, A. C. (1993). Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J Biol Chem*, **268**, 12239-12242.
- Langebartels, C., Ernst, D., Kangasjärvi, J. & Sandermann, H. (2000). Ozone effects on plant defense. *Meth Enzymol*, **319**, 520-535.
- Langebartels, C., Kerner, K., Leonardi, S., Schraudner, M., Trost, M., Heller, W. & Sandermann, H. (1991). Biochemical plant responses to ozone. I. Differential

- induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol*, **95**, 882-889.
- Langebartels, C. & Sandermann, H. (1999). Ozone sensitivity of the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. In *Different Pathways through Life. Biochemical Aspects of Plant Biology and Medicine*, eds. A. Denke, K. Dornisch & F. Fleischmann, Lincom Europa. München, pp. 319-331.
- Langebartels, C., Schraudner, M., Heller, W., Ernst, D. & Sandermann, H. (2002). Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In *Oxidative stress in Plants*, eds. D. Inzé & M. Van Montagu, Taylor & Francis. London, pp. 105-135.
- Lea, P. J., Wellburn, F. A. M., Wellburn, A. R., Creissen, G. P. & Mullineaux, P. M. (1998). Use of transgenic plants in the assessment of responses to atmospheric pollutants. In *Responses of plant metabolism to air pollution and global change*, eds. L. J. De Kok & I. Stulen, Blackhuys Publishers. Leiden, NL, pp. 241-250.
- León, J., Lawton, M. A. & Raskin, I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol*, **108**, 1673-1678.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**, 583-593.
- Liang, H., Maynard, C. A., Allen, R. D. & Powell, W. A. (2001). Increased *Septoria musiva* resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing a wheat oxalate oxidase gene. *Plant Mol Biol*, **45**, 619-629.
- Lucas, G. B. (1975). *Diseases of tobacco*. Biological Consulting Associates, Raleigh.
- Lyons, T., Ollerenshaw, J. H. & Barnes, J. (1999). Impacts of ozone on *Plantago major*: Apoplastic and symplastic antioxidant status. *New Phytol*, **141**, 253-263.
- Lyons, T., Plöchl, M., Turcsányi, E. & Barnes, J. (1999). Extracellular antioxidants: A protective screen against ozone? In *Environmental pollution and plant response*, eds. S. Agrawal, M. Agrawal & D. T. Krizek, CRC Press / Lewis Publ., Boca Raton, USA, pp. 183-201.
- Manning, W. J. & von Tiedemann, A. (1995). Climate change: Potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases. *Environ Pollut*, **88**, 219-245.
- Marla, S. S., Lee, J. & Groves, J. T. (1997). Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 14243-14248.
- Martin, M. N., Cohen, J. D. & Saftner, R. A. (1995). A new 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-conjugating activity in tomato fruit. *Plant Physiol*, **109**, 917-926.
- Martin, M. N. & Saftner, R. A. (1995). Purification and Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid N-malonyltransferase from tomato fruit. *Plant Physiol*, **108**, 1241-1249.
- Mauch, F., Meehl, J. B. & Staehelin, L. A. (1992). Ethylene-induced chitinase and β-1,3-glucanase accumulate specifically in the lower epidermis and along vascular strands of bean leaves. *Planta*, **186**, 367-375.
- McKenney, D., Brown, K. E. & G, A. D. (1995). Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. *J Bacteriol*, **177**, 6989-6992.
- Membré, N., Berna, A., Neutelings, G., David, A., David, H., Staiger, D., Sáez Vásquez, J., Raynal, M., Delseny, M. & Bernier, F. (1997). cDNA sequence, genomic organization and differential expression of three *Arabidopsis* genes for germin/oxalate oxidase-like proteins. *Plant Mol Biol*, **35**, 459-469.
- Meuwly, P. & Métraux, J.-P. (1993). Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal Biochem*, **214**, 500-505.

- Miller, P. R., Parmeter, J. R., Taylor, O. C. & Cardiff, E. A. (1963). Ozone injury to the foliage of *Pinus ponderosa*. *Phytopathology*, **53**, 1072-1076.
- Mithöfer, A., Daxberger, A., Fromhold-Treu, D. & Ebel, J. (1997). Involvement of an NAD(P)H oxidase in the elicitor-inducible oxidative burst of soybean. *Phytochemistry*, **45**, 1101-1107.
- Mittelstrass, K. (2000). Reaktive Sauerstoffspezies und Ethylen als Verstärkungsfaktoren bei der Wirkung von Ozon auf Wild- und Kulturpflanzen, Ludwig-Maximilians-Universität. München.
- Moeder, W. (1999). Untersuchungen zum Auftreten von Signalsubstanzen im Blatt-Apoplasten von *Nicotiana tabacum* und *Vicia faba* bei oxidativem Streß, Technische Universität. München.
- Moeder, W., Anegg, S., Thomas, G., Langebartels, C. & Sandermann, H. (1999). Signal molecules in ozone activation of stress proteins in plants. In *Plant responses to environmental stress*, eds. M. F. Smallwood, C. M. Calvert & D. J. Bowles, BIOS. Oxford, pp. 43-49.
- Nakajima, N., Matsuyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Aono, M., Kubo, A. & Kondo, N. (2001). Effects of ozone exposure on the gene expression of ethylene biosynthetic enzymes in tomato leaves. *Plant Physiol Biochem*, **39**, 993-998.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessmann, H. & Ryals, J. (1995). Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J*, **8**, 227-233.
- Neutelings, G., Domon, J. M., Membré, N., Bernier, F., Meyer, Y., David, A. & David, H. (1998). Characterization of a germin-like protein gene expressed in somatic and zygotic embryos of pine. *Plant Mol Biol*, **38**, 1179-1190.
- O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J. & Klee, H. J. (2001). Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J*, **25**, 315-323.
- Ogawa, K., Kanematsu, S. & Asada, K. (1996). Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiol*, **37**, 790-799.
- Ohmiya, A., Tanaka, Y., Kadowaki, K. & Hayashi, T. (1998). Cloning of genes encoding auxin-binding proteins (ABP19/20) from peach: Significant peptide sequence similarity with germin-like proteins. *Plant Cell Physiol*, **39**, 492-499.
- Ohtsubo, N., Mitsuhashi, I., Koga, M., Seo, S. & Ohashi, Y. (1999). Ethylene promotes the necrotic lesion formation and *basic PR* gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant Cell Physiol*, **40**, 808-817.
- Olson, P. D. & Varner, J. E. (1993). Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J*, **4**, 887-892.
- Ono, M., Sage-Ono, K., Inoue, M., Kamada, H. & Harada, H. (1996). Transient increase in the level of mRNA for a germin-like protein in leaves of the short-day plant *Pharbitis nil* during the photoperiodic induction of flowering. *Plant Cell Physiol*, **37**, 855-861.
- Orozco-Cardenas, M. & Ryan, C. A. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 6553-6557.
- Örvar, B. L., McPherson, J. & Ellis, B. E. (1997). Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. *Plant J*, **11**, 203-212.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, C., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H. & Kangasjärvi, J. (2000). The ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell*, **12**, 1849-1862.

- Park, J., Choi, H. J., Lee, S., Lee, T., Yang, Z. & Lee, Y. (2000). Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol*, **124**, 725-732.
- Pell, E. J., Schlagnhauser, C. D. & Arteca, R. N. (1997). Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiol Plant*, **100**, 264-273.
- Pellinen, R., Palva, T. & Kangasjärvi, J. (1999). Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J*, **20**, 349-356.
- Peters, J. L., Castillo, F. J. & Heath, R. L. (1989). Alteration of Extracellular Enzymes in Pinto Bean Leaves Upon Exposure to Air Pollutants, Ozone and Sulfur Dioxide. *Plant Physiol*, **89**, 159-164.
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. & Van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1571-1580.
- Raab, M. M. & Weinstein, L. H. (1990). Polyamine and ethylene metabolism in *Triticum aestivum* (var. vona). In *Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interactions*, eds. H. E. Flores, R. N. Arteca & J. C. Shannon, American Society of Plant Physiologists. Rockville, pp. 408-410.
- Rao, M. V. & Davis, K. R. (1999). Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: The role of salicylic acid. *Plant J*, **17**, 603-614.
- Rao, M. V. & Davis, K. R. (2001). The physiology of ozone-induced cell death. *Planta*, **213**, 682-690.
- Rao, M. V., Koch, J. R. & Davis, K. R. (2000). Ozone: A tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Mol Biol*, **44**, 345-358.
- Rao, M. V., Lee, H. I., Creelman, R. A., Mullet, J. E. & Davis, K. R. (2000). Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell*, **12**, 1633-1646.
- Rao, M. V., Paliyath, G., Ormrod, D. P., Murr, D. P. & Watkins, C. B. (1997). Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂ -metabolizing enzymes. *Plant Physiol*, **115**, 137-149.
- Reupold, P. E. (1991). Einfluss von Ozon auf die Diaminoxidase-Aktivität in *Pisum sativum* L.: Extrazelluläre Lokalisation und Korrelation mit dem Polyamingehalt, Ludwig-Maximilians-Universität. München.
- Ribnicky, D. M., Shulaev, V. & Raskin, I. (1998). Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol*, **118**, 565-572.
- Richards, B. L., Middleton, J. T. & Hewitt, W. B. (1958). Air pollution with relation to agronomic crops: V. Oxidant stipple of grape. *Agron J*, **50**, 559-561.
- Romeis, T., Piedras, P. & Jones, J. D. G. (2000). Resistance Gene-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase in the Plant Defense Response. *Plant Cell*, **12**, 803-815.
- Rossetti, S. & Bonatti, P. M. (2001). In situ histochemical monitoring of ozone- and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiol Biochem*, **39**, 433-442.
- Rowland-Bamford, A. J., Borland, A. M., Lea, P. J. & Mansfield, T. A. (1989). The role of arginine decarboxylase in modulating the sensitivity of barley to ozone. *Environ Pollut*, **61**, 95-106.
- Runeckles, V. C. & Vaartnou, M. (1997). EPR evidence for superoxide anion formation in leaves during exposure to low levels of ozone. *Plant Cell Environ*, **20**, 306-314.
- Sagi, M. & Fluhr, R. (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol*, **126**, 1281-1290.

- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuel, M. A., Miles, G. P. & Ellis, B. E. (2000). Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant J*, **22**, 367-376.
- Sandalio, L. M. & Rio, L. A. (1987). Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implications in cellular metabolism. *J. Plant Physiol.*, **127**, 395-409.
- Sandermann, H. (1996). Ozone and plant health. *Annu Rev Phytopathol*, **34**, 347-366.
- Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W. & Langebartels, C. (1998). Ozone: An abiotic elicitor of plant defense reactions. *Trends Plant Sci*, **3**, 47-50.
- Sandermann, H., Wellburn, A. R. & Heath, R. L. (1997). Forest decline and ozone. A comparison of controlled chamber and field experiments. In *Ecol Studies*, Vol. 127, Springer. Berlin.
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol*, **101**, 7-12.
- Scheel, D. (2002). Oxidative Burst and the Role of Reactive Oxygen Species in Plant-Pathogen Interactions. In *Oxidative Stress in Plants*, eds. D. Inzé & M. Van Montagu, Taylor and Francis. London, pp. 137-153.
- Schiene, K., Pühler, A. & Niehaus, K. (2000). Transgenic tobacco plants that express an antisense construct derived from a *Medicago sativa* cDNA encoding a Rac-related small GTP-binding protein fail to develop necrotic lesions upon elicitor infiltration. *Mol Gen Genet*, **263**, 761-770.
- Schmitt, M. R. (1991). Barley Seedling Oxalate Oxidase Purification and Properties. *Plant Physiol*, **96**, 85.
- Schraudner, M., Möder, W., Wiese, C., Van Camp, W., Inzé, D., Langebartels, C. & Sandermann, H. (1998). Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant J*, **16**, 235-245.
- Schweizer, P., Christoffel, A. & Dudler, R. (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *The Plant Journal*, **20**, 541-552.
- Segal, A. w., West, I., Wientjes, F. B., Nugent, H. A., Chavan, A. J., Haley, B., Garcia, R. C., Rosen, H. & Scrace, G. (1992). Cytochrome-b₂₄₅ is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J*, **284**, 781-788.
- Sharma, Y. K. & Davis, K. R. (1997). The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biol Med*, **23**, 480-488.
- Shirasu, K. & Schulze-Lefert, P. (2000). Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol Biol*, **44**, 371-385.
- Stockwell, W. R., Kramm, G., Scheel, H. E., Mohnen, V. A. & Seiler, W. (1997). Ozone formation, destruction and exposure in Europe and the United States. In *Forest decline and ozone. A comparison of controlled chamber and field experiments. Ecol. Studies Vol. 127*, eds. H. Sandermann, A. R. Wellburn & R. L. Heath, Springer. Berlin, pp. 1-38.
- Streller, S. & Wingsle, G. (1994). *Pinus sylvestris* (L.) needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta*, **192**, 195-201.
- Suh, Y., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K. & Lambeth, J. D. (1999). *Nature*, **401**, 79-82.
- Surplus, S. L., Jordan, B. R., Murphy, A. M., Carr, J. P., Thomas, B. & Mackerness, S. A. H. (1998). Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: Role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant Cell Environ*, **21**, 685-694.

- Swart, S., Logman, T. J. J., Smit, G., Lugtenberg, B. J. J. & Kijne, J. W. (1994). Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of Rhizobiaceae. *Plant Mol Biol*, **24**, 171-183.
- Tenhaken, R. & Rübel, C. (1999). Cloning of putative subunits of the soybean plasma membrane NADPH oxidase involved in the oxidative burst by antibody expressing screening. *Protoplasma*, **205**, 21-28.
- Thalmair, M. (1996). Reaktion von Stress-Proteinen auf Ozon und UV-B Strahlung bei Tabak (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 und cv. Bel B), Ludwig-Maximilians-Universität. München.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. & Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J*, **11**, 1187-1194.
- Tingey, D. T., Standley, C. & Field, R. W. (1976). Stress ethylene evolution: A measure of ozone effects on plants. *Atmos Environ*, **10**, 969-974.
- Tipping, A. J. & McPherson, M. J. (1995). Cloning and molecular analysis of the pea seedling copper amine oxidase. *J Biol Chem*, **270**, 16939-16946.
- Ton, J., Davison, S., Van Wees, S. C. M., Van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J. (2001). The *Arabidopsis* ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol*, **125**, 652-661.
- Torres, M., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K. & Jones, J. (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (*gp91phox*). *Plant J*, **14**, 365-370.
- Torres, M. A., Dangl, J. L. & Jones, J. D. G. (2002). *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 523-528.
- Tuomainen, J., Betz, C., Kangasjärvi, J., Ernst, D., Yin, Z. H., Langebartels, C. & Sandermann, H. (1997). Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: Regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *Plant J*, **12**, 1151-1162.
- Tuomainen, J., Pellinen, R., Roy, S., Kiiskinen, M., Eloranta, T., Karjalainen, R. & Kangasjärvi, J. (1996). Ozone affects birch (*Betula pendula* Roth) phenylpropanoid, polyamine and active oxygen detoxifying pathways at biochemical and gene expression level. *J Plant Physiol*, **148**, 179-188.
- Turunen, M., Heller, W., Stich, S., Sandermann, H., Sutinen, M. L. & Norokorpi, Y. (1999). The effects of UV exclusion on the soluble phenolics of young Scots pine seedlings in the subarctic. *Environ Pollut*, **106**, 219-228.
- Vallélian-Bindschedler, L., Möisinger, E., Métraux, J. P. & Schweizer, P. (1998). Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley (*Hordeum vulgare* L.) that is insolubilized in stressed leaves. *Plant Mol Biol*, **37**, 297-308.
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F. & Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, **161**, 405-414.
- Van Camp, W., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1998). H₂O₂ and NO: Redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci*, **3**, 330-334.
- Vanacker, H., Carver, T. L. W. & Foyer, C. H. (1998). Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol*, **117**, 1103-1114.
- Wang, A. M., Doyle, M. V. & Mark, D. F. (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 9717-9721.
- Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C. H., Schmelzer, E., Gregersen, P. L., Collinge, D. B., Smedegaard-Petersen, V. & Thordal-Christensen, T. (1998). An epidermis/papilla-

- specific oxalate oxidase-like protein in the defense response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol*, **36**, 101-112.
- Weigel, H. J. & Jäger, H. J. (1988). Zur Ökotoxikologie von Luftschadstoffen. 2. Aufbau und Funktionsweise einer Expositionsanlage aus open-top Kammern zur Untersuchung von Immissionswirkungen auf Pflanzen. *Landbauforschung Völkenrode*, **38**, 182 - 195.
- Wellburn, F. A. M. & Wellburn, A. R. (1996). Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections. *Plant Cell Environ*, **19**, 754-760.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F. & Durner, J. (2001). Nitric oxide: Comparative signaling and synthesis in animal and plant cells. *Trends Plant Sci*, **6**, 177-183.
- Whitfield, C. P., Davison, A. W. & Ashenden, T. W. (1997). Artificial selection and heritability of ozone resistance in two populations of *Plantago major*. *New Phytol*, **137**, 645-655.
- Wientjes, F. B., Hsuan, J. J., Totty, N. F. & Segal, A. W. (1993). p40^{phox}, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J*, **296**, 557-562.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**, 562-565.
- 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. *EMBO J*, **16**, 4806-4816.
- Willekens, H., Langebartels, C., Tiré, C., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Camp, W. (1994). Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 10450-10454.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, **322**, 681-692.
- Wojtaszek, P., Stobiecki, M. & Bolwell, G. P. (1997). Changes in the composition of exocellular proteins of suspension-cultured *Lupinus albus* cells in response to fungal elicitors or CuCl₂. *J Exp Bot*, **48**, 2015-2021.
- Woo, E.-J., Dunwell, J. M., Goodenough, P. W., Marvier, A. C. & Pickersgill, R. W. (2000). Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nature structural biology*, **7**, 1036-1040.
- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., León, J., Fitzsimmons, K. C., Levine, E. B., Raskin, I. & Shah, D. M. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol*, **115**, 427-435.
- Xing, T., Higgins, V. J. & Blumwald, E. (1997). Race-Specific Elicitors of *Cladosporium fulvum* Promote Translocation of Cytosolic Components of NADPH Oxidase to the Plasma Membrane of Tomato Cells. *Plant Cell*, **9**, 249-259.
- Yalpani, N., Enyedi, A. J., León, J. & Raskin, I. (1994). Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta*, **193**, 372-376.
- Yamahara, T., Shiono, T., Suzuki, T., Tanaka, K., Takio, S., Sato, K., Yamazaki, S. & Satoh, T. (1999). Isolation of a germin-like protein with manganese superoxide dismutase activity from cells of a moss, *barbula unguiculata*. *J Biol Chem*, **274**, 33274-33278.
- Yoshioka, H., Sugie, K., Park, H. J., Maeda, H., Tsuda, N., Kawakita, K. & Doke, N. (2001). Induction of plant gp91^{phox} homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol Plant Microbe Interact*, **14**, 725-736.
- Yu, L., DeLeo, F. R., Biberstine-Kinkade, K. J., Renee, J., Nauseef, W. M. & Dinauer, M. C. (1999). Biosynthesis of flavocytochrome b₅₅₈. gp91^{phox} is synthesized as a 65-kDa precursor (p65) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **274**, 4364-4369.

- Yu, L., Quinn, M. T., Cross, A. R. & Dinauer, M. C. (1998). Gp91^{phox} is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 7993-7998.
- Zhang, Z., Collinge, D. B. & Thordal-Christensen, H. (1995). Germine-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J*, **8**, 139-145.
- Zhou, F., Zhang, Z., Gregersen, P. L., Mikkelsen, J. D., de Neergaard, E., Collinge, D. B. & Thordal-Christensen, H. (1998). Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol*, **117**, 33-41.

VII. Anhang

1. Verwendete Primer

1.1. Primer für Oxalatoxidase/Germin-ähnliche Proteine

Nectarin:

5'-CACGGCGGCAGATTTCTCG-3' Primer Neca
 5'-GGCACAGTTGGTGAAGCCCC-3' Primer Necb
 umfasst ca. 419bp

Primer zur Herstellung der Northern Sonde zu *Te-gf-2.8*

5'-TAGCTGGCCTGTTTCGCAATG-3' Ox0a
 5'-AACCCAGCGGCAAACCTTGA-3' Ox0b

Primer für die Suche der Germin-ähnlichen Proteine in Tabak:

OxO/GLP:

5'-GCN GTN TTA/G/CTN GAC/T TTC/T TGC/T GT-3' Primer 1
 5'-AA NAC CAT A/G/TAT A/GTT NCC-3' Primer 2
 5'-TT NGT NCC NCC T/CAA/NAG NAC NCC-3' Primer 3

Degenerierte Primer nach Tomate (AB012138) und Kartoffel (AF067731):

5'-GAT/C GTN TGT/C GTN GCN GA-3' Primer 1
 5'-CGN ATT/C/A GAT/C TAT/C GCN CC-3' Primer 2a
 5'-GG NGC A/GTA A/GTC A/G/TAT NCG-3' Primer 2b
 5'-GT A/GAA A/GTG NAC T/CAA/NAG NCC-3' Primer 3

Primer nach *Prunus persica*:

ABP20

5'-CAGGCAATCATGATTTTCCCTA-3' Primer 1
 5'-GAGAGAGCTCAATTAATTAGTACCAC-3' Primer 2

ABP19:

5'-ATGATTTTCCCTATCTTCTTCAC-3' Primer 1
 5'-TTAATTAGTGCCACCAAGAACACC-3' Primer 2

1.2. Primer für NADPH-Oxidase

Primer für *Ntrboh D*

5'-CCAGAACGCATTGAAACCAGTG-3' Primer Tom7b
 5'-CGCCACTCGTGCCGAATTTCGGC-3' Primer Tom8a
 (Teilsequenz von *Ntrboh D* erhalten)

Primerkombination für quant. RT-PCR und DIG-Sonde:

5'-TGCAAAGAGGAGGCGAAAGTCCG-3' Primer 15a
 5'-CCAACCCCAAGAGCAATTGCCAC-3' Primer 16b

Primer für 5'- und 3'-Ende

5'-ATGCAAAATTCGGAAAATCATC-3' Primer D5'full

5'-GTGAGATAGTCCGTCTATTCCAACC-3' Primer DMitteb
5'-TCAAAAATTTTCTTTATGGAAATCA-3' Primer D3'full
5'-GGTTGGAATACACGGACTATCTCAC-3' Primer DMittea

Primer für *Ntrboh F*

5'-GACAACATAAACTTTACAAA-3' Primer Tom2a
5'-CCTTTCAATGCGTTCTGGTA-3' Primer Tom3b
(Teilsequenz)

5'-TGTTGCTGCAGCCATTGTCCT-3' Primer 5a
5'-CACTGGTTTCAATGCGTTCTGGA-3' Primer 7b
(verlängerte Teilsequenz)

5'-TGTTGCTGCAGCCATTGTCCT-3' Primer 5a
5'-GATCCTTCTCCCGGGTCACCC-3' Primer 9b
(Teilsequenz von 1073 Basen)

Primer für quant. RT-PCR und DIG-Sonde

5'-GCTACACGATGGTTTAGACGGAGCC-3' Primer 19a
5'-TTGAGTCCAGTCACCAAGTTGCCG-3' Primer 20b

Primer für 5'- und 3'-Ende

5'-ATGAGGGGTTTACCTGGGCATGAAC-3' F5'a
5'-GTCGTCAAAGGGTACAAAATGGCT-3' FMitteb
5'-CTAAAAATGTTCTTTGTGAAACTCG-3' F3'b
5'-AGCCATTTTGTACCCTTTGACGAC-3' FMittea

Primer für artifizielle, interne Standards (quantitative RT-PCR)

5'-GTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATC-3' Primer DM151
5'-CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC-3' Primer DM152

2. Sequenzen

Codierende Sequenz der Isoform *Ntrboh D* mit abgeleiteter Aminosäuresequenz:

```

1  atgcaaaattcggaaaatcatcatccgcaccaccagcaccaccattcggacacagagataattggaatgatagagcgtcgtacagtgg
   M Q N S E N H H P H H Q H H H S D T E I I G N D R A S Y S G
30  cggtaagcggaccgttaacaaaacgagggcgcaaaaagagtgcgagatttaacattcctgaatctaccgacatcggaaccagtgtcgg
   P L S G P L N K R G G K K S A R F N I P E S T D I G T S V G
60  accggcggcaagtccaatgatgatgcgtacgttgaaatcactctcgaatgtccgcgaagattccgctcgtgtccacagtgtcaaaactgcc
   T G G K S N D D A Y V E I T L D V R E D S V A V H S V K T A
90  ggcggtgatgacgtggaagatcccagctggctttatggctaaaggcttagagaagaagtcacttttaggatcttcacttgttcgaaat
   G G D D V E D P E L A L L A K G L E K K S T L G S S L V R N
120 gcttcgtctagaattcggcaagtgtcacaagagctcagggcttggcttccttaataaaacgcccaattcctactggaagggttcgacagg
   A S S R I R Q V S Q E L R R L A S L N K R P I P T G R F D R
150 aataaatcagctgctgctcatgctcttaaaaggtcctcaagtttattagtaagaccgacggcggcgtggtggccgccgtcgagaagcgg
   N K S A A A H A L K G L K F I S K T D G G A G W A A V E K R
180 ttcgatgagattactgcttctactactggtttgcttctcctcgtgcctaaattggagaatgtataggtatgaataaggagtctaaggaattt
   F D E I T A S T T G L L P R A K F G E C I G M N K E S K E F
210 gctgttgagctatatgatgcgctagctcggaggagaacattacaactgattccattaacaaagcacagctcaagagttctgggaccaa
   A V E L Y D A L A R R R N I T T D S I N K A Q L K E F W D Q
240 gtggctgaccaaagttttgattctcgccttcaaacatTTTTtgacatgggtgataaagatgctgatggtagaattacagaagaagaagtc
   V A D Q S F D S R L Q T F F D M V D K D A D G R I T E E E V
270 agagagattataggccttagcgcgtcggccaacagcgtgtcaacaatccagaacaagctgatgaatacgcagcaatgatcatggaagag
   R E I I G L S A S A N R L S T I Q K Q A D E Y A A M I M E E
300 ttggatcctaacaacctcggatacattatgattgagaacttggaaatgcttttactgcaagcaccaaatcaatcagtgcaaaagggaggc
   L D P N N L G Y I M I E N L E M L L L Q A P N Q S V Q R G G
330 gaaagtcggaacttgagtcaaagctcaaaactaaagcatacacaagagagaatccaatagtaagatggtacaagagtttcatg
   E S R N L S Q M L S Q K L K H T Q E R N P I V R W Y K S F M
360 tactttttgctggataattggcaaaagatttgggtattggtactgtggattggaattatggctggctctatttacatggaatatatacag
   Y F L L D N W Q R V W V L L L W I G I M A G L F T W K Y I Q
390 tataaagaaaagctgcataaaagtcattgggtcctgtgtgttttgccaaaggtgctgctgaaacactcaagctcaacatggcaatt
   Y K E K A A Y K V M G P C V C F A K G A A E T L K L N M A I
420 attttatttcgggtttgcagaacacgatcacatggcttcgaaataagaccagattagggtgctgctgttccttttgatgataaccttaat
   I L F P V C R N T I T W L R N K T R L G A A V P F D D N L N
450 tttcacaagtgatagcagtggaattgctcttgggttgggaatacacggactatctcacttgacatgtgattttcctcggcttttaaat
   F H K V I A V A I A L G V G I H G L S H L T C D F P R L L N
480 gctagtgaagaagaatgaaccaatgaagtactatTTTggagatcagccagaaagctattgggtggtttataaaaggagtagaaggggta
   A S E E E Y E P M K Y Y F G D Q P E S Y W W F I K G V E G V
510 actggaattataatgggtggttttaatggcaatagcatttactctagcaaccccatggtttagaaggaatagagttagtttgccaaaacca
   T G I I M V V L M A I A F T L A T P W F R R N R V S L P K P
540 tttcacaactcactggatttaatgccttttggtactctcaccatctcttggttattgtctacactctgttcattgtgcatggtgaaaaag
   F H K L T G F N A F W Y S H H L F V I V Y T L F I V H G E K
570 ctatacattaccaaagattggtacaagagaacgacatggatgtacttaactatcccaatcatactctatgctagtgaagggttgattagg
   L Y I T K D W Y K R T T W M Y L T I P I I L Y A S E R L I R
600 gcattcaggtcaagcattaaagctgtaagatTTTgaaggtggcagtatatccaggaatgtggtggcacttcacatgtcaaaaccacag
   A F R S S I K A V K I L K V A V Y P G N V L A L H M S K P Q
630 ggctacaaaatacaaaagtgggcaatacatgtttgtcaactgtgctgcagtttctcattttgagtggtccattttcaattacttcggcc
   G Y K Y K S G Q Y M F V N C A A V S P F E W H P F S I T S A
660 ccaggagatgactatctcagtggtccatattcgaactcttgggtgattggaccagacaacttaaaactgttttctccgaggtttgcccagca
   P G D D Y L S V H I R T L G D W T R Q L K T V F S E V C Q P

```

ccacctaattgaaaaagtggactcctcagagctgactacttgcaggagagaataatcctaatttcccaagggtgtaatatagatggacca
 690 P P N G K S G L L R A D Y L Q G E N N P N F P R V L I D G P
 tatggagcaccagcacaagactacaagaaatgatgagtggttttggtaggtccttggattggagctacaccaatgatcagttattggt
 720 Y G A P A Q D Y K K Y E V V L L V G L G I G A T P M I S I V
 aaagacattgtcaacaacatgaaggcaatggacgaagaagaaaattccttggaaatggacacaataataatggcaccaaattctagc
 750 K D I V N N M K A M D E E E N S L E D G H N N N M A P N S S
 cccaatattgcaaaaaataagggtataaatcaggttcagcaagtgaggaaataatttcaatacaaggagagcatatttctattgggtt
 780 P N I A K N K G N K S G S A S G G N N F N T R R A Y F Y W V
 actagagaacaagggttcatttgattggttcaagggtataatgaatgaagctgctgaaatggaccataagggagtaattgaaatgcataat
 810 T R E Q G S F D W F K G I M N E A A E M D H K G V I E M H N
 tattgtactagtgtttatgaagaaggatgatgctcgttctgctcttattactatgcttcagttccttcaccatgcaaaaaatggtggtgac
 840 Y C T S V Y E E G D A R S A L I T M L Q S L H H A K N G V D
 attgtctctggcaccagagtttaagtcacattttgctaacctaattggcgtaagtctcaaacgcattgctctcaaccaccctgaggct
 870 I V S G T R V K S H F A K P N W R N V Y K R I A L N H P E A
 aaagttgggtcttctattgtggggcaccagcactgaccaaaagaactaagacaacacgccttggatttttcacacaagacatctaccaag
 900 K V G V F Y C G A P A L T K E L R Q H A L D F S H K T S T K
 tttgatttcataaagaaaatttttga
 930 F D F H K E N F -

Codierende Sequenz der Isoform *Ntrboh F* mit abgeleiteter Aminosäuresequenz:

atgaggggtttacctgggcatgaacgccggtggacatccgatacggatcttccgacaaggattttagtggtgaattatcgccgggagct
 1 M R G L P G H E R R W T S D T V S S D K D F S G E L S P G A
 gattccggctataattccgggtttgcttccgaggagtttggtaggtcacgcttgatcttcaggatgatgataccattattctacggagc
 30 D S G Y N S G F A S E E F V E V T L D L Q D D D T I I L R S
 gttgaaccggctactgtgattaacattgacgctcctgatcttccgcgggagtcggtatttccggagtttcaattgaaactccgacgtca
 60 V E P A T V I N I D A P D L P A G V G I S G V S I E T P T S
 gcatcgggtgcggaatctcgatcgccgacgatccgcccggagttcatctagtaaaacttcgctcagttttcacaggagttgaaagctgaggcg
 90 A S V S E S R S P T I R R S S S S K L R Q F S Q E L K A E A
 gttgcgaaagcaggcagttttcacaagagctgaaggcggagtttaaggagattctcatggagccatgggcatgctctcgcgcttttccg
 120 V A K A R Q F S Q E L K A E L R R F S W S H G H A S R A F S
 ccctcgtcgttttttcaaaacgccgctcgttggaaacaggtaacggcgtggactcggcttttagcggcacgtgcattacgtcggcaacgcg
 150 P S S F F Q N A V V G T G N G V D S A L A A R A L R R Q R A
 cagcttgatcggactcgttccagcgcctatagagctcttctgtagactcaaattcattagcaataacaaaacaaatggatggaatgaagtt
 180 Q L D R T R S S A H R A L R R L K F I S N N K T N G W N E V
 gaaaacaatttctcaagctcgctaagagcgttatctttaccggttccgatttccgacaatgcataggtatgaaggattcgaaggaattt
 210 E N N F S K L A K D G Y L Y R S D F A Q C I G M K D S K E F
 gcattggaattatttgatgctttgagtagaagaagaagattaaagggtgataaaattagcaaggaggaattgtatgagtactggtctcaa
 240 A L E L F D A L S R R R R L K V D K I S K E E L Y E Y W S Q
 atcaccgatcagagtttgcattctcggcttcagatctccttcgacatggtggacaagaatgaagatggtcgaattgctgaagaggaagta
 270 I T D Q S F D S R L Q I S F D M V D K N E D G R I A E E E V
 aaagagatcatcatgctaagtgcattctgcaacaagttatcaagattaaaagaacaagcagaggagatgacagctttaatcatggaagaa
 300 K E I I M L S A S A N K L S R L K E Q A E E Y A A L I M E E
 ttagatcctgaaagactcggctacattgagctatggcagctggaaacacttctcctccaaaaggacacttacctcaactacgtcaagca
 330 L D P E R L G Y I E L W Q L E T L L L Q K D T Y L N Y S Q A
 ctaagttacacgagccaagccttgagccaaaaccttcacggattaaggaagaaaagcccaataaaaaagaatgagcacaaaacttgtctat
 360 L S Y T S Q A L S Q N L H G L R K K S P I K R M S T K L V Y
 tcattgcaagaaaactggaagagaatttgggttctcactttatggattttgataatgattgggtttttcttggagttctatcagtac
 390 S L Q E N W K R I W V L T L W I L I M I G L F L W K F Y Q Y

420 aaaaacaagagtgcatccgtgtcatgggttattgccttgtcacggctaagggcgctgctgagactctcaagttcaacatggctcttata
 K N K S A F R V M G Y C L V T A K G A A E T L K F N M A L I
 450 ttattgccagtatgcagaaacactattacatggctcaggtccaccaagttgagccatthttgtaccctttgacgacaacatcaactttcac
 L L P V C R N T I T W L R S T K L S H F V P F D D N I N F H
 480 aagactgtcgtgcagccattgtcactgggtatcatactccatgctggtaaccatcttgtatgtgatttcccaaggcttatacatgcagat
 K T V A A A I V T G I I L H A G N H L V C D F P R L I H A D
 510 gatcaagattatcaaagttttttgtcgaatgattttggccaaagtaagcctggatacatagacctgttaaaggagttgaggggtgacg
 D Q D Y Q S F L S N D F G Q S K P G Y I D L V K G V E G V T
 540 ggaataataatggtaaccccttattggccattgctttcactcttgcctacacgatggtttagacggagcctcattaagttgccaaaccccttt
 G I I M V I L M A I A F T L A T R W F R R S L I K L P K P F
 570 gatagactcactggcttcaatgcattctgggtattcacaccaccttcttgcattgtctacatcctactgatcatccatggcagcttctctc
 D R L T G F N A F W Y S H H L L V I V Y I L L I I H G T F L
 600 ttccttgtgcataaatggctactccaagacgacgtggatgtagctagcagttcctgtgcttctctacgaggggaaagaactcttagattc
 F L V H K W Y S K T T W M Y L A V P V L L Y A G E R T L R F
 630 ttcgggtcaggcttgtacactgtccggcttctgaaagtagcaatatacctggaaatgctcctcactctacaaatgtctaagcctcctcaa
 F R S G L Y T V R L L K V A I Y P G N V L T L Q M S K P P Q
 660 tttcgatacaaaaagtggaacaatatagtttgtccagtgctcagctgtttctccattcgagtgccatccattttccattacttcagctcct
 F R Y K S G Q Y M F V Q C P A V S P F E W H P F S I T S A P
 690 ggggatgactacttggcattcacatccggcaacttgggtgactggactcaagaactcaagcgggtcttttctgaggcttgcgagcggcca
 G D D Y L S I H I R Q L G D W T Q E L K R V F S E A C E R P
 720 gaggctgaaagagtgccctgctcagagctgacgaaaacactaagaaaagtttgccaaagctattaatagatggaccttacggagctcca
 E A G K S G L L R A D E N T K K S L P K L L I D G P Y G A P
 750 gcacaagattaccgaaaatgatgtcttgcctgcttgggtcttggcattggagcaacgccgttcataagatcctgaaagacttgcctc
 A Q D Y R K Y D V L L L V G L G I G A T P F I S I L K D L L
 780 gttaacatcgtgaaaatggaggagcaagcagatthtagcctcagatthcagtggaactcagacatgagcgttgcgacaagtgaacaacca
 V N I V K M E E Q A D L A S D F S G N S D M S V A T S E Q P
 810 gctctcaacaagatttctctgaaaaggagaaagagcactctaagaaccacaaatgcatatthtttattgggtgacccgggagcaaggatca
 A L N K I S L K R R K S T L R T T N A Y F Y W V T R E Q G S
 840 tttgattgggtcaaaggcgttatgaacgaagtggtgaacttgatcaaggggggtcatcgagatgcataactacttgacgagtgthttat
 F D W F K G V M N E V A E L D Q R G V I E M H N Y L T S V Y
 870 gaggaaggggatgctcgttcagctctcattaccatgggtccaggcacttaaccatgctaagaatgggggtgatattgtatcaggcaccagg
 E E G D A R S A L I T M V Q A L N H A K N G V D I V S G T R
 900 gtgaggacacatthttgctagccaaatgggaagaaagtatthttccaagaccttaaccaagcatgcaaatgcaagaataggggtthttctac
 V R T H F A R P N W K K V F S K T L T K H A N A R I G V F Y
 930 tgtggtgcaccctgatttagcaaaagaactcagcaaaactctgcaaaagagtataatcaaaagggtgcaacaaagttcgagthttcacaagaa
 C G A P V L A K E L S K L C K E Y N Q K G A T K F E F H K E
 960 cattthttag
 H F -

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Sandermann danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und das Interesse an meiner Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. Christian Langebartels bedanke ich mich herzlich für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung während der gesamten Zeit.

Kirstin Mittelstraß danke ich für die gute Zusammenarbeit während ihrer Diplomarbeit und für das gemeinsame Erarbeiten schöner Ergebnisse. In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei Prof. Dr. H.-J. Weigel, Dr. J. Bender und Carina Trenkler (FAL Braunschweig) für die Kooperation bei der Untersuchung der Ozon-exponierten Wildpflanzen in Open-top Kammern bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an meine Kollegen Dr. Gerd Vogg, Florian Kaffarnik, Regina Schuegger und Sabine Kscheschan für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag.

Bei Matthias Affenzeller, Evi Kiefer, Tobias Sahr und Sigrun Wegener möchte ich mich für die Einführung in die Molekularbiologie, sowie das geduldige Beantworten sämtlicher molekularbiologischer Fragen bedanken.

Herzlich danken möchte ich Dr. Jogi Schnitzler, Fraunhofer-Institut für Atmosphärische Umweltforschung Garmisch-Partenkirchen, und Dr. P. Hutzler, Institut für Pathologie, GSF, für die engagierte und interessierte Unterstützung bei der Laser Scanning Mikroskopie.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. J. Dunwell und Dr. Sawsan Khuri, Reading, für die nette Gastfreundschaft und die Hilfe bei der Bestimmung von Oxalatoxidase-Aktivität.

Vielen Dank auch an Prof. F. Bernier, Strasbourg, für das Bereitstellen der transgenen Tabakpflanzen.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Kreitmeyer und Bärbel Groß für die sorgfältige Aufzucht und Betreuung der Versuchspflanzen sowie für die „kleinen“ Hilfeleistungen im Labor.

Dr. Günther Bahnweg, Dr. Sebastian Grün, Gudrun Fricke-Bode, Elke Mattes, Susanne Stich, Rosina Ludwig, Wolfgang Mayr, Lucia Gössl, Claudia Knappe und besonders Judith Mayr sei gedankt für Ratschläge und die Hilfe bei verschiedenen Methoden.

Insgesamt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemische Pflanzenpathologie für die sehr gute Arbeitsatmosphäre recht herzlich bedanken. Außerdem geht ein Dankeschön an die Techniker von EPOKA, besonders an P. Bader.

Bei Frank-Wolfgang und meinen Eltern bedanke ich mich sehr für die Geduld und Unterstützung während der letzten drei Jahre.

Lebensauf:

Persönliche Daten:

Heike Wohlgemuth
Geboren am 14.01.1972 in Pforzheim

Schulbildung:

1978 – 1982 Grundschule Neuenbürg
1982 - 1991 Mathematisch - naturwissenschaftliches Gymnasium
Neuenbürg; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

02 - 07/1992 Praxissemester für das Studium der Außenwirtschaft
(FH) in Pforzheim bei der Firma Biosthetique.
1992 - 1998 Studium der Biologie an der Universität Heidelberg.
06/1997 - 02/1998 Diplomarbeit am Botanischen Institut der Universität
Heidelberg;
Thema: Der Einfluss des durch *Agrobacterium*
tumefaciens induzierten Tumors auf den
Kohlenhydrathaushalt in *Ricinus communis* L.
02/1998 Abschluß: Diplom

Wissenschaftliche Tätigkeit:

03 - 06/1998 Kooperation zwischen der Universität Würzburg und
dem Botanischen Institut in Heidelberg: Etablierung von
Methoden zur Untersuchung der Leitbündel-Anatomie im
Knotenbereich von *Ricinus communis*.

Promotion:

seit 11/1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Biochemische Pflanzenpathologie der GSF, Neuherberg.
07/1999 Gastaufenthalt an der University of Reading, School of
Plant Sciences, England (Prof. J. Dunwell).